

С.А. ЭГАМБЕРДИЕВА

МОЛЕКУЛЯР БИОТЕХНОЛОГИЯ



*Дарслик олий ўқув юртлари учун Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта
маҳсус таълим вазирлиги томонидан тасдиқланган*

Тошкент 2021

УО'К: 619:61.98:579.873.21

КВК 40.711(Узб)

С.А. Эгамбердиева “Молекуляр биотехнология” дарслик

– Тошкент, «Fan ziyosi» нашриёти, 2021 – 214 бет.

Дарсликда ген муҳандислигининг асослари: репликация, транскрипция ва трансляция механизмлари; клонлаш, ДНК амплификацияси ва секвенирлаш усуллари; рекомбинант ДНК конструкциясини ишлаш; нишон-кетма-кетликларни микроорганизмлар, ўсимликлар ва ҳайвонлар геномига киритиш, шунингдек, ген муҳандислигидан инсон учун зарур моддаларни олиш амалиётида фойдаланиш баён этилган. Хужайра муҳандислигининг тамойиллари ва ютуқлари умумлаштирилган. Ген муҳандислигининг ахлоқий-этик муаммоларига, биотехнология маҳсулотлари ва уларни олиш усуллари патентлашга катта эътибор қаратилган. Университетлар, қишлоқ хўжалиги институтлари ва биотехнология бўйича мутахассислар учун мўлжалланган. Дарслик ПСУЕАИТИ ёрдами билан нашр этилган.

Такризчилар:

Зупаров М.А. - Тошкент давлат аграр университети
Агробиотехнология кафедраси доценти, биология
фанлари номзоди

Даминова Д.М. - Пахта селекцияси, уруғчилиги ва етиштириш
агротехнологиялари илмий-тадқиқот институти
Ўсимликлар биохимия ва физиология
лабораторияси катта илмий ходими, биология
фанлари номзоди

ISBN 978-9943-708-90-7

© С.А. Эгамбердиева
© «Fan ziyosi» нашриёти, 2021

§ 1. Молекуляр биотехнологияга кириш

- 1. Молекуляр биотехнологиянинг пайдо бўлиши.*
- 2. Молекуляр биотехнологиянинг бошқа фанлар билан боғлиқлиги.*
- 3. Молекуляр биотехнологиянинг ривожланиш тарихи.*
- 4. Фан истиқболлари ва хавфлиликни баҳолаш*

Рекомбинатли ДНК технологияси тарихи генетик маълумотни бир организмдан иккинчисига ўтказиш усулини ишлаб чиққан америкалик олимлар Стэнли Коэн ва Герберт Бойер ишларига (1973й.) бориб тақалади. Тадқиқотчиларга аниқ бўлдики, рекомбинация қилинган ДНК технологияси жуда катта имкониятларни тақдим этади.

Бироқ, рекомбинатли ДНК ишлаб чиқариш бўйича олиб борилган дастлабки муваффақиятли тажрибалардан кейин кўп ўтмай, бир гуруҳ олимлар, жумладан, Берг, Коэн ва Бойерлар ген муҳандислиги бўйича тажрибаларни ўтказишни чеклашни таклиф қилдилар. Ушбу эҳтиёткорлик бегона генетик ахборотни ўзида жамлаган организмлар хусусиятлари ҳақида олдиндан бирор нарса дейиш қийинлигига асосланган эди. Улар ноҳуш ёки хавфли белгиларга эга бўлишлари, экологик мувозанатни бузишлари, инсонлар, ҳайвонлар ва ўсимликларнинг ғайриоддий касалликлари ривожланиши ва тарқалишига олиб келишлари мумкин. Бундан ташқари, тирик организмларнинг генетик аппаратида инсоннинг аралашуви ахлоқ қоидаларига тўғри келмайди ва ижтимоий ва этика жиҳатидан ноҳуш оқибатларга олиб келиши мумкин. 1975 йилда мазкур муаммолар Асиломареда (АҚШ) ўтказилган халқаро анжуманда муҳокама қилинган. Унинг иштирокчилари бажарилиши шарт бўлган муайян қоидалар ва риоя қилган ҳолда ген муҳандислиги усулларида фойдаланишни давом эттириш зарур деган хулосага келдилар. Кейинчалик кўпчилик мамлакатларда ўрнатилган мазкур қоидалар анчагина юмшатилади ва микробиологик тадқиқотлардаги одатий усулларни қўллаш, атроф-муҳитда биологик агентларнинг тарқалишига тўсқинлик қиладиган махсус ҳимоя мосламаларини яратиш, табиий шароитларда кўпайиш хусусиятига эга бўлмаган хавфсиз векторлар ва реципиент хужайраларидан фойдаланишга олиб келди.

Рекомбинатли ДНК билан боғлиқ баъзи бир илмий тадқиқотларнинг вақтинча тўхтатилиши ген муҳандисларининг иштиёқини камайтирмади. Янги технология жамоатчилик томонидан ва шу каби олимлар томонидан ҳам мислсиз диққат эътиборни жалб этиб келмоқда.

Коэн ва Бойер томонидан амалга оширилган генларни клонлаш ҳақидаги хабар бутун дунёга тарқалди. Кўпгина тадқиқотчилар дарҳол ушбу стратегиянинг барча афзалликларини баҳоладилар ва генларни юқори самарадорлик ва нисбатан оддий усулда идентификациялаш, ажратиш, тавсифлаш ҳамда фойдаланиш имконини берадиган кўплаб усулларни яратдилар. Ушбу технологик ишланмалар деярли барча биологик фанлар, жумладан, ҳайвонлар ҳуқ-атвори ҳақидаги фан, ривожланиш биологияси, молекуляр эволюция, ҳужайра биологияси ва инсон генетикаси фанлари ривожланишига улкан ҳисса қўшдилар, лекин буюк ўзгаришлар айнан биотехнология соҳасида юз берди.

XX аср охирида жаҳон илм-фани ва иқтисодиётининг устувор йўналишларидан бири бўлган биотехнология фан сифатида замонавий биологиянинг муҳим қисми ҳисобланади. "Биотехнология" атамаси 1917 йилда венгриялик муҳандис Карл Эреки томонидан озуқа сифатида қанд лавлагидан фойдаланиб катта кўламда чўчка етиштириш жараёнини тасвирлаш учун ўйлаб топилган. Эреки таърифига кўра, биотехнология – бу “хом ашёлардан у ёки бу маҳсулотларни тирик организмлар ёрдамида ишлаб чиқариладиган барча иш турлари”. Бироқ бу мутлақо аниқ таъриф кенг оммалашмади.

Кенг маънода биотехнология микроорганизмлар томонидан уларнинг ҳаёт фаолияти натижасида ҳосил бўладиган тижорат маҳсулотларини ишлаб чиқариш билан шуғулланади. Янада расмий равишда биотехнологияни “маҳсулотлар ва хизматларни яратиш мақсадида тирик организмлар томонидан материалларни қайта ишлашда илмий ва муҳандислик тамойилларини қўллаш” деб таъриф бериш мумкин. Тарихий маънода биотехнология биринчи марта хамиртурушдан вино ишлаб чиқаришда, бактериялардан эса – қатик ишлаб чиқаришда фойдаланилганида пайдо бўлди.

Рекомбинат ДНК технологияси ривожланиши билан биотехнология табиати узил-кесил ва батамом ўзгарди.

Биотрансформация босқичини янада тўғри йўл билан оптималлаштириш, юқори ҳосил берувчи штаммларни шунчаки танлаб олиш эмас, яратиш, микроорганизмлар ва эукариотик ҳужайралардан инсулин, интерферон, ўсиш гормони, вирусли антигенлар ва кўпгина бошқа оксиллар ишлаб чиқариш учун “биологик фабрикалар” сифатида фойдаланиш имкони пайдо бўлди. Рекомбинатли ДНК технологияси муҳим паст молекулали моддалар ва табиий шароитда жуда кам миқдорда синтезланадиган макромолекулаларни катта миқдорда олиш имконини беради. Ўсимликлар ва ҳайвонлар ҳеч қачон мутагенез ҳамда селекция ёки чатиштириш усуллари билан яратиш мумкин бўлмаган янги ёки ўзгарган генли маҳсулотлар ишлаб чиқарадиган табиий биореактор бўлиб қолдилар. Ва ниҳоят, бу янги технология турли касалликларни ташхислаш ва даволашнинг мутлақо янги усуллари ривожлантириш имконини беради.

Рекомбинатли ДНК технологияси ва биотехнология бирлашмасида тадқиқотларнинг динамик ва юқори рақобатбардош янги соҳаси – **молекуляр биотехнология** вужудга келди. Молекуляр биотехнология фан сифатида қирқинчи йилларнинг бошида юзага келди ва 1953 йилдан бошлаб Джеймс Уотсон ва Френсис Крикларнинг ДНК қўш спиралининг кимёвий тузилиши ҳамда фазовий тузилиши ҳақидаги кашфиётларидан кейин жадал ривожлана бошлади. Янги илмий фанлар жуда кам ҳолатларда “бўш жойда” ривожланади; одатда фаннинг турли соҳалари уларнинг пойдевори бўлиб хизмат қилади. Молекуляр биотехнологияга келсак, унинг биотехнологик таркиби саноат микробиологияси ва кимёвий муҳандислик соҳасига, молекуляр таркиби эса – молекуляр биология, бактерияларнинг молекуляр генетикаси ва нуклеин кислоталарнинг энзимологияси соҳаларига мансуб (Жадвал 1.1).

Молекуляр биотехнологиянинг ривожланиш тарихи

Сана	Воқеалар
1917	Карл Эреки “биотехнология” атамасини киритди
1943	Пенициллин саноат кўламида ишлаб чиқарилди
1944	Эвери. МакЛеод ва МакКарти генетик материал ДНК эканлигини кўрсатдилар
1953	Уотсон ва Крик ДНК молекуласи тузилишини аниқладилар
1961	“Biotechnology and Bioengineering” журнали таъсис этилди
1961-1966	Генетик код дешифрланди
1970	Дастлабки рестрикция эндонуклеазаси ажратилди
1972	Корана ва бошқ. тўлиқ бўйли тРНК генини синтез қилдилар
1973	Бойер ва Коэн рекомбинант ДНК технологияси бошланишини белгилаб бердилар
1975	Колер ва Мильштейн моноклонал антитаналар ишлаб чиқарилишини таърифладилар
1976	Рекомбинант ДНК билан ишлашни тартибга солувчи дастлабки қўлланмалар чоп этилди
1976	ДНК нкулеотид кетма-кетлигини аниқлаш усуллари ишлаб чиқилди
1978	Genentech фирмаси <i>E.coli</i> ёрдамида олинган инсон инсулинини ишлаб чиқарди
1980	АҚШ Олий суди <i>Чакрабартига қарши Даймонд</i> ишини тинглаб, генетик муҳандислик усуллари билан олинган микроорганизмларга патент олиш мумкинлиги ҳақида қарор чиқарди
1981	Дастлабки автоматик ДНК синтезаторлари сотувга чиқарилди
1981	АҚШда моноклонал антитаналарнинг биринчи диагностика тўплами фойдаланиш учун рухсат этилган

- 1982 Европада рекомбинант ДНК технологияси бўйича олинган биринчи вакцинадан ҳайвонларни эмлаш учун фойдаланишга рухсат берилди
- 1983 Ўсимликлар трансформацияси учун гибрид Ti-плазмидлар қўлланилди
- 1988 АҚШда ўсмалар учраш даражаси юқори бўлган сичқонларнинг ген муҳандислиги усуллари билан олинган тизмасига патент берилди
- 1988 Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули яратилди
- 1990 АҚШда инсон соматик ҳужайралари ёрдамида генетик терапияни синаш режалари тасдиқланди
- 1990 “Инсон геноми” лойиҳаси бўйича расмий равишда ишлар бошланди
- 1994-1995 Инсон хромосомаларининг батафсил генетик ва физик хариталари чоп этилди
- 1996 Биринчи рекомбинат оксилининг (эритропоэтин) йиллик сотув ҳажми 1 миллиард доллардан ошди
- 1996 Эукариотик микроорганизм (*Saccharomyces cerevisiae*) барча хромосомаларининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланди
- 1997 Дифференциациялашган соматик ҳужайрадан сут эмизувчи клонланди
- 2003 Инсон геноми кетма-кетлигини дешифрлаш ишлари якунланди

Кенг маънода молекуляр биотехнология фаннинг турли соҳаларида эришилган ютуқлардан фойдаланади ва уларни турли хил тижорат маҳсулотларини ишлаб чиқаришда қўллайди (расм 1.2).



Расм. 1.2. Молекуляр биотехнология фаннинг турли соҳаларида эришилган ютуқлардан фойдаланади ва тижорат маҳсулотлари ҳамда усуллариининг кенг ассортименти яратиш имконини беради (Глик ва Пастернак бўйича)

Фан истиқболлари ва хавфлиликни баҳолаш

Инсоният улкан истиқболларни молекуляр биотехнология билан боғлайди:

- кўпгина юқумли ва генетик касалликларни аниқ ташхислаш, профилактика қилиш ва даволаш имкониятлари
- зараркунандалар, замбуруғли ва вирусли инфекцияга ҳамда атроф муҳит таъсирига чидамли ўсимликларни яратиш йўли билан қишлоқ хўжалиги экинлари ҳосилдорлигини сезиларли даражада ошириш
- турли хил кимёвий бирикмалар, антибиотиклар, полимерлар, аминокислоталар, ферментлар ишлаб чиқарадиган микроорганизмларни яратиш
- қишлоқ хўжалиги ва бошқа ҳайвонларнинг ирсий белгилари яхшиланган зотларини яратиш
- атроф муҳитни ифлослантирадиган чиқиндиларни қайта ишлаш.

Бизни кутиб турган афзалликларни муҳокама қилиш осон ва ёқимли, лекин айни вақтда молекуляр биологиянинг шу қадар

жадаллик билан ривожланаётганлиги оқибатлари ҳақида унутиш мумкин эмас. Ушбу янги йўналиш ўз тўрини шунчалик кенг ёйдики, жамоатчилик ўзининг саволларига жавоб олишга ҳақлидир:

- ген муҳандислиги усуллари билан олинган организмлар бошқа тирик организмларга ёки атроф муҳитга зарарли таъсир кўрсатмайдими?

- генетик жиҳатдан ўзгартирилган организмларни яратиш ва тарқатиш табиий генетик хилма-хилликнинг камайишига олиб келмайдими?

- инсоннинг генетик хусусиятини ўзгартириш учун генетик муҳандислик усулларида фойдаланишга ҳаққимиз борми?

- Янги диагностик усуллари қўллаши инсон ҳуқуқларини бузмайдими?

- генетик муҳандислик усуллари билан яратилган ҳайвонларни патентлаш мумкинми?

- Молекуляр биотехнологиянинг фаол молиялаштирилиши бошқа муҳим технологияларни ривожланишини тўхтатиб қўймайдими?

- Даромадни максимал даражада ошириш истаги молекуляр биотехнология афзалликларидан фақатгина бадавлат кишилар фойдаланишига олиб келмайдими?

- Молекуляр биотехнология анъанавий қишлоқ хўжалигига зарар келтирмайдими?

- даволашда молекуляр биотехнология ютуқларига асосланган ёндашувлар анъанавий самарали даволаш усуллари сиқиб чиқармайдими?

- устуворликлар учун курашиш олимлар ўртасида эркин фикр алмашишга тўсқинлик қилмайдими?

Бу ва кўплаб бошқа масалалар ҳукумат комиссиялари томонидан кўриб чиқилмоқда ҳамда олимлар анжуманларда ва илмий нашрларда фаол муҳокама қилмоқдалар, оммабоп нашрларнинг муаллифлари чуқур фикр юритмоқдалар. Ушбу кенг қамровли асосда тегишли қоидалар ва йўриқномалар шакллантирилди, қўлланмалар тузилди ва сиёсий қарорлар ишлаб чиқилди. Бунда олимлар ҳам, жамоатчилик ҳам иштирок этди, лекин баъзи бир зиддиятлар ҳозирда ҳам мавжуд.

Рекорд қисқа вақт ичида молекуляр биотехнология тенг даражадаги тижорат ва академик кўп тармоқли илмий корхонага айланди. Кўп сонли илмий ва иш билан боғлиқ нашрлар унга бағишланди, бутун дунёнинг университетларида талабалар ва аспирантларга молекуляр биотехнология бўйича ўқув курслари ўқилди. АҚШ янги технологияларни баҳолаш бўлимнинг 1987 йил ҳисоботини ёзиш учун бўлган иштиёқни қуйидаги баёнот тасдиқлайди: «Молекуляр биотехнология ҳаёт ва келажакни... одамларни икки аср илгари Саноат инқилоби ва бугунги кунда компьютер инқилоби каби радикал ўзгартириши мумкин бўлган фандаги яна бир инқилобни кўрсатиб берди. Генетика материалларини мақсадга мувофиқ равишда ишлатиш имконияти ... бизнинг ҳаётимизда катта ўзгаришларни ваъда қилади».

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Коэн, Бойер ва бошқаларнинг 1973 йилда эълон қилинган ишларининг инқилобийлиги нимадан иборат?
2. Карл Эрекининг биотехнологияга қандай алоқаси бор?
3. Биотехнология ва молекуляр биотехнологияни таққосланг.
4. Қандай хавф-хатарлар молекуляр биотехнология ривожланиши билан боғлиқ?
5. «Молекуляр биотехнология кўп тармоқли фан ҳисобланади» деган фикрнинг маъносини очиб беринг.
6. Молекуляр биотехнология тақдим этиши мумкин бўлган баъзи имкониятларни айтиб беринг.
7. Охирги 30 йил давомида биотехнологик саноат ривожланиши тарихини тавсифлаб беринг.
8. Кутубхона ёки интернетдан топишингиз мумкин бўлган “Nature Biotechnology” журналининг бир нечта сонидан “Янгиликлар” бўлимини ўқиб чиқинг (<http://biotech.nature.com>), бир жуфт маълумотни батафсил кўриб чиқинг.

§ 2. Молекуляр биотехнологияда фойдаланиладиган биологик тизимлар

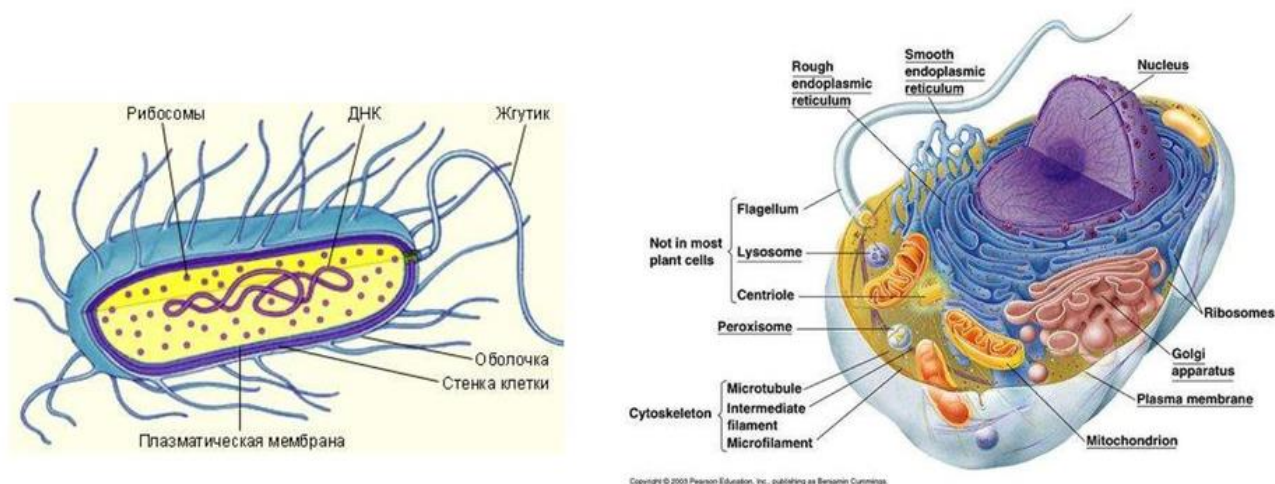
1. *Молекуляр биотехнология объектлари*
2. *Прокариотлар ва эукариотлар*
3. **Esherichia coli**
4. **Saccharomyces cerevisiae**
5. *Эукариотик ҳужайралари культуралари*

Молекуляр биотехнологиянинг объектлари турли хил биологик тизимлардир: микроорганизмлар, ҳашаротлар, ўсимликлар ва сут эмизувчилар, кўп ҳужайрали организмларнинг (ўсимликлар, сичқонлар, уй ҳайвонлари ва бошқалар) ҳужайравий тизмалари – тизимни танлаш тажриба мақсадлари билан боғлиқ. Биологик тизим хусусиятлари биотехнологик жараён учун ниҳоятда муҳим. Кўпчилик ҳолларда айнан гени ўзгартирилган ўз-ўзидан ишлаб чиқариладиган биологик бирлик – микроорганизм, вирус, ўсимлик ёки ҳайвон – охирги тижорат маҳсулоти ҳисобланади. Молекуляр биотехнологияда фойдаланиладиган кўпчилик биологик объектлар ўртасида энг аҳамиятлиси *Esherichia coli* бактерияси, *Saccharomyces cerevisiae* хамиртуруши ва ҳашаротлар, ўсимликлар ва сут эмизувчиларнинг ҳужайравий культуралари ҳисобланади. Уларнинг барчаси клонланган генлар томонидан кодланган оқсилларни ишлаб чиқаришда муҳим рол ўйнайди.

Прокариотлар ва эукариотлар

Барча тирик организмлар икки асосий гуруҳга бўлинади: прокариотлар ва эукариотлар. Ушбу тасниф асосини кўплаб структуравий фарқлар ташкил этади. Улардан айримларини кўрсатиб ўтамиз: 1. хромосомали ДНКни ўз ичида сақлаган ядро мавжудлиги ёки йўқлиги; 2) ҳужайра деворининг тузилиши ва кимёвий таркиби ҳамда 3) субҳужайравий цитоплазматик органеллаларнинг мавжудлиги ёки йўқлиги. Прокариотик, масалан бактериал ҳужайраларда хромосомали ДНК бевосита цитоплазмада жойлашган бўлиб, ҳужайра таркибида кўпинча хитин ёки целлюлоза эмас пептидогликан бўлган ригид ҳужайра девори билан ўралган, ҳужайрада субҳужайравий цитоплазматик органеллалар мавжуд эмас. Эукариотик ҳужайрада цитоплазмадан ядровий мембрана билан

ажратилган ядро мавжуд; хромосомал ДНК ядрога жойлашган; агар мавжуд бўлса, ҳужайра деворида хитин ёки целлюлоза бўлиши мумкин, лекин пептидогликан эмас; цитоплазмада субҳужайравий органеллалар мавжуд (митохондриялар, Голджи аппарати, ўсимлик ҳужайраларида хлоропластлар) (расм 2.1).



Расм 2.1. Прокариотик бактериал ҳужайра (чапда) ва эукариотик ҳайвон ҳужайрасининг (ўнгда) схематик тасвири
<https://www.google.com/url?sa>

Esherichia coli

Esherichia coli бактерияси — энг яхши ўрганилган организмлардан биридир. Охирги эллик йил давомида унинг генетикаси, молекуляр биологияси, биокимё, физиология ва умумий биологияси ҳақида тўлиқ маълумот олишга муваффақ бўлинди. Бу узунлиги 1 мкм дан кам бўлган грамманфий таёқча. Унинг яшаш жойи инсон ичаги ҳисобланади, лекин тупроқдан ва сувдан ҳам ўстирилиши мумкин. Таркибида фақатгина Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} ва SO_4^{2-} ионлари, микроэлементлар ва углерод манбаи (масалан глюкоза) бўлган муҳитда оддий бўлиниш йўли билан кўпайиш хусусиятига эга бўлганлиги туфайли, *E.coli* илмий тадқиқотларнинг одатий объектига айланди. Таркибида аминокислоталар, витаминлар, тузлар, микроэлементлар ва углерод манбаи бўлган тўйинтирилган суюқ озуқа муҳитида ўстирилганда *E.coli* ўсишнинг логарифмик фазасида 37°C ҳароратда генерация вақти (яъни бактериянинг ҳосил бўлиши ва бўлиниши орасидаги вақт) тахминан 22 дақиқани ташкил қилади.

Ҳар бир тирик мавжудот учун унинг ўсиши ва кўпайиши учун оптимал бўлган маълум ҳарорат интервали мавжуд. Ҳарорат жуда юқори бўлганда ҳужайранинг ҳалок бўлишига олиб келадиган оксиллар денатурацияланиши ва бошқа муҳим ҳужайра компонентларининг бўлиниши содир бўлади. Паст ҳароратда оксил молекулаларидаги структуравий ўзгаришлар туфайли биологик жараёнлар сезиларли даражада секинлашади ёки бутунлай тўхтайди. У ёки бу микроорганизмларнинг ҳарорат режимидан келиб чиқиб, уларни термофиллар (45 дан 90⁰С гача ва ундан юқори), мезофиллар (10 дан 47⁰С гача) ва психрофилларга (психрофит) (-5 дан 35⁰С гача) ажратиш мумкин. Фақатгина маълум ҳароратлар диапазонида фаол кўпаядиган микроорганизмлар турли хил биологик муаммоларни ҳал қилишда фойдали бўлиши мумкин. Масалан, термофиллар кўпинча саноат ва лаборатория жараёнларида фойдаланиладиган термостабил ферментларни кодловчи генлар манбаи бўлиб хизмат қилади, гени ўзгартирилган психротрофлардан эса тупроқ ва сувда мавжуд бўлган токсик чиқиндиларнинг паст ҳароратда биодеградациясида фойдаланилади.

E.coli аэроб (кислород иштирокида) каби, анаэроб (кислородсиз) шароитларда ҳам ўстирилиши мумкин. Шу билан бирга, рекомбинат оксилларни оптимал ишлаб чиқариш учун *E.coli* ва бошқа микроорганизмлар аэроб шароитда етиштирилади. Агар бактерияларни лабораторияда етиштиришдан мақсад маълум бир оксилни синтезлаш ва ажратиш бўладиган бўлса, у ҳолда культуралар колбаларда суюқ озуқа муҳитларида ўстирилади. Керакли ҳароратни ушлаб туриш ва ўстириш муҳитида етарлича аэрацияни таъминлаш учун колбалар сув ҳаммомига ёки термостатик хонага жойлаштирилади ва тинимсиз силкитиб турилади. Бундай аэрация ҳужайралар кўпайиши учун етарли, лекин оксил синтези учун – ҳар доим ҳам етарли эмас. Ҳужайравий массанинг ўсиши ва оксил ишлаб чиқарилиши озуқа муҳитида углерод ёки азот миқдори билан чегараланмайди, балки эриган кислород миқдори билан чегараланади: 20⁰С да тўққиз миллион улушга тенг, саноатда микроорганизмлар ёрдамида рекомбинант оксил олишда айниқса муҳим бўлиб қолади. Оксилларни максимал ишлаб чиқариш учун мақбул шароитни таъминлаш учун махсус ферментлар ишлаб чиқарилади ва аэрация тизими барпо этилади.

Молекуляр биотехнологияда *E.coli* дан ташқари кўпгина бошқа микроорганизмлардан ҳам фойдаланилади. Уларни икки гуруҳга ажратиш мумкин: махсус генлар манбаи бўлган микроорганизмлар ва муайян муаммоларни ҳал қилиш учун ген муҳандислиги усуллари билан яратилган микроорганизмлар. Махсус генларга масалан, кенг қўлланиладиган полимераза занжирли реакцияда фойдаланиладиган (ПЗР) термостабил ДНК-полимеразани кодлайдиган ген киради. Мазкур ген термофил бактериялардан ажратиб олинган ва *E.coli* га клонланган. Иккинчи гуруҳ микроорганизмларига масалан, *Corynebacterium glutamicum* нинг саноатда муҳим бўлган аминокислоталар ишлаб чиқарилишини ошириш мақсадида генетик ўзгартирилган турли штаммлари киради.

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae хамиртуруши – бу кўп жиҳатдан *E.coli* нинг эукариотик аналоги бўлиб, диаметри тахминан 5 мкм бўлган патоген бўлмаган бир ҳужайрали микроорганизмлардир. Уларнинг генетикаси, молекуляр биологияси ва метаболизми батафсил ўрганилган. *S. cerevisiae* куртакланиш йўли билан кўпаяди, *E.coli* каби оддий муҳитда ҳам яхши ўсади. Уларнинг қандни этанол ва карбонат ангидрид газига айлантириш хусусиятидан қадимдан спиртли ичимликлар ва нон тайёрлашда фойдаланиб келинган. Ҳозирги вақтда йилига 1 миллион тоннадан ортиқ *S. cerevisiae* сарфланади. *S. cerevisiae* хамиртуруши ҳам катта илмий қизиқиш уйғотади. Хусусан, улар бошқа эукариотларни, шу жумладан инсонларни ўрганиш учун энг мақбул модель ҳисобланади, чунки, *S. cerevisiae* ҳужайраси бўлинишини бошқариш учун масъул бўлган кўпчилик генлар инсонники билан ўхшашдир. Мазкур кашфиёт инсонларда ўсма ҳужайралари ривожланиши учун жавоб берадиган генларни идентификациялаш ва тавсифлашга ёрдам берди. Хамиртурушларнинг кенг қўлланиладиган генетик тизими (сунъий хромосома) инсон ДНКсини ўрганиш бўйича барча тадқиқотларнинг зарур иштирокчиси ҳисобланади. 1996 йилда *S. cerevisiae* бутун хромосомалар тўпламининг тўлиқ нуклеотидли кетма-кетлиги аниқланди, бу эса мазкур микроорганизмнинг илмий тадқиқотлар учун қийматини янада оширди. Бундай тадқиқотлар эукариотларда биринчи марта амалга оширилди.

Бактериал ҳужайра томонидан синтезланган эукариотик оксилни оксил молекуласига паст молекулали бирикмаларни бириктириб тез-тез ферментатив ўзгартиришга тўғри келади – бу кўпчилик ҳолларда оксилнинг тўғри ишлаши учун зарур. Афсуски, *E.coli* ва бошқа прокариотлар бундай ўзгартиришни амалга оширишга қодир эмас, шу сабабдан тўлақонли эукариотик оксил олиш учун *S. cerevisiae*, шунингдек, хамиртурушнинг бошқа турларидан: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizisaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* фойдаланилади. Тўлақонли рекомбинант оксилларни энг самарали ишлаб чиқарувчилари *P. pastoris*, *H. polymorpha* ҳисобланади.

Эукариотик ҳужайралар культураси

Эукариотларнинг турлари ўртасида фарқ бўлгани билан ҳашаротлар, ўсимликлар ва сут эмизувчилар ҳужайраларини етиштиришга услубий ёндашувлар кўпгина умумий хусусиятларга эга.

Дастлаб мазкур организм тўқимасидан кичик бир бўлак олиниб, унга ҳужайралараро материалдаги оксилни парчалайдиган протеолитик ферментлар билан ишлов берилади (ўсимлик ҳужайралари билан ишланганда ҳужайра деворини парчалайдиган махсус фермент кўшилади). Ажралиб чиққан ҳужайраларни таркибида аминокислоталар, антибиотиклар, витаминлар, тузлар, глюкоза ва ўсиш омили бўлган мураккаб озуқа муҳитига жойлаштирилади. Бундай шароитларда ҳужайралар идиш деворида ҳужайралардан бир қаватли қатлам ҳосил бўлгунча бўлинишда давом этади. Агар шундан кейин ҳужайралар ичида янги озуқа муҳити бўлган идишга кўчирилмаса ҳужайралар кўпайишдан тўхтади. Одатда дастлабки (бирламчи) ҳужайра культурасидан 50-100 тагача ҳужайра генерациясини кўчиришга (кўчириб ўтказиш, субкултивациялаш) ва ушлаб туришга муваффақ бўлинади, кейин ҳужайралар кўпайиш хусусиятини йўқотадилар ва ҳалок бўладилар. Етиштирилган ҳужайралар дастлабки ҳужайра материалининг баъзи хусусиятларини ўзида сақлаганлиги сабабли улардан турли хил тўқималарнинг биокимёвий хусусиятларини ўрганишда фойдаланиш мумкин.

Кўпинча кўчириб ўтказилган бирламчи ҳужайрали культураларнинг баъзи ҳужайралари генетик ўзгаришга учрайди, натижада уларнинг ўсиши тезлашади. Мазкур жараёнда селектив афзалликка эга бўлган ҳужайра культуралари *in vitro* шароитида чекланмаган ўсиш хусусиятига эга бўладилар ва улар барқарор ҳужайра қаторлари деб аталади. Баъзи ҳужайра қаторлари дастлабки ҳужайраларнинг асосий биокимёвий хусусиятларини сақлаб қоладилар, баъзилари эса йўқ. Чексиз ўсиш хусусиятига эга бўлган ҳужайраларнинг аксариятида хромосомаларнинг сезиларли ўзгаришлари бўлади, хусусан баъзи хромосомалар сонининг ортиши ва бошқаларининг йўқотилиши қайд этилади. Молекуляр биотехнологияларда барқарор ҳужайралар қаторларидан баъзан вирусларни кўпайтиришда ва ДНК клонланган кетма-кетлиги билан кодланган оқсилларни аниқлашда фойдаланилади. Бундан ташқари улар вакцина ва рекомбинант оқсилларни кенг кўламда ишлаб чиқариш учун қўлланилади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Нима учун молекуляр биотехнологияда шунчалик кўп турли биологик тизимлар ишлатилади?
2. Прокариотлар нима? Эукариотлар нима?
3. *Escherichia coli* нинг асосий хусусиятларини айтиб беринг.
4. «Грамманфий» атамаси нимани билдиради?
5. *S. cerevisiae* нинг асосий хусусиятларини айтиб беринг.
6. Бирламчи ҳужайра культураси нимани билдиради?
7. Барқарор ҳужайралар тизмаси нима?

§ 3. ДНК тузилиши

Генетик код

Ҳар қандай тирик организмнинг тузилиши ва фаолияти тўғрисидаги бутун маълумотлар генетик материалида кодланган шаклда мавжуд бўлиб, уларнинг асосини дезоксирибонуклеин кислотаси (ДНК) ташкил қилади. Аксарият организмларнинг ДНКси – узун икки занжирли полимер молекуладан иборат. Унинг бир занжиридаги мономер бирликлар (дезоксирибонуклеотидлар) бошқа занжиридаги дезоксирибонуклеотидлар кетма-кетлигига мос келади (комплементар). Комплементарлик тамойили ДНКнинг икки қарра қўпайишида (репликация) янги синтезланган ДНК молекулаларининг дастлабки асл молекулалар билан айнан ўхшашлигини таъминлайди. Муайян маҳсулотларни кодловчи қатъий специфик нуклеотид кетма-кетлигига эга бўлган индивидуал генетик элементлар генлардир. Уларнинг баъзилари оқсилларни, бошқалари эса – фақат РНК молекулаларини кодлайдилар.

ДНКнинг оқсил синтези билан боғлиқлиги 1944 йилдаёқ биокимёгарлар Дж. Бидл ва Э. Тейтум томонидан моғор замбуруғи *Neurospora* да мутация механизмини ўрганиш вақтида айтиб ўтилган. Георгий Гамов кодонлар барча 20 та аминокислотага етарли бўлиши учун учта нуклеотиддан (учта нуклеотиддан жамми 64 та кодон бўлиши мумкин: уч позициядан ҳар бирига тўрт нуклеотиддан бирини қўйиш мумкин) ташкил топган бўлиши кераклигини тахмин қилган.

1961 йилда Маршалл Ниренберг ва унинг ҳамкасби Генрих Маттеи генетик коднинг уч ўрамлилигини *in vitro* шароитида трансляция учун хужайрасиз тизимдан фойдаланиб тажрибада исботлашни уддаладилар. Ахборот ДНК молекуласида азотли асосларнинг муайян кетма-кетлиги кўринишида ёзилган. Оқсилнинг ҳар бир аминокислотасига ДНКнинг учта кетма-кет юривчи нуклеотиди – триплет, ёки кодон мос келади. Протеинларни кодловчи генлардаги (структуравий генлар) ахборот иккита кетма-кет кечувчи жараёнлар мобайнида дешифрланади: РНК синтези (транскрипция) ва протеин синтезларида (трансляция). Дастлаб ДНКнинг маълум бир соҳасида матрицадаги каби матрица РНК (мРНК) синтезланади. Кейин транспорт РНК (тРНК), мРНК, ферментлар ва турли хил протеин омиллари иштирокида кўп компонентли системасининг

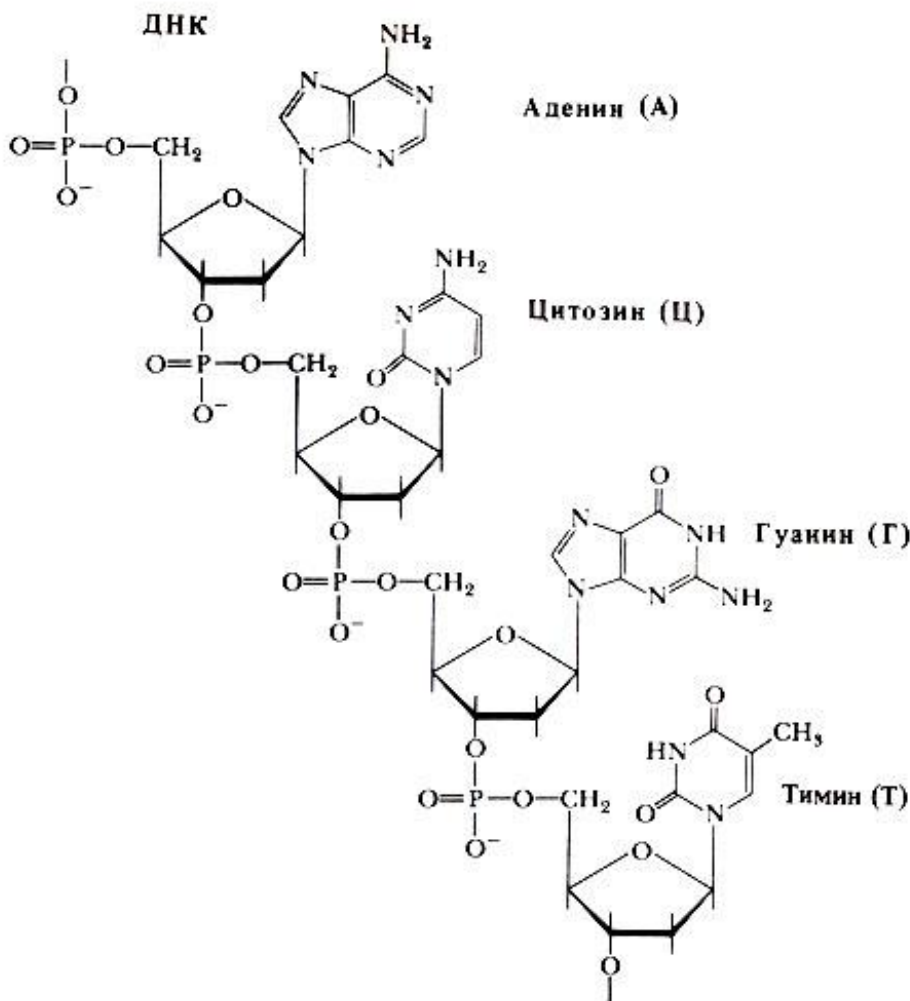
мувофиқлаштирилган иши давомида протеин молекуласининг синтези амалга оширилади. Мазкур жараёнларнинг барчаси ДНКда шифрланган генетик ахборотнинг нуклеотидлар тилидан аминокислоталар тилига ўтишида тўғри ўтказилишини таъминлайди. Протеин молекуласининг аминокислоталар кетма-кетлиги унинг тузилиши ва функциясини белгилайди.

Генетик луғат 64 кодондан иборат. Уларнинг 3 таси – бу стоп-кодонлар UAG (янтарь), UGA (опал) ва UAA (охра), биттаси (AUG) – метионин аминокислотасини ҳам кодловчи старт-кодон (жадвал 3.2). Стоп-кодонларни терминатор кодонлар деб ҳам аталади. AUG кодони мРНК молекуласининг 5'-охирида эмас, ички соҳасида жойлашганда у ўзгартирилмаган метионин бириккан бошқа тРНК (Met-ТРНК^{Met}) томонидан аниқланади. Триптофан аминокислотаси фақат биргина кодон (UGG) билан, протеинларни ташкил қилган қолган аминокислоталар – ҳеч бўлмаганда иккита, кўпинча тўртта, баъзан эса олтита кодон билан кодланади. Масалан, лейцин учун олтита кодон мавжуд: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA ва CUG. Синонимик кодонлар турли организмлар томонидан турлича сонда ишлатилади. Глицин учун инсон структуравий генларида тўрт кодондан бири бўлган GGA 26% ҳолатларда ишлатилади, *Escherichia coli* да эса – 9% ҳолатларда ишлатилади. Стоп-кодонлар учун ҳам шундай ҳолат кузатилади. Демак, инсонларда UAA, UAG ва UGA кодонларининг ишлатилиш даражаси мос равишда – 0,62, 0,09 ва 0,30 ни, *E.coli* учун эса – мос равишда 0,62; 0,09 ва 0,30 ни ташкил қилади. Мана шу барча фарқланишларга қарамай, барча организмлардаги генетик код айрим фарқларни ҳисобга олмаганда, бир биридан фарқ қилмайди.

ДНКнинг тузилиши

ДНКнинг кимёвий хоссалари ҳақидаги дастлабки маълумотлар 1868 йилда пайдо бўлган. 1940 йилларнинг бошида ДНК молекуласи чизикли полимер бўлганлиги аниқланди. Унинг мономер бирликлари азотли асос, беш карбонли шакар (пентоза) ва фосфат гуруҳидан ташкил топган нуклеотидлар ҳисобланади (расм 3.1). Фосфат гуруҳи моносахарид қолдиғининг 5'-углерод атомига, органик асоси эса – 1'-углерод атомига бириктирилган. ДНКнинг асоси икки турда бўлади: пурин [аденин (А) ва гуанин (G)] ва пиримидинли [цитозин (С) ва тимин (Т)] (расм 3.1). ДНКдаги моносахарид фақат битта гидроксил

гуруҳи (ОН) бўлган 2'-дезоксирибоза билан, РНКдаги эса – иккита гидроксил гуруҳига эга рибоза билан ифодаланади. Нуклеотидлар бир-бири билан фосфодиэфир боғламлар орқали боғланган, бунда бир нуклеотиднинг 5'-углерод атоми фосфат гуруҳи қўшни нуклеотиддаги дезоксирибозанинг 3'-ОН-гуруҳи билан боғланган (расм 3.1). Полинуклеотид занжирининг бир учиди 3'-ОН-гуруҳи (3'-учи), бошқасида эса – 5'-фосфат гуруҳи (5'-учи) жойлашган.



Расм. 3.1 ДНК молекуласи занжирларидан бирининг фрагменти. Ҳар бир нуклеотид беш карбонли шакар ўз навбатида фосфор кислотаси молекуласи билан боғланган дезоксирибозага бириккан азот асосидан ташкил топган (уларнинг номи ва шартли белгилари расмда кўрсатилган). Фосфор кислотаси нуклеотидларни нуклеин кислоталар занжирида боғлаб туради

1953 йилда Джеймс Уотсон ва Фрэнсис Крик, ДНК кристалларининг рентгеноструктуравий таҳлили маълумотларига асосланиб, натив ДНК қўш спирални ҳосил қилувчи иккита полимер занжирдан ташкил топган, деган хулосага келдилар (расм 3.2). Бир бирига ўралган полинуклеотид занжирлар карама-қарши занжирларнинг комплементар асослари ўртасида ҳосил бўладиган водород боғламлари билан биргаликда ушлаб турилади (расм 3.3).



Расм 3.2. ДНК қўш спирали модели. Кўндаланг зинапоялар - асосларнинг комплементар жуфтликлари, «ён томонлари» - шакарфосфатли рамкаси. (Глик ва Пастернак бўйича)

Бунда аденин фақат тимин билан, гуанин эса – цитозин билан жуфтлик ҳосил қилади. Асослар жуфтлиги А-Т иккита водород боғлами билан, G-C – эса учта водород боғлами билан мустаҳкамланади. Икки занжирли ДНК узунлиги одатда комплементар **нуклеотидлар жуфтликлари** сони билан ўлчанади (**н.ж.**). минг ёки миллион нуклеотидлар жуфтлигидан ташкил топган ДНК молекулалари учун мос равишда минг.н.ж. ва млн.н.ж. бирликлари қабул қилинган. Масалан, инсоннинг I хромосоманинг ДНКси 263 млн.н.ж. узунликка эга битта қўш спиралдан иборат.

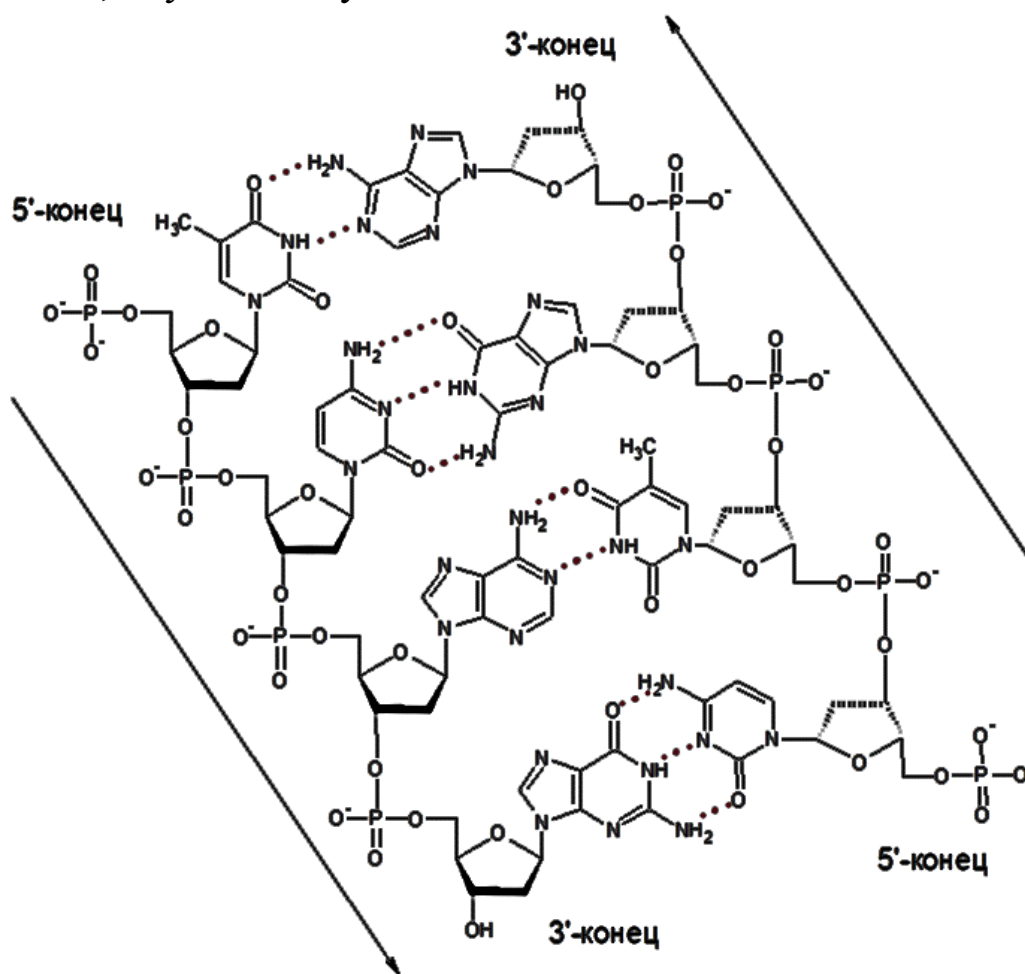
Молекуланинг 5'-3'-фосфодиэфир боғламлар билан боғланган фосфат гуруҳлари ва дезоксирибоза қолдиқларидан ташкил топган шакарфосфатли рамкаси худди винт зинанинг ён томонларини, асоснинг А-Т ва G-C жуфтликлари эса – унинг зинапояларини ҳосил

қилгандек (расм 3.3). ДНК молекуласи занжирлари антипараллел жойлашган: улардан бири 3' - 5', бошқаси 5' - 3' йўналишга эга. Комплементарлик тамойилига мувофиқ, агар занжирларнинг бирида 5'-TAGGCAT-3' нуклеотид кетма-кетлиги бўлса, у ҳолда бошқа комплементар занжирда 3'-ATCCGTA-5' кетма-кетлиги жойлашиши керак. Бу ҳолатда икки занжирли шакл қуйидагича кўринишда бўлади:

5'-TAGGCAT-3'

3'-ATCCGTA-5'

Бундай ёзувда юқори занжирнинг 5'-учи ҳар доим чапда жойлашади, 3'-учи эса – ўнгда.



Расм 3.3. Икки занжирли ДНК фрагменти

Генетик ахборот ташувчиси икки асосий талабни қондириши керак: юқори аниқлик билан кўпайиш (репликацияланиш) ва протеин молекулаларининг синтезини аниқлаш (кодлаш). Уотсон-Крик ДНК модели ушбу талабларга тўлиқ жавоб беради. Биринчидан, комплементарлик тамойилига кўра, ҳар бир ДНК занжири янги қўшимча занжирнинг шаклланиши учун матрица бўлиб хизмат

қилиши мумкин. Натижада, бир репликация раундидан сўнг, асл ДНК молекуласи каби бир хил нуклеотид кетма-кетлигига эга бўлган икки қиз молекула ҳосил қилинади. Иккинчидан, структуравий геннинг нуклеотид кетма-кетлиги унинг кодланган оқсилнинг аминокислоталар кетма-кетлигини ягона маънода аниқлайди.

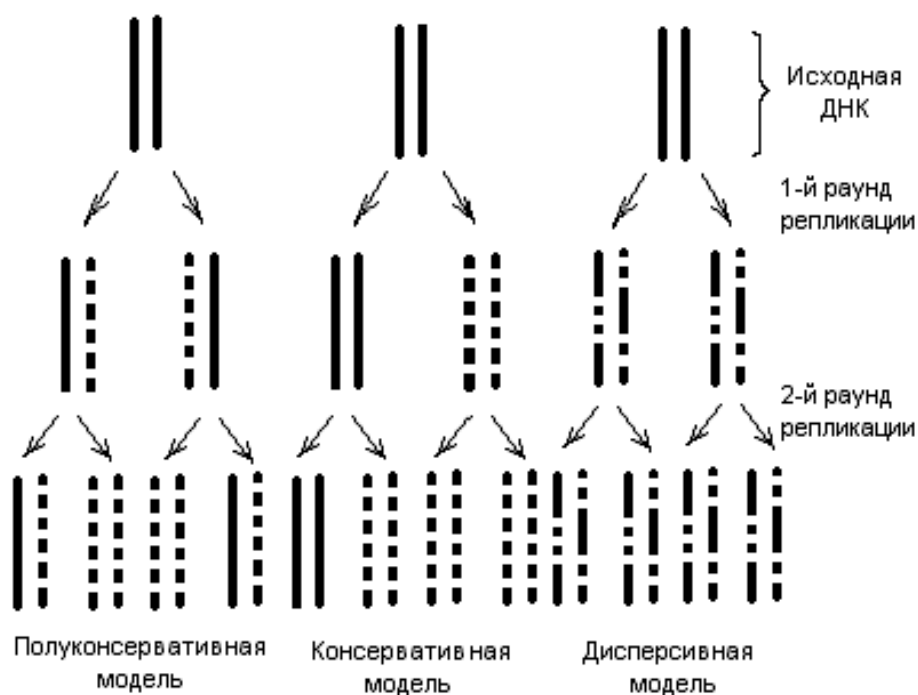
§ 4. Репликация

Репликация (лотинча *replicatio* – янгиланиш) – ДНК ота-она молекуласи асосида ДНКнинг икки қиз молекуласи ҳосил бўлиши жараёни. ДНК репликациясини 15-20 турли хил оқсил-ферментлардан ташкил топган *реплисома* (ингл.) деб номланадиган мураккаб комплекс амалга оширади. Махсус ферментлар ёрдамида она ДНКнинг қўшалок спирали иккита ипга ажралади, ҳар бир ажралган ипда ДНКнинг айнан ўхшаш иккита молекуласини ҳосил қилган иккинчи иплар барпо бўлади ва кейин улар алоҳида спирал бўлиб ўралади. Она ҳужайранинг кейинги бўлиниши мобайнида ҳосил бўлган ҳар бир янги ҳужайра бир нусхадан дастлабки она ҳужайранинг ДНК молекуласига айнан ўхшаш бўлган ДНК молекуласини қабул қилади. Мазкур жараён генетик ахборотнинг авлоддан авлодга аниқ ўтказилишини таъминлайди.

Ўрганиш тарихи

Мезелсон ва Стал тажрибаси

ДНКнинг ҳар бир молекуласи битта дастлабки ота-она молекуласидан синтезланган битта янги занжирдан ташкил топган. Репликациянинг бундай механизми полуконсерватив деб номланади. Ҳозирги вақтда мазкур механизм Мэтью Мезелсон ва Франклин Стал (1958 й.) тажрибалари туфайли исботланган ҳисобланади (расм 4.1) Илгари иккита бошқа модель мавжуд бўлган: “консерватив” модель - репликация натижасида фақат она занжирлардан иборат бўлган битта ДНК молекуласи ва фақат янги ҳосил бўлган (қиз) занжирлардан битта ДНК молекуласи ҳосил бўлади; “дисперсион” модель - репликация натижасида ҳосил бўлган барча ДНК молекулалари баъзи бир соҳалари янги синтезланган бўлиб, бошқа соҳалари ДНК она молекуласидан олинган занжирлардан иборат бўлади.



Расм 4.1. Дуплексли ДНК репликациясининг фараз қилинган модели. Узлуксиз чизиклар билан ДНКнинг дастлабки (“оғир”, ^{15}N сақлаган) занжирлари, узук-узук чизиклар билан репликация натижасида олинган янги (“енгил”, ^{14}N сақлаган) занжирчалари тасвирланган

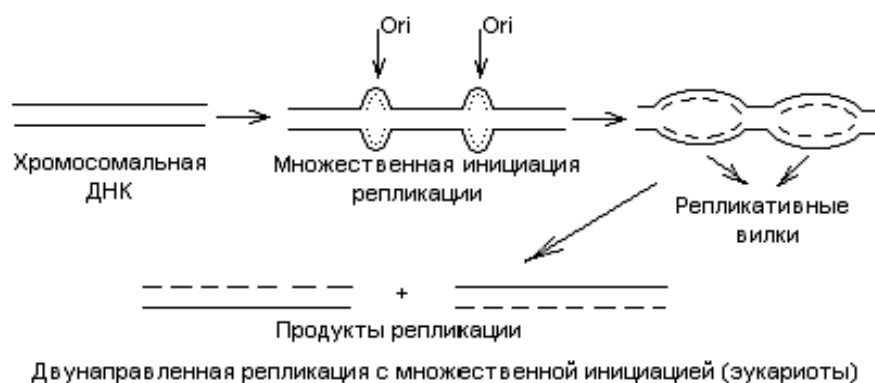
Умумий тасаввурлар

ДНК репликацияси – ҳужайра бўлинишида муҳим ҳодиса. Умуман олганда, бўлиниш вақтига келиб ДНК тўлиқ ва фақат бир марта репликацияланган бўлиши керак. Мазкур жараён ДНК репликациясини бошқаришнинг маълум механизмлари орқали таъминланади. Репликация уч босқичда ўтади:

1) репликация инициацияси, 2) элонгация, 3) репликация терминацияси (расм 4.2)

Репликация бошқарилиши асосан инициация босқичида амалга оширилади. Бу осон кечилади, чунки репликация ДНКнинг ҳар қандай соҳасидан бошланиши мумкин эмас, балки *репликация инициацияси сайти* деб номланадиган қатъий муайян соҳасидан бошланади. Геномда бундай сайтлардан фақат битта ёки кўп бўлиши ҳам мумкин. Репликация инициацияси сайти тушунчаси билан репликон тушунчаси чамбарчас боғлиқ. Репликон – бу репликация инициацияси сайтини ўз ичига олган ва шу сайтдан ДНК синтези бошлангандан сўнг репликацияланидиган ДНК соҳаси. Бактериялар геномлари одатда битта репликондан иборат, демак бу бутун геном репликацияси фақат битта репликация инициацияси натижаси

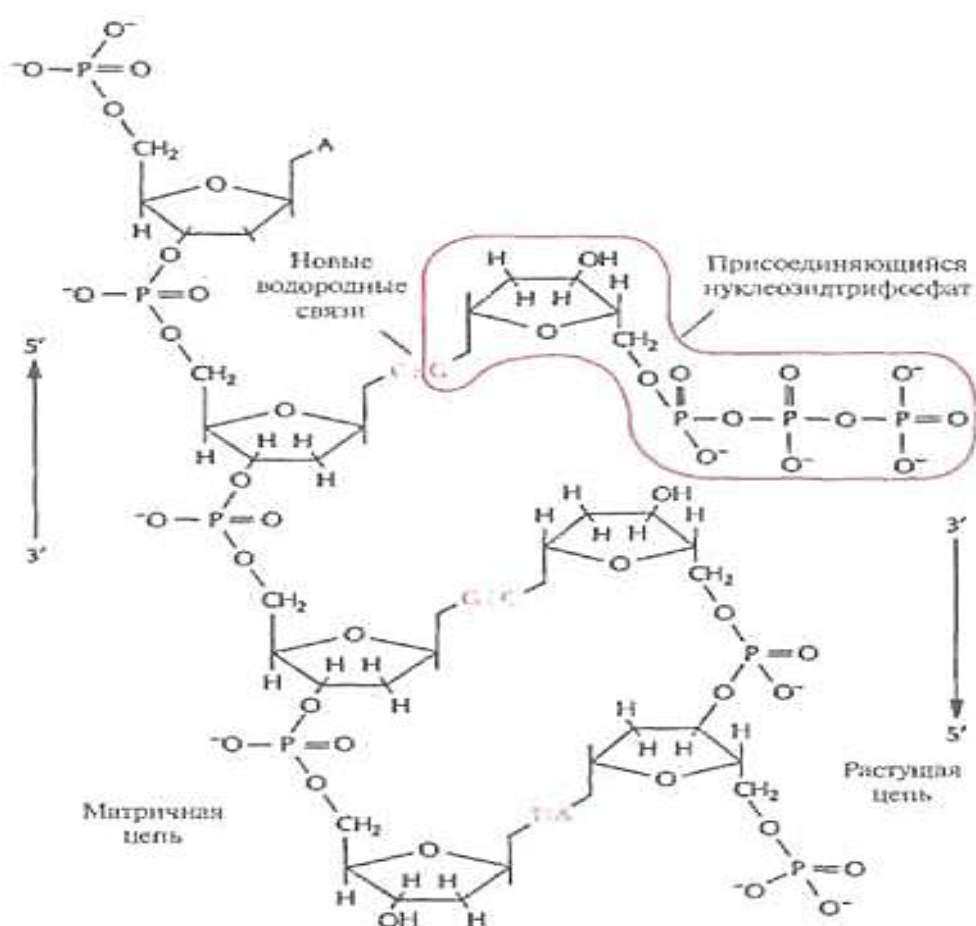
ҳисобланишини билдиради. Эукариотлар геномлари (шунингдек уларнинг алоҳида хромосомалари) кўп сонли мустақил репликациялардан иборат, бу алоҳида хромосома репликацияси умумий вақтини анчагина қисқартиради. Бошқа сўз билан айтганда, хромосомада ДНК репликациясининг кўп нуқталари мавжуд ва ДНК иккиланиши бир томондан иккинчи томонга кетма-кетликда эмас, балки кўп соҳаларида бир вақтда бирданига содир бўлади. Сперматогонийларда бир хромосомада ўртача 40 та репликация бошланиш нуқталари бор ва ҳужайра циклининг S-фазаси 15 соатни ташкил этади.



Расм 4.2. икки занжирли ДНКнинг икки йўналишли репликацияси. Узлуксиз чизиқлар билан ДНКнинг дастлабки занжирлари, пунктир билан – янги синтезланаётган занжирлари тасвирланган.

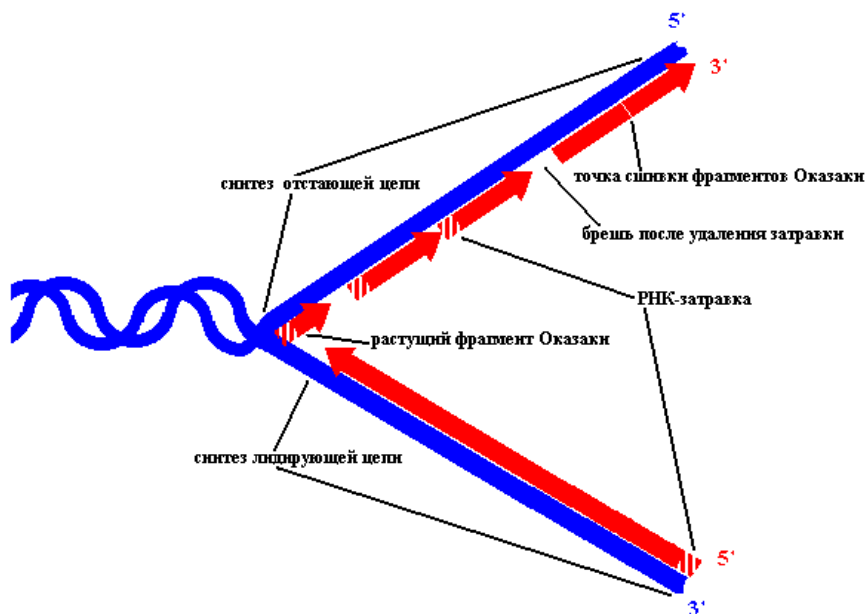
Ҳар бир сайтда ҳужайра бўлинишининг бир циклини назорат қиладиган репликация инициацияси актлари сонини назорат қиладиган молекуляр механизмлар **нусхаланиш назорати** деб номланади. Бактериал ҳужайраларда кўпинча хромосомали ДНКдан ташқари алоҳида репликациялардан иборат плазмидалар ҳам бўлади. Плазмидаларда ўзларининг нусхаланиш назорати механизмлари мавжуд: улар ҳужайра цикли давомида плазмиданинг атиги битта нусҳаси каби мингта нусҳасининг ҳам синтезини таъминлаши мумкин.

ДНКнинг янги занжирлари синтезланиши учун ДНК таркибига кирувчи **дезоксирибонуклеозидмонофосфатлар (дНМФ)** эмас, **дезоксирибонуклеозидтрифосфатлар (дНТФ)** субстратлар бўлиб ҳисобланади. (дНМФ) эмас (дНТФ) нинг ишлатилиши энергетик сабаблар билан тушунтирилади – нуклеотидлараро боғланиш ҳосил бўлиши энергия талаб этади, фосфатлараро боғланишлар эса энергия мабаи бўлиб хизмат қилади. Ўсиб бораётган занжирга бирикадиган ҳар бир мономер бирлик дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат кўринишида бўлади; дезоксирибозанинг 5'-карбон атоми билан боғланган фосфат гуруҳи α ҳарфи билан белгиланади, унга β -фосфат ва кейин γ -фосфат гуруҳлари бирикади. Репликация давомида β - ва γ -фосфат гуруҳлари пирозинфосфат шаклида ажралади, α -фосфат гуруҳи эса ўсиб бораётган занжирнинг охириги нуклеотидининг 3'-ОН-гуруҳи билан боғланади (расм 4.3)



Расм 4.3 ДНК репликацияси. Навбатдаги дезоксирибонуклеозидтрифосфатнинг ДНК-матрица комплементар асоси билан бирлашиши (Глик ва Пастернак бўйича)

Репликация репликация инициацияси сайтида ДНК қўш спирали ўрамининг ечилишидан бошланади, бунда *репликацион вилка* ҳосил бўлади - ДНКни бевосита репликацияниш жойи (расм 4.4). Ҳар бир сайтда репликация бир ёки икки йўналишли бўлиши билан боғлиқ ҳолда бир ёки икки репликацион вилка шаклланиши мумкин. Икки йўналишли репликация кенгрок тарқалган.



Расм 4.4. ДНК қиз занжирларининг репликатив вилкада ҳосил бўлиш схемаси (Димшиц Г.М. (2000) бўйича)

Репликация бошлангандан кейин бирмунча вақт ўтиб электрон микроскопда репликацион тешикча – ДНК репликацияланиб бўлган соҳасини ва ёнларида хромосоманинг репликацияланмаган ДНК узун соҳалари билан кўриш мумкин.

Репликацион вилкада ДНКни йирик оксил комплекси (реписома) ва унинг таркибида муҳим ферменти бўлган *ДНК-полимераза* нусхалайди. Репликацион вилка прокариотларда 1 дақиқада 100 000 жуфт нуклеотидлар, эукариотларда эса 500-5000 нуклеотидлар тарзидаги тезлик билан ҳаракатланади.

Репликациянинг молекуляр механизми

Ферментлар (*хеликаза*, *топоизомераза*) ва ДНК-боғловчи оксиллар ДНК ўрамини ечади, матрицани ёйилган ҳолатда ушлаб туради ва ДНК молекуласини айлантиради. ДНК молекуласининг занжирлари ажралади, репликацион вилкани ҳосил қилади, ва улардан ҳар бирида янги комплементар занжир синтезланадиган матрица бўлиб шаклланади.

Репликация тўғрилиги асослар комплементар жуфтликлари аниқ мос тушиши ва хатони аниқлай ва тўғрилай оладиган ДНК–полимераза фаоллиги билан таъминланади. Ферментли комплекс шундай ишлайдики, синтезланаётган иккала занжирдан биттаси бошқа занжирга нисбатан бирмунча илгарироқ ўсиб боради. Шунга мувофиқ биринчи занжир – етакчи, иккинчиси кечикадиган ҳисобланади. Етакчи занжир узлуксиз узун фрагмент кўринишида ҳосил бўлади, масалан сперматогонийлар учун бу 1 600 000 га яқин нуклеотидлардан иборат. Кечикадиган занжир *Оказаки фрагментлари* деб номланадиган тахминан 1500 нуклеотидлардан иборат қисқа фрагментлар серияси кўринишида ҳосил бўлади.

ДНКнинг ҳам узун, ҳам Оказаки фрагментларидан ҳар қайсиси каби ҳар бир фрагменти ҳосил бўлишидан олдин РНК-затравка қисқа кетма-кетлик (10-15 нукл.) синтези содир бўлади. РНК-затравка синтези учун рибонуклеозидтрифосфатлар талаб этилади, уларнинг киритилиши ҳам ДНКнинг мувофиқ соҳасига комплементарлик тамойили бўйича рўй беради.

Репликация жараёнида 20 дан ортиқ турли оксиллар (шу жумладан ДНК-полимераза) иштирок этади. Уларнинг ҳар бири муайян функцияни бажаради (жадвал 4.1). *ДНК-полимераза I* кечикаётган занжирда РНК-праймерларни йўқ қилиш ва ДНК тозаланган жойларининг репликациясини тугатиш учун ҳаракат қилади (расм 4.5). *ДНК полимераза III* –ДНКнинг етакчи (лидерлик қиладиган) занжири синтезида ва Оказаки фрагментлари кечикаётган занжир синтезини амалга оширадиган асосий фермент.

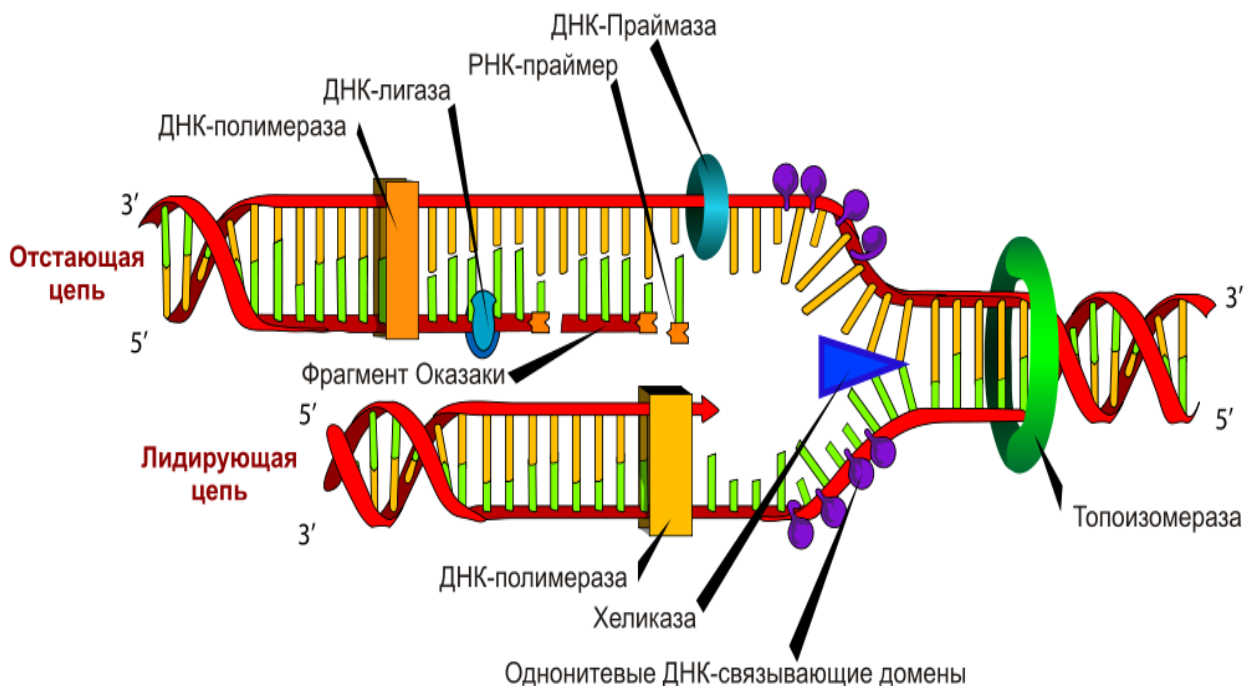
Жадвал 4.1

Ферментлар ва уларнинг функциялари

Фермент	Функция
ДНК-гираза	ДНКга вақтинчалик икки занжирли узилишларни киритиб, уларнинг ёзилишини осонлаштиради.
Хеликаза	ДНК икки занжирли молекуласини битталиқ занжирларга ажратади.
SSB-оксиллар	ДНК бир занжирли фрагментларини боғлайди ва комплементар жуфтлашишнинг олдини олади.
Праймаза	РНК-затравкани (праймер) - РНК қисқа фрагментини синтезлайди. Праймер ДНК-полимераза ишида инициатор ҳисобланади (полимераза ДНКни нолдан

	бошлаб синтезлаш хусусиятига эга эмас, лекин мавжуд бўлганига нуклеотидлар қўшиши мумкин).
ДНК-полимераза	Праймер билан боғланиб, ДНКни синтезлайди. Таъкидлаш лозимки, полимераза ДНКнинг бир учини узлуксиз бир томонга йўналтирилган холда, иккинчи учини эса – фрагментлар орқали қарама-қарши йўналиш томонга синтезлайди.
Сирпанувчи қисқич (илгак) оксиллари	ДНКни халқа билан ўраб, олдинга қараб ҳаракатланаётган ДНК-полимераза ферменти билан биргаликда ДНК бўйлаб “сирпанади”. Улар ферментнинг ДНК матрицасидан ажралишининг олдини олади ва унинг ишлаш самарадорлигини оширади.
РНКаза II	РНК-затравканинг кераксиз бўлиб қолган фрагментларини йўқ қилади.
ДНК-лигаза	ДНК фрагментларини бирлаштиради (Оказаки <i>фрагментларини</i>).
Теломераза	Нуклеотидларнинг такрорланадиган алоҳида кетма-кетликларини теломералар соҳаларида ДНК занжирининг бир учига қўшади ва шу билан бирга бўлиниш вақтида уларнинг қисқаришини компенсациялайди.
Реплисома (барча репликация ферментлари комплекси)	ДНК-матрица молекуласи бўйлаб ҳаракатланади, унинг ўрамини ечади ва ДНК комплементар занжирини узайтиради.

Натижада ДНКнинг ота-она молекуласи билан ўхшаш бўлган иккита янги икки спиралли молекуласи ҳосил бўлади. Кейин синтезланган молекулаларнинг ДНКнинг суперспиралланиши ва кейинги компактизацияси (ихчамланиши) тамойили бўйича ўралиши содир бўлади. Синтез энергия сарфловчи.



Расм 4.5. ДНК репликацияси схемаси <https://www.wikiwand.com/ru/>

Репликация жараёнининг тавсифи

Матрицали – синтезланаётган ДНК занжири кетма-кетлиги аниқ комплементарлик тамойилига мувофиқ она занжир кетма-кетлиги билан аниқланади;

ярим консерватив – репликация натижасида ҳосил бўлган ДНК молекуласининг бир занжири – янги синтезланган, иккинчиси – она занжир, янги молекуланинг 5'- учидан 3' учи томонга қараб кетади;

ярим узлуксиз – ДНК занжирларидан бири узлуксиз синтезланади, иккинчиси – алоҳида қисқа фрагментлар (Оказаки фрагментлари) тўплами кўринишида, ДНКнинг репликация инициацияси сайти деб номланган муайян соҳаларидан бошланади (ингл. *origin*).

Изоҳ:

Оказаки фрагментлари (ингл. Okazaki fragments) – ДНК репликацияси жараёнида ортда қолаётган занжирида ҳосил бўладиган ДНКнинг нисбатан қисқа фрагментлари (5'-учида РНК-праймери билан). Оказаки фрагментлари узунлиги *E.coli* да 1000-2000 га яқин нуклеотидни, эукариотларда эса – одатда 100-200 нуклеотидни ташкил этади.

Оказаки фрагментлари 1968 йилда Рэйдзи Окадзаки, Цунеко Окадзаки ва ҳаммуаллифлари томонидан ичак таёқчасида бактериофаг ДНКни репликациясини ўрганишда тавсифланган.

Механизм

Ҳар бир Оказаки фрагменти праймаза ёрдамида ҳосил бўлган РНК-праймердан кейин репликацион вилканинг ёнида ҳосил бўлади ва кейин прокариотлар ҳолатида ДНК-полимераза III ёрдамида давом этади. Эукариотларда ортда қолаётган занжир ДНК-полимераза δ ёрдамида синтезланади. Праймер кейинчалик РНКаза H, flap-эндонуклеаза ва геликаза/нуклеаза DNA2Lга ўхшаш эндонуклеаза фаоллиги бўлган фермент ёрдамида йўқ қилинади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. ДНК репликациясининг умумий тавсифини айтиб беринг.
2. ДНК ва РНК нима билан фарқ қилади?
3. Про- ва эукариотлар структуравий генларининг ўхшашлиги ва фарқларини тавсифланг.

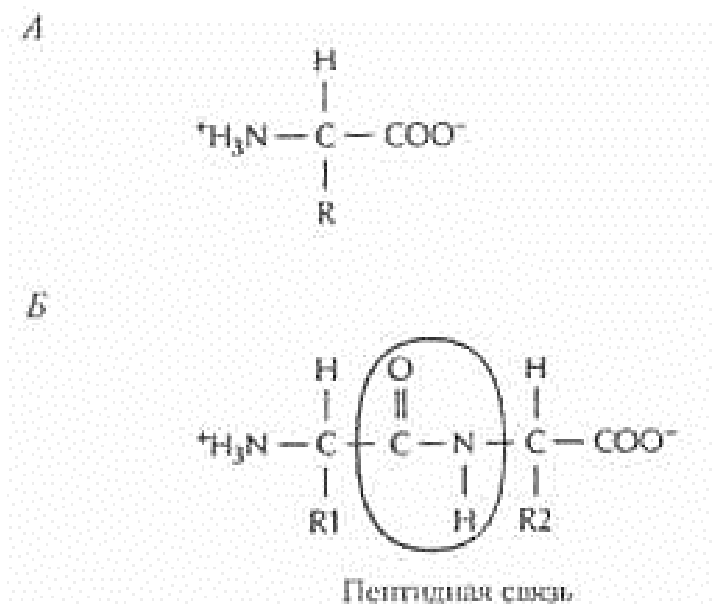
§ 5. Генетик ахборотнинг дешифрланиши: РНК ва оксил

1. *Генетик ахборотни ҳужайрада амалга ошириш – молекуляр биологияда «марказий тамойили»*
2. *Оқсилларнинг моҳияти*
3. *Трансляция*

Аксарият генлар кодланган ҳолда оксил синтези ҳақидаги ахборотни ўзларида сақлайдилар. Оқсиллар – бу биологик молекулалар бўлиб, тирик тизимларда кечадиган деярли барча жараёнларда иштирок этадилар. Улар турли-туман биокимёвий жараёнларнинг катализаторлари бўлиб хизмат қиладилар, ҳужайра ичида ва ҳужайралар ўртасида моддаларни ташишни амалга оширадилар, ҳужайра мембранали ўтказувчанлигини бошқарадилар, улардан турли хил структуравий элементлар тузилади. Оқсиллар ҳаракатлантирувчи функцияни амалга оширишда иштирок этадилар, инфекция ва токсинлардан ҳимояни таъминлайдилар, қолган ген маҳсулотларининг синтезини бошқарадилар.

Оқсилнинг асосий структуравий бирлиги бўлиб аминокислоталар ҳисобланади. Барча аминокислоталар ўхшаш кимёвий тузилишга эга. Углероднинг марказий атомига (α -углерод) водород атоми (H), аминогрух (NH_3^+), карбоксил грух (COO^-) ва R-грух (ён занжир) бириккан (расм 5.1 А). 20 та турли хил ён занжирлар ва мос равишда 20 та аминокислота мавжуд. Масалан, аланин аминокислотасида R-грух бўлиб метил грух (CH_3) ҳисобланади.

Аминокислоталар бир бирлари билан пептид боғламлари орқали бирлашиб полипептид занжирини ҳосил қилади. Пептид боғламлари бир аминокислотанинг карбоксил грухи ва бошқа аминокислотанинг аминогрухи ўртасида ҳосил бўлади.



Расм 5.1. Аминокислотанинг умумлаштирилган структуравий формуласи ва пептид боғламининг ҳосил бўлиши. А. Аминокислота. R - ён грух. Б. икки аминокислота қолдиғининг R1 ва R2 ён грухлар билан пептид боғлам ҳосил қилиши. (Глик ва Пастернак бўйича)

Оқсил молекуласининг биринчи аминокислотаси эркин аминогрухига эга бўлиб (N-учи), охиргиси эса – эркин карбоксил грухига (C-учи). 5.1 жадвалда аминокислоталарнинг бир ва уч ҳарфли шартли белгилари келтирилган.

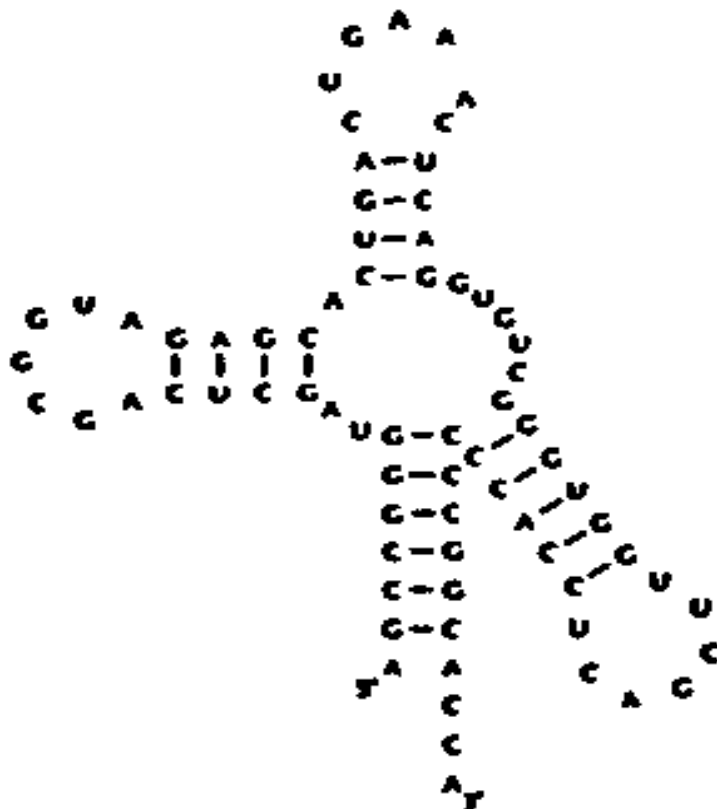
**Шартли белгиланган ва аминокислоталар, уларнинг шартли белгилари
(бир ва уч ҳарфли) ҳамда уларга мос кодонлар**

A	Ala	Аланин	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Цистеин	UGC UGU
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC GAU
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA GAG
F	Phe	Фенилаланин	UUC UUU
G	Gly	Глицин	GGA GGC GGG GGU
H	His	Гистидин	CAC CAU
I	Ile	Изолейцин	AUA AUC AUU
K	Lys	Лизин	AAA AAG
L	Leu	Лейцин	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Метионин	AUG
N	Asn	Аспарагин	AAC AAU
P	Pro	Пролин	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Глутамин	CAA CAG
R	Arg	Аргинин	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Серин	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Треонин	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Валин	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC UAU

Оқсил молекулалари узунлиги 40 дан 1000 гача аминокислота қолдиқлари оралиғида бўлиб, бунда уларнинг кетма-кетлиги ва таркибидаги аминокислоталар билан боғлиқ ҳолда оқсиллар молекулалари турли шаклга (конфигурация, конформация) эга бўлади. Аксарият функционал фаол оқсиллар бир хил ва бир биридан бир мунча фарқ қиладиган икки ёки ундан ортиқ полипептид занжирлардан (суббирликлар) ташкил топган. Бундан ташқари, асосий функцияларни бажарадиган оқсиллар кўпгина турли суббирликлардан ташкил топган мураккаб оқсил комплексларидир.

Генетик ахборотнинг нуклеотидлар тилидан аминокислоталар тилига ўтишида тўғри таржима қилинишида ДНКнинг муайян соҳаларида матрицалардаги каби уларнинг нуклеотид кетма-кетлигига мос равишда синтезланадиган рибонуклеин кислоталар (РНК) муҳим “ўтказувчи восита” ҳисобланади. РНК – бу ДНКдан икки жиҳатдан фарқ қилувчи чизиқли полинуклеотид молекула. Биринчидан, РНКнинг моносахариди бўлиб 2'- ва 3'-углерод атоми билан боғланган бир эмас, балки иккита гидроксил гуруҳини тутувчи рибоза ҳисобланади. Иккинчидан, РНКда тўрт асослардан бири тимин ўрнини босувчи урацил (U) ҳисобланади. РНКнинг молекулаларида икки занжирли тузилмалар – “шпилкалар”ни ҳосил

ДНК-матрицасида РНК синтезланиши **транскрипция** деб аталади. Аксарият прокариотларда барча РНК транскрипцияси айнан ўша РНК-полимераза ёрдамида амалга оширилади. Эукариотларда мРНК, рРНК ва тРНК турли РНК-полимеразалар ёрдамида транскрипцияланади.



Транскрипция кўп жихатдан репликация билан ўхшаш. РНК синтезида ДНК занжирларидан бирининг муайян бир соҳаси матрица бўлиб хизмат қилади. РНК-полимераза рибонуклеотидларни комплементарлик қоида­сига мувофиқ 3'-5'-фосфодиэфир боғламлари ёрдамида бир-бири билан кетма-кет бирлаштириб нусхалайди (расм 5.3).



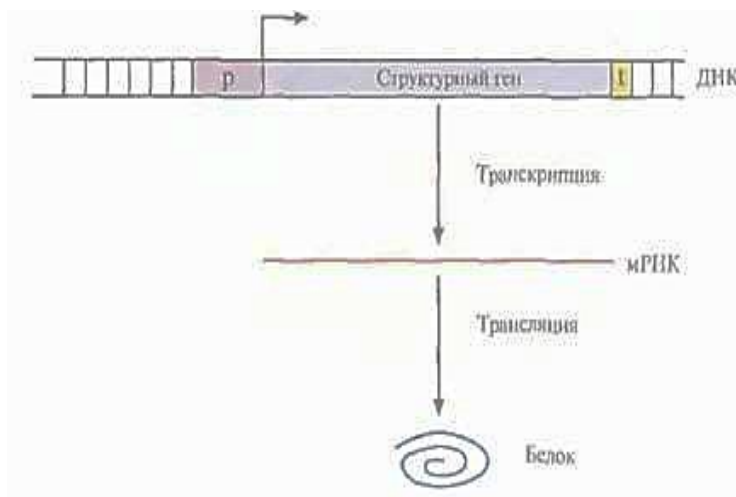
Расм 5.3. Транскрипциянинг схематик тасвири. Стрелка билан унинг йўналиши кўрсатилган. (Глик ва Пастернак бўйича)

Транскрипция давомида РНКнинг янги синтезланган молекуласи ДНКдан ажралади, ва ДНКнинг қўш спирали тикланади. ДНК алоҳида сегментларининг транскрипциясини таъминлаш учун қаерда транскрипция бошланиши (инициацияланиши) ва қаерда тўхташини (терминацияланиши) кўрсатувчи қандайдир сигнал кетма-кетлиги мавжуд бўлиши керак. Инициация сигнали одатда кодланадиган кетма-кетликдан олдин, терминация сигнали эса — ундан кейин жойлашади.

ДНКнинг транскрипцияланадиган генидан олдин жойлашган соҳаси 5'-фланкирловчи, кейин жойлашган соҳаси эса — 3'-фланкирловчи кетма-кетлик деб номланади.

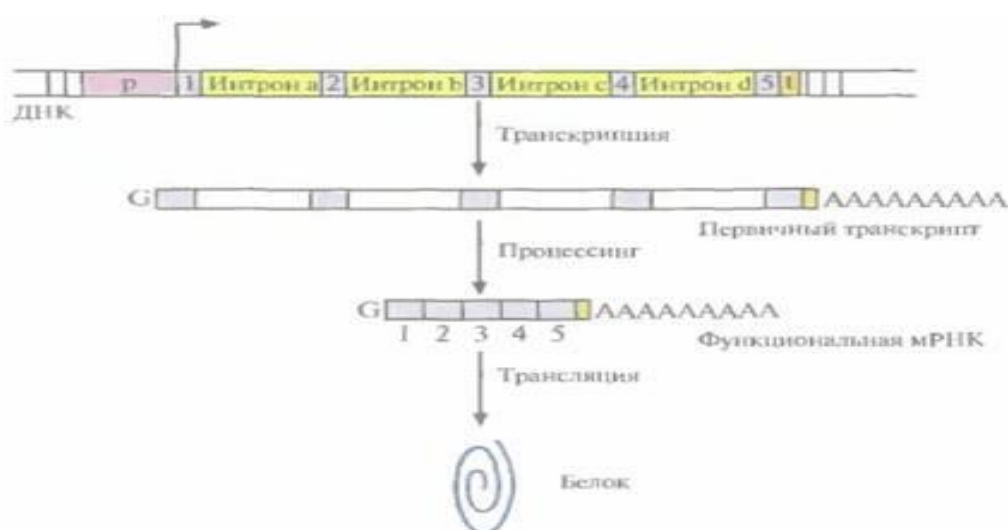
Молекуляр нуқтаи назардан ген РНКга транскрипцияланадиган ўзига хос нуклеотид кетма-кетлигини ифодалайди. Транскрипцияланадиган ДНК кетма-кетлигининг аксарият қисмини структуравий генлар деб аталадиган генлар ташкил қилади. Уларда мРНК синтезланади. Структуравий геннинг охириги маҳсулоти оксил ҳисобланади. Прокариотларда структуравий ген ДНК молекуласининг узлуксиз қисмини ифодалайди.

Транскрипция РНК-полимеразанинг промотори билан бирлашишидан бошланади, ва кейин бутун структуравий ген (кодловчи соҳа) биринчи нуклеотиддан охириги нуклеотидгача функционал мРНКни ҳосил қилиб нусхаланади (расм 5.4).



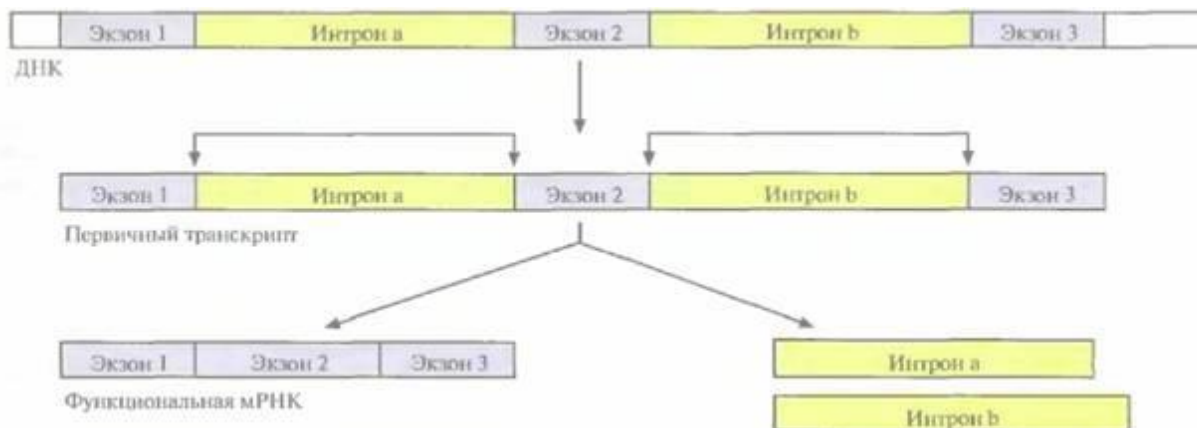
Расм 5.4. Прокариотик структурвий геннинг схематик тасвири. Промотор (р), транскрипция инициацияси сайти ва унинг йўналиши (горизонтал стрелка), РНК-полимераза билан аниқланадиган терминация транскрипцияси соҳаси (t) кўрсатилган. Даставвал ДНКда матрицадаги каби мРНК синтезланади (транскрипция), кейин эса оксил занжири синтези амалга ошади (трансляция). (Глик ва Пастернак бўйича)

Эукариотларда структурвий генларнинг аксарияти кодламайдиган соҳалар (интронлар) билан ажралган бир нечта дискрет кодловчи соҳалардан (экзонлар) ташкил топган. Эукариотик структурвий ген транскрипцияси якун топиши билан транскрипция бирламчи маҳсулотидан ферментлар ёрдамида интронлар кесилиб чиқади, экзонлар эса бир бири билан “ён томони ён томонга” функционал мРНК ҳосил қилиб бирикади (сплайсинг) (расм 5.5 ва 5.6).



Расм 5.5. Эукариотик структурвий геннинг схематик тасвири. Промотор (р), транскрипция инициацияси сайти ва унинг йўналиши (горизонтал стрелка), РНК-полимераза билан аниқланадиган терминацияси соҳаси (t) кўрсатилган. 1-5 - экзонлар, a-d - интронлар.

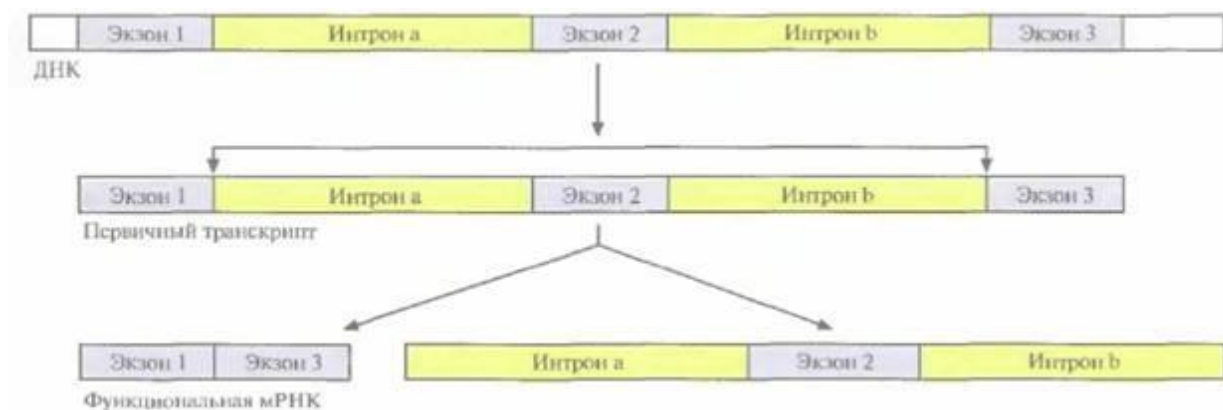
Бирламчи транскрипт 3'-учида poly(A)-«дум» ва 5'-учида метилирланган нуклеотид G («кэп») сақлайди. Транскрипциядан кейин интронлар бирламчи транскриптдан кесиб чиқарилади (процессинг) ва ҳосил бўлган функционал РНКда оксил молекуласи синтезланади (трансляция) (Глик ва Пастернак бўйича).



Расм 5.6. Эукариотларда бирламчи транскрипт сплайсинги. Бурчакли стрелкалар билан а ва б интронлар йўқ қилингандан кейин 1,2 ва 3 экзонларнинг бирлашган жойлари кўрсатилган (Глик ва Пастернак бўйича).

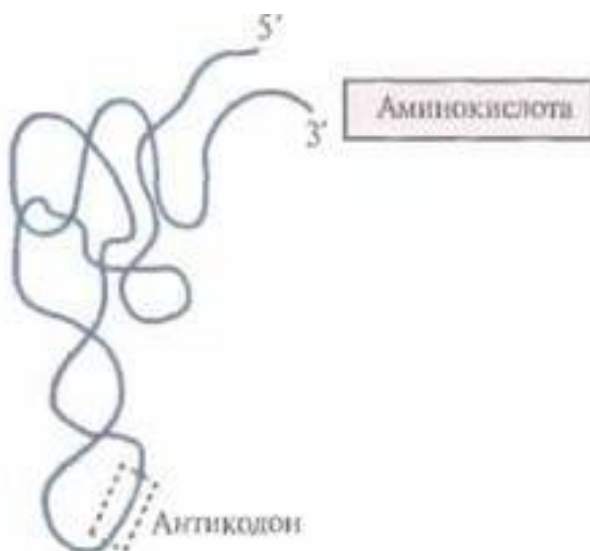
Одатда экзонлар узунлиги 150 дан 200 гача нуклеотидлардан иборат, интронлар узунлиги эса 40 дан 10 000 гача нуклеотидлар оралиғида бўлади. Интронсиз эукариотик структуравий генлар жуда кам учрайди. Баъзан мРНК сплайсинги альтернатив вариант бўйича ўтади. Масалан, баъзи бир тўқималарда функционал мРНК бирламчи транскриптнинг барча экзонларининг бирлашиши натижасида ҳосил бўлиши мумкин, бошқаларида қандайдир экзон уни фланкирловчи интронлар билан бирга кесиб олинади ва бошқа функционал мРНК ҳосил бўлади. Альтернатив сплайсинг туфайли турли хил тўқималарда айнан бир структуравий геннинг турли хил маҳсулотлари ҳосил бўлиши мумкин (расм 5.7).

Фаол функция олиб борадиган ҳужайрада умумий РНКнинг 3-5%и мРНК улушига, 90%и – рРНК ва 4%и – тРНК улушига тўғри келади. мРНК ўнлаб ҳар хил турдаги молекулалар орқали, рРНК эса атиги икки турдаги молекулалар орқали намоён бўлиши мумкин. Янада йирикроқ рРНК оксиллар билан рибосома суббирлиги деб номланган рибонуклеопротеидли комплекс, кичик ўлчамли рРНК эса кичик рибосома суббирлиги деб номланган комплексни ҳосил қилади. Оксиллар синтези вақтида суббирликлар рибосомалар ҳосил қилиб бирлашади. Эукариотларда иккала рибосомал суббирликлар прокариотлардагига қараганда йирикроқ бўлади.



Расм 5.7. Эукариотларда бирламчи транскриптнинг альтернатив сплайсинги. Стрелкалар билан интронлар йўқ қилингандан кейин экзонларнинг бирлашган жойлари кўрсатилган. 1,2 интрон билан фланкирланган экзон 2 бирламчи транскриптдан ажратилади, экзон 1 ва 3 эса функционал фаол мРНКни ҳосил қилиб бирлашади (Глик ва Пастернак бўйича).

Минглаб рибосомалардан ташқари оксилларни фаол синтезлайдиган ҳужайрада тРНКнинг 60 тагача ҳар хил турлари бор. тРНК – бу чизикли бир занжирли узунлиги 75 тадан 90 тагача нуклеотидлардан иборат бир занжирли молекула. Унда бир-бири билан жуфтлашадиган бир нечта ўзаро комплементар соҳалар мавжуд (расм 5.2), бутун молекула эса L ҳарфини эслатадиган структура ҳосил қилиб фазода жойлашади L (расм 5.8).

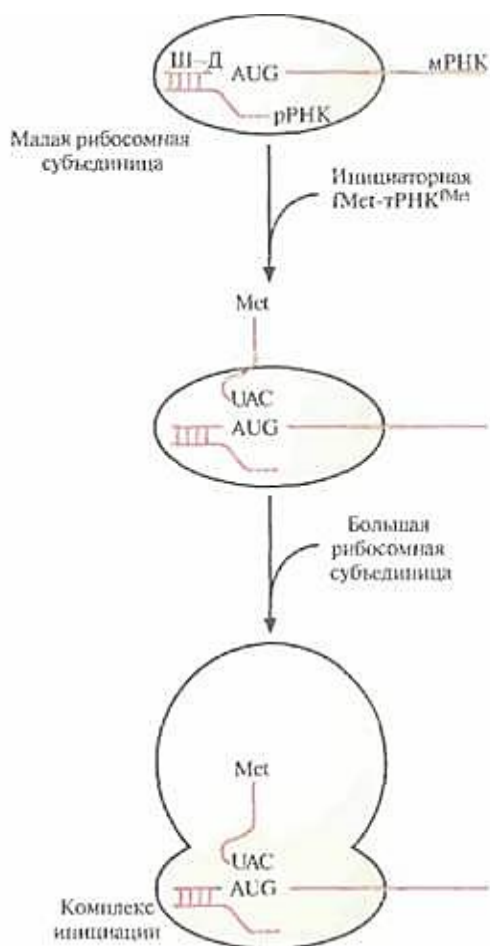


Расм 5.8. Аминокислота билан “юкланган” тРНК конформацияси. Штрихли тўғри тўртбурчак – антикодон. (Глик ва Пастернак бўйича)

Специфик ферментлар (аминоацил-тРНК-синтетазалар) ёрдамида тРНКнинг 3'-учига мос келувчи аминокислота бирлашади. Шундай қилиб, аргинил-тРНК-синтетаза ферменти тРНК^{Arg} молекуласига аргинин аминокислотасини бирлаштиради. Барча оксилларни ташкил қилган йигирмата аминокислотанинг ҳар бири учун ҳеч бўлмаганда битта специфик тРНК мавжуд. тРНК молекуласининг бошқа учида антикодон деб номланган уч нуклеотиддан иборат кетма-кетлик жойлашган. Мазкур кетма-кетлик мРНКдаги специфик кодонни аниқлайди ва ўсиб бораётган полипептид занжирга қайси аминокислота бирлашишини белгилайди.

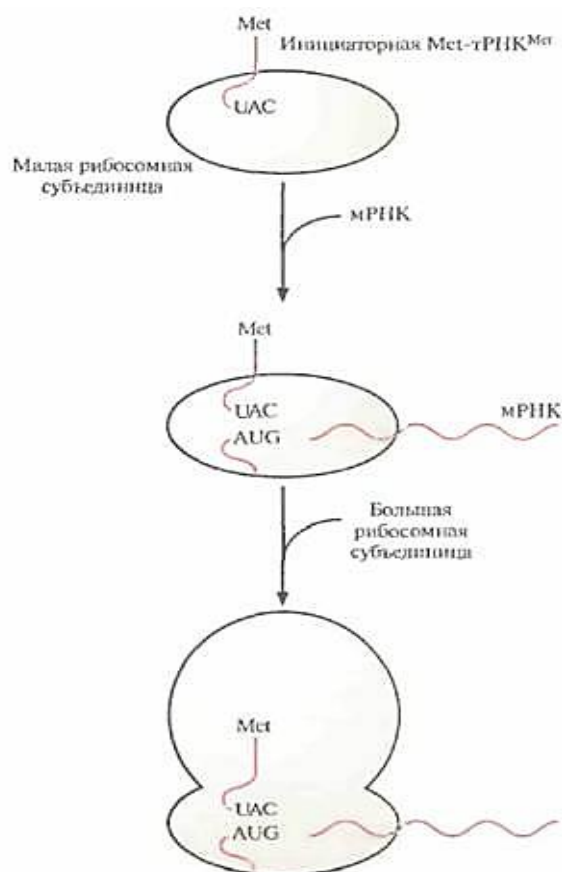
Трансляция

Трансляция мРНК, полипептид занжирининг инициация, элонгация ва синтез терминациясини таъминлайдиган мос келувчи аминокислоталар, рибосомалар ва кўпгина оксил омиллари билан “юкланган” турли хил тРНК иштирокида амалга оширилади. Прокариотик хужайраларда трансляция инициатор тРНК деб номланган формилметионинли тРНК билан инициацияланади. Инициатор тРНК^{fMet}нинг (fMet – амин гуруҳи формилирланган ўзгартирилган метионин) 3'-UAC-5' антикодони кичик рибосомали суббирлик билан комплекс ҳосил қилувчи мРНКнинг 5'-AUG-3' кодони билан бирлашади. Бошқа ҳеч қайси тРНК ушбу комплекс билан бирлаша олмайди. Ўз навбатида мРНКнинг кичик рибосомали суббирлик билан бирлашиши мРНКнинг 5'-учи яқинида жойлашган тахминан саккиз нуклеотиддан иборат кетма-кетликлар (Шайн-Дальгарно кетма-кетлиги) ва кичик рибосомали суббирлик билан бирлашган рРНК комплементар 3'-учлиги кетма-кетлиги ўртасида нуклеотидлар жуфтликлари ҳосил бўлиши орқали амалга оширилади. fMet-тРНК^{fMet}-мРНК-кичик суббирлик комплексига катта суббирлик бирлашади ва инициатор комплексни ҳосил қилади (инициация комплекси) (расм 5.9).



Расм 5.9. Прокариотик хужайрада трансляция инициацияси. мРНК 5'-учи яқинида жойлашган Шайн-Дальгарно (Ш-Д) кетма-кетлиги кичик рибосомали суббирлик билан комплекс ҳосил қиладиган рРНК комплементар 3'-учлиги кетма-кетлиги билан бирлашади. Инициатор $fMet\text{-}tRNA^{fMet}$ антикодони (UAC) инициатор $fMet\text{-}tRNA^{fMet}$ мРНК старт-кодони (AUG) билан жуфтлашади. Ҳосил бўлган комплексга катта рибосомали суббирлик бирлашади ва инициация комплекси ҳосил бўлади. Инициатор тРНК билан бирлашган метионин амин гуруҳи формилирланган (СНО) (расмда кўрсатилмаган). Трансляциядан кейин формилметионин оксил занжиридан ажралиб чиқади. (Глик ва Пастернак бўйича)

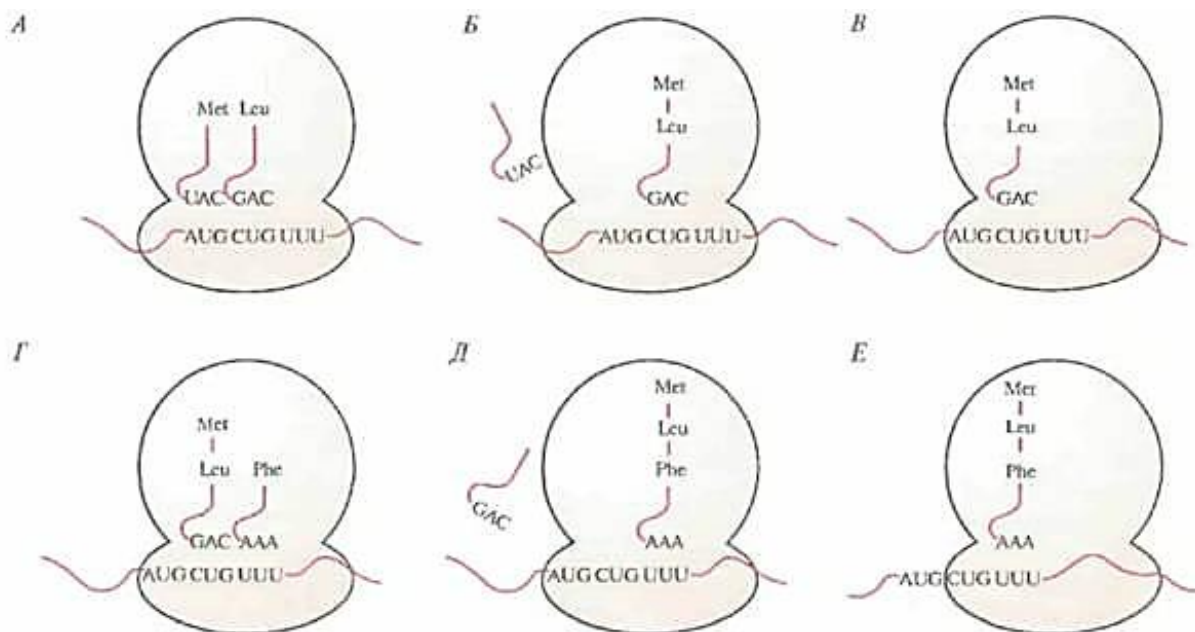
Эукариотларда трансляция специфик “юкланган” инициатор тРНК ($Met\text{-}tRNA^{Met}$) ва инициация омилларининг кичик рибосомали суббирликнинг бирлашиши билан бошланади. Кейин мРНК ўзининг 5'-учи билан тРНК-кичик рибосомали суббирлик комплексига бирикади, ва комплекс мРНК бўйлаб старт-кодонгача (AUG) сурилиб боради. Кейин инициатор $Met\text{-}tRNA^{Met}$ антикодони UAC мРНК кодони AUG билан жуфтлашади. Комплексга катта рибосомали суббирлик бирлашади ва инициатор комплекс ҳосил бўлади (расм 5.10.)



Расм 5.10. Эукариотик хужайрада трансляция инициацияси. Кичик рибосома суббирлиги метионин (Met-тРНК^{Met}) билан “юкланган” инициатор тРНК билан боғланади, комплекс мРНК бўйлаб, инициатор тРНК антикодони UAC мРНК старт-кодони AUG билан жуфтлашгунга қадар давом этади. Кейин мРНК-тРНК-кичик суббирлик комплекси катта суббирлик бирлашади ва инициация комплекси ҳосил бўлади (Глик ва Пастернак бўйича)

Элонгация ва терминация босқичлари про- ва эукариотларда кўп жихатдан ўхшаб кетади. Элонгация жараёни қўшни аминокислоталар ўртасида пептид боғламлари ҳосил бўлишини ўз ичига олади, бунда бирлашаётган аминокислоталар тартиби мРНКдаги кодонлар кетма-кетлиги билан белгиланади (расм 5.11.). Жараённи янада батафсилроқ кўриб чиқамиз.

Инициатор комплекс ҳосил бўлгач, AUG кодонидан кейин келадиган мРНК молекуласидаги кодон мос келадиган тРНКнинг ўзига комплементар кодони билан жуфтлашади ва бу билан юклатилган тРНКнинг қайси бири рибосомага бирлашишини белгилайди (юклатилмаган тРНК рибосомалар билан боғланмайди). Агар мРНКда иккинчи триплет CUG бўлса, у ҳолда навбатдаги рибосомали комплексга лейцин ташувчи тРНК 3'-GAC-5' антикодон билан бирлашади. Мазкур тРНК ўрнида ҳозир бўлганда, метионин карбоксил гуруҳи ва лейцин аминогуруҳи ўртасида катта суббирликка тегишли бўлган ферментатив фаоллик ёрдамида пептид боғлам ҳосил бўлади, бунда лейцин ўзининг тРНКси билан боғлиқлигича қолади, метионин эса инициатор тРНКдан ажралиб чиқади, ва тРНК рибосомалардан ҳоли бўлади.

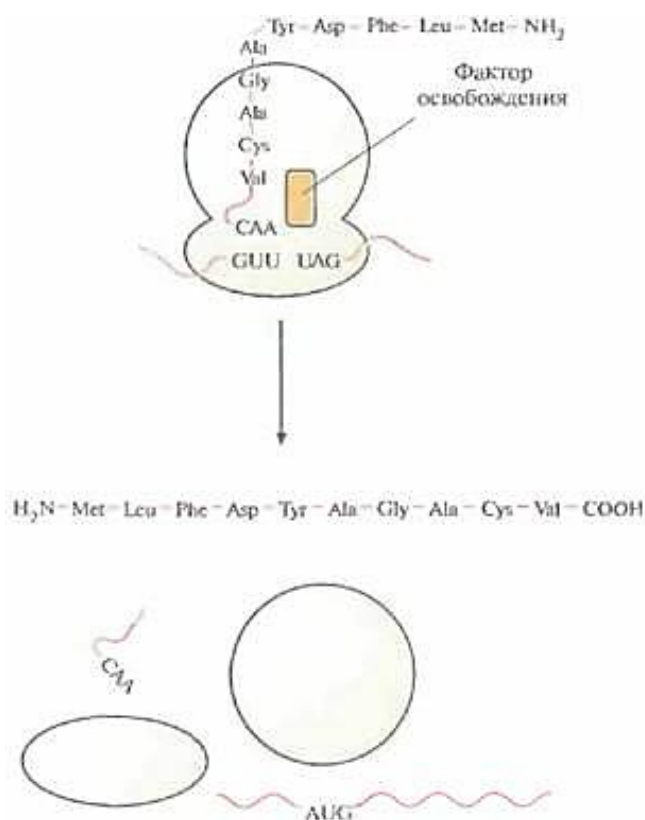


Расм 5.11. Полипептид занжир элонгацияси, А. мРНКдаги иккинчи кодон (CUG) Leu-тРНК^{Leu} даги антикодон (GAC) билан боғланади. Б. Метионин тРНК^{Leu} етказиб берган лейцин билан пептид боғламини ҳосил қилади, аминокислотадан озод бўлган инициатор тРНК ажралади. В. Пептидил-тРНК--мРНК комплекси транслокацияси навбатдаги кодон (UUU) экспонирланиши билан. Г. учинчи кодон (UUU) антикодон AAA Phe-тРНК^{Phe} билан жуфтлашади. Д. Лейцин тРНК^{Phe} етказиб берган фенилаланин билан пептид боғламини ҳосил қилади, аминокислотадан озод бўлган тРНК^{Leu} рибосомадан ажралади. Е. пептидил-тРНК-мРНК комплекси транслокацияси навбатдаги кодон экспонирланиши билан, ва х.к. (Глик ва Пастернак бўйича)

Метионин-лейцин-тРНК^{Leu}-мРНК комплекси рибосома орқали “тортилади” (транслокация), шундай бўлгач мРНКнинг навбатдаги кодони мос келувчи антикодонни ташувчи юклатилган тРНК билан боғланиши мумкин. мРНКнинг учинчи кодони UUU бўлса, ўсиб бораётган полипептид занжирда навбатдаги аминокислота фенилаланин бўлади; уни рибосомага AAA антикодонли тРНК етказди. Мазкур тРНК ўрнида ҳозир бўлганда, лейциннинг карбоксил гуруҳи ва фенилаланиннинг аминогуруҳи ўртасида пептид боғлам ҳосил бўлади. тРНК^{Leu} рибосомадан ажралади, пептидил-тРНК^{Phe} (тРНК ўзига бириккан ўсиб бораётган полипептид занжир билан), мРНК навбатдаги кодони мос келувчи антикодонни ташувчи юклатилган тРНК билан боғланиши мумкин.

Мазкур ҳодисалар – кодоннинг антикодон билан жуфтлашиши туфайли юклатилган тРНКнинг мРНК билан боғланиши, пептид боғлам ҳосил бўлиши, “бўшатиш” тРНК ажралиши, транслокация – мРНКда кодланган барча аминокислоталар бир-бири билан боғлангунга қадар давом этади. Трансляция 5'-3' йўналишида тахминан бир дақиқада 15 аминокислота тезлигида содир бўлади. мРНКнинг 5'-учи рибосомали комплексдан ажралганда у бошқа шундай комплекс билан боғланиши мумкин, шундай экан мРНК битта молекуласи бир вақтнинг ўзида кўплаб рибосомалар билан трансляцияланиши мумкин.

Элонгация рибосома UAA, UAG ёки UGA кодонларига (стоп-кодон, терминациялаш кодони) етиб боргунча давом этади (расм 5.12.). Нормада ҳужайраларда терминация сигналларига комплементар тРНК антикодонлари бўлмайди. Уларни бўшаш оқсил омиллари (терминация) аниқлайдилар. Бўшаш омилнинг рибосома билан боғланишида охирги тРНК ва полипептид ўртасидаги боғлам гидролизланади, эркин тРНК, полипептид занжири ва мРНК рибосомадан ажралади. Рибосома яна трансляцияда иштирок этиши мумкин бўлган суббирликларга ажралади.



Расм 5.12. Трансляция терминацияси. Стоп-кодон билан(UAG) бўшаш омили боғланади ва трансляция якунланади. Охирги тРНК ва полипептид занжири ўртасидаги кимёвий боғланиш узилади, эркин тРНК, мРНК ва тайёр оқсил занжири рибосомадан ажралади, ва рибосома суббирликларга бўлинади. (Глик ва Пастернак бўйича)

Трансляциядан кейин аксарият полипептидларда турли хил ўзгаришлар (модификациялар) юзага келади. Уларнинг кўпчилигида N-учидаги метионин ажралиб чиқади, шундай экан, N-учи қолдиғи иккинчи аминокислота бўлади. Эукариотларда баъзи оксилларда муайян сайтларда полипептид занжири специфик функцияли калтароқ оксил молекулаларига парчаланганда процессинг деб номланган жараён содир бўлади. Баъзи ҳолларда, айниқса эукариотик ҳужайраларда муайян аминокислоталарга ферментатив йўл билан фосфат гуруҳлари, липидлар, углеводлар ва бошқа паст молекулали бирикмалар бирикади. Мазкур кимёвий ўзгаришлар натижасида ҳужайрада специфик функцияни бажарадиган оксиллар ҳосил бўлади.

мРНК синтези ва мос келувчи оксил синтези қатъий бошқарилиши зарур, чунки ҳужайрада барча структуравий генларнинг бир вақтдаги транскрипцияси ва трансляцияси учун зарур бўлган ресурслар етарли эмас. Прокариотлар ҳам эукариотлар ҳам ҳар доим фақат асосий ҳужайравий функцияларни бажариш учун зарур бўлган мРНКни синтезлайди. Қолган структуравий генлар экспрессияси муайян оксилга (оксиллар) эҳтиёж пайдо бўлганда транскрипциясини ишга туширадиган бошқарувчи тизимларнинг қатъий назорати остида амалга оширилади.

Прокариотларда транскрипция РНК-полимеразанинг структуравий ген ёки опероннинг промотор соҳаси ТАТА ва TTGAC кетма-кетликлари билан боғланишидан бошланади. Баъзи оперонларнинг киритилиши ёки чиқарилиши оксил-репрессор конформациясини ўзгартирадиган эффе́ктор ёрдамида амалга оширилади ва транскрипция блокранишига тўсқинлик қилади. Ҳужайрада эффе́ктор концентрацияси пасайганда репрессор ДНКнинг транскрипция инициацияси сайтига туташган соҳаси билан боғланади, ва РНК-полимеразанинг ДНК молекуласи бўйлаб ҳаракатланишига тўсқинлик қилади ва бу билан транскрипцияни блоклайди. Бошқа оперонларда транскрипция тезлигини оширадиган оксил-фаоллаштирувчи (активатор) транскрипция инициацияси сайти билан қўшни бўлган ДНК соҳаси билан боғланади. Эффе́кторнинг активатор билан боғланиши транскрипция тезлигини пасайтириши мумкин, транскрипция бошқарилишига жавобгар

бўлган ДНК-оқсил ўзаро таъсири, ДНК, РНК ва оқсил синтези муайян структуравий генлар ёки оперонларга нисбатан қатъий спецификдир.

Эукариотларда структуравий генларни транскрипциялайдиган РНК-полимераза II оқсилларнинг бутун бир тўплами – промотор соҳаси ТАТА-кетма-кетлигига бирин кетин бирикадиган транскрипция омиллари билан боғланади. Транскрипция бошланиши ва тўхташи учун ДНКнинг мос келадиган соҳалари билан боғланадиган транскрипция қўшимча омиллари масъулдир.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Полипептид занжири элонгацияси жараёнини тавсифланг.
2. Қуйидаги аминокислоталар кетма-кетлигини кодлаш эҳтимоли юқори бўлган нуклеотид кетма-кетлиги қайси: MAGGTWYQLFPRKMWNDSTLHPFILPMNVAG.
3. Қуйидаги нуклеотид кетма-кетлиги қайси аминокислоталар кетма-кетлигига жавобгар: GCGAUCGACGAUGUUUCUAAAAGUAU CUCAUCGAAAUG AGGGUUCG UAAUAGCGACCCGGGCGG.
4. Оперон нима? Унинг биологик роли нимадан иборат?
5. Прокариотларда транскрипция бошқарилишининг уч турли хил усули ҳақида айтиб беринг.
6. Эукариотик структуравий генлар транскрипциясига жавобгар асосий ДНК элементларини тавсифланг.

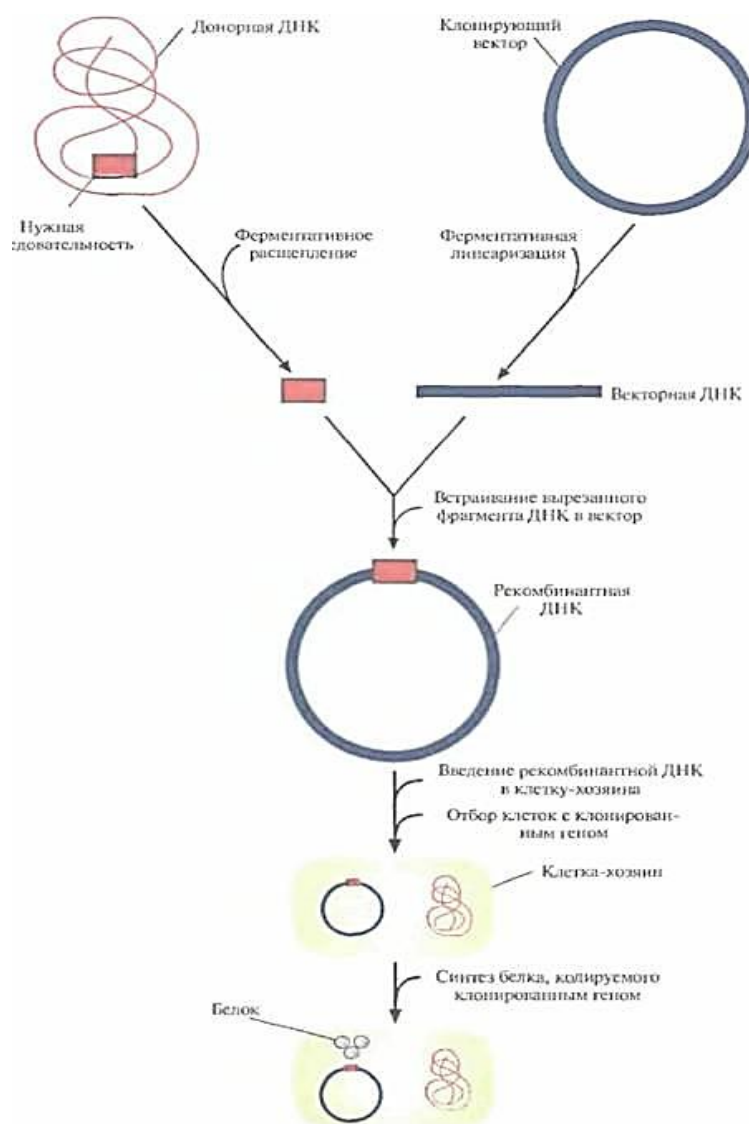
§ 6. Рекомбинант ДНК технологияси

1. *Рекомбинант ДНК билан тажриба схемаси*
2. *Рестрикция ферментлари*
3. *Клонлаш учун вектор тушунчаси*
4. *II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалар*
5. *Рестрикция сайтларини хариталаш*

Рекомбинант ДНК технологияси (уни яна молекуляр клонлаш ёки ген муҳандислиги деб ҳам аталади) – генетик материални (дезоксирибонуклеин кислотаси, ДНК) бир организмдан бошқа организмга кўчиришни амалга ошириш имконини берадиган тажриба тадбирларининг йиғиндиси. Бу ерда усулларнинг ҳеч қандай универсал тўплами мавжуд эмас, лекин кўпинча рекомбинант ДНК

билан ўтказиладиган тажрибалар қуйида келтирилган схема бўйича олиб борилади (расм 6.1).

Расм 6.1. Рекомбинант ДНК клонлиниши. Донор ДНКни рестрикцияловчи эндонуклеаза томонидан парчаланиб клонловчи векторга киритилади. Олинган конструкция хўжайин-хужайралар популяциясига киритилади, рекомбинант ДНК тутган хужайралар идентификацияланиб, улар экилади. Зарур бўлганда хўжайин-хужайраларда генларни экспрессиясини индукциялаш орқали кодланган оқсилни олиш мумкин (Глик ва Пастернак бўйича)



•Организмдан — керакли генлар доноридан — натив ДНК экстракцияланади (клонланадиган ДНК, киритиладиган ДНК, ДНК-нишон, бегона ДНК), у ферментатив гидролизга таъсирланади (қисмларга ажратилади, кесилади) ва бошқа ДНК (клонлаш учун вектор, клонловчи вектори) билан бирлаштириб (лигирланади, тикилади) янги рекомбинант молекула ҳосил қилинади («клонловчи вектор-киритилган ДНК» конструкцияси).

•Ушбу конструкция хўжайин-хужайрага киритилади (реципиент), бу ерда у репликацияланади ва авлодларга ўтади. Мазкур жараён трансформация деб аталади.

• Рекомбинант ДНК ташувчи хужайралар (трансформацияланган хужайралар) идентификацияланади ва танлаб олинади.

•Хўжайин-хужайралар томонидан специфик оксил маҳсулоти олиниши мақсадли ген клонланганлигини тасдиқлайди.

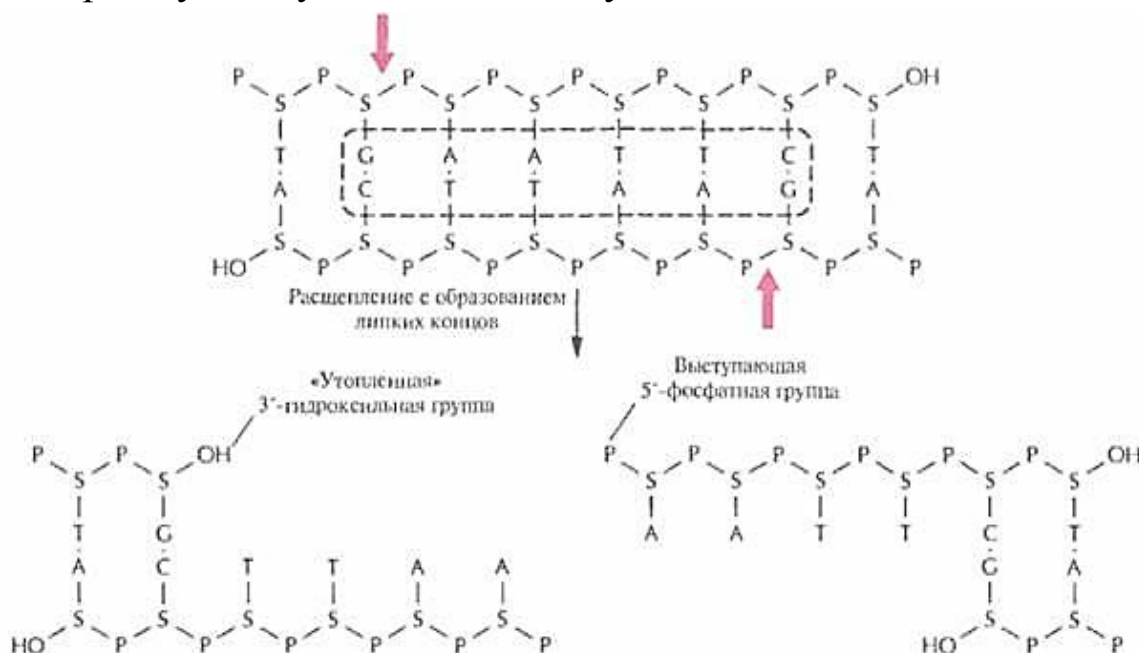
Молекуляр биология, нуклеин кислоталар энзимологияси, бактериал вирусларнинг молекуляр генетикаси ҳамда бактерияларнинг хромосомадан ташқари элементлари (плазмидалар) соҳасидаги ихтиролар рекомбинант ДНК технологиясини яратишга замин бўлиб хизмат қилди. Рекомбинант молекулаларнинг конструкцияланиши мазкур мураккаб жараён деярли барча босқичларининг мажбурий ва алмаштириб бўлмайдиган инструменти – ферментларнинг бутун бир арсенали ёрдамида амалга оширилади. Сўз даставвал ДНКни икки занжирли молекуласидаги специфик нуклеотидлар кетма-кетликларини аниқлайдиган ва парчалайдиган рестрикция ферментлари (рестрикцияловчи эндонуклеазалар, рестриктазалар) ҳақида боради.

Рестрикцияловчи эндонуклеазалар

Молекуляр клонлашда фрагментларнинг дискрет ва қайта тикланадиган тўплами ҳосил бўлиши билан донор ва вектор ДНК бўлиниши қатъий муайян соҳаларда (сайтларда) содир бўлиши муҳим. Молекуляр клонлашга ДНК икки занжирли молекуласида асосларнинг муайян кетма-кетлигини аниқлайдиган ва иккала занжирни парчалайдиган юқори специфик бактериал ферментлар ажратиб олингандан кейин имкон яратилди. Мазкур ферментлар II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалар деб номланади.

Дастлабки II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалардан бири *Escherichia coli* дан ажратиб олинган ва *EcoRI* номини олган. Ушбу фермент олти жуфт асосдан иборат специфик палиндром кетма-кетлик (иккала занжирда 5'-->3' йўналишда ўқилганда айнан ўхшаш) сақловчи ДНК соҳасини аниқлайди ва бир нуклеотиднинг шакарли қолдиғининг 3'-углерод атоми яқинидаги кислород атоми билан қўшни нуклеотиднинг шакар қолдиғининг 5'-углерод атомига бириккан фосфат гуруҳи ўртасидаги боғламни парчалаб ҳар бир занжирдаги гуанин ҳамда аденин қолдиқлари ўртасига узилиш киритади (расм 6.2). ДНК занжиридаги узилишлар бир биридан қиямасига жойлашган ва бунинг натижасида ҳар бирида тўрт нуклеотиддан иборат “думлар” бўлган бир занжирли комплементар учлар (ёпишқоқ учлар) ҳосил бўлади. Ҳар қайси бир занжирли “дум”

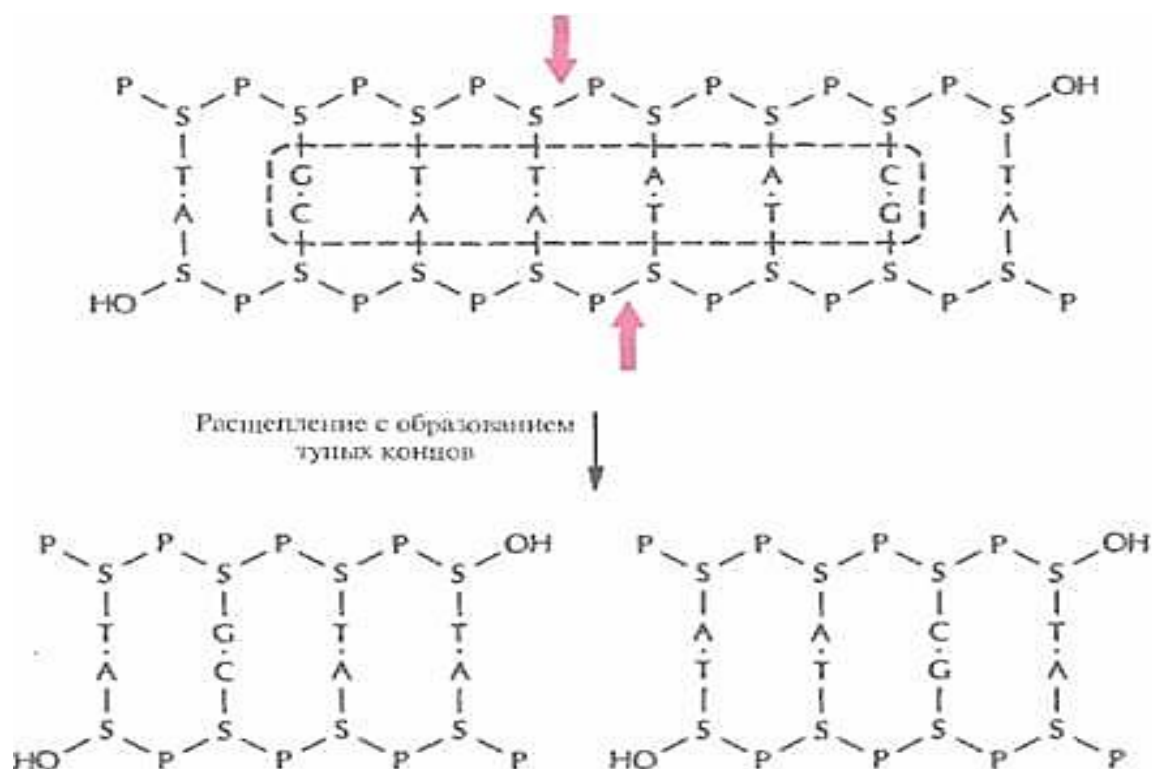
5'-фосфат гуруҳи билан, 3'-гидроксил гуруҳи эса қарама-қарши занжирда худди чўкиб кетгандай тугайди.



Расм 6.2. ДНК қисқа фрагментининг II типдаги *EcoRI* рестрикцияловчи эндонуклеаза билан ёпишқоқ учлар ҳосил қилиб бўлиниши. Стрелкалар – шакарфосфат рамкада бўлиниш содир бўладиган боғламлар. S – дезоксирибоза. P – фосфат гуруҳи, OH – гидроксил гуруҳи. *EcoRI* томонидан аниқланадиган кетма-кетлик штрихли чизиқ билан ажратилган. (Глик ва Пастернак бўйича)

EcoRI дан ташқари бактериал ҳужайралардан юзлаб II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалар олинди. Ушбу эндонуклеазаларга *EcoRI* даги каби тамойил бўйича ном берилади: микроорганизм авлоди босма ҳарф билан, микроорганизм тури эса иккита кичик ҳарф билан, штамм одатда кўрсатилмайди. Рим рақамлари – бошқа рестриктазалар қаторидаги ушбу микроорганизмдан ажратиб олинган мазкур эндонуклеазанинг тартиб рақами. Масалан, *HpaI* ва *HpaII* – бу мос равишда *Haemophilus parainfluenzae* дан ажратиб олинган II типдаги биринчи ва иккинчи рестрикцияловчи эндонуклеазалар.

II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалар томонидан аниқланадиган ва ДНК молекулалари парчаланадиган палиндром кетма-кетликлар таниш сайтлари деб аталади. Полинуклеотид занжирларини ёпишқоқ учлар ҳосил қилиб гидролизлайдиган (парчалайдиган) рестриктазалардан ташқари занжирларга “тўмтоқ” учлар билан ДНК фрагментларини ҳосил қилиб қатъий бир-бирига қарши узилишлар киритадиган рестриктазалар ҳам мавжуд (расм 6.3).



Расм 6.3. ДНК қисқа фрагментининг II типдаги *Hind*III рестриктаза билан тўмтоқ учлар ҳосил қилиб бўлиниши. Стрелка – шакарфосфат рамкада бўлиниш содир бўладиган боғламлар. Ҳарфли белгилар – 4.2 расмда кўрсатилганлар. *Hind*III рестриктаза томонидан танилган кетма-кетлик штрихли чизик билан ажратилган. (Глик ва Пастернак бўйича)

Таниш сайтлари тўрт, беш, олти, саккиз ва ундан кўп нуклеотидлардан ташкил топиши мумкин (жадвал 6.1).

Таниш сайти узунлигидан унинг ДНК молекуласида тарқалиш тезлиги боғлиқ бўлади; кўпчилик ҳолатларда тетра- ва гексануклеотидларни танийдиган рестриктазалар қўлланилади.

II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалар генли клонлашда муҳим роль ўйнайди. ДНК намунасига муайян рестриктаза билан ишлов бериш ҳар доим фрагментларнинг айнан ўша тўпламини беради – бўлиниш барча таниш сайтларида содир бўлиш шarti билан. Агар бир нечта рестрикция ферментларидан фойдаланилса ва дастлаб ҳар бир рестриктаза ДНКсига алоҳида, кейин эса комбинация қилиб ишлов берилса, мазкур ДНКни физик харитасини тузиш мумкин, яъни молекула бўйлаб рестрикция сайтларининг кетма-кет жойлашиш тартибини ўрнатиш мумкин. Олинган фрагментларнинг ўлчамини гель-электрофорез ёрдамида аниқлаб, рестрикция сайтларининг ўрнини топиш мумкин.

Жадвал 6.1.

Баъзи рестрикция ферментлари билан аниқланадиган нуклеотид кетма-кетликлари (Глик ва Пастернак бўйича)

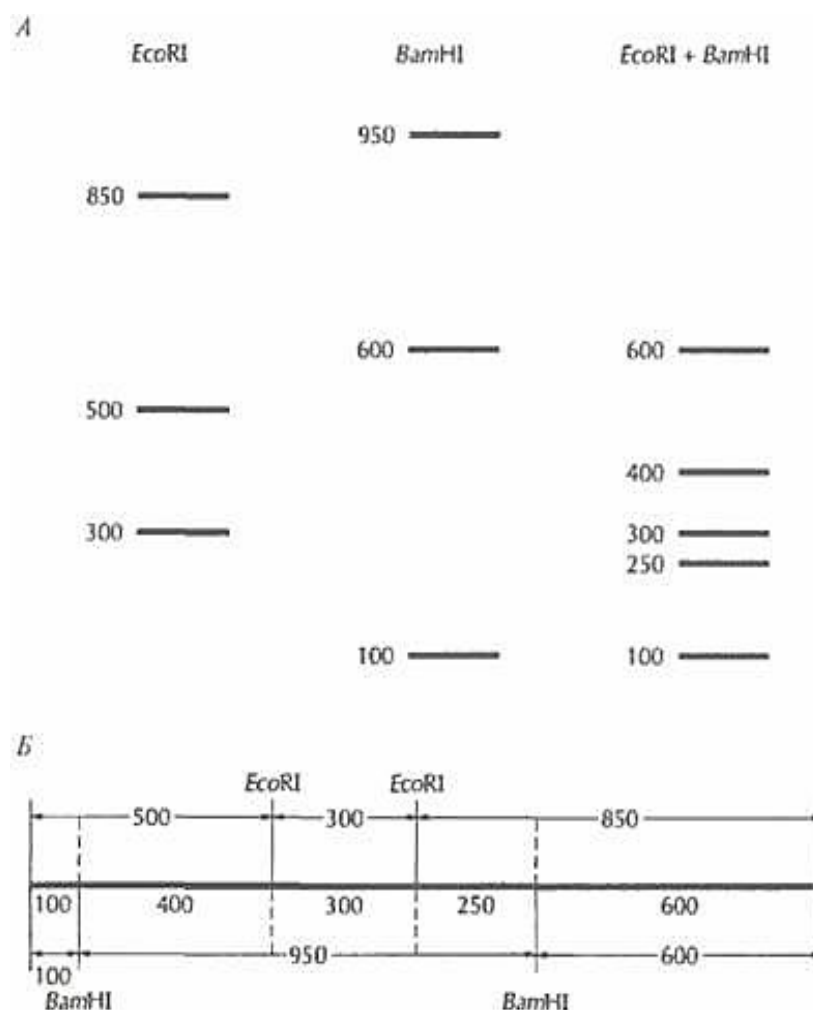
Фермент	Таниш сайтлари	Ҳосил бўладиган учлар
<i>EcoRI</i>	G ⁺ A-A- T- T- C C- T -T- A-A ⁺ G	Чиқиб турган 5'-вчига эга фосфат гуруҳи
<i>BamHI</i>	G ⁺ G-A-T-C-C C-C-T-A-G ⁺ G	Чиқиб турган 5'-вчига эга фосфат гуруҳи
<i>PstI</i>	C-T-G-C-A ⁺ G G ⁺ A-C-G-T-C	Чиқиб турган 3'- вчига эга гидроксил гуруҳи
<i>Sau3AI</i>	⁺ G-A-T-C C-T-A-G ⁺	Чиқиб турган 5'-вчига эга фосфат гуруҳи
<i>PvuII</i>	C-A-G ⁺ C-T-G G-T-C ⁺ G-A-C	Тўмтоқ учлар
<i>HpaI</i>	G-T-T ⁺ A-A-C C-A-A ⁺ T-T-G	Тўмтоқ учлар
<i>HaeIII</i>	G-G ⁺ C-C C-C ⁺ G-G	Тўмтоқ учлар
<i>NotI</i>	G ⁺ C-G-G-C-C-G-C C-G-C-C-G-G-C ⁺ G	Чиқиб турган 5'-учига эга фосфат гуруҳи

6.4, А расмда турли рестриктазалар ва уларнинг аралашмалари ёрдамида ДНК бўлиниши натижасида олинган фрагментлар ўлчамлари кўрсатилган. Ушбу маълумотлардан келиб чиқадики, ДНКнинг мазкур соҳаси *BamHI* ва *EcoRI* учун иккитадан сайтга эга.

Рестрикция харитани тузиш учун алоҳида рестрикция ва ферментлар аралашмаси ёрдамидаги рестрикцияда олинган фрагментлар ўлчамларини таққослаш зарур. Бундай таққослашнинг натижаси 6.4,Б расмда келтирилган.

Агар ДНКнинг иккала рестриктазанинг ҳар бири (*EcoRI* ва *BamHI*) ёрдамидаги гидролизидида учта фрагмент ҳосил бўлса, демак, ДНКнинг дастлабки фрагментида ишлатилган ҳар бир рестриктаза учун иккита танлаш сайти бўлган. *EcoRI* гидролизи натижасида ҳосил бўлган 300 н.ж. ўлчамли фрагмент 850 ва 500 н.ж. ўлчамли *EcoRI*-фрагментлардан фарқли ўлароқ, *EcoRI* ва *BamHI* аралашма билан гидролизланганда парчаланмайди. Демак, иккита *EcoRI*-сайт бир-биридан 300 н.ж. масофада жойлашган ва уларнинг ўртасида *BamHI*-сайти йўқ, узунлиги 850 ва 500 н.ж. бўлган *EcoRI*-фрагментларда эса биттадан *BamHI*-сайти бор.

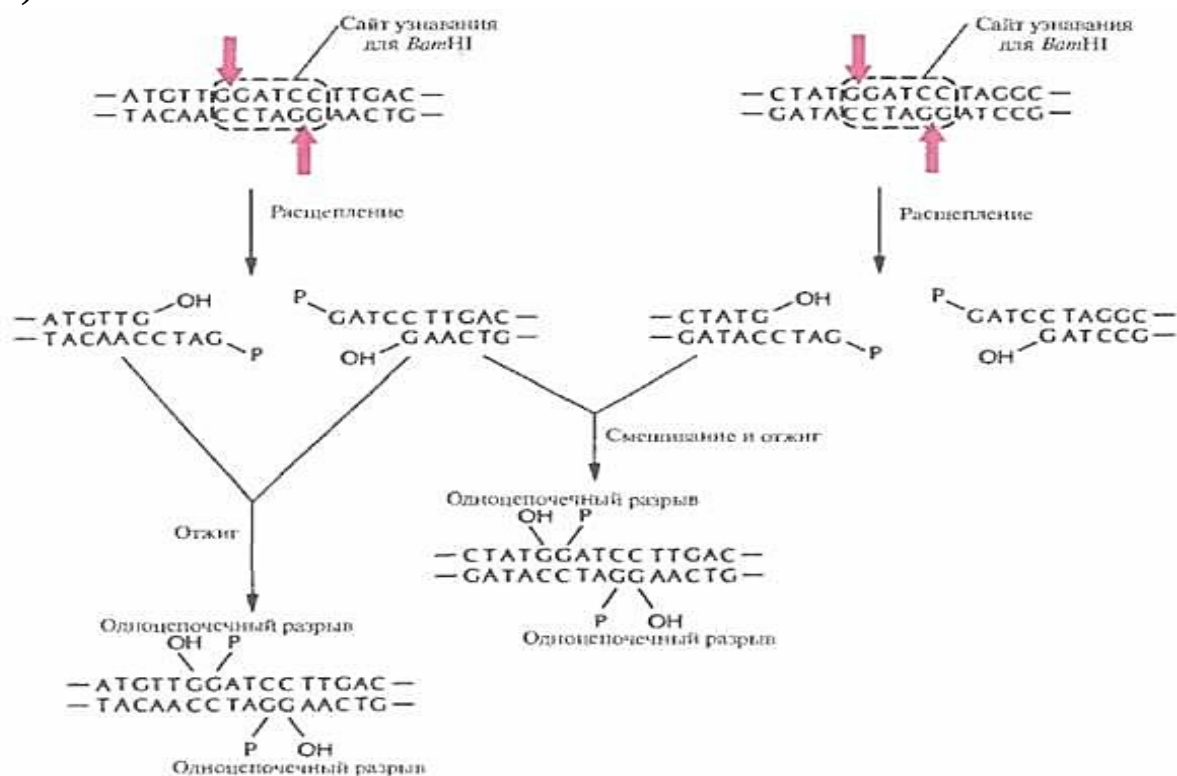
Расм 6.4. Рестрикция сайтларини хариталаш. А. ДНК кўрсатилган ферментлар орқали бўлиниши натижасида олинган фрагментларнинг гель-электрофорези натижалари. Тозаланган ДНК *EcoRI* ва *BamHI* рестриктазалари билан алоҳида, кейин эса аралашмаси билан гидролизланади, гель-электрофорез ўтказилди ва маҳсулотлар бромид этидий билан бўялиб, визуаллаштирилди. Горизонтал чизиқлардан чап тарафдаги сонлар – асослар жуфтлигидаги фрагментлар узунлиги. Б. Электрофорез маълумотлари асосида тузилган рестрикцион харита. Сонлар – мос келувчи ферментлар таниш сайтлари орасидаги масофа. (Глик ва Пастернак бўйича)



ДНКга рестриктаза *BamHI* билан ишлов берилганда ҳосил бўладиган 950 н.ж. фрагмент *EcoRI* икки мартабали гидролизида уч фрагментга парчаланади (250+300+400 - 950 н.ж.). Демак, икки *BamHI*-сайти *EcoRI* учун сайтлардан икки томонга 250 и 400 н.ж. масофада жойлашган. *BamHI* 850 н.ж. узунликдаги *EcoRI*-фрагментни 250 ва 600 н.ж. узунликдаги фрагментларга парчалайди, *EcoRI* учун сайтлардан бири эса *BamHI* учун сайтдан 250 н.ж. масофада жойлашган, демак, 600 н.ж. фрагментида ДНК дастлабки молекуласининг учларидан бири бўлиши керак. Биз кейин *BamHI* узунлиги 500 н.ж. бўлган *EcoRI*-фрагментини ўлчамлари 100 ва 400 н.ж. бўлган икки фрагментга парчалашини ва *EcoRI*-сайтларидан бири *BamHI*-сайтидан 400 н.ж. ажратилганлигини кўрамиз, демак, узунлиги 100 н.ж. бўлган фрагмент дастлабки молекуланинг бошқа учига эга бўлиши керак. 6.4,Б расмдаги харита ҳар бир гидролизда

олинадиган фрагментлар ўлчамлари ва рестрикция сайтлари ҳолати ўртасидаги аниқ мувофиқликни кўрсатади.

Рестрикцияловчи эндонуклеазалар томонидан бўлинишнинг яна бир қўлланилиши мавжуд. ДНКнинг икки хил намуналарига айнан бир хил рестриктаза билан ёпишқоқ учли фрагментлар ҳосил бўлиши билан ишлов берилганда ва кейин мазкур намуналар аралаштирилганда турли хил намунадаги фрагментлар ёпишқоқ учларининг комплементар жуфтлашиши туфайли генларнинг янги комбинациялари – рекомбинант ДНК ҳосил бўлиши мумкин (расм 6.5).



Расм 6.5. ДНК икки турли хил намуналарининг *Bam*HI эндонуклеаза ёрдамида бўлинганда ҳосил бўлган фрагментлар комплементар ёпишқоқ учларининг ренатурацияси (тикланиши, отжиги). Расмда тасвирланган тўрт фрагмент бир-бири билан ДНКнинг олти хил турли молекулаларини ҳосил қилиб бирлашиши мумкин (расмда мумкин бўлган комбинацияларнинг ҳаммаси ҳам кўрсатилмаган). Фрагментлар ёпишқоқ учларнинг тўрт асоси орасида ҳосил бўлган водород боғламлари билан бирга ушлаб турилади, лекин бу боғламлар эритмадаги молекулалар узок вақт стабил қолиши учун етарлича мустаҳкам эмас. (Глик ва Пастернак бўйича)

Молекуляр клонлашни амалга ошириш учун фақат рестрикция ферментларининг ўзигина етарли эмас. Биринчидан, ёпишқоқ учлар ҳосил қиладиган ўша тўрт асос орасидаги водород боғламлари

ДНКнинг бирлашаётган икки фрагментини ушлаб туриш учун етарлича мустаҳкам эмас, молекуланинг шакарфосфат рамкадаги узилишларни бартараф этиш учун, яъни бир занжирнинг 3'-гидроксил охирги гуруҳи ва бошқа занжирнинг 5'-фосфат гуруҳи орасидаги боғламни тиклаш учун қандайдир восита зарур. Бактериофаг Т4нинг ДНК-лигазаси ана шундай восита ҳисобланади.

Мазкур фермент ёпишқоқ учлар жуфтлашиши туфайли биргаликда ушлаб туриладиган полинуклеотид занжирларнинг учлари ўртасидаги фосфодиэфир боғламлар ҳосил бўлишини катализлайди. Бундан ташқари ДНК-лигаза Т4 бирлашаётган фрагментлар фермент билан бирлашгандан кейин бир-бири билан яқинлашаётган тўмтоқ учларни “улайди”. Иккинчидан, агар янги ҳосил бўлган комбинациялар (рекомбинант ДНК) ҳужайра-ҳўжайинда репликацияланмаса ДНК турли молекулалари бирлашишининг ўзи фойдасиз. Шундай қилиб, ДНК рекомбинант молекуласининг бир қисми клонлаш мўлжал қилинаётган керакли ёд генни ташиша, бошқа қисми рекомбинант ДНКнинг ҳужайрадаги репликацияси учун зарур бўлган ахборотни ўзида сақлайди. Бу муаммони ҳал қилиш учун клонловчи векторлардан фойдаланилади. Учинчидан, ДНК рестрикцияланганда турли хил фрагментлар аралашмаси ҳосил бўлади, ва уларнинг векторли ДНК билан лигирланишидан (уланишдан) кейин кўпгина турли хил комбинациялар ҳосил бўлади. Керакли нуклеотидлар кетма-кетлигига эга бўлган ДНКни сақлаб қолган реципиент ҳужайраларни таниб олиш зарур. Бунинг учун турли хил скрининг тизимларидан фойдаланилади.

Бу қизик.

Рестрикция ферментлари 40 йилдан ортиқ вақт илгари бактериофагларнинг сайт-специфик рестрикцияси ва модификацияси тадқиқотлари ўтказилаётганда кашф қилинган. Рестрикция ферментлари бактерияларни вируслар ҳужумидан ҳимоя қилади. Умумий қабул қилинган нуқтаи назар шундан иборатки, бу уларнинг табиий вазифаси. Улар бактерияларнинг иммун тизими сифатида ишлайдилар. *E.coli*нинг рестрикция ферментларидан маҳрум қилинган штамми вирус ҳужумига дучор қилинса, вирус заррачалари ҳужайрани инфекция билан муваффақияли зарарлаши мумкин. Қайсидир штаммда рестриктаза мавжуд бўлса, вирус билан

зарарланиш эҳтимоли кескин пасаяди. Хужайрада турли хил рестриктазалар бўлиши кўпгина таъсир кўрсатади: тўрт ёки беш турдаги рестриктазалари бўлган шартли равишда боқий (ўлмас) ҳисобланади.

Дастлабки софланган рестриктазалар орасида *E.coli* дан ажратиб олинган EcoRI ва EcoRII, ҳамда *Haemophilus influenzae* дан ажратиб олинган HindII и HindIII бўлган. Бу ферментлар специфик сайтларда ДНКни лаборатория шароитида бирлаштириш мумкин бўлган алоҳида фрагментлар ҳосил қилиб ажратганлар. Тез орада тадқиқотчилар рестриктазалар генларни ташкил этилиши, экспрессияланиши ва ишлашини ўрганишнинг ноёб инструменти эканлигини англадилар.

1970-йилларда рестриктазаларнинг молекуляр-биологик муҳитда тарқалиши мобайнида New England Biolabs га ўхшаш компаниялар янада батафсилроқ текширувларга киришдилар. Баъзи бир вируслардан ташқари рестриктазалар прокариотларда ҳам аниқланди. Кўпгина минглаб бактериялар ва археялар ҳозирги вақтда рестрикция ферментлари мавжудлигига текширилади. Прокариотик геномлар сиквенсларининг таҳлили шуни кўрсатдики, уларнинг барчаси бир-бирига ўхшаш – эркин яшовчи бактериялар ва археяларнинг барча геномлари рестриктазаларни кодлайди.

Рестрикция ферментлари жуда ҳам турли-туман, ўлчами бўйича PvuII да (157 аминокислота қолдиқлари) гигант SmaI (1250 аминокислота қолдиқлари) ва ундан катта ўлчамлигача ўзгариб туради. Тавсифи келтирилган ўрганилган 4000 сайтдан ташқари яна 330 та специфик сайт аниқланган. Уларнинг 30% дан ортиғи New England Biolabs мутахассислари томонидан идентификацияланган. Янги спецификлик сайтларини излаш биокимёвий тадқиқотлар доирасида хужайра экстрактлари таҳлили орқали, шунингдек, ахборот тадқиқотлари орқали, геномлар сиквенсини компьютерли таҳлил қилиш йўли билан давом эттирилмоқда. Бугунги кунда маълум бўлган ферментлар рестрикцияси сайтларининг кўпчилиги изошизомералар – дубликатлар ҳисобланишига қарамай, илгари номаълум бўлган рестрикция сайтларида мунтазам аниқланиб туради.

Р-М тизмлар

Рестриктазалар одатда хўжайин хужайра ДНКсини кесилиб кетишдан ҳимоя қиладиган бир ёки иккита модификацияловчи

ферментлар (ДНК-метилтрансферазалар) билан бир комплексида таъсир кўрсатади. Модификацияловчи ферментлар рестриктазалар билан биргаликда таъсир кўрсатувчи бир хил сайтларга спецификлик хусусиятига эга. Кесиш ўрнига улар ДНКнинг ҳар бир занжиридаги асослардан бирини метилирлайди. Метил гуруҳлари боғлаш сайтидаги ДНК етакчи занжирига қўшилади ва рестриктаза таъсирига монелик қилади. Рестриктазалар модификацияловчи ферментларлар билан биргаликда рестрикция-модификация тизимини (Р-М тизими) шакллантирадилар. Баъзи Р-М тизимларда рестриктаза ва метилтрансфераза бир-биридан ажралиб туради ва бир-биридан боғлиқ бўлмаган ҳолда таъсир кўрсатади. Бошқа тизимларда эса улар битта катта комплекснинг турли хил суббирликлари сифатида намоён бўлади.

Рестриктазалар типлари

Классик тасниф бўйича рестриктазалар базавий суббирлик, рестрикция сайти, спецификлик сайти ва кофакторга талаблар билан боғлиқ ҳолда 4 типга бўлинади. Бироқ, рестриктазаларнинг аминокислота таркибини ўрганиш молекуляр даражада ферментларнинг анчагина кўп турли хил типлари мавжуд эканлигини кўрсатди.

I типдаги рестриктазаларга бир нечта суббирликлардан ташкил топган мураккаб рестриктазалар, ДНКни ўзининг рестрикция сайтидан тасодифий масофада кесадиган Р-М тизимлар киради. I типдаги ферментлар биокимёвий қизиқиш уйғотади, бироқ улар алоҳида рестрикцион фрагментлар ёки гелда фарқлаш мумкин бўлган паттернларни ишлаб чиқармаганликлари учун амалиётда кам қўлланилади.

II типдаги ферментлар ДНКни ўз рестрикция сайтлари доирасида ёки унчалик узоқ бўлмаган жойда кесади. Улар алоҳида рестрикцион фрагментлар ёки гелда фарқлаш мумкин бўлган паттернларни ишлаб чиқарадилар. Бу лаборатория шароитида ДНКни ўрганиш ёки генларни клонлашда қўлланиладиган ягона ферментлар типидир. II типдаги ферментлар ўхшаш оксилларнинг алоҳида синфига ажратилмайди, у ҳар хил оксиллар турларини ўзида бирлаштиради. II типдаги рестриктазалар кўпинча аминокислота таркибига кўра бир-биридан, шунингдек бошқа барча маълум бўлган

оқсиллардан фарқ қилади. Улар кўпинча паразит-хўжайин ўзаро таъсирида муҳим роль ўйновчи оқсиллар синфларини намоён этади.

III типдаги ферментлар шунингдек, катта оқсил комплексларини намоён этади. Улар ДНКни ўз рестрикция сайтларидан ташқарида кесади ва уларга кесишни якунлаш учун ДНКнинг бир молекуласи доирасида қарама-қарши йўналишли иккита шундай сайт зарур бўлади.

IV типдаги ферментлар модификацияланган, одатда метилирланган ДНКни аниқлайди, ва *E.coli*нинг McrBC ва Mrr тизимларини ифодалайди.

<https://www.skygen.com/katalog/reagenty>

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. II типдаги рестрикция эндонуклеазаси нима ва нега улар рекомбинант ДНК технологияси учун шунчалик муҳим?
2. Плазмида pBR322 ни вектор сифатида тавсифланг. У қандай хусусиятларга эга?

§ 7. Плазмида векторлари. Трансформация ва танлаш

1. *Плазмидаларнинг моҳияти*
2. *pBR322 плазмида вектори*
3. *Трансформация ва танлаш*

Плазмидалар – бу ДНКнинг хромосомадан ташқари автоном репликацияланувчи икки занжирли халқали молекулалари. Плазмидалар деярли барча бактерияларда мавжуд. Улардан бири ўзининг бир хужайрадан иккинчисига кўчирилишини таъминловчи ахборотга эга бўлса (F-плазмидалар), бошқалари антибиотикларга чидамлилик генларини (R-плазмидалар) ёки ноодатий метаболитларнинг утилизациясига жавобгар генларнинг специфик генлар тўпламини ташиydi (деградация плазмидалари). Шундай плазмидалар борки, уларда қандайдир муайян функцияни бажарадиган генлар аниқланмаган (криптик плазмидлар; инглизча *cryptic* –яширин, латент). Плазмидалар ўлчамлари 1 минг.н.ж. дан кам 500 минг.н.ж. гача бўлади. Улардан ҳар бири репликация бошланиши сайтига (*ori*) эга, у сиз хужайра-хўжайинда плазмида репликациясининг имкони бўлмаган бўлар эди.

Баъзи плазмидалар ҳужайрада 10-100 нусхада ифодаланган; улар юқори нусхаланадиган деб аталади. Кам нусхаланадиган плазмидалар ҳужайрада 1-4 нусхада мавжуд бўлади. Плазмид ДНКнинг улуши одатда умумлашган ҳужайравий ДНКнинг 0,1-5,0%ини ташкил қилади. Агар икки ёки ундан ортиқ плазмидалар айнан бир ҳужайрада биргаликда яшай олмаса, у ҳолда улар бир-бирига мос келмайдиган гуруҳга мансублиги тўғрисида гапирилади. Агар плазмидлар бир-бирига мос келмайдиган турли гуруҳларга мансуб бўлса, нусхалар сонидан қатъий назар бир ҳужайрада тўсиқсиз ҳаёт кечириши мумкин.

Баъзи микроорганизмларда бир ҳужайрада 8-10 турли хил плазмидалар аниқланган, бунда улардан ҳар бири ўзининг функциясини бажарган, ўзига хос бўлган нусхалар сони билан намоён бўлган ва ўзининг хусусий бир-бирига мос келмайдиган гуруҳга мансуб бўлган. Баъзи плазмидаларда специфик репликация инициацияси сайти мавжуд ва фақат бир турнинг ҳужайраларида репликацияланишлари мумкин. Бошқа плазмидаларда эса мазкур сайт камроқ специфик бўлиб, улар турли хил бактериал ҳужайраларда репликацияланадилар. Шунга мувофиқ тор ва кенг спектрга эга ҳужайринли плазмидалар фарқланади.

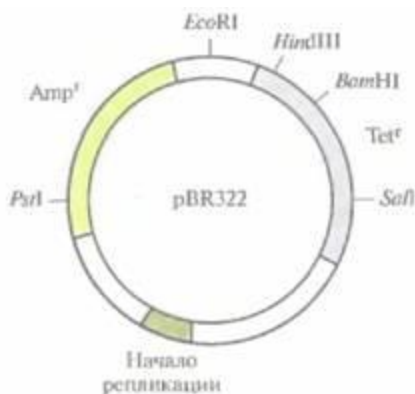
Автоном репликацияланувчи генетик элементлар каби плазмидалар клонланаётган ДНКни кўчириб ўтказиш учун вектор сифатида фойдаланиш имконини берадиган асосий хусусиятларга эга. Лекин, кўпинча табиий (ўзгартирилмаган, конструкцияланмаган) плазмидалар “юқори сифатли” вектор учун бўлиши мажбур бўлган хусусиятларга эга эмас.

Бундай хусусиятлар: 1) ўлчами унчалик катта бўлмаслиги керак, чунки, плазмидалар узунлиги 15 минг.н.ж. дан катта бўлганда экзоген ДНКни *E. coli* га кўчириб ўтказиш самарадорлиги анчагина камаяди; 2) киритмани (вставкани) киритиш мумкин бўлган ноёб рестрикция сайти бўлиши; 3) рекомбинант ДНК ташувчи реципиент ҳужайраларни идентификациялаш учун бир ёки ундан ортиқ селектив генетик маркерлар бўлиши. Шунинг учун плазмида векторларини ген муҳандислиги йўли ёрдамида яратишга тўғри келади.

рВR322 плазмида вектори

80-йилларда рВR322 плазмида вектори энг машхур универсал векторлардан бири бўлган. Одатда плазмида вектори ифодаланиши кичик р ҳарфини (инглизча *plasmid*) ва вектор тавсифи ёки унинг яратилиш тарихига алоқаси бўлган бир нечта ҳарфни ўз ичига олади. Демак, рВR322 плазмидани ифодалашда ВR ҳарфлари мазкур плазмидани тузган Ф. Боливар ва Р. Родригесларни билдиради, 322 сони эса – уларнинг тадқиқотлар протоколларидан олинган рақамли белгидир. рВR322 плазмида узунлиги – 4361 н.ж. Унда иккита антибиотикларга чидамлилик гени мавжуд (расм 7.1.), ампициллингга (Amp^r) ва тетрациклингга (Tet^r), шунингдек, Tet^r генида *Bam*HI, *Hind*III ва *Sal*Iв учун ноёб сайтлар, Amp^r генида битта *Pst*I-сайт, *Eco*RI учун кодловчи кетма-кетликдан ташқарида жойлашган битта сайт мавжуд, ва фақат *E.coli* да репликацияни таъминлайдиган репликация бошланиши сигнали мавжуд. Плазмида кўп сонли нусхалар ҳосил қилиб репликацияланади, бошқа бактериал ҳужайраларга қийинчилик билан ўтказилади.

Клонловчи вектор рВR322 қандай ишлайди? Агар тозаланган халқали плазмида рВR322 га у ёки бу антибиотикка чидамлилик генларидан бирида жойлашган ягона сайтда уни парчалайдиган рестриктаза билан ишлов берилса ёпишқоқ учларга эга чизиқли молекула ҳосил бўлади.

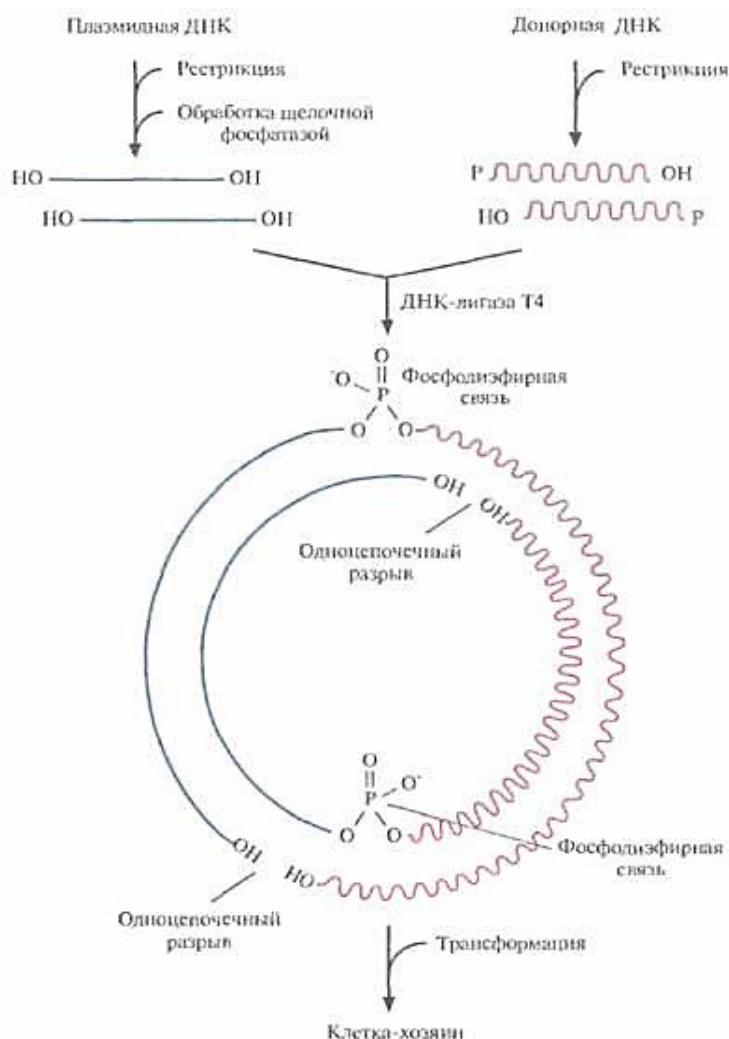


Расм 7.1. Плазмида вектори рВR322 генетик харитаси. Тетрациклин (Tet^r) ва ампициллингга (Amp^r) чидамлилик генларида *Hind*III, *Sal*I, *Bam*HI ва *Pst*I учун ноёб таниш сайтлари мавжуд. *Eco*RI-сайти мазкур генлардан ташқарида жойлашган. Вектор узунлиги – 4361 н.ж. (Глик ва Пастернак бўйича).

Бундай молекулалар керакли генни сақлаган ва айнан шундай рестриктаза билан ишлов берилган донор ДНК билан аралаштирилади. Модомики, бу иккала ДНК ёпишқоқ учлари ўзаро комплиментар бўлса, улар гибрид молекулалар ҳосил қилиб жуфтлашадилар. Кейинчалик аралашмага АТР иштирокида Т4 фаг ДНК-лигазаси билан ишлов берилади, натижада фрагментларнинг кўпгина турли хил комбинациялари, шунингдек номақбул

маҳсулотлар, хусусан донор ДНК ва дастлабки плазмид ДНКнинг бири бири билан ўзаро бирлашган фрагментлари ҳосил бўлади. Мазкур бирлашган фрагментлар сонини камайтириш учун рестрикцияланган плазмид ДНКга линеаризирланган (чизикли) молекуладан 5'-фосфат гуруҳини ажратадиган ишқорий фосфатаза билан ишлов берилади: ДНК-лигаза дефосфоририлланган чизикли плазмид ДНК учларини бирлаштира олмайди (расм 7.2).

Хусусан ДНК рекомбинант молекулаларига келсак, уларда иккита бир занжирли узилишлар бўлса ҳам, уларнинг фрагментлари ДНК-лигаза ёрдамида дефосфоририлланган плазмид ДНК ва рестрикцияланган донор ДНК орасида ҳосил бўлган иккита фосфодиэфир боғламлари билан бирга ушлаб турилади (расм 7.2). Трансформацияланган ҳужайрада репликациядан кейин бир занжирли узилишлар ҳужайра-ҳўжайиннинг лигирлаш (улаш) тизими орқали бартараф этилади.



Расм 7.2. Плазмида векторига бегона ДНКни ўрнатиш. Рестриктаза ва ишқорий фосфатаза билан ишлов берилган плазмид ДНК керакли генни тутувчи рестрикцияланган донор ген билан аралаштирилади ва ДНК-лигаза қўшилади. Бунда тўртта бир занжирли узилишлардан иккитаси бартараф этилади, ва конструкция ҳосил бўлган фосфодиэфир боғламлари туфайли мустаҳкам бўлади. Ҳужайра-ҳўжайинга гибрид ДНК киритилгандан кейин унинг репликацияси содир бўлади ва узилишларсиз янги халқасимон молекулалар ҳосил бўлади. (Глик ва Пастернак бўйича)

Трансформация ва танлаш

Энди рекомбинант ДНКни ҳужайра-хўжайинга киритиш керак. Мазкур жараён трансформация деб аталади. Уни амалга ошириш учун махсус ишлаб чиқилган усуллардан фойдаланилади, масалан, ҳужайраларга юқори ҳарорат билан таъсир кўрсатилади ва уларга кальций хлориди (CaCl_2) билан ишлов берилади. Бироқ шунда ҳам трансформация самарадорлиги унчалик баланд бўлмайди, одатда мингтанинг орасидан биттадан ортиқ ҳужайра трансформацияланмайди. Шундай қилиб, кўпчилик ҳужайраларда трансформациядан кейин рекомбинант ДНК бўлмайди. Уларнинг баъзиларида ишқорий фосфатаза ёрдамида дефосфорилланишдан четда қолган қайтадан бирлашган халқали плазмид ДНК пайдо бўлади, бошқаларида – плазмид бўлмаган ДНК ва фақат баъзиларида – бегона ДНК фрагменти киритилган плазмида (гибрид плазмида) пайдо бўлади.

Айтиб ўтганимиздек, репликация бошланиш нуқтасига эга бўлмаган хромосомадан ташқари ДНК бактериал ҳужайрада репликациялана олмайди. Шундай қилиб, ҳужайрага экзоген ДНКнинг кириши ҳали хўжайин ҳужайрасида ушлаб турилади дегани эмас. Кейин рекомбинант ДНКни ҳужайра-хўжайинда дастлабки кўринишда сақлаб туриш учун ҳужайрада уни деградацияга олиб келувчи рестриктазаларни кодловчи генлар бўлмаслиги, ва ҳужайрада фенотип ResA^- мавжуд бўлиши керак (бундай ҳужайралар умумий рекомбинацияланиш хусусиятига эга эмас, демак экзоген ДНК гомологик рекомбинация натижасида ўзгармайди (модификацияланмайди)). Кейин рекомбинант ДНК сақловчи ҳужайраларни идентификациялаш зарур. Идентификация усули имкон борича оддий бўлиши керак, чунки кўплаб ҳужайраларни текширишга тўғри келади.

Бегона ДНК *Bam*HI сайтига ўрнатиладиган pBR322 тизимида специфик идентификация икки босқичдан иборат. Дастлаб трансформациядан кейин ҳужайралар таркибида ампициллин бўлган озуқа муҳитига экилади. Бундай шароитларда ёки интакт (бузилмаган) pBR322 плазмида, ёки гибрид плазмиданинг таркибида Amp^r интакт гени бўлган ҳужайралар ўсиши мумкин; трансформацияланмаган ҳужайралар ампициллинга сезувчан бўлади. *Bam*HI сайти pBR322 плазмиданинг Tet^r генида жойлашган (расм 7.1);

мазкур генга ДНК фрагментининг ўрнатилиши кодловчи кетма-кетликни узиб юборади, ва тетрациклинга чидамлик йўқолади. Шундай қилиб, гибрид плазмида ташувчи ҳужайралар ампициллинга чидамли, лекин тетрациклинга сезувчан, рBR322 интакт плазмидани қабул қилган Tet^r генини ташувчи ҳужайралар эса ампициллин каби тетрациклинга ҳам чидамли бўлади.

Иккинчи босқичда иккала вариант ажратилади. Ампициллинли муҳитда ўстирилган ҳужайралар қайтадан босиш усули билан тетрациклинли муҳитга кўчириб ўтказилади. Тетрациклинли ликобчаларда колониялар ҳосил қилувчи ҳужайраларда рBR322 интакт плазмидаси мавжуд, айтиб ўтганимиздек улар ампициллинга ҳам тетрациклинга ҳам чидамли бўлади. Тетрациклинли ликобчаларда ўсмаган ҳужайралар ушбу антибиотикка сезувчан, демак уларда рBR322 гибрид плазмидаси мавжуд.

Ампициллинли муҳитда ўстирилган колониялардан тетрациклинга сезувчанлари ажратиб олинади ва ҳар бир колониядан индивидуал ҳужайравий клонлар ёки ампициллинга чидамли ва тетрациклинга сезувчан барча колониялар бирлаштирилади (кўпинча айнан шундай қилинади), ва улар биргаликда ўстирилади. Кейин қўшимча скрининг ўтказиш ва специфик киритмага (вставкага) эга рBR322 гибрид плазмида ташувчи ҳужайраларни идентификациялаш мумкин. рBR322 плазмиданинг Tet^r генида *HindIII*и *SalI* сайти ва Amp^r генида *PstI* сайти бўлиши бегона ДНК клонланган фрагментларнинг жойлашувини ўзгартириш имконини беради. Агар ичига ўрнатиш учун *PstI* сайтидан фойдаланилса, у ҳолда танлов ўша схема бўйича, лекин ўзгача тартибда олиб борилади, яъни дастлаб ҳужайралар тетрациклинли, кейин эса – ампициллинли муҳитга экилади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Рекомбинант плазмидаларни грамманфий бактериялар, масалан *E.coli* га киритиш усулларини тавсифлаб беринг.
2. Нима учун рестрикцияланган плазмид ДНКга лигирлашдан олдин кўпинча ишқорий фосфатаза билан ишлов берилади?

§ 8. Геномик кутубхонани яратиш

Сақлаш ва қўлланилиш соҳалари

ДНК геномик кутубхонасини яратиш учун ДНК муайян ўлчамдаги фрагментларга ажратиб олиш учун хужайрадан ажратиб олинади ва кейин рестриктаза ёрдамида парчаланади. Фрагментлар кейин ДНК-лигаза ферменти ёрдамида векторга киритилади. Кейин вектор ДНКни организм-хўжайинга – одатда ичак таёқчаси (*E.coli*) ёки хамиртуруш популяциясига киритиш мумкин бўлади, бу ерда ҳар бир хужайрада битта ноёб киритмали вектор нусхаси бўлади.

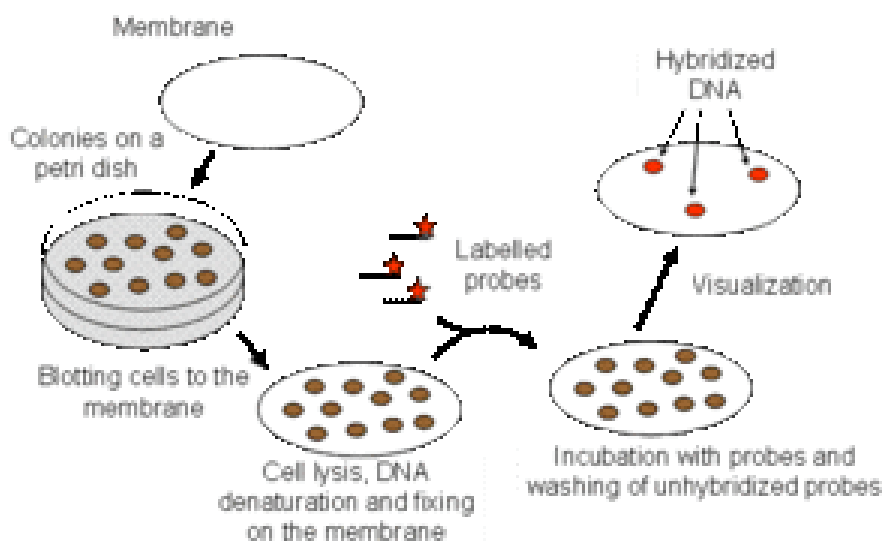
Векторни сақлаш учун хўжайин хужайрасидан фойдаланиш кутубхонадан таҳлил учун муайян клонларни осон амплификациялаш ва топиш имконини беради. Геномик кутубхонани узоқ вақт сақлаш мумкин (музлатилган ҳолатда). Зарур бўлганда ДНКнинг керакли ген ёки геномнинг бошқа элементлари бўлган фрагментларини тутган алоҳида бактериал ёки хамиртуруш клонлари ажратиб олинади ва кўпайтирилади (клонланади). Геномнинг бундай усул билан клонланган соҳалари хужайрадан чиқариб олинади ва генетика, тиббиёт (шу жумладан ирсий касалликларни ташхислаш) ва биотехнологиянинг турли хил назарий ҳамда амалий масалаларини ҳал қилиш, шунингдек, геномларни хариталашда фойдаланилади.

Кутубхона скрининги (ингл. screening), яъни юзлаб ва минглаб бошқа кетма-кетликлар орасидан ДНКнинг аниқ фрагментини излаш ДНК-зонд ёрдамида ДНК-гибридизация усули билан амалга оширилади (расм 8.1). Агар тадқиқотчи қидирилаётган соҳанинг ҳеч бўлмаганда унчалик катта бўлмаган нуклеотид кетма-кетлигини билса, у комплементар кетма-кетликни сунъий равишда синтезлайди (узунлиги 20 га яқин нуклеотиддан иборат праймер) ва уни радиоактив изотоп ёки флуоресцент белги билан белгилайди. Колониялар бўлган Петри ликовчасидан блоттинг ёрдамида реплика қилинади: ликовчага юпқа нитроцеллюлозали ёки бошқа мембрана қўйилади, бу мембранада барча колонияларнинг изи қолади. Шундан кейин мембранада қолган изда бактериал хужайраларни парчалаш, ДНКни бир молекулали занжиргача ишқорий муҳитда оксилдан ажратиш ва денатурациялаш амалга оширилади. Кейин барча колонияларга зонд билан ишлов берилади ва колонияларнинг қайси бирида зонд комплементарлик тамойилига кўра бирикканлиги қаралади. Мазкур колония ДНКнинг керакли фрагментини сақлайди.

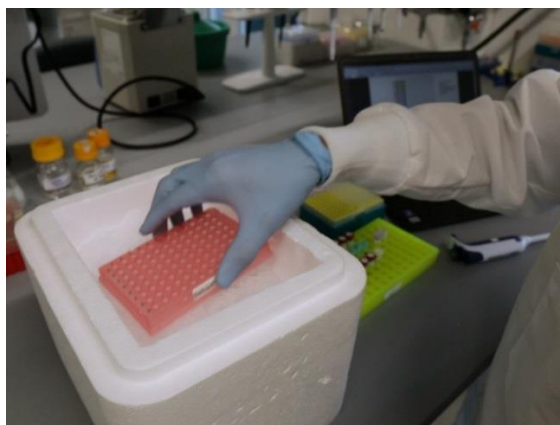
Баъзан тадқиқотчи ўзи излаётган ДНК кетма-кетлигини билмайди, лекин текширилаётган оқсилнинг аминокислоталар кетма-кетлигини билади. Модомики, ҳар бир аминокислотага нуклеотидларнинг бир нечта триплетлари (биттадан олтигача) мос келиши мумкин экан, кодлаш эҳтимоли тутилган ДНК турлича бўлиши мумкин. У ҳолда тахмин қилинаётган кетма-кетликни таниши мумкин бўлган зондлар аралашмаси тайёрланади.

Геномик кутубхоналарни (хусусан БАК-векторлар ёрдамида тайёрланган) скрининглашнинг замонавий юқори технологик усуллари роботлаштирилган (автоматлаштирилган) ишлаб чиқариш, ҳар қанча керакли миқдорда нусхалар, колонияларни (клонлар) сақлаш учун микропланшетлар, шунингдек, ДНК-зондлар билан бевосита гибридлашда фойдаланиладиган нитроцеллюлоза ва нейлон мембраналарни қўллашга асосланган. Бунда скрининг самарадорлигининг кейинги оширилишига ДНК-зондлар сифатида *overgos* (ингл. *overlapping oligos* — «бир бирига устма уст тушадидиган олигонуклеотидлар») деб номланган намуналарни қўллаш ҳисобига эришилади. Кутубхоналарни скрининглаш учун ПЗР ҳам қўлланилиши мумкин.

Геномик кутубхонанинг яна бир тури клонлари тандем такрорланишга эга микросателлит кутубхона ҳисобланади. Уларнинг секвенирланиши турли хил генетик ва геномик иловалар учун полиморф ДНК-маркерлар (микросателлит локуслари) олиш имконин беради.



Расм 8.1. Геномик кутубхона колонияларининг ДНК колониялари ва белги қўйилган ДНК-зондларнинг кейинги гибридланиши билан блоттинги схемаси.



Модулли ДНКли суюқлик ускуналарини автоматлаштирилган роботлаштирилган йиғими

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.jove.com>

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Геномик кутубхона нима?
2. Геномик кутубхонанинг қўлланилиш соҳалари.

§ 9. Гибридизация ёрдамида скрининглаш. ДНК полиморфизми

1. ДНК-зонд;
2. ДНК-гибридизациялаш процедураси;
3. Полиморфизмлар турлари.

ДНК намунасидаги керакли нуклеотид кетма-кетлигини фақат изланган кетма-кетлик билан жужтлашадиган ДНК-зонд ёрдамида аниқлаш мумкин. Бунинг учун аввал ДНКга иссиқлик ёки ишқорий таъсир кўрсатиб ишлов бериб бир занжирли шаклга ўтказилади. Бундай шароитларда асослар орасидаги водород боғламлари узилади ва занжирлар ажралади (денатурация содир бўлади). Агар ҳарорат аста-секин пасайтирилса, уларнинг қайта бирлашиши (ренатурация) содир бўлади. Бунда, агар эритмада бир занжирли ДНК-зонд бўлса у ҳам комплементар соҳалар билан специфик жужтлашиб ДНК билан ренатурацияланади. Натижада гибрид ДНК, яъни занжирлари икки турли хил ДНКга тегишли бўлган икки занжирли молекула ҳосил бўлади.

ДНК гибридизацияси процедураси қуйидагидан иборат. ДНК-нишон денатурацияга дучор қилинади ва бир занжирли молекулалар қаттиқ тагликка (нитроцеллюлозали ёки найлонли филтр) қайтариlmас ҳолда бириктирилади. Ушбу муолажа юқори хароратда

амалга оширилади. Кейин фильтр радиоизотоп ёки бошқа белги билан белгиланган бир занжирли ДНК-зонд билан инкубацияланади. Агар зонд ва ДНК-нишоннинг нуклеотид кетма-кетлиги комлементар бўлса уларнинг жуфтлашиши (яъни гибридизацияси) содир бўлади. Гибрид молекулаларни белгининг табиати билан боғлиқ ҳолда радиоавтографик ёки бошқа усул билан визуализациялаш мумкин. Агар зонд ва ДНК-нишон орасида комлементарлик бўлмаса, гибридизация содир бўлмайди, ва биз манфий натижа оламиз. Одатда зонд ўлчами 100 дан 1000 гача н.ж. ва ундан ортиқ бўлади, ваҳоланки янада йирикроқ зондлар каби кичик ўлчамли зондлардан ҳам фойдаланиш мумкин. Гибридизация, яъни стабил комплекс ҳосил бўлиши учун, 50 нуклеотиддан иборат соҳада уларнинг 80%дан кўпи мос келиши керак, лекин бу реакция шароитлари билан боғлиқ бўлади.

Бир биологик тур доирасида ҳар хил организмлар геномлари генларнинг умумий тўплами ва уларнинг нозик ички муҳити нуқтаи назаридан айнан ўхшаш бўлади. Айни вақтда нуклеотид кетма-кетлигининг у ёки бу вариацияси билан боғлиқ бўлган кўп сонли индивидлараро фарқлар ҳам мавжуд. Шундай қилиб, ҳар қандай ген турли хил алтернатив белгилар – аллеллар кўринишида бўлиши мумкин. Бир геннинг аллеллари сони иккитадан бир неча ўнтагачани ташкил этиши мумкин. Ҳар бир организмдаги генларнинг аксарияти биттаси отасидан, иккинчиси онасидан мерос қилиб олинган иккита аллел билан намоён бўлади. Агар иккала аллел бир хил бўлса, унда организм гомозиготали, ҳар хил бўлса – гетерозиготали ҳисобланади. Эволюция мобайнида турли хил аллеллар битта аллел-ўтмишдошидан мутация натижасида келиб чиққан. Шундай қилиб, популяцияда бир нечта кўринишда намоён бўлган генлар (аллеллар) полиморф генлар деб номланади.

Полиморфизмлар турлари

Бир нуклеотидли полиморфизм (БНП, ингл. Single nucleotide polymorphism, SNP, снп каби талаффуз этилади) — ДНК кетма-кетлигининг бир тур вакиллари геномида ёки гомологик хромосомаларнинг гомологик соҳалари (ёки бошқа таққосланадиган кетма-кетликда) ўртасидаги бир нуклеотид ўлчамичалик фарқи (А, Т, G ёки С).

Агар ДНКнинг иккита кетма-кетлиги – ААГССТА ва ААГСТТА битта нуклеотидга фарқ қилса, у ҳолда иккита аллел: С ва Т мавжудлиги ҳақида сўз боради. Бир нуклеотидли полиморфизмлар (SNPs) нуқтали мутациялар натижасида пайдо бўлади.

Бир нуклеотидли полиморфизм (узун рестрикцион фрагментлар полиморфизми билан бир қаторда (ингл. RFLP) ва ПДАФ (ингл. AFLP)) филогенезда ДНК гомологик соҳалари дивергенцияси (ажралиши) асосида молекуляр-генетик тизимнинг кладограммасини тузиш учун молекуляр-генетик белгилар (маркерлар) сифатида кенг қўлланилади. Мазкур соҳада энг кўп рибосомал РНК генларининг спейсерларидан фойдаланилади. Мазкур спейсерларда мутациялар геннинг охириги маҳсулоти структурасида акс этмаслиги сабабли (назарий жиҳатдан улар яшовчанликка таъсир кўрсатмайди), биринчи яқинлашишда полиморфизм даражаси ва организмлар ўртасидаги филогенетик масофа ўртасидаги тўғридан тўғри боғлиқлик фараз қилинади.

Полиморфизм криминалистикада шахсни аниқлаш воситаси сифатида кенг қўлланилади. Тиббиётда ДНК полиморфизмларини ўрганишдан ирсий касалликлар сабабларини тадқиқ қилиш, беморларнинг дори воситаларига сезувчанлигини баҳолаш, генетик ассоциацияларни аниқлашда кенг фойдаланилади.

Нусхалар сони вариациялари, CNV. ДНКнинг ўзида функционал генларни ташувчи чўзилган соҳалари нусхалари сонининг вариациялари кузатилади. Бу балансланмаган функционал қайта қурилишлар: делеция, дупликация ҳисобига содир бўлади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ:

1. ДНК-зондга тўлиқ тавсиф беринг.
2. ДНК-гибридизация процедурасининг хусусияти нимадан иборат.
3. ДНК-нишонга тавсиф беринг.

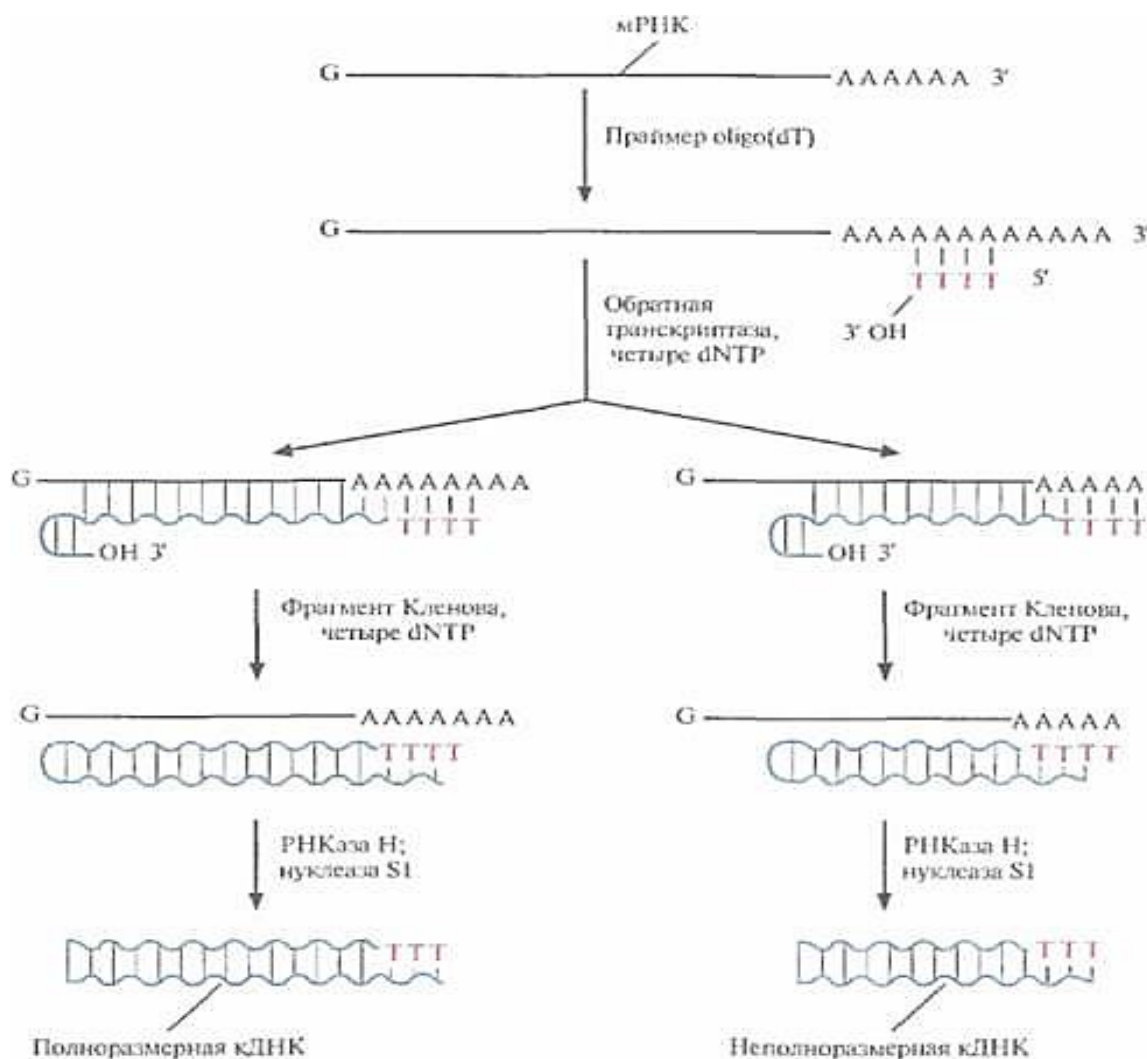
§ 10. Эукариотларнинг структуравий генларини клонлаш

Эукариотик структуравий генларни клонлаш учун махсус усуллар зарур. Прокариотлар бирламчи РНК-транскриптлардан интронларни чиқариб юбориш хусусиятига эга бўлмаганликлари боис, эукариотик мРНКнинг бактерия ҳужайрасида тўғри трансляция қилинишининг имкони йўқ. Бундан ташқари, эукариотик ДНК экспрессияси фақат транскрипция ва трансляцияни бошқарадиган прокариотик сигнал кетма-кетлиги мавжуд бўлгандагина амалга оширилиши мумкин. Эукариотик мРНКнинг охирги соҳалари ўзига хос тарзда ўзгарган (модификацияланган): уларнинг 5'-учлари кэпланган (G қолдиқдан кўпинча метилирланган «кэп»ни сақлайди), 3'-учлари эса полиаденилирланган (аденозиннинг тахминан 200 қолдиғидан иборат poly(A)-«дум» сақлайди).

Poly(A)-дум борлиги мРНКни рибосома ва транспорт РНКдан ажратиш имконини беради. Бунинг учун умумий эукариотик РНК целлюлоза билан тўлдирилган, тимидин қолдиқларидан иборат ўлчамлари тахминан 15 звенога тенг қисқа олигонуклеотид занжирлари, oligo (dT) бириктирилган колонкадан ўтказилади. мРНК молекулаларининг Poly(A)-думлари oligo (dT) билан жуфтлашади ва колонкада тутиб қолинади, тРНК ва рРНК молекулалари эса колонкадан тўсиқсиз ўтиб кетади. Кейин колонка А ҳамда Т ўрасидаги водород боғламларининг узилиши содир бўладиган буфер билан ювилади, ва мРНК ажралади.

мРНКнинг ўзини ДНК-векторга киритиш мумкин эмас, дастлаб унда икки занжирли ДНКни синтезлаш зарур. Бунинг учун иккита турли хил полимеразадан фойдаланилади: тескари транскриптаза ва ДНК-полимераза I нинг Кленов фрагменти (расм 10.1). Дастлаб тозаланган РНКли реакцион аралашмага қисқа oligo (dT), тескари транскриптаза ва тўртта dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) қўшилади. мРНКнинг Poly(A)-думи комплементар занжир синтезини инициациялайдиган эркин 3'-ОН-гуруҳини тутувчи oligo (dT) билан жуфтлашади. Мазкур синтезда матрица бўлиб мРНК молекуласи хизмат қилади, уни эса баъзи РНК-вируслар ишлаб чиқарадиган тескари транскриптаза катализациялайди. У қолдиқнинг ўсиб бораётган занжирига бирин-кетин Т, С, G, ёки А, комплементар А, G, С ёки U мРНКни бирлаштиради. In vitro шароитида ДНК синтези охиригача бормайди, бунда тескари транскриптаза одатда тўхташдан

олдин “орқага қайтади” ва бир нечта нуклеотидларни тескари йўналишда бириктирадики (расм 10.1), натижада “шпилка” ҳосил бўлади.



Расм 10.1. кДНК синтези. Тозаланган мРНК препаратига праймер oligo(dT) қўшилади. РНК-матрицада ДНК синтези учун тескари транскриптаза ферменти ва тўртта dNTPдан фойдаланилади. In vitro шароитида тескари транскриптаза барча матрицаларда тўлиқ ўлчамли кДНК-нусхалар синтезини таъминламайди ва ўсиб бораётган занжир учида эркин 3'-ОН-гуруҳ билан шпилка ҳосил қилади. Бу гуруҳ Кленов фрагменти иштирокида ДНК иккинчи занжири синтезини инициациялайди. Молекула синтези якунлангандан кейин мРНК РНКазa II билан гидролизланади, ДНКга эса нуклеаза SI билан ишлов берилади, натижада ДНКнинг тўмтоқ учли шпилкасиз чизиқли молекулалари ҳосил бўлади (Глик ва Пастернак бўйича).

Реакцион аралашмага *E.coli* ДНК-полимераза I нинг биринчи занжирдан матрица сифатида фойдаланиб, ДНК иккинчи занжирини

охиригача куриб битказадиган Кленов фрагменти қўшилади. У дизоксирибонуклеозидларни шпилканинг 3'-ОН-учидан бошлаб ўсиб бораётган занжирга бирлаштиради. Синтез тугатилгандан кейин препаратга мРНК молекулаларини ажратадиган РНКазани ферменти ва ДНК бир занжирли учларини ажратадиган нуклеаза S1 ферменти билан ишлов берилади. Олинган препарат мРНКнинг икки занжирли комплементар ДНК-нусхалари (нДНК) дастлабки намунада устунлик қиладиган қисман ёки тўлиқ аралашмасидир.

Турли хил кДНКни плазмид векторга киритиш ва нДНК-кутубхонани ҳосил қилиш мумкин. Специфик гибрид плазмидаларни ташувчи клонларни идентификациялаш мақсадида нДНК-кутубхонани скрининглаш учун гибридизация ёки иммунологик усуллардан фойдаланиш мумкин. Охирги ҳолатда кДНК транскрипцияни таъминловчи бактериал промотор назорати остида турадиган сайтга жойлаштирилиши керак. Бироқ, ҳеч қайси вектор жойлаштирилган нДНКда тўғри ўқиш рамкаси сақланишини ва тўғри полипептид занжир синтезланишини кафолатламайди. Шундай бўлса-да, у ёки бу усул ёрдамида аниқланган барча ижобий клонларни яна текшириш ва улардан оқсил-нишонни кодлайдиган тўлиқ ўлчамли нуклеотид кетма-кетлигини (таниб олиш жойи) ажратиш зарур.

Генларни клонлаш бўйича типик тажриба қуйидаги босқичларни ўз ичига олади. 1. Организмдан ажратиб олинган зарур бўлган генни ўз ичига олган ДНКнинг рестриктазали бўлиниши. 2. Клонлаш (одатий плазмидали) учун донор ДНК бўлинишида фойдаланилган рестриктазалар ёрдамида хужайра-хўжайинда репликацияланиши мумкин бўлган векторга ишлов бериш. 3. ДНКнинг шу икки намунасини аралаштириш ва фаг Т4 ДНК-лигазаси ёрдамида фрагментларни бириктириш. 4. Хўжайин-хужайраларнинг бириктирилган молекулалари билан трансформациялаш. Трансформацияланган хужайраларда рекомбинант ДНКни амплификациялаш.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Генларни клонлашнинг асосий босқичларини тавсифланг.
2. Кленов фрагменти функциялари.

§ 11. Прокариотларнинг генетик трансформацияси.

ДНКни *E.coli* га кўчириш

Бактерияларнинг ирсий материали – ДНК бошқа хужайрали организмларникига ўхшаш бўлади. Прокариотлар ирсийлиги асосида мутациялар, репликациялар, генлар рекомбинацияси тўғрисидаги умумий тушунчалар ётади. Замонавий генетиканинг кўпгина қонуниятлар моделлари – прокариотларда кашф этилган. Энг кенг тарқалган тадқиқот объекти *Escherichia coli*.

Молекуляр биологиянинг асосий тамойили: “Бир ген – бир фермент” ҳозирги кунда жиддий равишда тўлдирилган. Генлар экспрессиясининг РНК-маҳсулотлари ҳам хужайра жараёнларини бошқаришлари мумкин. Генетик ахборот ота-она хужайраларидан қиз хужайраларга ўтказилади (вертикал ҳолатда). Ахборот амалга оширилиши транскрипция ва трансляция механизмлари ёрдамида содир бўлади. ДНКнинг роли 1944 йилда О.Эвери, К.Маклеод ва М.Маккарти (стрептококк трансформацияси) ва 1952 йилда А.Херши ва М.Чейз (*E.coli* фаг билан трансдукцияси) тажрибаларида исботланган.

Трансформация – бу эркин ДНКни бактерия хужайрасига киритиш. *E.coli*дан кўпгина рекомбинант ДНК билан ишлашда организм-хўжайин сифатида фойдаланилади, ва плазмид ДНК хужайраларига киришини таъминлаш учун уларга CaCl_2 нинг муздек эритмаси билан ишлов берилади, кейин 42°C да 1,5 дақиқа тутиб турилади. Чамаси бундай ишлов берилгандан кейин хужайра деворининг локал зарарланиши содир бўлади.

Мазкур усул трансформациянинг максимал частотасини беради, тахминан 10^{-3} , яъни ҳар 1000 хужайрага битта трансформацияланган хужайра тўғри келади. Қўшилган ДНКнинг 1 мкг га трансформантлар сони каби аниқланадиган трансформация самарадорлиги тахминан 10^7 - 10^8 ни ташкил этади. Трансформация частотаси ҳеч қачон 100 фоиз бўлмайди, лекин бу камчилик трансформацияланган хужайраларни идентификациялаш имконини берадиган танлаш схемаси қўлланилиши туфайли компенсацияланади.

Бегона ДНКни қамраб олиш хусусиятига эга хужайралар компетент деб номланади. *E.coli* компетентлигини индукциялаш зарур, баъзи бир бошқа хужайралар эса азалдан шундай хусусиятга

эга бўладилар. Махсус озуқа муҳити ёки ўстириш шароитидан фойдаланиб компетент ҳужайралар улушини ошириш мумкин. Компетентликнинг кимёвий индукторларига чидамли ёки табиий компетентлик хусусиятига эга бўлмаган ҳужайралар учун ДНК етказиб берилишининг бошқа тизимлари қўлланилади.

Генларни горизонтал ўтказиш (ГГЎ) – организм генетик материални авлоди бўлмаган организмга ўтказиш жараёни. ГГЎ прокариотларда генетик хилма-хилликни оширишнинг муҳим механизми ҳисобланади. Генларни горизонтал ўтказиш мутацион ўзгарувчанлик, геном ичи қайта қурилиши ва генларнинг йўқотилиши билан бир қаторда бактерияларда турлар ҳосил бўлиши ва эволюциянинг ҳаракатлантирувчи кучларидан бири ҳисобланади. Геномнинг бир қисми – экзогенот донордан реципиентга ўтади ва эндогенотга бирлашади. Мерозигот – прокариотлар ирсий материали бир қисмининг вақтинчалик диплоид ҳолати. Бактериялар ирсий материал соҳалари, шу жумладан антибиотикларга чидамли генлар билан алмашилиш хусусиятига эга. Алмашинув патоген бўлмаган ва патоген шакллар орасида содир бўлиши мумкин.

- Конъюгация. Ҳужайраларнинг вақтинчалик жисмоний контакти вақтида ДНК нинг тўғридан-тўғри кўчириб ўтказилиши.

- Трансформация. ДНК эркин молекулаларининг кўчириб ўтказилиши.

- Трансдукция. ДНК молекулаларининг бактериал вируслар иштирокида кўчириб ўтказилиши.

Конъюгация – Генетик материалнинг тўғри ҳужайравий контакт ёрдамида бактериал ҳужайралар аро кўчириб ўтказилиши. Конъюгация F-фактор (F-плазмида), жинсий пиллар ва IV типдаги секреция тизимини ўз ичига олади.

- F+ x F- конъюгацияда F-плазмида бактериал хромосомадан боғлиқ бўлмаган ҳолда мавжуд бўлади ва реципиент ҳужайрасига бутунлигича кўчирилади, донор генлари одатда кўчирилмайди.

- Hfr-конъюгацияда донор ДНКсининг қисман репликацияси содир бўлади, фақат плазмида ва хўжайин генларини сақлаган ДНК занжири (Hfr) кўчирилади, F-плазмида хўжайин хромосомасига интеграциялашган ва бутун бўйича кўчирилмайди.

Электропорация

Хужайралар мембраналари ўтказувчанлигини ошириш учун уларга электр токи билан таъсир этилади. Мазкур жараён электропорация деб номланади. Уни ўтказиш шарт шароитлари турли бактериялар учун турли хил бўлади. *E. coli* билан ишлаганда хужайравий суспензия (50 мкл) ва ДНКни электродлар туширилган идишга жойлаштирилади ва давомийлиги 4,5 мс бўлган ягона импульс берилади (конденсатор сиғими 25 мкФ, кучланиши 2,5 кВ, қаршилиги 200 Ом).

Бундай ишлов берилгандан кейин трансформация самарадорлиги қисқа плазмидалар учун 109 (тахминан 3 минг.н.ж.) ва катта плазмидалар учун 106 (тахминан 135 минг.н.ж.) гача ортади. *E. coli* га ВАС векторини киритиш учун аналогик шарт-шароитлардан фойдаланиш мумкин. Шундай қилиб, электропорация *E. coli* нинг 100 минг.н.ж. дан узунроқ бўлган киритмаларни сақлаган плазмидалар билан трансформациясининг самарали усули ҳисобланади. Электропорациянинг барча турдаги бактериялар учун қулай шарт-шароитлари ишлаб чиқилади деб фараз қилиш учун асос бор, шунинг учун мазкур жараён трансформациянинг стандарт усули бўлиб қолиши мумкин.

Шундай қилиб, рекомбинант ДНК технологияси экспериментал жараёнларнинг бутун бир тўпламини ўз ичига олади. Шулар туфайли специфик генларга эга ДНК фрагментларини ажратишни (клонлаш) амалга оширса бўлади. Клонлашнинг муваффақиятга эришиши ДНК молекуласини муайян ўлчамдаги фрагментларга бўлиш имконияти билан боғлиқ бўлади. ДНКнинг тўғри парчаланиши учун II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалардан фойдаланилади. Мазкур ферментлар специфик нуклеотидли кетма-кетликларни аниқлайди ва ҳар бир занжирдаги фосфодиэфир боғламларни симметрик тарзда бўлади.

Рекомбинант ДНК тутган хужайраларни ажратиш учун махсус усуллардан фойдаланилади. Фрагментларнинг ДНК-лигаза Т4 ёрдамида бирикишида ҳосил бўлган плазмида молекулалари сонини камайтириш учун рестрикцияланган плазмид ДНКга 5'-охирги фосфат гуруҳини чиқариб юборадиган ишқорий фосфатаза билан ишлов берилади. Гибрид плазмидалар сақловчи трансформацияланган хужайраларни танлаб олиш учун 1) муайян

антибиотикларга резистентликни аниқлайдиган тестлар ёки колориметрик реакция; 2) иммунологик тестлар ёки специфик оқсил – клонланган ген маҳсулотини аниқлаш; 3) изланаётган геннинг қайсидир соҳасига комплементар зонд билан гибридлаш ўтказилади.

Бутун бир гени клонлаш имкониятига эга бўлиш учун донор ДНК фақат қисман парчаланади. Бунда турли хил ўлчамли фрагментлар олинади, кейин улардан геномик кутубхона ташкил этилади. ДНК йирик фрагментларини клонлаш учун λ ва P1 бактериофаглар, шунингдек F плазмида асосида векторлар тузилган.

Эукариотик оқсилларни кодловчи ДНК фрагментларини олиш учун тозаланган мРНКда тескари транскриптаза ёрдамида матрицадаги каби ДНКнинг комплементар занжири синтезланади; бу занжирдан ўз навбатида иккинчи занжир синтези учун матрица сифатида фойдаланилади. Ферментатив ишлов берилгандан кейин мазкур икки занжирли комплементар ДНК векторга киритилади.

Клонлашнинг қайси стратегиясидан фойдаланишдан қатъий назар, клонланган кетма-кетлик идентификациялангандан кейин структуравий ген натив эканлигини кўрсатиш зарур.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Рекомбинант ДНК қандай олинади?
2. Генларни вертикал ва горизонтал кўчиришни тавсифланг.

§ 12. ДНКни кимёвий синтези, нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш

1. *ДНК кимёвий синтезининг аҳамияти*
2. *ДНКни секвенирлаш усуллари*
3. *ДНКни секвенирлашнинг дидезоксинуклеотид усули*
4. *Клонлаш ва секвенирлаш учун бактериофаг M13 дан фойдаланиш*

Молекуляр биотехнология учун энг муҳим бўлган усуллар қаторига генларни клонлашдан ташқари ДНК кимёвий синтези, ДНКни секвенирлаш ва полимераза занжир реакцияси (ПЗР) киради.

ДНКнинг ўзи ҳамда унинг репликацияси механизмининг энг муҳим тадқиқотлари давомида олинган маълумотлар туфайли эндиликда ДНКнинг бир молекуласини синтезлаш, бошқасининг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш ва учинчисини ПЗР ёрдамида амплификациялаш имкони пайдо бўлди.

Бир занжирли ДНК-фрагментларини берилган нуклеотид кетма-кетлиги билан кимёвий синтезлашнинг тез ва унчалик қиммат бўлмаган усуллари ишлаб чиқилиши билан молекуляр клонлаш ва ДНКни тавсифлаш методологияси жиддий равишда ўзгарди.

Кимёвий синтезнинг мақсади *in vitro* шароитида бир занжирли ДНК молекуласини олишдан иборат. Бу ерда фақат фосфодиэфир боғламлари ҳосил бўлишининг самарадорлиги юқори бўлгандагина муваффақиятга эришиш мумкин. Акс ҳолда жараён тугагач жуда кам сонли керакли ўлчамдаги молекулалар олинади. *In vitro* шароитида синтезланган молекулаларнинг узунлиги одатда 20-30 нуклеотидни ташкил қилади ва кам ҳолларда 100 нуклеотиддан ошади.

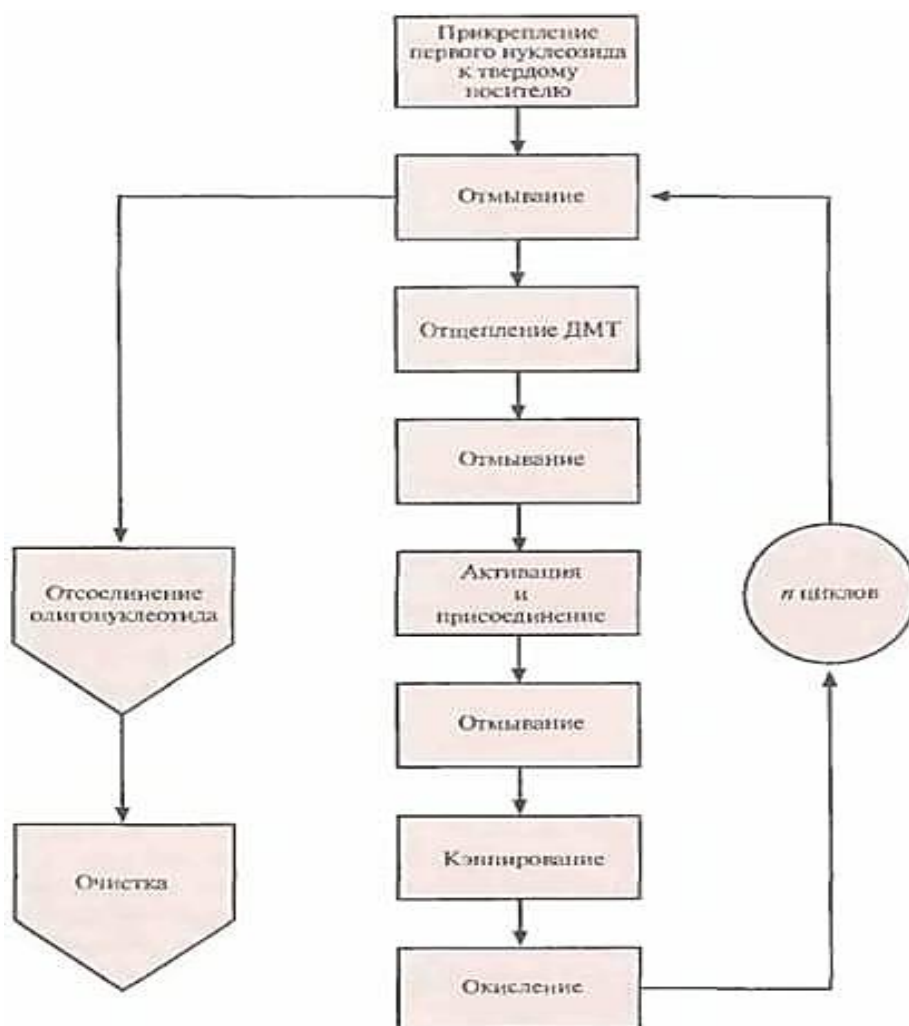
Икки занжирли молекулаларни олиш учун комплементар занжирлар бир-биридан алоҳида синтезланади ва кейин бир турнинг битталиқ полинуклеотид занжирларидан икки занжирли ДНК молекуласини аста-секин совутиш йўли билан отжиг қилиш – тиклаш (ренатурация) жараёни ўтказилади. Бундай йўл билан олинган ДНКдан бутун ген ёки унинг фрагментларини конструкциялаш, ДНК амплификацияси, ажратиб олинган ДНКнинг йўналтирилган мутацияси, шунингдек, гибридизацияда зонд сифатида ва клонлашни енгиллаштирадиган линкер сифатида фойдаланиш мумкин.

ДНКнинг автоматик кимёвий синтези учун воситалар (ДНК-синтезаторлар) пайдо бўлиши билан ≤ 50 занжир звеноси узунлигига эга бир занжирли олигонуклеотидларни олиш бирмунча оддий жараён бўлиб қолди. Ҳар қандай ДНК-синтезаторнинг асосий компоненти клапанлар ва насосдан иборат. Улар ёрдамида реакцион аралашмага қатъий белгиланган дастур бўйича керакли мономер бирликларни ўсиб бораётган занжирга бирлаштиришни таъминлайдиган нуклеотидлар ва реагентлар киритилади. ДНК биологик синтездан фарқли ўлароқ кимёвий синтез давомида ҳар бир янги нуклеотидни занжирнинг 5'-гидроксил учига бириктириш мумкин. Барча реакциялар кетма-кетликда бир реакцион колонкада амалга оширилади, улардан ҳар бирининг давомийлиги ва ювиш вақти эса компьютер ёрдамида назорат қилинади.

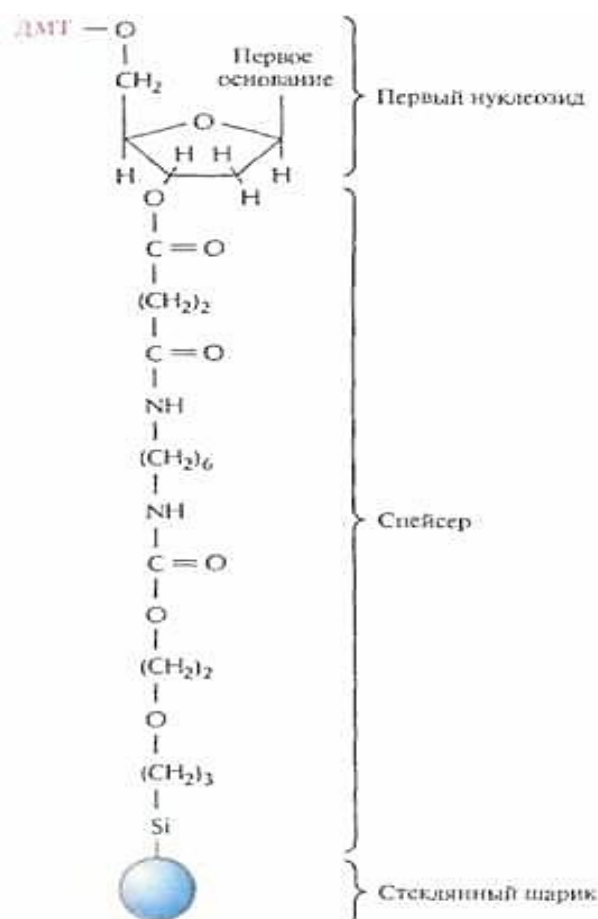
Ҳозирги вақтда фосфорамидит усули ДНК кимёвий синтезининг энг кенг тарқалган усулларида бири ҳисобланади. Унда дастлабки қурилиш блоклари модификацияланган дезоксирибонуклеозидлар ҳисобланади. Модификация дезоксиаденозин ва дезоксицитидин аминогуруҳларига бензол гуруҳи, дезоксигуанозин аминогуруҳига эса изобутирил гуруҳи бирлашишидан иборат. Аминогуруҳи бўлмаган тимидин модификацияланмайди. Бундай модификация нуклеозидларни занжир ўсиб боришидаги ноҳуш ножўя реакциялардан ҳимоялаш учун зарур. Синтез қаттиқ фазада амалга оширилади (ДНКнинг ўсиб бораётган занжири қаттиқ ташувчида фиксацияланади), бу эса барча реакцияларни бир идишда ўтказиш, ҳар бир босқичдан кейин кераксиз реагентларни ювиб ташлаш ва янгиларини реакцияларни имкон қадар тўлиқ ўтказишни таъминлайдиган миқдорда қўшиш имконини беради.

Кўп поғонали синтез босқичлари 12.1.-расмда акс эттирилган.

Расм. 12.1.
Олигонуклеотидн
и кимёвий
синтезлаш.
 n цикллардан
кейин $n+1$
нуклеотиддан
ДНКнинг 1
занжирли
фрагменти ҳосил
бўлади. (Глик ва
Пастернак бўйича)

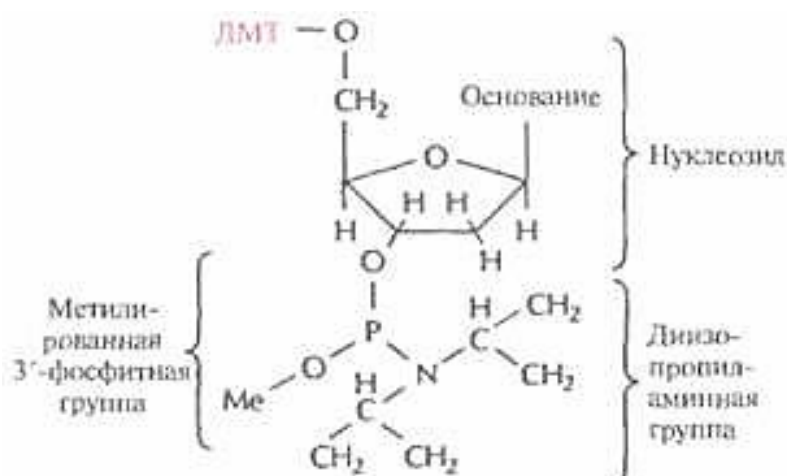


Биринчи нуклеозид (азотли асос+шакар) қаттиқ инерт ташувчида фиксацияланади, одатда булар бир хил ўлчамдаги ковакчалари бўлган ғовак шиша шарчалардан иборат. Биринчи нуклеозиднинг синтезланаётган занжирнинг 3'-энг охирги нуклеотида бўладиган 3'-гидроксил гуруҳини ташувчи билан ковалент боғланган спейсер молекуласига бирикади. Биринчи нуклеотид 5'-гидроксил гуруҳининг носпецифик ўзаро таъсирини бартараф қилиш учун реакцион аралашмасига иккинчи нуклеотидни қўшишдан олдин у диметокситритил (ДМТ) гуруҳи ёрдамида ҳимояланади (расм 12.2).



Расм.12.2. ДНК занжирининг кимёвий синтези бошланадиган комплекс. Биринчи нуклеотид дезоксирибозаси 5'-гидроксил гуруҳига диметокситритил (ДМТ) гуруҳи, 3'-гидроксил гуруҳига эса спейсер молекуласи бириктирилган. Спейсер молекуласи ўз навбатида қаттиқ ташувчи (ғовакли шиша шарча) билан боғланган (Глик ва Пастернак бўйича)

Ўсиб бораётган занжирга бирикадиган ҳар бир нуклеотидда шундай гуруҳ мавжуд, бундан ташқари эса ҳар бир нуклеотид ўз навбатида метил қолдиқ билан ҳимояланган 3'-фосфит гуруҳига бирлашган диизопропиламин гуруҳини ташийди (расм 12.3). Бундай молекуляр конфигурация фосфорамидит деб номланади.



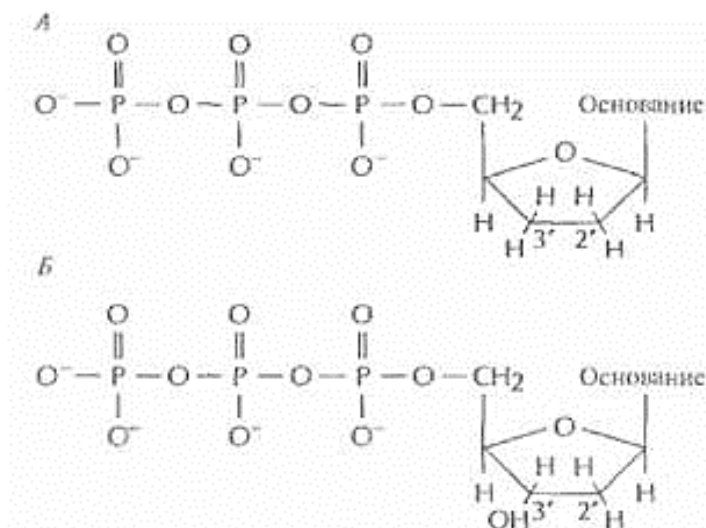
Расм. 12.3. Фосфорамидитнинг структуравий формуласи. Барча тўрт асоснинг – А, Т, G ва С бундай ҳосилаларидан ДНК ДМТ – диметокситритил, Me – метил гуруҳ кимёвий синтезида фойдаланилади. (Глик ва Пастернак бўйича)

ДНКни секвенирлаш усуллари

ДНК молекуласи ҳақидаги мукамал маълумотни фақат унинг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлабгина олиш мумкин. Демак, генни секвенирлаб, унинг нуклеотид кетма-кетлигини функцияси аллақачон маълум бўлган генлар нуклеотид кетма-кетлиги билан солиштирилганда кўпинча унинг функциясини аниқлашга муваффақ бўлинади. Нуклеотид кетма-кетлиги тўғрисидаги маълумотга эга бўлмай туриб молекуляр клонлаш бўйича тадқиқотлар олиб боришнинг имкони йўқ. ДНКнинг у ёки бу фрагментини секвенирлашни ёки А.Максам ва В.Гилбертлар томонидан ишлаб чиқилган кимёвий усул билан, ёки Ф.Сангер томонидан таклиф этилган ферментатив усул билан амалга ошириш мумкин, лекин ҳозирги вақтда дидезоксинуклеотидли метод деб номланган усулдан кенг фойдаланилмоқда.

ДНКни секвенирлашнинг дидезоксинуклеотидли усули

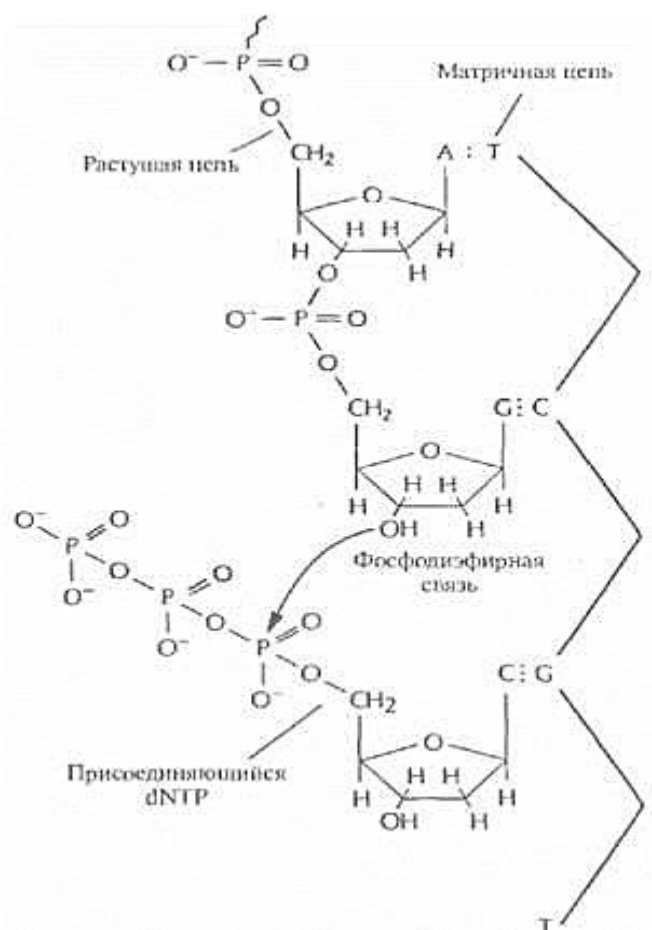
Дидезоксинуклеотид – шакар халқаси углерод атомида 2' ва 3' гидроксил гуруҳларидан маҳрум қилинган сунъий йўл билан олинган нуклеотид (расм12.4,А).



Расм.12.4. А.
Дидезоксинуклеотид
(халқада 2'- ва 3'-
гидроксил гуруҳлари
йўқ).

Б. Дезоксинуклеотид
(фақат 2'-гидроксил
гуруҳи йўқ). (Глик ва
Пастернак бўйича)

Нормада ДНК таркибига кирган дезоксинуклеотидда фақат 2'-гидроксил гуруҳи мавжуд эмас (расм12.4, Б).



Расм.12.5. Одатий шароитларда ДНК синтези. Навбатдаги дезоксирибонуклеотид (дезоксирибонуклеозидтри фосфат; dNTP) матрица занжири комплементар нуклеотиди билан жуфтлашади. Ўсиб бораётган занжир охирги нуклеотидининг 3'-гидроксил гурухи ва бирлашаётган нуклеотиднинг α -фосфат гурухи ўртасида фосфодиэфир боғлам ҳосил бўлади. (Глик ва Пастернак бўйича)

ДНК репликацияси вақтида занжирнинг узайиши навбатдаги нуклеозидтрифосфатнинг ўсиб бораётган занжир охирги нуклеотидининг 3'-гидроксил гуруҳига бирлашиши натижасида содир бўлади (расм 12.5). Ва агар бундай навбатдаги бирлашадиган звено дидезоксинуклеотид бўлса, у ҳолда ДНК синтези тўхтайди, чунки навбатдаги нуклеотид фосфодиэфир боғламини ҳосил қила олмайди (расм 12.6).



Расм 12.6.

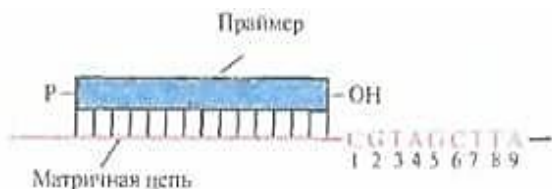
Дидезоксинуклеотиднинг ўсиб бораётган занжирнинг учига бирлашишидан кейин ДНК синтезининг тўхташи. 3'-гидроксил гуруҳ йўқлиги туфайли охирги дидезоксинуклеотид ва навбатдаги нуклеотид ўртасида фосфодиэфир боғлам ҳосил бўлмайди. (Глик ва Пастернак бўйича)

ДНК синтезининг тўхтатилиши – бу дидезокси-усулнинг асосий босқичи, лекин секвенирлашни тўлиқ амалга ошириш учун, бутун бир қатор шартларни бажариш зарур. Турли пробиркаларда секвенирлаш учун бир вақтнинг ўзида ДНК синтезининг ҳар бирида тўртта дидезоксинуклеотидлардан бири иштирок этган тўртта реакцияси ўтказилади. Реакция маҳсулотлари гель-электрофорез ёрдамида ажратилади, радиоавтография ўтказилади ва радиоавтографдан ДНК синтезланган фрагментининг нуклеотид кетма-кетлиги “ўқиб чиқилади”.

Дидезоксисеквенирлаш жараёнининг биринчи босқичи киритилган вставка билан ёнма-ён бўлган, клонловчи вектор занжирларидан бирининг специфик қисмига эга бўлган, узунлиги 17-20 звенодан иборат синтетик олигонуклеотид гибридизациясидан ташкил топган. Ушбу олигонуклеотид синтез инициацияси учун 3'-гидроксил гуруҳини етказиб берувчи праймер ҳисобланади. Таркибида праймер бор эритма ҳар бирида тўртта дезоксинуклеотид dATP, dCTP, dGTP ва dTTP (улардан бири – изотоп билан нишонланган) ва тўртта дидезоксинуклеотидлардан (ddATP, ddCTP, ddGTP ёки ddTTP) бири бўлган тўртта пробиркага тақсимланади.

Ҳар бир дидезоксинуклеотиднинг концентрацияси шундай танланадики, дидезоксинуклеотид ўсиб бораётган занжирнинг фақат унга биринчи бўлиб учраган позицияси бўйичагина эмас, балки барча

позициялари бўйича киритилган бўлиши керак. (Эслатиб ўтамиз, дидезоксинуклеотид бирлашгандан кейин занжирнинг ўсиши дарҳол тўхтайди, шу сабабдан ҳар бир занжир 3'-дидезоксинуклеотид билан тугайди.) ДНК-полимераза иштирокидаги ферментатив синтез якунида ҳар бир пробиркада ҳар бири праймерли кетма-кетликка эга бўлган олигонуклеотидларнинг ноёб тўплами мавжуд бўлади (расм 12.7).



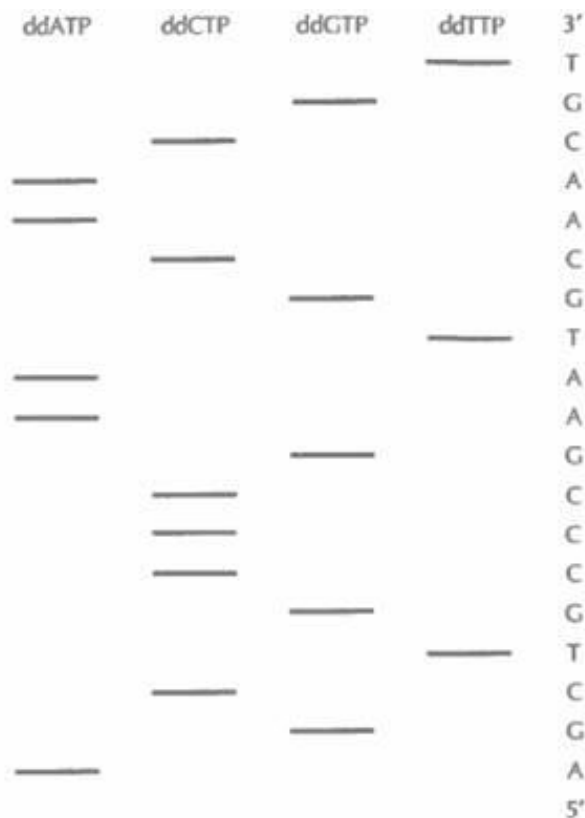
Реакционная смесь	Праймер и длина достроенной последовательности	Праймер и достроенная последовательность
ddATP+ четыре dNTP	Праймер +3 Праймер +7 Праймер +8	Праймер-dGdCddA Праймер-dGdCdAdTdCdGddA Праймер-dGdCdAdTdCdGdAddA
ddCTP+ четыре dNTP	Праймер +2 Праймер +5	Праймер-dGddC Праймер-dGdCdAdTddC
ddGTP+ четыре dNTP	Праймер +1 Праймер +6	Праймер-ddG Праймер-dGdCdAdTdCdG
ddTTP+ четыре dNTP	Праймер +4 Праймер +9	Праймер-dGdCdAddT Праймер-dGdCdAdTdCdGdAdAddT

Расм12.7.

Дидезоксинуклеотидлар иштирокидаги занжир синтезида праймер узайиши. Тўрт пробирканинг ҳар бирида праймер кетма-кетлигини ўз ичига олган турли узунликдаги олигонуклеотидларнинг ноёб тўплами ҳосил бўлади. Бунда ДНК молекулаларининг тўлиқ ўлчамли қандайдир сони ҳосил бўлади. dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат (Глик ва Пастернак бўйича)

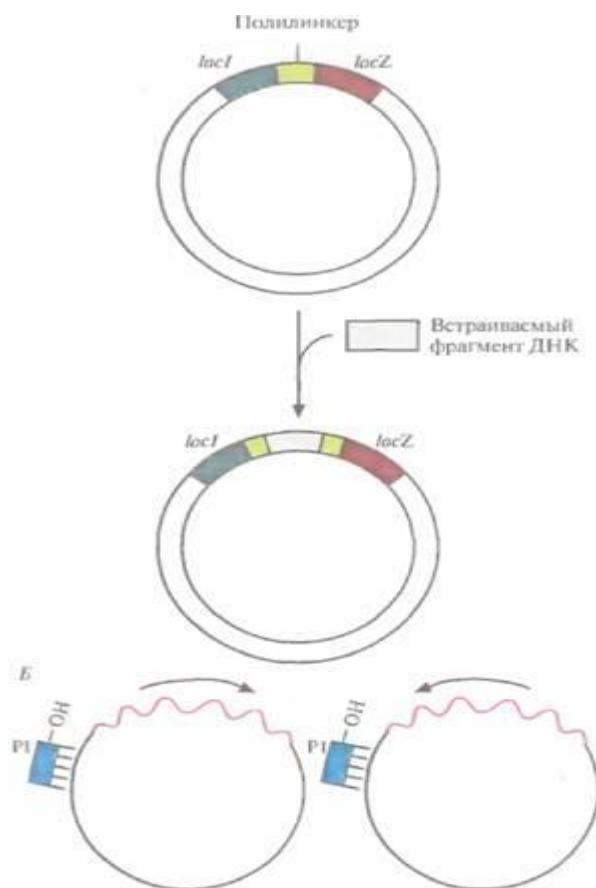
Кейин занжирлар ажралишини таъминлаш учун пробиркаларга формамид қўшилади, ва тўртта йўналишда (пробиркалар сонига кўра) полиакриламид гелида электрофорез ўтказилади. Бу ДНК бир занжирли фрагментларини улар узунлиги бўйича ҳатто бир нуклеотидга фарқ қилса ҳам ажратиш имконини беради. Радиоавтографда ДНК нишонланган фрагментларига жавоб берувчи узун чизиклар тўплами аниқланади. Уларнинг таққосланиши ДНК секвенирланадиган сегментининг нуклеотид кетма-кетлигини тўғридан-тўғри “ўқиш” имконини беради. 12.8-расмда келтирилган мисолда мазкур сегментнинг 5'-учидан бошланган дастлабки олти нуклеотиди – бу AGCTGC. Энг “тез” узун чизик (гелнинг энг пастидаги радиоактив нишонланган фрагмент) энг қисқа фрагментга

мос келади ва ddATP йўлида жойлашади; кейинги узун чизиклар мос равишда ddGTP, ddCTP, ddTTP йўлларида жойлашади ва ҳ.к. Кўпчилик радиоавтографларда 250 дан 300 тагача узун чизиклар аниқ ажралиб туради. Праймерли кетма-кетлик клонланган ДНК киритилган сайтдан фиксацияланган масофада (10-20 нуклеотид) жойлашади ва бу клонланган фрагмент бошланишини осон аниқлаш имконини беради.



Расм.12.8. Дидезокси-усул ёрдамида ДНКни секвенирлашда олинган радиоавтографнинг схематик тасвири. Катаклардан ҳар бирининг ичига ddATP, ddCTP, ddGTP ёки ddTTP дидезоксинуклеотидлардан бири жойлашган тўрт пробиркалардан бирининг ичидагилари киритилди. Нуклеотид кетма-кетлиги автографдан пастдан тепага қараб ўқилади. Расмда у ўнг томонда кўрсатилган. (Глик ва Пастернак бўйича)

Секвенирлаш учун шунингдек M13 фаги асосидаги тизимдан фойдаланилади. Фаг ДНКсига секвенирланиши исталган 500гача нуклеотиддан иборат узунликка эга бўлган ДНК фрагменти киритилади(расм 12.9). Мазкур рекомбинант ДНКни бир занжирли шаклда олиш ва ундан вставкани секвенирлаш учун матрица сифатида фойдаланиш мумкин. Шунингдек клонланган ДНК тутган икки занжирли плазмидалардан ҳам фойдаланиш мумкин.

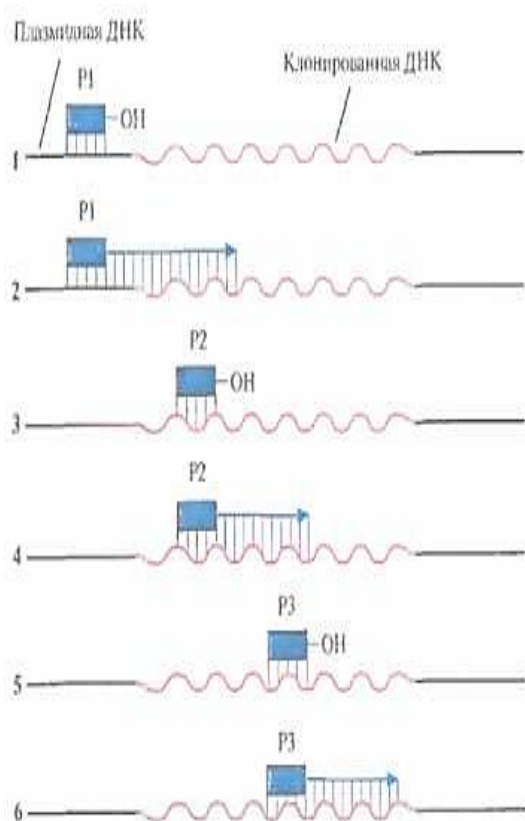


Расм.12.9. Бактериофаг М13дан клонлаш ва секвенирлашда фойдаланиш.

А. ДНК фрагментини ДНК М13 икки занжирли репликатив шаклининг ичига ўрнатиш.

Б. ДНК клонланган фрагментининг комплементар занжирларини айнан ўша бир праймер (P1) ёрдамида секвенирлаш. Стрелкалар билан вставканинг (киритманинг) вектордаги турган жойи кўрсатилган. (Глик ва Пастернак бўйича)

Чўзилган клонланган сегментларнинг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш учун дастлаб киритилган вставка билан қўшни бўлган соҳага комплементар бир нуклеотидли праймер танланади, ва дидезокси-усул ёрдамида дастлабки 250-300 нуклеотид секвенирланади. Кейин секвенирлаш натижаларига кўра иккинчи праймер синтезланади ва клонланган соҳанинг кейинги 250-300 нуклеотидларининг кетма-кетлиги аниқланади ва ҳ.к. “Праймер-воситали сайр” («праймер-опосредованная прогулка») деб номланган мазкур усул ДНК чўзилган фрагментларини уларнинг М13 фаги асосидаги тизим ҳолатидаги каби субклонланишсиз секвенирлаш имконини беради (расм 12.10).



Расм.12.10. ДНКни праймер-воситали сайр усули билан секвенирлаш. 1. ДНК занжири синтезини плазмиданинг киритма яқинида жойлашган соҳасига комплементар праймер (P1) ёрдамида инициациялаш. 2. Клонланган ДНКнинг узунлиги 250-300 нуклеотиддан иборат фрагментини секвенирлаш. 3. Узунлиги тахминан 20 нуклеотиддан иборат секвенирлаб бўлинган охирги соҳасига комплементар бўлган иккинчи праймерни танлаб олиш. 4. Клонланган ДНКнинг навбатдаги сегментини иккинчи праймер (P2) ёрдамида секвенирлаш. 5. Узунлиги тахминан 20 нуклеотиддан иборат секвенирлаб бўлинган охирги соҳасига комплементар бўлган учинчи праймерни танлаб олиш. 6. Учинчи праймердан (P3) клонланган ДНКнинг навбатдаги сегментини секвенирлашда фойдаланилади. Мазкур жараён бутун вставкани секвенирлаб бўлингунча давом эттирилади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Айтайлик, сизнинг янги ДНК-синтезаторингиз нуклеотидларни 98,5% бирлаштиришда ўртача самарадорликка эга. Агар сиз узунлиги 50 нуклеотиддан иборат гибридизация зондини синтезлаётган бўлсангиз маҳсулотнинг чиқиши қандай бўлади?
2. Линкер нима? Ундан қаерда фойдаланилади?
3. Дидезоксинуклеотидлар нима? Қандай қилиб уларнинг ёрдамида ДНКнинг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланади?
4. Нима учун фақат бир занжирли ДНКнинг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш мумкин?
5. Қандай қилиб M13 фаги асосидаги вектор тизими ёрдамида клонланган ДНК нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш мумкин?

§ 13. ДНК амплификацияси. Полимераза занжир реакцияси

Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) – бу *in vitro* шароитида кўп сонли специфик нуклеотид кетма-кетликлари нусхаларини олишнинг самарали усули. Уларнинг амплификацияси – баъзан миллион марталаб – уч босқичли циклик жараён мобайнида амалга оширилади. ПЗР учун зарур: 1) кетма-кетлик-нишонни ён томондан жойлашган қарама-қарши занжирлардаги ДНК соҳаларига комплементар иккита синтетик олигонуклеотид праймер (узунлиги 20 тадан нуклеотидлар); уларнинг 3'-гидроксил учларини ДНК билан тиклангандан (отжигдан) кейин бир-бирига қараши кўзда тутилиши лозим; 2) узунлиги 100 ~35 000 н.ж.гача бўлган ДНК-нишон; 3) 95⁰ ва ундан юқори ҳароратда ўз фаоллигини йўқотмайдиган термостабил ДНК-полимераза; 4) тўртта дезоксирибонуклеотид.

Типик ПЗР-амплификация қуйидаги уч реакциянинг кўп маротаба такрорланишидан иборат.

1. *Денатурация*. ПЗР биринчи босқичи ДНК намунасини 95⁰С ҳароратда ҳеч бўлмаганда 1 дақиқа давомида ушлаб туриб иссиқлик билан денатурациялашдан иборат. Реакцион аралашмада ДНКдан ташқари ортиғи билан иккита праймер, *Thermus aquaticus* бактериясидан ажратиб олинган термостабил ДНК-полимераза *Taq*, ва тўртта дезоксирибонуклеотид мавжуд бўлади.

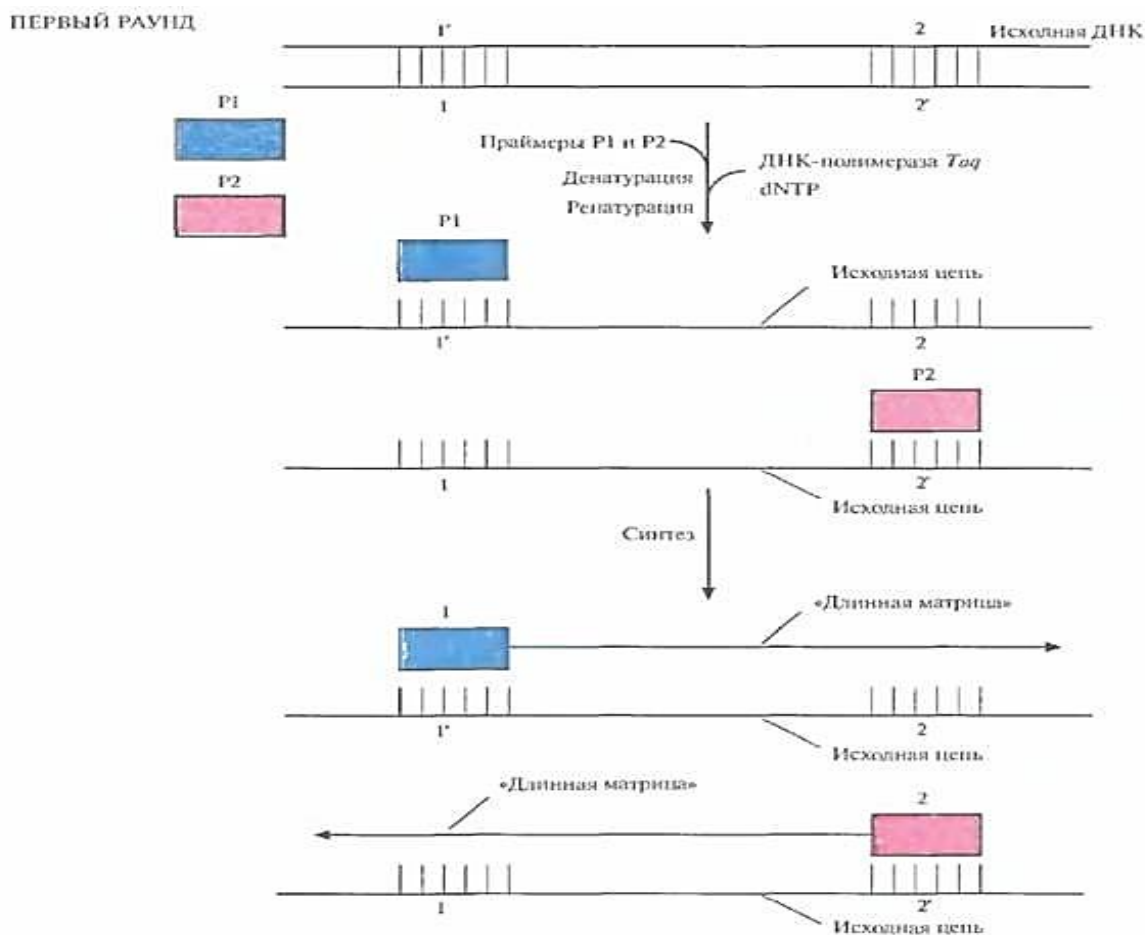
2. *Ренатурация*. Аралашма ҳарорати 55⁰С гача секин пасайтирилади, бунда праймерлар ДНК комплементар кетма-кетликлари билан жуфтлашади.

3. *Синтез*. Ҳарорат 75⁰С гача оширилади – бу ДНК-полимераза *Taq* учун оптимал катталиқ. ДНКнинг праймер 3'-гидроксил гуруҳи билан инициацияланадиган комплементар занжири синтези бошланади (расм.13.1).

Барча реакциялар термостатга қўйилган пробиркаларда олиб борилади. Ҳарорат режимини ўзгартириш ва уни ушлаб туриш автоматик тарзда амалга оширилади. Ҳар бир цикл одатда 3-5 дақиқа давом этади.

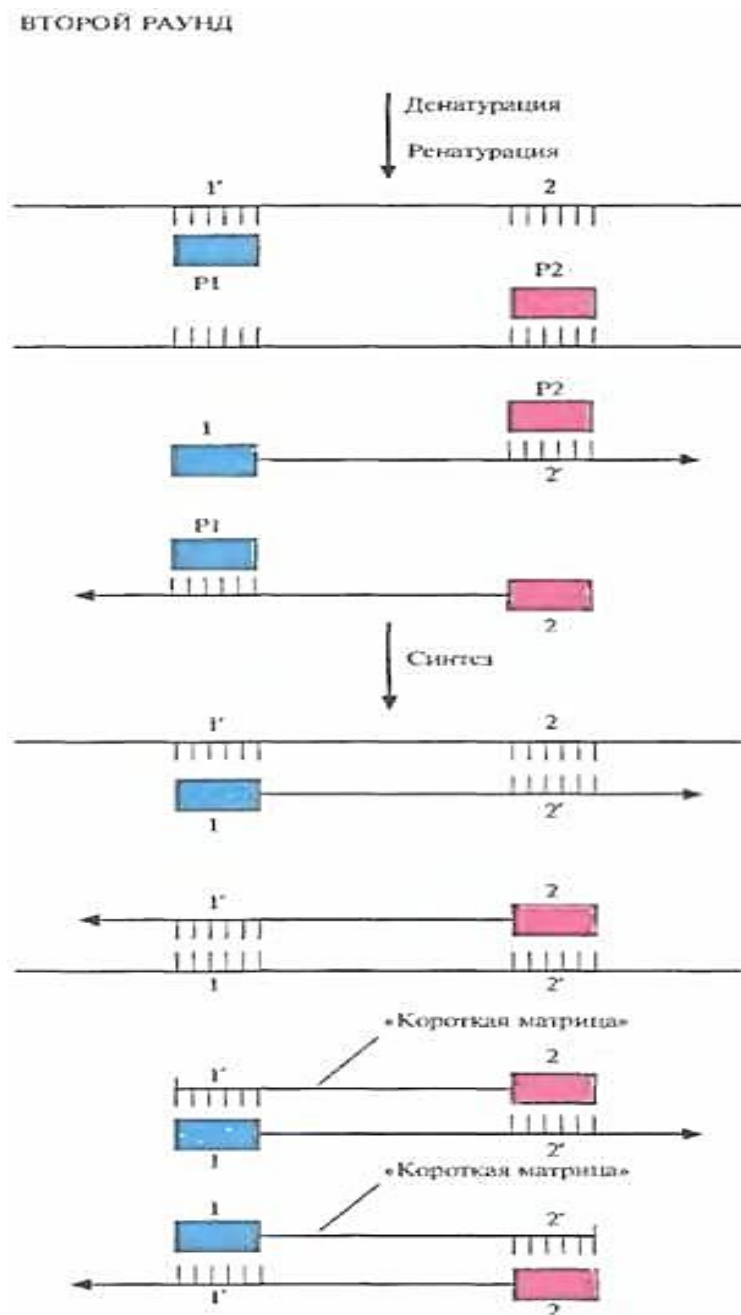
ПЗР давомида ДНК муайян сегментининг амплификацияси айнан қай йўсинда содир бўлишини тушуниш учун барча праймерларнинг ҳолати ва уларга комплементар бўлган кетма-кетликларни ҳар бир раундда аниқ тасаввур қилиш зарур. Биринчи раундда янги синтезланган занжирларнинг ҳар бири “унинг”

праймерининг 3'-гидроксил гуруҳидан иккинчи праймерга комплементар бўлган кетма-кетликнинг охирги нуклеотидигача бўлган масофага нисбатан анча катта узунликка эга. Бундай занжирлар “узун матрицалар” деб аталади, кейинги бўладиган синтез айнан уларда боради (расм. 13.1).



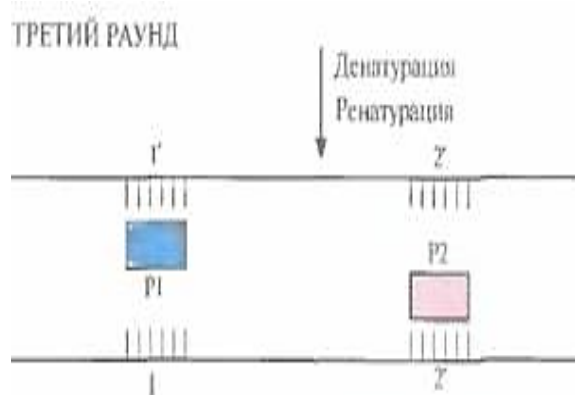
Расм. 13.1. ПЗРнинг биринчи раунди. ДНК-нишон бир занжирдаги 1'-2 ва бошқа занжирдаги – 1-2' кетма-кетликлар билан фланкизацияланган (чегараланган). ДНК намунасига праймерлар (P1 ва P2), ДНК-полимераза *Taq* ва тўртта дезоксирибонуклеозидтрифосфат (dNTP) қўшилади. Аралашма 95°C гача қиздирилади, 1 дақиқа давомида инкубацияланади ва 55°C гача аста-секинлик билан совутилади. Ортиғи билан қўшилган праймерлар бундай ҳароратда ажратилган занжирлар билан жуфтлашади. Ҳарорат 75°C гача оширилади. Бундай шароитларда ДНК иккала занжирлари праймерларининг 3'-гидроксил учларидан бошланадиган синтези содир бўлади. Синтезланган занжирларнинг ҳар бири “унинг” праймерининг 3'-гидроксил гуруҳидан иккинчи праймерга комплементар бўлган кетма-кетликнинг охирги нуклеотидигача бўлган масофага нисбатан анча катта узунликка эга. Бу занжирлар ПЗРнинг иккинчи раундида матрица бўлиб хизмат қилади. (Глик ва Пастернак бўйича)

Иккинчи раундда дастлабки ва янги синтезланган (“уzun матрица”) занжирлардан ташкил топган икки занжирли ДНК яна денатурацияга дучор қилинади, кейин эса праймерлар билан тикланади (отжиг қилинади). Синтез вақтида мазкур раундда “уzun матрицалар”, шунингдек бир учида праймер ва бошқа учида иккинчи праймерга комплементар кетма-кетлик бўлган («қиска матрицалар») баъзи бир занжирлар қайтадан синтезланади (расм. 13.2).



Расм. 13.2. ПЗРнинг иккинчи раунди. Бу ҳолатда биринчи раундда ҳосил бўлган ДНК молекуласи аралашмаси дастлабки материал бўлиб хизмат қилади (расм. 5.18). Отжиг қилинганда (тикланганда) праймерлар дастлабки занжирларникидек, биринчи раундда синтезланган “уzun матрицалар”нинг ҳам ўзларига комплементар бўлган соҳалари билан гибридланади. *in vitro* шароитидаги ферментатив синтез натижасида бошланғич занжирларда “уzun матрицалар”, “уzun матрицалар” да эса – “қиска” лари синтезланади. “Қиска матрицалар” бир праймердан бошланиб, иккинчи праймерга комплементар кетма-кетлик билан тугайди. (Глик ва Пастернак бўйича)

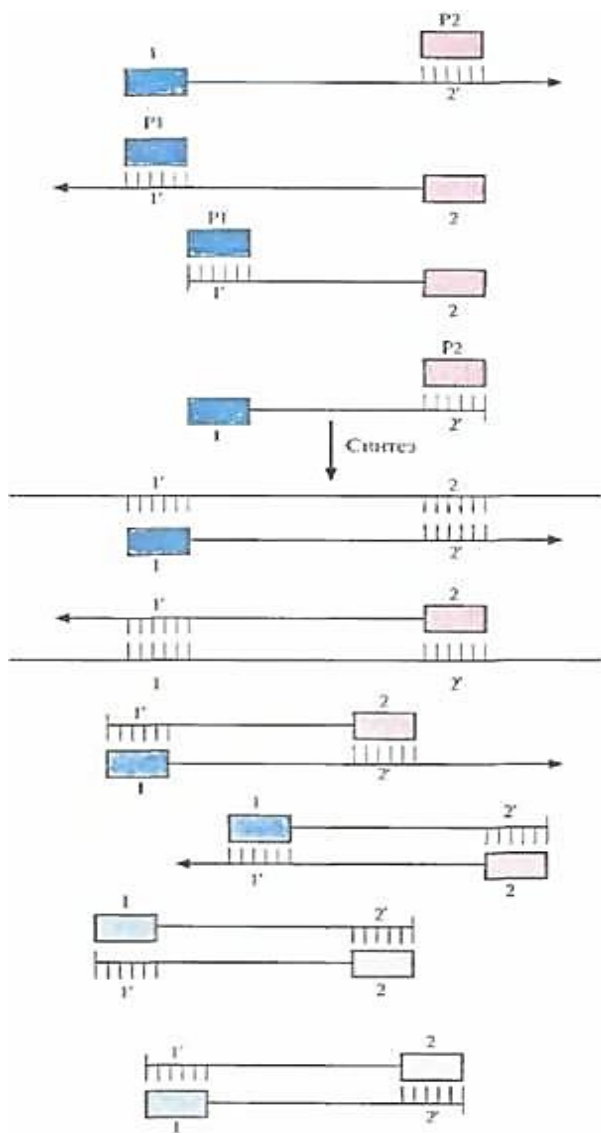
Учинчи раунд давомида илгари ҳосил бўлган гетеродуплекслар бир вақтнинг ўзида денатурация ва праймерлар билан тикланишга (отжигга) дучор қилинади, кейин эса репликацияланади (расм.13.3).



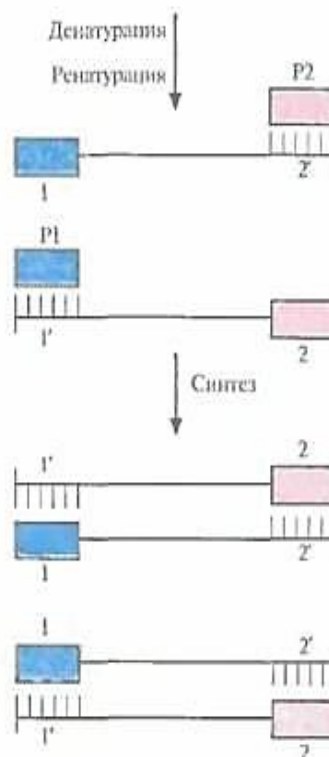
Расм. 13.3. ПЗРнинг учинчи раунди. Отжиг қилинганда (тикланганда) праймерлар бошланғич занжирларнинг комплементар соҳалари, шунингдек “уzun” ва “қиска” матрицалар билан гибридланади. *in vitro* шароитидаги ферментатив синтез натижасида бошланғич занжирларда “уzun матрицалар”, “уzun” ва “қиска” ларида эса – фақат “қиска матрицалар” синтезланади. (Глик ва Пастернак бўйича)

Кейинги раундларда “қиска матрицалар” янада кўпроқ бўлади, ва 30-раундга келиб уларнинг сони бошланғич “уzun” матрицалар сонидан 10^6 баробар ортиқ бўлади (расм. 13.4).

ПЗР усули кенг тарқалган. Энг муҳим қўлланилиш ҳолатларидан бири – бу патоген микроорганизмлар, инсон, ҳайвонлар ва ўсимликлар касалликларининг қўзғатувчиларини идентификациялаш, клонлаш мақсадида ДНК специфик ферментларини кўп миқдорда олиш; специфик мРНК 5'- ва 3'-учларининг амплификацияси, генлар синтези, генлардаги у ёки бу ирсий касалликка жавобгар делециялар ва вставкаларни аниқлашдир.



ТРИЦАТЫЙ РАУНД



Расм. 13.4. ПЗРнинг ўттизинчи раунди. Бу боскичда реакцион аралашмада деярли фақат “қисқа матрицалар” мавжуд бўлади. (Глик ва Пастернак бўйича)

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. “Узун матрица”, “қисқа матрица” нима, ПЗР-раундлар сони ортиши билан уларнинг нисбати қандай ўзгаради?
2. ПЗР ёрдамида генлар қандай синтезланади?
3. мРНК молекулалари охирларини қандай қилиб кДНКга “айлантириш” мумкин?

§ 14. Гель электрофорези. ДНК гибридизацияси

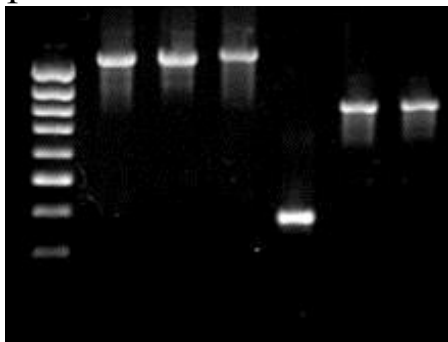
Агарозали гелда ДНК электрофорези – ДНК фрагментларини узунлиги бўйича бўлиш учун қўлланиладиган аналитик усул. Турли хил ўлчамга эга фрагментларнинг ташқи электр майдони таъсири остида гелда ҳаракатланишидаги турлича ҳаракат тезлигига асосланган.

Усулнинг қўлланилишидан бири – плазмид ДНКни тадқиқ қилиш. У одатда халқасимон ва иккиламчи тузилмаларни ҳосил қилади, масалан, суперспиралга буралади. Шундай қилиб, плазмида ўлчамини аниқлаш учун иккиламчи тузилмалар элементларини бузиш зарур. Бунинг учун гелга суртишдан олдин плазмида “линеарланади” (чизиқли қилинади), яъни рестриктазалардан (эндонуклеазалардан) бири билан ишлов берилади. Рестриктаза шундай танланадики, у плазмидани фақат бир жойидан кесиш керак.

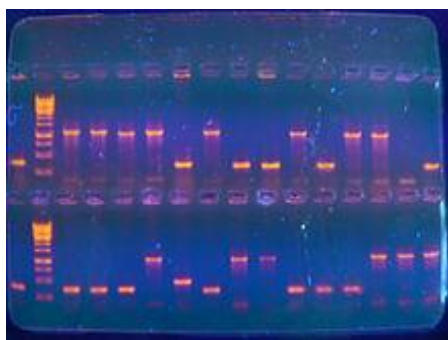
Турли хил ўлчамли ДНК фрагментларини бўлиш учун турлича концентрацияга эга агарозали гелдан фойдаланилади. Бўлинаётган ДНК фрагментларининг узунлиги қанчалик кам бўлса, агароза концентрацияси шунчалик катта бўлиши керак:

Бўлинаётган ДНК фрагментининг узунлиги	Агароза концентрацияси, %
50-1500 н.ж.	2
300-3000 н.ж.	1,5
400-6000 н.ж.	1,2
500-10000 н.ж.	1
800-10000 н.ж.	0,7
1000-20000 н.ж.	0,5

Электрофорез ўтказилганда ДНК фрагментлари гелда электр майдони кучи остида миграцияланади. Гап шундаки, ДНК молекулаларининг шакарфосфатли рамкаси манфий зарядланган ва шу сабабдан ДНК занжирлари манфий зарядланган катоддан мусбат анодга қараб ҳаракатланади. Анча узунроқ молекулалар секинроқ миграцияланади, чунки гелда секин ҳаракатланади, анча қисқароқ молекулалар тезроқ ҳаракатланади.



ДНК электрофорезидан кейин агароз гелъ фотосурати. Чап йўлакча – маълум ўлчамли ДНК фрагменти



ПЗР маҳсулотларининг электрофорез усули билан бўлиниши натижалари. Агароз гелъ ультрабинафша нурлари таъсири остида флуоресценцияланадиган бромид этидий билан бўялган (бу ерда 312 нм тўлқин узунлиги билан)

Электрофорез бошланишидан олдин электрофорез боришини визуаллаштириш ва намуналарни глицерин билан оғирроқ қилиш учун (намунада глицерин 20%гача) намуналарга рНи кислотали кўрсаткичга эга икки хил бўёқ (бу мақсадда кўпинча ксилен ҳаво ранги ва бромфенол кўкидан фойдаланилади) қўшиш одатий ҳолдир. Бўёқ шунингдек жараёни қачон тўхтатиш лозимлигини аниқлаш учун ҳам зарур.

Электрофорез буферли эритма билан тўлдирилган камерада ўтказилади. Кўпинча таркибида ЭДТА, трис, борат ва сирка кислотаси бўлган буфердан фойдаланилади. Шунга мувофиқ борат кислотали буфер TBE (tris-borate-EDTA), сирка кислотали буфер эса -TAE (tris-acetate-EDTA) деб номланади. TBE ва TAE она эритмалари

концентрациялари агар уларни ишчи концентрациялар билан солиштирилса мос равишда 6х ва 50х ни ташкил қилади. Буфер қўйилган электр майдони таъсири остида ДНК молекуласининг бўлиниши содир бўладиган эритманинг ион кучини ошириш учун зарур.

Бўлинишдан кейин (баъзан бўёқ эритилган агарозага солинади) турли хил узунликка эга ДНК фрагментлари ДНК билан специфик ўзаро таъсирга эга флуоресцент бўёқлар ёрдамида визуаллаштирилади, масалан, агароз геллар одатда дуплекс азот асослари ўртасида интеркалирлайдиган ва УБ-нурларида флуоресценцияланадиган бромид этидий билан бўялади. Ўлчамларни аниқлаш узунлиги маълум ДНК («DNA ladder», «линейка», «ДНК маркерлари») тижорий фрагментлари тўпламлари ва текширилаётган намуналардаги ДНКни солиштириш йўли билан амалга оширилади. Одатда чизиклар интенсивлигини солиштириб текширилаётган намуналарда ДНК концентрациясини тезликда баҳолаш мумкин бўлиши учун тижорий маркерларда алоҳида фрагментлар таркиби ҳам кўрсатилади. Лозим бўлса плазмидага уни бир нечта жойидан кесадиган рестриктаза билан ишлов бериб, гель учун ДНК маркерларини мустақил тайёрлаш мумкин. Бунинг учун эндонуклеаза танлаб олинади, унинг таъсири остида турли хил узунликдаги 5-6 та фрагмент ҳосил бўлади.

Одатда ДНКнинг электрофоретик таҳлили учун агароза гелидан фойдаланилади, лекин агар ДНКнинг бўлинадиган фрагментлари бир неча ўн жуфт нуклеотид узунлигига эга бўлса, у ҳолда полиакриламид гелдан фойдаланиш мумкин. Полиакриламид гелдан шунингдек, ДНКни секвенирлашда ДНК қисқа молекулаларини юқори аниқликлаш учун фойдаланилади.

ДНК гибридизацияси

ДНК гибридизацияси, нуклеин кислоталар гибридизацияси *in vitro* шароитида комплементар бир занжирли нуклеин кислоталарни бир молекулага бирлаштириш. Тўлиқ комплементарликда бирлашиш осон ва тез содир бўлади, қисман нокомплементарлик ҳолатида эса занжирчаларнинг қўшилиши секинлашади, бу эса комплементарлик даражасини баҳолаш имконини беради. ДНК-ДНК ва ДНК-РНК гибридизацияси имкони мавжуд.

Таҷриба баённомаси

Икки занжирли ДНК мос келувчи буферда иситилади. Ташқи шароитлар ўзгариши туфайли комплементар азотли асослар ўртасидаги водород боғламлари термодинамик тарафдан ноқулай бўлиб қолади ва занжирчалар ажралади.

Денатурацияланган ДНКлар препарати бошқа денатурацияланган ДНК билан аралаштирилади.

Препаратлар аста-секинлик билан совутилади, бунда бир занжирли ДНКлар бир-бири билан гибридизацияланади (комплементар асослар ўртасида водород боғламлари ҳосил бўлади), бунда ДНКнинг “гибрид” молекуласи ҳосил бўлади.

ДНК гибридизацияси турлар ўртасидаги генетик ўзаро боғлиқликни аниқлаш учун турли организмлар ДНКларини солиштириш усули. Турларнинг ҳар биридан ажратиб олинган ДНК тасмачалари шундай аралаштириладики, уларнинг ўртасида реакция бошланади. Баъзи тасмачалар “гибрид” қўш тасмалар, яъни ДНКнинг одатдаги структурасини ҳосил қилади, ва уларнинг бирлашиш даражаси бир-бирига қўшимча бўлган асослар кетма-кетлиги сонининг кўрсаткичи ҳисобланади. Мазкур кўрсаткич ўз навбатида турлар ўртасидаги ўхшашлик ўлчами бўлиб хизмат қилади.

Рекомбинант ДНК таҳлилининг кўп босқичлари ДНК ва РНК синтезининг зарур шarti – нуклеин кислоталар занжирларининг ўзаро таъсири комплементарлигига асосланган. Иситиш ёки ишқор билан ишлов бериш йўли билан икки занжирли ДНК алоҳида занжирларга ажратилади (денатурацияланган ДНК).

Денатурацияланган ДНКни нуклеин кислоталар гибридизацияси, яъни комплементар занжирлар нуклеотидларини жуфтлаш йўли билан икки занжирли молекулаларни қайта ҳосил бўлишини таъминлайдиган шароитларда инкубацияланади. Мазкур реакция шунчалик спецификки, ҳатто агар кДНК ДНК умумий сонидан ўн мингдан бир қисмини ташкил қилса ҳам ДНК бир занжирли молекуласининг комплементар занжир (РНК ёки ДНК) билан гибридини аниқлаш мумкин.

Усул гомологик кетма-кетликларни тўлиқ ёки қисман фарқлаш имконини беради.

Нуклеин кислоталар гибридизацияси спецификлиги кўпинча фракцияланиш ёки амплификация билан биргаликда ўн минглаб

бошқа генлар орасидан керакли генни ёки инфекция кўзгатувчисининг нуклеин кислотасини ҳатто унинг ягона нусхаси инсоннинг бир нечта ҳужайрасига тўғри келганда ҳам аниқлаш имконини беради.

Гибридизация зондларини аниқлаш учун радиоактив белги ёки норадиоактив усуллардан фойдаланилади.

Кўпинча нуклеин кислоталарнинг аллель-специфик зондлар билан гибридизацияси қўлланилади. Бундай зонд одатда 15-20 нуклеотид узунлигига эга синтетик бир занжирли олигонуклеотиддан иборат. Битта нуклеотидга фарқ қиладиган иккита зонд синтезланади. Улардан бири нормал, бошқаси эса – мутант кетма-кетликка айнан мос келади, кейингисида алмаштирилган нуклеотид зонднинг ўрта қисмида жойлашган. Гибридизация шароити шундай танланадики, олигонуклеотид фақат унга жуда ҳам комплементар бўлган кетма-кетлик билан боғланади. Аллель-специфик олигонуклеотид зондлардан Саузерн бўйича блоттинг билан биргаликда фойдаланиш мумкин, лекин ҳозир улардан ДНК амплификацияси билан биргаликда фойдаланилади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Электрофорез усулининг асосида қандай тамойил ётади?
2. 150 мл 2.5%-ли гел тайёрлаш учун қанча оғирликдаги агароза зарур бўлади?
3. ДНКнинг 350 ва 150 н.ж. ўлчамли фрагментларини электрофорез усули билан ажратиш учун қандай концентрацияли агарозали гелдан фойдаланиш лозим?
4. Электрофорез ўтказилганда ДНК молекулалари қайси йўналишда ва нима учун ҳаракатланади?
5. Электрофорез жараёнида ДНК молекулалари агарозали гелда ҳаракатланиш тезлиги қандай омиллар билан боғлиқ бўлади?
6. Нима учун гелда ҳаво пуфакчалари ҳосил бўлишига йўл қўймаслик керак? Нима ҳисобига ДНКнинг гелдаги визуализацияси содир бўлади?
7. Электрофорез вақтида гелда ДНК молекулалари ҳаракатини қандай қилиб назорат қилиш мумкин?
8. Электрофорез ўтказилишининг қайси босқичида қўлқопларда ишлаш зарур ва нима учун?

§ 15. Тижорат маҳсулотларини ишлаб чиқаришда рекомбинант микроорганизмлардан фойдаланиш

Генларни ажратиш ва клонлаш стратегияси

Ҳозирги вақтгача молекуляр биотехнология соҳасидаги тадқиқотларнинг асосий мақсади турли хил оқсиллар олиш бўлиб келган. Бироқ рекомбинант ДНК технологиясидан шунингдек кўпгина қимматли паст молекулали бирикмалар – витаминлар, аминокислоталар, антибиотиклар ва бошқаларни кенг кўламда ишлаб чиқаришда фойдаланиш мумкин. Оқсилни – специфик ген маҳсулотини – олишнинг самарали экспрессия тизими мавжуд бўлганда бу алоҳида қийинчилик туғдирмайди. Оқсил бу олиниши исталган ўша охирги маҳсулот (масалан рестрикцияловчи эндонуклеаза), ёки муайян кимёвий реакцияни (масалан, антибиотиклар биосинтези реакциясини) катализацияловчи фермент бўлиши мумкин. Баъзан генетик манипуляциялар натижасида микроорганизм янги фермент синтезлаш хусусиятига эга бўлади ва *in vivo* шароитида улардан паст молекулали бирикмалар – витаминлар, аминокислоталар, бўёқлар, антибиотиклар, турли биополимерларнинг турли хил ўтмишдошлари ва бошқаларни олишда фойдаланиш мумкин. Бундай микроорганизм фойдали метаболитларни ишлаб чиқариш бўйича “фабрика” бўлиб қолади.

Агар тадқиқотчиларнинг ихтиёрида керакли рестрикция эндонуклеазалари (рестриктазалар) бўлмаганда, рекомбинант ДНК технологияларини ривожлантиришнинг имкони бўлмаган бўлар эди. Ҳозирги вақтда савдода 300дан ортиқ турли хил рестриктазалар мавжуд. Мазкур ферментларни энг турли хил: аэроб, анаэроб, фотосинтезловчи, диазотроф, мезотроф, термофил, психрофил, секин ва тез ўсувчи микроорганизмлар синтезлайдилар. Уларнинг ҳар бирини ўстириш учун ферментациянинг турли хил шароитларини: ҳарорат, рН, муҳит таркиби, кислород концентрациясини танлаб олиш зарур – керакли фермент ишлаб чиқаришни максимал даражада ошириш учун. Кўп сонли микроорганизмларни етиштириш, кўп компонентли муҳитларни тайёрлаш, турли хил ферментларни ишлаб чиқиш ва кўпчилик организмлар учун оптимал ўсиш шароитларини танлашга вақт сарфлашга тўғри келмаслиги учун кўпинча *Escherichia coli* да рестрикция эндонуклеазалари генлари клонланади. Бу керакли

маҳсулотларни олиш шароитларини стандартлаш имконини беради. Бундан ташқари, *E. coli* хужайралари культураси тезда юқори зичликка эришади ва керакли ферментни ортиғи билан ишлаб чиқариш учун мослашиши мумкин бўлади.

E. coli ва баъзи бошқа микроорганизмларда бегона генларни ажратиш ва экспрессиялаш технологияси яхши ишлаб чиқилган, лекин шуни унутмаслик лозимки, хўжайин-организмда гетерологик оқсилни синтезлаш унга негатив таъсир кўрсатиши мумкин. Масалан, бундай оқсилни ортиғи билан ишлаб чиқариш хўжайин организми ресурслари битишига олиб келиши ва унинг ўсишига салбий таъсир кўрсатиши мумкин. Гетерологик оқсил мавжудлиги хужайра-хўжайин учун ҳалокатли бўлиши мумкин. Яъни рестрикция сайтлари ДНКнинг барча молекулаларида мавжуд, ва агар клонланган геннинг маҳсулоти рестрикция эндонуклеазаси бўлса, у ҳолда махсус ҳимоя механизмлари бўлмаганда у хўжайин ДНКсини парчалайди.

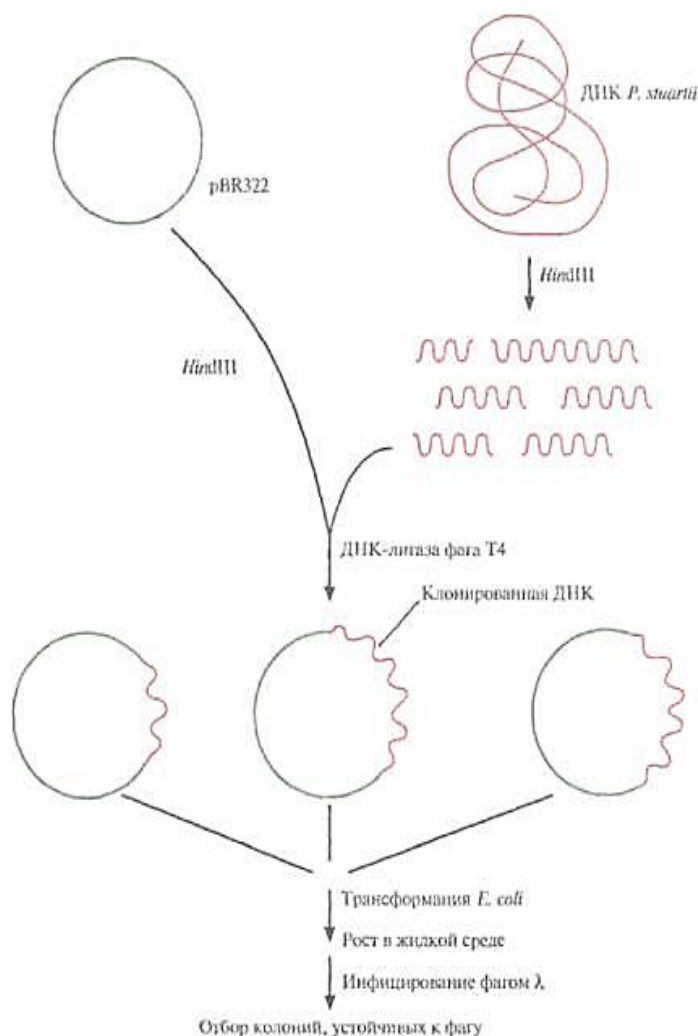
Рестрикция эндонуклеазасини синтезлайдиган микроорганизмлар томонидан ўз-ўзини ҳимоялаш тизими ишлаб чиқилган: рестриктаза сайтининг бир ёки бир нечта асосларини метилирлайди, ва мазкур сайтда ДНКнинг гомологик рестрикция эндонуклеазаси билан парчаланиши блокланади. Грамманфий микроорганизмлар яна бир ҳимоя механизмига эга: уларда рестрикция эндонуклеазалари периплазматик бўшлиқда жойлашган. Бундай компартментализация туфайли рестриктазалар ва ДНКнинг бири биридан ажралиши содир бўлади ва бунда метилирланган (модификацияланган) ферментнинг хромосома ДНКсига эркин етиб бориши таъминланади. Бундан ташқари, бу хужайрани унга кирадиган ҳар қандай ДНК, масалан вирус ДНКси киришидан ҳимоя қилади.

Хўжайин ДНКсини гетерологик рестрикция эндонуклеазалари билан деградацияланиши муаммоларини ҳал қилиш учун ёндашувлардан бири реципиент организмда рестрикция ферменти гени каби мос келувчи модификацияловчи фермент генини ҳам клонлаш ва экспрессиялашдан иборат. Бироқ мазкур икки генни бир микроорганизмда клонлаш, агар улар донор организм хромосомасида бир-биридан узоқ жойлашган бўлса, техник томондан қийинчилик туғдиради. Бундан ташқари, хўжайин ДНКсининг рестрикция эндонуклеазалари билан парчаланишига йўл қўймаслик учун,

метиловчи фермент трансформациядан кейин рестриктаза синтези бошлангунга қадар синтезланиб бўлиши лозим.

15.1 расмда *E. coli* да грамманфий бактерия *Providencia stuartii* рестриктазаси гени *PstI*ни ажратиш ва клонлаш стратегияси кўрсатилган.

Расм. 15.1. *PstI* рестриктаза генини клонлаш ва уни ташувчи трансформацияланган бактериал хужайраларни танлаб олиш. *P. stuartii* хромосома ДНКси *HindIII* билан парчаланadi ва фрагментлар pBR322 плазмидага киритилади. Рекомбинант плазмидалар билан *E. coli* HB101 хужайралари трансформацияланади ва улар суюқ муҳитда ўстирилади, кейин эса бактериофаг λ билан инфекция юктирилади. Фагга чидамли трансформантлар танлаб олинади; айнан улар клонланган *PstI* генини ташийдиган ва экспрессиялайди. (Глик ва Пастернак бўйича)



1. *P. stuartii* ДНКси *HindIII* ёрдамида парчаланadi ва фрагментлар pBR322 плазмиданинг *HindIII*-сайтига киритилади.

2. Рекомбинант плазмидалар билан *E. coli* HB101 хужайралари трансформацияланади ва улар суюқ муҳитда ўстирилади, кейин эса бактериофаг λ билан инфекция юктирилади. Агар хўжайин хужайрада рестрикция ферменти экспрессияланса, у холда хужайра ДНКси синтезланаётган рестриктаза билан фаол парчаланадиган λ типдаги фагларнинг литик таъсирига чидамли бўлиб қолади.

3. λ фагга чидамли трансформацияланган хужайралар периплазматик оксилларни ажратиб чиқариш учун осмотик шокка дучор қилинади. *PstI* рестриктазанинг фаоллиги оксилли экстрактда аниқланади.

4. Мусбат клонларни *PstI*-метириловчи фаоллик бoрлигига текширилади.

Мазкур тажрибада аниқланган битта мусбат клон рестриктаза ва *Art* метилазанинг интакт (бузилмаган) оперони ва *P.stuartii* промотори бўлган 4 минг.н.ж. узунликка эга киритилган ДНК фрагментини сақлайди. Мазкур генетик конструкцияни ташувчи клонда синтезнинг табиий вақт тартиби сақланган: дастлаб метириловчи фермент, кейин рестрикция эндонуклеазаси синтезланган.

E.coli даги рестриктаза *PstI* гени экспрессия даражаси *P.stuartii* дагидан тахминан 10 баробар ортиқ бўлган. Тахмин қилинганидек, рестриктаза периплазматик бўшлиқда, метилаза эса – цитоплазмада жойлашган. *E.coli* да мос генни клонлаб *PstI* олиш мазкур ферментни *P.stuartii* дан ажратишга нисбатан анчагина самаралироқдир.

Рестрикция ва модификация (метирилаш) ферментларини кодлайдиган генларни ажратиш учун қуйида келтирилганлардан иборат бўлган бошқа ёндашувни қўллаш мумкин:

1. Рестрикциянинг маълум эндонуклеазасини ишлаб чиқарувчи организм-донор ДНКси клонлари банки яратилади. Бунда фойдаланилган плазмида вектори мазкур рестриктазанинг ҳеч бўлмаганда битта таниб олиш сайтига эга бўлиши керак.

2. *E. coli* гибрид плазмидалар билан трансформацияланади.

3. Суюқ селектив (танлаш) муҳитида ўстирилган трансформацияланган хужайралардан (яъни плазмидага эга бўлган хужайралардан) плазмид ДНК ажратиб олинади.

4. Унга тадқиқотчини қизиқтирган рестрикция эндонуклеазаси билан ишлов берилади.

5. *E.coli* рестрикция эндонуклеазаси билан ишлов берилган плазмида ДНКси билан трансформацияланади.

Ушбу усулнинг асосий томони шундан иборатки, клонларнинг модификация ферменти генини ташувчи ва экспрессияловчи плазмида ДНКси мос келувчи рестрикция эндонуклеазаси томонидан

парчаланишга чидамли экан, чунки ундаги таниб олиш сайти метилирланган.

Куйидаги мисолни кўриб чиқамиз. pBR322 плазмидага *Desulfovibrio desulfuricans* ДНКси HindIII-фрагментлар ўрнатилди ва у билан *E.coli* хужайралари трансформацияланди. Трансформацияланган хужайралардан ажратиб олинган плазмида ДНКсига *DdeI* рестриктазаси билан ишлов берилди. Метилирловчи фермент генини ташувчи ва экспрессияловчи плазмидалар парчаланмади, чунки pBR322 даги барча саккиз таниб олиш *DdeI* сайтлари метилирланган бўлган. *DdeI* билан ишлов берилган плазмидалар аралашмасидан *E.coli* трансформациясида фойдаланилди. *DdeI* функционал модификацияловчи генни ташувчи трансформантлар ҳосил бўлишини фақат плазмид ДНКнинг бус-бутун халқали молекулалари таъминлади. Қолган плазмидалар рестрикция эндонуклеазаси томонидан парчаланди. Қайси клонларда модификация ферменти гени ҳам ва рестрикция эндонуклеазаси гени ҳам мавжудлигини аниқлаш учун трансформантлар *DdeI* фаол рестриктаза борлигига текширилди. Тавсифланган ёндашувдан ҳар қандай рестриктаза генини ажратиш учун муваффақият билан фойдаланиш мумкин, фақат у мос келувчи модификацияловчи фермент генига етарлича яқин жойлашиши ва мазкур фермент учун ҳеч бўлмаганда битта танлаб олиш сайтига эга бўлган плазмида векторига киритилиши керак.

Рекомбинант ДНК технологиясидан фойдаланиб, микроорганизмлар метаболизмини уларга янги генлар киритиб ёки борларини модификациялаб мақсадли ўзгартириш мумкин. Бундай ўзгаришларнинг асосий мақсади янги ферментатив фаолликка эга, мавжуд субстратни одатда фақат кимёвий ва микробиологик усулларни биргаликда қўллаб олинадиган қимматли маҳсулотга айлантира олиш хусусиятига эга рекомбинант микроорганизмларни яратишдан иборат.

Ҳозирги вақтда ичак таёқчаси (*E.coli*) инсулин ва соматотропин каби муҳим гормонларни етказиб берувчига айланди. Илгари инсулин ҳайвонларнинг ошқозон ости безидан олинар эди, шунинг учун унинг нарҳи жуда қиммат бўлган. 100 г кристал инсулин олиш учун 800-1000 кг ошқозон ости беzi талаб этилади, бир сигирнинг ошқозон ости беzi 200-250 грамм оғирликка эга. Бу инсулиннинг

жуда қиммат бўлишига ва диабет билан хасталанган беморларнинг кенг доираси учун эришиш қийин бўлишига сабаб бўлди. 1978 йилда "Генентек" компанияси тадқиқотчилари биринчи марта ичак таёқчасининг махсус конструкцияланган штаммидан инсулин олишга муваффақ бўлишди. Инсулин 20 ва 30 аминокислота узунлигига эга иккита А ва В полипептид занжирлардан ташкил топган. Улар дисульфид боғламлар билан бирлаштирилганда натив икки занжирли инсулин ҳосил бўлади. Унинг таркибида *E.coli* оксили, эндотоксинлар ва бошқа аралашмалар йўқ ва ҳайвонлар инсулини каби ножўя самаралар бермайди, биологик фаоллиги бўйича эса ундан фарқ қилмайди. Пировардида *E.coli* ҳужайраларида проинсулин синтези амалга оширилди, бунинг учун РНК матрицасида тескари транскриптаза ёрдамида унинг ДНК-нусхаси синтезланди.

Олинган инсулин тозалангандан кейин у парчаланди ва натив инсулин олинди, бунда экстракция ва гормонни ажратиш босқичлари минимумга келтирилди. 1000 литр культура суюқлигидан чўчка ёки сигирнинг 1600 кг ошқозон ости безидан олинган инсулинга эквивалент миқдорда 200 граммгача гормон олиш мумкин.

Соматотропин – гипофиз томонидан ишлаб чиқариладиган инсон ўсиш гормони. Бу гормоннинг етишмаслиги гипофизар паканаликка олиб келади. Агар соматотропин 1 кг тана вазнига 10 мг миқдорида ҳафтасига уч марта юборилса, паканалик билан хасталанган боланинг бўйи бир йилда 6 см га ўсиши мумкин. Илгари у мурда материалидан олинар эди, бир мурдадан охириги фармацевтик препаратга қайта ҳисобланганда 4-6 мг соматотропин олинган.

Шундай қилиб, гормоннинг олиш мумкин бўлган дозаси чекланган, бундан ташқари, бундай усул билан олинган гормон таркиби бир хил бўлмаган ва секин ривожланадиган вируслар бўлиши мумкин бўлган. "Genentec" компания 1980 йилда кўрсатилган камчиликлардан ҳоли бўлган соматотропинни бактериялар ёрдамида олиш технологиясини ишлаб чиқди. 1982 йилда инсон ўсиш гормони Францияда Пастер институтида *E.coli* ва ҳайвон ҳужайралари культурасида олинди, 1984 йилдан бошлаб эса СССРда инсулинни sanoатда ишлаб чиқариш бошланди. Интерферон ишлаб чиқаришда *E.coli*, *S.cerevisae* (хамиртуруш) каби, фибробластлар ёки трансформацияланган лейкоцитлар культураларидан ҳам

фойдаланилади. Аналогик усуллар билан шунингдек хавфсиз ва арзон вакциналар ҳам олинади.

Streptomyces – антибиотиклар олиш учун фойдаланиладиган асосий микроорганизмнинг рекомбинант штаммларини яратишда шуни эсда тутиш лозимки, трансформация ва трансформацияланган ҳужайраларни танлаш ҳаддан ташқари қийин бўлмаслиги лозим. Бироқ *E. coli* дан фарқли ўлароқ *Streptomyces* изоляцияланган ҳужайралар кўринишида эмас, балки чўзилган мицеллалар кўринишида мавжуд бўлади, шунинг учун трансформациядан олдин ҳужайра деворини бузиш ва алоҳида протопластларни чиқариб олиш зарур (расм 15.2). Бусиз трансформацияланган ҳужайраларни трансформацияланмаганларидан фарқлашнинг имкони бўлмайди, чунки қаттиқ муҳитда кўриниб турган колониялар индивидуал ҳужайралардан эмас, балки ҳужайралар гуруҳидан ҳосил бўлади; шунга мувофиқ селектив антибиотик иштирокида ўсадиган колониялар трансформацияланган ва трансформацияланмаган ҳужайралар аралашмасидан иборат.



Расм.15.2. *Streptomyces* рекомбинант штаммларини трансформациялаш ва танлаш схемаси. Трансформацияланган ҳужайралар пушти ранг, трансформацияланмаганлари – яшил доиралар билан белгиланган. ПЭГ — полиэтиленгликоль. (Глик ва Пастернак бўйича)

Плазмид ДНКни *Streptomyces* протопластларига киритиш полиэтиленгликол иштирокида осонлашади. Трансформациядан кейин протопластлар дастлаб хужайра девори ҳосил бўлиши учун қаттиқ муҳитга экилади, кейин эса танлаб олиш учун трансформацияланган хужайралар одатда неомицин, ёки тиострептон сақлаган селектив муҳитга кўчирилади.

Юқори специфик ДНК-зондлар олиш рекомбинант ДНК технологиясига асосланган. Уларнинг ёрдамида тўқималарда генлар экспрессияси, хромосомаларда генлар жойлашуви ўрганилади, қариндошлик функцияларига (масалан, инсон ва товукларда) эга генлар аниқланади. ДНК-зондлардан шунингдек, турли хил касалликларни ташхислашда ҳам фойдаланилади.

Рекомбинант ДНК технологияси “қайтарувчи генетика” номини олган анъанавий бўлмаган “оқсил-ген” ёндашувига имкон яратди. Бундай ёндашувда хужайрадан оқсил ажратиб олинади, мазкур оқсилнинг гени клонланади ва модификацияланади, шундай қилиб оқсилнинг ўзгартирилган шаклини кодлайдиган мутант ген ҳосил бўлади. Олинган ген хужайрага киритилади. Агар у экспрессияланса, уни ташувчи хужайра ва унинг авлодлари келажакда ўзгартирилган оқсилни синтезлайди. Шу тарзда дефекти бор генларни тўғрилаш ва ирсий касалликларни даволаш мумкин.

Агар гибрид ген уруғланган тухум хужайрасига киритилса, мутант генни экспрессияловчи ва уни авлодларга етказиб берувчи трансген организмларни олиш мумкин. Ҳайвонларни генетик трансформациялаш алоҳида генлар ва уларнинг оқсил маҳсулотларининг бошқа генлар фаоллигини бошқаришидаги роли каби, турли хил патологик жараёнлардаги ролини ҳам аниқлаш имконини беради. Ген муҳандислиги ёрдамида вирусли касалликларга чидамли ҳайвонлар қатори, шунингдек, ҳайвонларнинг инсон учун фойдали белгилари бор зотлари яратилди. Масалан, буқа соматотропин гормонининг генини сақлаган рекомбинант ДНК микроинъекцияси орқали куён зиготасига юбориш мазкур гормонни гиперпродукциялаш хусусиятига эга трансген ҳайвон олиш имконини берди. Олинган ҳайвонларда аниқ фойдаланган акромегалия кузатилган.

Ҳозир ҳатто яқин ўн йил ичида амалга ошириш мумкин бўлган имкониятлар ҳақида олдиндан айтиш қийин.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. EcoRI рестрикция эндонуклеазаси генини ажратиш стратегиясини тавсифланг.
2. *Corynebacterium Erwinia* 2,5-DKG-редуктаза генини клонлаш стратегиясини тавсифланг. Нима учун бу қизиқиш уйғотади?
3. *Streptomyces* ҳар ҳил турларини трансформациялашдаги қийинчиликлар нимадан иборат? Уни қандай қилиб енгиш мумкин?
4. Қандай қилиб ген муҳандислиги ёрдамида *Streptomyces* берилган штамми билан антибиотик ишлаб чиқаришни амалга ошириш мумкин?

§ 16. Ўсимликлар ген муҳандислиги

1. *Ўсимликлар ГМ босқичлари*
2. *Агробактериялар ёрдамида ўсимликларни трансформациялаш*
3. *Тi-плазмидалар*

Биринчи трансген ўсимликлар (тамаки ўсимлиги микроорганизмлардан киритилган генлар билан) 1983 йилда олинган. 1994 йилда АҚШда токсиклик, аллергияга берилувчанлик, мутагенлик ва бошқаларга зарур бўлган барча текширувлардан ўтгандан кейин биринчи трансген маҳсулотлар сотувда пайдо бўлди. Улар секин етиладиган помидор, шунингдек гербицид-чидамли соя бўлган. Ҳозирги вақтда бутун дунёда генетик модификацияланган ўсимликларни олиш ва синов ўтказиш билан умумий капитали юз миллиард доллардан ортиқ бўлган юзлаб тижорат фирмалари шуғулланмоқда.

Ўсимликларнинг ген муҳандислик биотехнологияси озиқ-овқат ва бошқа фойдали маҳсулотлар ишлаб чиқаришнинг муҳим тармоғи бўлиб қолди. Ген муҳандислиги усуллари қишлоқ хўжалиги маҳсулотларининг янги шакллари, тизмалари, навлари ва гибридларининг турли ҳил патогенларга чидамлилигини ошириш ва янги навлар чиқариш давомийлигини қисқартириш бўйича қўйилган бир қатор вазифаларни ҳал қилиш имконини беради. Ўсимликларнинг ген муҳандислиги бутун бир ген муҳандислиги каби, қуйидаги асосий босқичлардан иборат:

- генни танлаш ва уни клонлаш; - ўсимлик-реципиент генотипини саралаш; - генни киритиш ва ўсимлик-реципиент геномида уни экспрессиялаш; - трансформацияланган ҳужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.

Ўсимликларнинг ҳайвонлардан муҳим устунлиги битта ҳужайрадан бутун бир ўсимликни олишдан иборат - тотипотентлик.

Тотипотентлик (ингл. totipotency) – бўлиниш орқали организмнинг ҳар қандай ҳужайра турига асос бериш ҳужайранинг хусусияти. Ўсимликлар соматик ҳужайраларининг хусусияти муайян шароитларда етиштиришдан то етук ўсимлик ва уруғлар олингунга қадар ўзининг онтогенетик ривожланиш наслий дастурини амалга оширишдан иборат.

Трансген ўсимликлар олишда асосий муаммолардан бири бегона генларни ўсимлик хромосомасига киритиш усулидан иборат, яъни *ўсимлик ҳужайраларининг трансформацияси*.

Ўсимлик ҳужайрасига киритилган генетик конструкция одатда: оксил-кодловчи структуравий кетма-кетлик, трансляция ва транскрипциянинг сигнал элементлари, шунингдек маркер генларни ҳам ўз ичига олади.

Ўсимликларга бегона ДНКни турли хил усуллар билан киритиш мумкин. Икки паллали ўсимликлар учун генларни горизонтал кўчириш учун табиий вектор – агробактериялар плазмидалари мавжуд. Бир паллалилар бўйича эса, охириги йилларда уларнинг агробактериал векторлар билан трансформациясида маълум ютуқларга эришилган бўлса ҳам ҳали трансформациянинг бундай усули жиддий қийинчиликларга дучор бўлмоқда.

Агробактериялар ёрдамида ўсимликлар трансформацияси

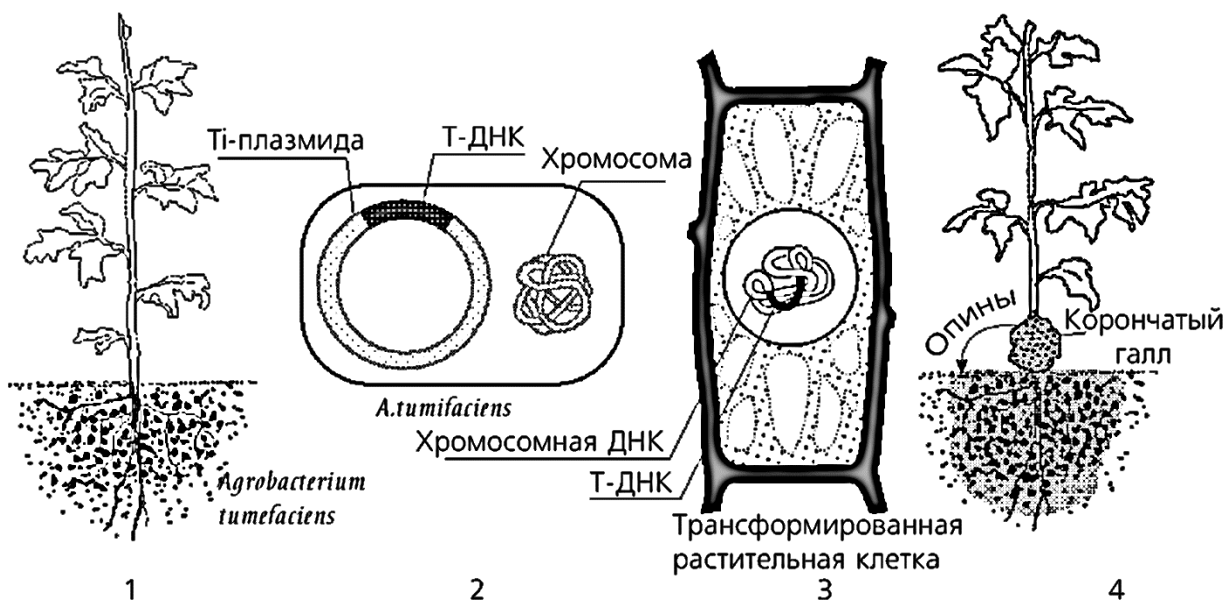
Маълумки, тупроқ бактерияларининг (*Agrobacteria*) баъзи турлари икки паллали ўсимликларни зарарлаши ва бунда специфик ўсма ҳосил бўлишини келтириб чиқариши мумкин. Ўсма ҳужайралари ўсимлик учун одатий бўлмаган, агробактериялар томонидан азот ва углевод манбаи сифатида фойдаланиладиган аминокислоталар – опинларни (аргинин ҳосилалари) синтезлайди. Шундай қилиб, ўсимликлар агробактериялар билан зарарланганда ўсимликнинг трансформацияланган ҳужайралари метаболизмининг қайта тузилиши содир бўлади ва улар фақат бактериялар учун зарур бўлган бирикмаларни синтезлашни бошлайдилар.

Трансформация жараёнида ўсимлик хужайраси девори бактерияларнинг пектолитик ферментлари таъсири остида шикастланади ва бактерияларнинг ўсимлик хужайраси плазмолеммаси билан мустаҳкам контакт таъминланади. Бу контакт натижасида бактериялар ДНКси ўсимлик хужайрасига кўчирилади.

Энг яхши ўрганилган ва кенг қўлланиладиган агробактериялар 2 турдан иборат. Биринчиси – *Agrobacterium tumefaciens*, иккинчиси – *Agrobacterium rhizogenes*. *A. tumefaciens* ўсимликларда “тождор галл” типигаги ўсма ҳосил бўлишини чақиради, бу эса уларда ўсимлик хужайралари хромосомаларига киритиладиган Ti-плазмиданинг (tumor inducing) бир қисми мавжудлиги билан боғлиқ.

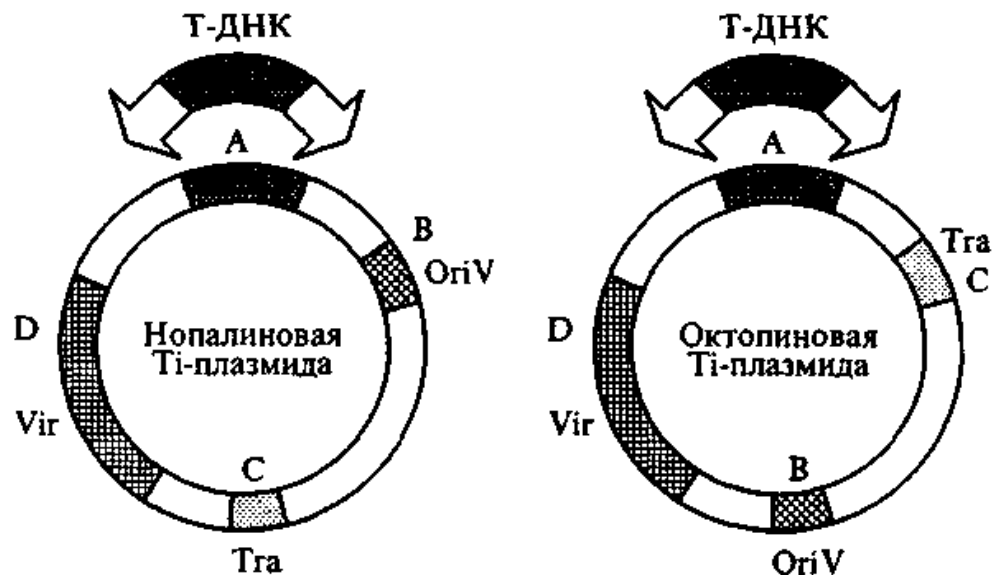
A. rhizogenes – “соқолли илдиз” деб номланадиган касаллик келтириб чиқаради, бунда илдиз зарарланиш соҳасида жуда кўп янги илдизчалар ҳосил бўлади ва бу ҳолат Ri – плазида (root inducing) билан боғлиқ. Плазмидалар – ДНКнинг узунлиги 200 минг.н.ж. га яқин бўлган халқасимон молекулалари. Бактериялар хужайраларида улар автоном репликацияланиш хусусиятига эга.

Трансформация механизмини ўрганиш давомида аниқландики, на агробактерия, на плазида ўзи ўсимлик хужайрасига кирмайди. Фақат Т-ДНК (трансформацияловчи ДНК) деб номланадиган плазмиданинг бир қисми хужайрага кўчирилади ва геномга киритилади (расм16.1). Узунлиги –23 минг.н.ж. га яқин.



Расм 16.1. Ўсимлик хромосомасига Т-ДНК интеграцияси ва ўсма ҳосил бўлиши (Э.С. Пирузян бўйича) (тождор галл).

Agrobacterium плазмидалари тузилиши ҳақидаги тўлиқ маълумот рестрикцион ёки жисмоний хариталаш йўли билан олинган. Тадқиқот натижасида октопинли ва нопалинли плазмидалар орасида гомологиянинг тўрт асосий соҳаси аниқланди. Иккита консерватив (А ва D соҳалар) онкогенликка жалб этилган, яна бири (В) плазмида репликацияси назорати соҳасига мос келади, шу билан бир вақтда охирги (С) соҳаси конъюгатив кўчириш функциясини кодлайди (расм. 16.2). Плазмидаларда Т-ДНК дан ташқари конъюгация функциясини кодлайдиган соҳа (Tra), репликация соҳаси (OriV) ва вирулентлик соҳаси (Vir) мавжуд. Т-ДНК ни фланкирзациялайдиган Ti-плазмида кетма-кетликлари (чегаравий ёки учли соҳалар) ўсимлик геномига интеграциялашда муҳим роль ўйнайди ва 24 - 25 н.ж. дан такрорланишга эга.



Расм. 16.2. Нопалин ва октопин типдаги Ti-плазмида тузилиши.

Т-ДНК ни кўчиришда охирги соҳанинг ролини ҳисобга олиб, ДНКнинг мазкур учлар орасига киритилган ҳар қандай сегменти Т-ДНКнинг бир қисми каби ўсимликка кўчириб ўтказилиши мумкин. Барча онкоген кетма-кетликларни йўқотиш учун плазмидалар шундай модификацияланадики, уларнинг ўрнига бегона ДНК киритилади. Натижада плазмида ўзининг онкоген хусусиятларини йўқотади, ўсимлик-регенерантларда мавжуд бўлган ноонкоген Т-ДНК Мендель қонунига мувофиқ ўтказилади. Керакли генни сақлаган Ti-плазмидали кетма-кетликлар ўсимликка киритиш учун иккита усул ишлаб чиқилган. Биринчи усул – “оралиқ векторлар” (коинтегротив векторлар) усули – ичак таёқчаси плазмидаси pBR322

дан фойдаланишга асосланган. Т-ДНК Ti-плазмидадан рестриктазалар ёрдамида кесиб олинади ва *E. coli* да клонлаш учун pBR322 плазмидага ўрнатилади. Клонланган Т-ДНКга рестриктазалардан фойдаланиб керакли ген ўрнатилади, олинган рекомбинант молекула кўп миқдорда янгидан кўпайтирилади, яъни ичак таёқчасида клонланади. Кейин конъюгация ёрдамида тўлиқ Ti-плазмидани ташувчи агробактерия хужайрасига киритилади.

Иккинчи усул бинар (иккиланган) векторлар яратишга асосланган. Охирги тадқиқотлар кўрсатишича, зарарланиш ва трансформация учун бутун Ti-плазида керак эмас, фақат Т-ДНКнинг чегаравий соҳалари ва Ti-плазмиданинг вирулентликка жавоб берувчи битта соҳаси етарли. Бунда ДНКнинг бу икки соҳаси айнан битта плазмидада жойлашиши шарт эмас. Агар агробактериялар хужайраларида Ti-плазида *vir* сегменти билан ва бошқа плазида Т-ДНК билан мавжуд бўлса, бу бактериялар ўсимлик хужайраларини трансформациялай олади. Бунда Т-ДНК ўзига ўрнатилган ҳар қандай генлар билан биргаликда ўсимлик геноми билан интеграцияланади, бунинг учун бактериал хужайраларда гомологик рекомбинация керак эмас.

Ўсимликлар трансформацияси учун шунингдек ДНК-сақловчи вируслар асосидаги векторлардан ҳам етарлича кенг фойдаланилади. Асосан карам оиласига мансуб ўсимликларни зарарлайдиган оқ карам мозаикаси вируси энг истиқболли ҳисобланади. Вирион 8000 нм узунлигидаги ҳалқасимон ДНК сақлайдиган 50 нм диаметрغا эга. Геномнинг унчалик катта бўлмаган ўлчами вирус ДНКсини *in vitro* шароитида ҳудди бактериал плазида каби бошқариш ва кейин уни баргларга суртиш йўли билан ўсимликка киритиш имконини беради, бунда барча хужайраларга инфекция юқиши содир бўлади, чунки вирус жадаллик билан кўпаяди ва хужайрадан хужайрага ўтади.

Вируслар асосидаги вектор тизимининг устунлиги геномнинг кичик ўлчамлилиги, ўсимлик хужайрасидаги вирус ДНКси концентрацияси юқорилиги (битта хужайрага 50000 тагача), бегона генларнинг самарали экспрессиясини таъминлайдиган кучли промоторлар мавжудлигидан иборат. Агробактерияларга бардошли ўсимликлар трансформацияси учун ДНКни хужайрага тўғридан-тўғри жисмоний кўчириш усуллари ишлаб чиқилган, улардан кўпчилиги бактериялар ва ҳайвонлар хужайралари билан ишлаш

амалиётидан олинган. Ушбу усуллар етарлича ҳилма ҳил бўлиб, микрозаррачалар билан бомбардимон қилиш ёки баллистик усул, электропорация, полиэтиленгликол билан ишлов бериш, ДНКни липосомалар таркибига кўчириш ва бошқа усулларни ўз ичига олади. Энг маҳсулдор ва энг кўп фойдаланиладиган усул микрозаррачалар билан бомбардимон қилиш ҳисобланади. Етарлича тезликка эга бўлганда бу микрозаррачалар бевосита ядрога кириб бориши мумкин, бу трансформация самарадорлигини кучли даражада оширади.

Шу усулнинг ўзи билан қолаверса бошқа ДНК сақлайдиган хужайра органеллалари – хлоропластлар ва митохондрияларни трансформациялаш мумкин.

Кейинги вақтларда трансформациянинг агролистик деб номланган мураккаб усули ҳам муваффақият билан қўлланилмоқда. Бунда бегона ДНК тўқималарга қандайдир жисмоний, масалан баллистик усул билан киритилади. Киритилган ДНК Т-ДНК, мақсадли ва маркерли геноми бўлган вектор каби вирулентликнинг эукариотик промотор остига қўйилган агробактериал генларини ҳам ўз ичига олади. Вирулентлик генларининг ўсимлик хужайрасидаги вақтинчалик экспрессияси одатдаги агробактериал трансформация каби плазмидадан Т-ДНКни кесиш ва уни хўжайин геномига ўрнатиш имконини берадиган оксил синтезига олиб келади.

Ўсимлик тўқимаси у ёки бу усул билан трансформацияланганидан кейин уни хужайраларнинг *in vitro* кўпайишига имкон берувчи фитогормони бор махсус муҳитга жойлаштирилади. Муҳит одатда селектив агентга эга, унга нисбатан трансген, лекин назорат хужайралари эмас, чидамлилиқ хусусиятига эга бўлади. Регенерация кўпинча каллус босқичи орқали содир бўлади, шундан кейин муҳитлар тўғри танланганда органогенез (новда ҳосил бўлиши) бошланади. Шаклланган новдалар кўпинча трансген турларни янада қатъийроқ танлаб олиш учун селектив агент мавжуд бўлган илдизланиш муҳитига кўчириб ўтказилади.

Охириги йилларда олимлар “antisense RNA” (тўнтарилган ёки антимаъновий РНК) сақлаган трансген ўсимликлар олиш учун исталган генни бошқариш имконини берадиган янги усулдан фойдаланмоқдалар. Бу ҳолда векторни лойиҳалашда киритилаётган геннинг ДНК нусхаси (к-ДНК) 180° га айлантирилади. Натижада трансген ўсимликда мРНКнинг нормал молекуласи ва тўнтарилган

мРНК ҳосил бўлади, у комплементар тамойилига мувофиқ нормал мРНК билан комплекс ҳосил қилади ва кодланган оқсил синтезланмайди.

Бундай ёндашувдан меваларининг сифати яхшиланган помидорнинг трансген ўсимлигини олишда фойдаланилган. Вектор полигалактуроноза – ўсимлик тўқимаси ҳужайралараро бўшлиғининг асосий компоненти бўлган пектинни парчалашда иштирок этадиган фермент синтезини назорат қиладиган РГгенининг к-ДНКсини ўз ичига олган. РГ гени маҳсулоти помидор мевалари етилиши вақтида синтезланади, унинг миқдорининг ошиши шунга олиб келадики, помидор мевалари янада юмшоқроқ бўлиб қолади, бу эса уларни сақлаш муддатини анчагина қисқартиради. Трансгенларда мазкур генни тўхтатиб қўйиш янги хусусиятга эга мевали помидор ўсимлигини олиш имконини берди, помидор мевалари нафақат узоқроқ сақланган, балки ўсимликнинг ўзи ҳам замбуруғли касалликларга чидамли бўлган. Конструкцияларнинг антимаъновий стратегияси генлар экспрессиясини модификациялашда кенг татбиқ этиш учун яроқлидир. Ушбу стратегиядан нафақат янги сифатларга эга бўлган ўсимликлар олиш учун, балки ўсимликлар генетикасида фундаментал тадқиқотларда ҳам фойдаланилади.

Кўпгина тупроқ микроорганизмлари ўсимликлар ўсишини тезлаштириш хусусиятига эга. Мазкур хусусиятнинг асосида ётган молекуляр механизмлар фойдали тупроқ бактерияларидан кимёвий ўғитлар ўрнига фойдаланиш мумкинлигини аниқлаш учун тадқиқ қилинди. Фойдали бактериялар ўсимликларга фиксацияланган азот, хелатирланган темир, фитогормонларни етказиб бериб ёки улар томонидан фосфор шимилишини енгиллаштириб, бевосита ўз таъсирини кўрсатиши мумкин. Лекин таъсир кўрсатиш фитопатоген микроорганизмлар орқали билвосита бўлиши ҳам мумкин.

Ўсимликлар ўсишини тезлаштирувчи ва қишлоқ хўжалигида аллақачон ишлатиладиган барча бактериялардан *Rhizobium* ва *Bradyrhizobium* оиласи аъзолари батафсил ўрганилди. Бу микроорганизмлар қатъий муайян ўсимликлар билан мураккаб облигат муносабатларга киришади.

Азот фиксацияланишининг молекуляр асослари *Rhizobium* ва *Bradyrhizobium* оилалари симбиотик бактерияларини ўрганишда модель тизими бўлиб хизмат қиладиган *K. pneumoniae* да ҳар

томонлама тадқиқ қилинди. Азотфиксацияловчи фермент нитрогеназа батафсил тавсифланди. Молекуляр-генетик тадқиқотлар шуни кўрсатдики, бактериялар томонидан азотнинг фиксацияланиши – бу мураккаб жараён; унда ҳаммаси бўлиб 20 хил турли оксилларни кодловчи етти та бошқариладиган оперон иштирок этади. Бу ген муҳандислиги усули ёрдамида азотни ўзлари ўзлаштира оладиган ўсимликлар ва бошқа азот фиксацияловчи бактерияларни яратиш имконини ҳозирча йўққа чиқаради.

Азотфиксацияловчи нитрогеназа ферменти АТР гидролизи энергиясидан фойдаланиб, газсимон водород (H_2) ҳосил бўлишини катализлайди. *Rhizobium* нинг баъзи штаммлари гидрогеназа ферментини синтезлайди. Бу фермент азот фиксацияланиши самарадорлигини оширадиган N ни *in vivo* N^+ га айланиш жараёнини катализлайди. Агар штаммда нофаол гидрогеназа мавжуд бўлса, унинг азотни фиксациялаш ва ўсимликни ўстириш хусусиятлари камаяди. Айтилганларнинг барчасини ҳисобга олиб, гидрогеназаларнинг клонланган генларини қишлоқ хўжалиги экинлари билан симбиотик муносабатларга киришадиган *Rhizobium* штаммига киритишга уриниб кўришга киришилди. Дастлабки маълумотларга кўра, гидрогеназа генларини ген муҳандислиги орқали модификациялашни ўтказиб туриб, *Rhizobium* нинг ўсимликлар ўсишини янада кучлироқ стимуляциялайдиган хусусиятига эга штаммларини яратиш мумкин.

Rhizobium штаммлари ўсимликлар билан симбиотик муносабатларга киришиб, уларнинг илдизларида тугунчаклар ҳосил бўлишини чақиради, ва бу ерда мазкур бактерияларнинг кўпайиши ва азот фиксацияси содир бўлади. Оқилона фараз қилиш мумкинки, агар ген муҳандислиги усуллари ёрдамида кўп сонли тугунчаклар ҳосил бўлишига имкон берувчи бактерия яратишга эришилса, *Rhizobium* инокуляцияланган штаммларининг ўсимлик-симбионтлар илдизларидан жой эгаллаш учун бўлган курашда ёввойи типдаги штаммларга нисбатан рақобабардошлиги ортади. Афсуски, шу нарса аниқ бўлдики, тугунчаклар ҳосил бўлишида кўпгина турли-туман генлар иштирок этади, ва бу мураккаблик мувофиқ молекуляр-генетик тажрибалар ўтказишни қийинлаштиради.

Бактериялар томонидан ўсимликлар ўсишини билвосита стимуляциялаш ўсимликларни фитопатоген замбуруғлар ва

бактериялар томонидан етказилган зарарлардан химоя қилишдан иборат. Бундай химоя ўсимликлар ўсишини стимуллайдиган бактериялар: сидерофорлар томонидан синтезланган специфик бирикмалар, антибиотиклар, бошқа кичик молекулалар ва турли хил ферментлар иштирокида амалга оширилади. Синтезнинг баъзи бир бошқа маҳсулотлари, хусусан фитогормонлар ва АЦК- дезаминаза ўсимликлар ўсишига бевосита таъсир кўрсатади. Умид борки, қачонлардир санаб ўтилган барча бирикмаларнинг генларидан бактериялар – ўсимликлар ўсишини янада самаралироқ стимуляторларини яратишда фойдаланиш мумкин бўлади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Фараз қиламизки, сизда азотни ўзлаштириш ва соя ўсимлиги билан симбиотик муносабатларга киришиш хусусиятларига эга *Rhizobium japonicum* штамми бор. Сиз *nod*-генлар билан гибридизациялаш учун зонд бўлмаган шароитда тугунчаклар ҳосил бўлишини кодловчи генлар кластерини идентификациялаш учун қандай ёндашувдан фойдаланган бўлар эдингиз?

2. Гидрогеназа нима? Унинг ёрдамида беда ҳосилдорлигини қандай қилиб ошириш мумкин?

3. Сизда бошқа микроорганизмларнинг гибридизация зонди сифатида фойдаланиш мумкин бўлган *nif*-генлари йўқлигини назарда тутиб, *Azotobacter vinelandii* нинг азот боғланишида иштирок этадиган барча генларини идентификациялаш стратегиясини таклиф этинг.

4. Азотни фиксациялаш хусусиятига эга рекомбинант ўсимликлар яратиш имкониятини муҳокама қилинг.

5. Микробиологик ўғитларнинг кимёвий ўғитлардан устунлиги нимадан иборат?

6. Қандай қилиб ген муҳандислиги усуллари ёрдамида *Agrobacterium radiobacter* нинг бионазорат асбоби сифатида самарадорлигини ошириш мумкин?

7. Бактерияларнинг “бионазорат қилиш” хусусиятлари улар томонидан ишлаб чиқариладиган ўсимликлар ўсишини рағбатлантирадиган қайси ферментлар билан боғлиқ бўлади? Мазкур ферментларнинг таъсир механизми қандай?

§ 17. Ўсимликлар ген муҳандислиги ютуқлари

Биринчи трансген ўсимликлар (тамаки ўсимлиги микроорганизмлардан киритилган генлар билан) 1983 йилда олинган. Трансген ўсимликларни экин майдонида синов ишлари (вирусли инфекцияга чидамли бўлган тамаки ўсимлиги) АҚШда 1986 йилдаёқ олиб борилган.

1994 йилда АҚШда токсикликка, аллергияни чақирувчанликка, мутагенликка ва бошқаларга зарур бўлган барча текширувлардан ўтгандан кейин биринчи трансген маҳсулотлар сотувда пайдо бўлди.

Улар "Calgen" фирмаси томонидан яратилган пишиб етилиши секин бўлган Flavr Savr помидори, шунингдек "Monsanto" компаниясининг гербицид-чидамли соя ўсимлиги бўлган. 1-2 йилдан кейинок биотехнологик фирмалар бозорга гени ўзгартирилган бир қатор ўсимликларни: помидорлар, маккажўхори, картошка, тамаки, соя, рапс, ковокча, редиска, пахта маҳсулотларини етказиб бердилар.

Ҳозирги вақтда бутун дунёда гени ўзгартирилган (модификацияланган) ўсимликларни олиш ва синовдан ўтказиш билан умумий капитали юз миллиард доллардан ортиқ бўлган юзлаб тижорат фирмалари шуғулланмоқда. 1999 йилда трансген ўсимликлар умумий майдони 40 млн. гектар бўлган майдонга экилган, бу эса Буюк Британия каби давлатнинг умумий майдонидан ортиқдир. АҚШда гени ўзгартирилган ўсимликлар GM Crops) ҳозирги кунда маккажўхори ва соя экинининг 50%га майдони ва ғўза ўсимлигининг экиш майдони 30-40%дан ортиғини ташкил қилади. Бу шундан далолат берадики, ўсимликларнинг ген-муҳандислик биотехнологияси инсон ресурслари ва молиявий оқимларни жалб этадиган озиқ-овқат ва бошқа фойдали маҳсулотлар ишлаб чиқарадиган тармоғига айланиб қолди. Яқин йилларда маданий ўсимликларнинг трансген шакллари билан банд бўлган майдонларнинг янада тезроқ кенгайиши кутилмоқда.

Амалда қўллаш учун рухсат этилган трансген ўсимликларнинг биринчи тўлқинида қўшимча чидамлик (касалликларга, гербицидларга, зараркунандаларга, сақлаш вақтида бузилишга, стрессларга) генлари мавжуд бўлган.

Ўсимликлар ген муҳандислиги ривожланишининг эндиги босқичи “метаболик муҳандислик” номини олди. Асосан, бунда анъанавий селекциядаги каби ўсимликнинг мавжуд бўлган у ёки бу

сифатини яхшилашгина эмас, балки ўсимликни тиббиётда, кимё саноатида ва бошқа соҳаларда фойдаланиладиган бутунлай бошқа янги бирикмалар ишлаб чиқаришга ўргатиш вазифаси қўйилган. Масалан, айрим ёғ кислоталари, таркибида кўп микдорда алмаштириб бўлмайдиган аминокислоталар сақлаган фойдали оксиллар, модификацияланган полисахаридлар, ейиладиган вакциналар, антитаналар, интерферонлар ва бошқа “дори” оксиллари, шунингдек, атроф-муҳитни ифлослантirmайдиган янги полимерлар ва кўпгина бошқалар бундай маҳсулотлардан бўлиши мумкин. Трансген ўсимликлардан фойдаланиш бундай маҳсулотларни кенг кўламда ва арзон ишлаб чиқаришни йўлга қўйиш ва бу билан уларни кенг истеъмолчилар учун ҳаммабоп бўлиши имконини беради.

Заҳира оксиллари сифатини яхшилаш

Асосий экинлар турларининг заҳира оксиллари яқин қариндош генлар оиласи орқали кодланади. Уруғлар заҳира оксилларининг тўпланиши – мураккаб биосинтетик жараён. Бир ўсимлик хусусиятини бошқасидан заҳира оксили генини киритиш йўли билан яхшилашга ген муҳандислиги орқали уриниш 1983 йилда АҚШда Д. Кемп ва Т. Холл томонидан олиб борилган. Дуккаклиларнинг фазеолин гени Тi-плазмида ёрдамида кунгабоқар геномига кўчириб ўтказилган. Мазкур тажрибанинг натижаси фақатгина санбин номини олган химер ўсимлик бўлган. Кунгабоқар ҳужайраларида иммунологик қариндош фазеолин полипептидлар аниқланиши генларни турли оилаларга мансуб ўсимликлар орасида генлар кўчирилиши фактини тасдиқлади.

Кейинроқ фазеолин гени тамаки ҳужайраларига ўтказилган: ўсимлик-регенерантларда ген барча тўқималарда кам микдорда бўлса ҳам экспрессияланган. Фазеолин генининг носпециффик экспрессияси уни кунгабоқар ҳужайраларига ўтказиш ҳолатидаги каби мазкур генни дуккаклиларнинг етук уруғпаллаларида экспрессияланишидан кучли фарқ қилади, бунда фазеолин умумий оксилнинг 25-50%ини ташкил қилади. Мазкур факт химер ўсимликлар тузишда бошқа ушбу геннинг бошқарувчи сигналларини сақлаш зарурлигини ҳам ва ўсимликлар онтогенези жараёнида генлар экспрессияси назорати муҳимлигини ҳам кўрсатади.

Маккажўхорининг заҳира оксили – зеинни кодлайдиган ген унинг Т-ДНКга интеграциясидан кейин кунгабоқар геномига

қуйидаги тарзда ўтказилган. Агробактерияларнинг Ti-плазмида билан зеин геномига эга бўлган штаммларидан ўсмани кунгабоқар поясида индукциялашда фойдаланилади.

Генетик муҳандислик учун янада реал вазифа оксилларнинг аминокислота таркибини яхшилашдан иборат. Маълумки, кўпчилик бошоқлиларнинг захира оксилида лизин, треонин, триптофан, дуккаклиларникида эса – метионин ва цистеин етишмаслиги кузатилади. Бу оксилларга етишмаган аминокислоталар қўшимча миқдорининг киритилиши аминокислоталар дисбалансига барҳам бериши мумкин. Анъанавий селекция усуллари билан бошоқлиларнинг захира оксилларида лизин миқдори оширишга муваффақ бўлинди. Ушбу барча ҳолатларда проламинларнинг (бошоқлиларнинг спиртда эрийдиган захира оксиллари) бир қисми таркибда лизин миқдори кўп бўлган бошқа оксиллар билан алмаштирилди. Бироқ бундай ўсимликларда дон ўлчами кичрайди ва ҳосилдорлик камайди. Чамаси, проламинлар нормал дон шаклланиши учун зарур, ва уларни бошқа оксиллар билан алмаштириш ҳосилдорликка салбий таъсир кўрсатади. Мазкур жиҳатларни ҳисобга олиб, бошоқлилар захира оксиге сифатини яхшилаш учун шундай оксил зарурки, у нафақат лизин ва треонин миқдори юқорилиги билан ажралиб туриши, балки дон шаклланишида проламинлар муайян қисмининг ўрнини босиши керак.

Ўсимликлар ҳайвон оксилларини ҳам ишлаб чиқариши мумкин. Ҳақиқатдан ҳам, *Arabidopsis thaliana* ва *Brassica napus* ўсимликларининг геномларига арабидопсис 25-захира оксиге генининг бир қисми ва нейропептид – энкефалин учун кодловчи қисмдан ташкил топган химер геннинг киритилиши 1 г уруғга 200 нг химер оксил синтезланишига олиб келди. Доменнинг иккита структуравий оксиге трипсин билан таниб олинadиган кетма-кетлик билан боғланган бўлган, бу эса кейинчалик тоза энкефалин ажратиб олиш имконини берди.

Бошқа тажрибада трансген ўсимликлар чатиштирилгандан кейин, улардан бирида иммуноглобулиннинг гамма-суббирликлар гени ўрнатилган, иккинчисид эса –каппа-суббирликлари ўрнатилган, наслида иккала занжир экспрессиясини олишга муваффақ бўлинган. Натижада ўсимлик барглари умумий оксигининг 1,3%ини ташкил қиладиган антитаналарни шакллантирди. Шунингдек, тамаки

ўсимликларида тамомила функционал секретор моноклонал иммуноглобулинлар йиғилиши мумкин. Секретор иммуноглобулинлар одатда оғиз бўшлиғига ажралади ва инсон ҳамда ҳайвонларнинг ошқозони ичак инфекцияси йўлида биринчи тўсиқ бўлиб хизмат қилади. Юқорида тилга олинган ишда ўсимликларда *Streptococcus mutans* – тиш кариесини келтириб чиқарадиган бактериялар учун специфик бўлган моноклонал антитаналар маҳсулоти олинди. Трансген ўсимликлар томонидан ишлаб чиқарилган бундай моноклонал антитаналар асосида ҳақиқатдан кариесга қарши тиш пастасини ишлаб чиқаришга муваффақ бўлиш мўлжалланмоқда. Тиббиёт учун қизиқиш уйғотадиган бошқа ҳайвон оқсилларидан ўсимликларда инсон β -интерферони ишлаб чиқарилиши кўрсатилган.

Ўсимликларда бактериал антигенлар олиш ва улардан вакцина сифатида фойдаланиш имконини берадиган ёндашувлар ишлаб чиқилди. Вабо β -токсинининг токсик бўлмаган суббирликларининг олигомерларини экспрессиялайдиган картошка олинди. Ушбу трансген ўсимликлардан вабодан арзон вакцина олишда фойдаланиш мумкин.

Ёғлар

Ҳар турдаги кимёвий моддаларни олиш учун ёғ кислоталари – ўсимлик ёғининг асосий компоненти муҳим хом ашё ҳисобланади. Ўзининг тузилишига кўра бу углерод занжирлари бўлиб, ўзининг узунлиги ва углерод боғламларининг тўйинганлиги билан боғлиқ ҳолда ҳар қил физикавий–кимёвий хусусиятларга эга. 1955 йилда тажриба текшируви якунланди ва АҚШ федерал ҳукуматидан одатдаги 16- ва 18-аъзоли ёғ кислоталари билан биргаликда яна 45%гача 12-аъзоли ёғ кислотаси – лауратни ўз ичига олган таркиби ўзгартирилган ўсимлик ёғи билан рапс трансген ўсимликларини етиштириш ва тижорат мақсадларида фойдаланишга рухсат олинди. Бу моддадан кир ювиш кукуни, шампунь, косметика ишлаб чиқаришда кенг фойдаланилади.

Тажриба иши лауратнинг уруғ ёғидаги таркиби 70% га етган *Umbellularia califonica* ўсимлигидан специфик тиоэстераза генини клонлашдан иборат бўлди. Мазкур фермент генининг структуравий қисми уруғ ҳосил бўлишининг эрта босқичи учун специфик бўлган оқсил гени промотор-терминатори назорати остида рапс ва

арабидопсис геномига киритилган ва бу мазкур ўсимликлар ёғида лаурат миқдори ошишига олиб келди.

Ёғ кислоталари таркибини ўзгартириш билан боғлиқ бошқа лойиҳалардан ўсимлик ёғида тўйинмаган ёғ кислоталари миқдорини ошириш ёки камайтириш мақсадини қўйган ишларни айтиб ўтиш мумкин. Петрозелин кислотаси – жуфт боғлами олтинчи углерод аъзосидан кейин жойлашган олеин кислотаси изомери билан боғлиқ ишлар қизиқиш уйғотади. Мазкур ёғ кислотаси кориандр ёғи таркибига киради ва унинг эриш ҳарорати юқорироқ бўлишини (33°C) белгилайди, айти вақтда олеин кислотаси бўлганда эриш ҳарорати фақат 12°C ни ташкил қилади. Петрозелин кислотаси синтезини белгилайдиган генлар ўсимликлар – ўсимлик ёғи продуцентларига кўчирилгандан кейин таркибида тўйинмаган ёғ кислоталари бўлган парҳезбоп маргарин ишлаб чиқариш муваффақиятга эришиши тахмин қилинади. Бундан ташқари, петрозелин кислотасидан озон билан оксидлаш йўли билан осонгина лаурат олиш мумкин. Ёғ кислоталари биокимёвий синтези спецификасини кейинги ўрганилиши, чамаси, узунлиги ва тўйиниш даражаси турлича бўлган ёғ кислоталарини олиш мақсадида ушбу синтезни бошқариш имкониятига олиб келади, бу эса углеводородли хом ашёдан фойдаланиш билан боғлиқ бўлган детергентлар, косметика, кандолат маҳсулотлари, қаттиқлаштирувчилар, дори-дармонлар, полимерлар, дизел ёқилғиси ва кўпгина бошқа маҳсулотлар ишлаб чиқаришни анчагина ўзгартириш имконини беради.

Полисахаридлар

Трансген картошка ўсимлиги ва таркибида крахмал асосан амилопектин, яъни крахмалнинг тармоқланган шакли, ёки асосан фақат амилоза, яъни крахмалнинг чизиқли шакли кўринишида бўладиган крахмал тўпловчи экинлар яратиш бўйича иш олиб борилмоқда. Амилопектиннинг сувдаги эритмаси янада суюқроқ ва тиниқ эритмадир, сув билан ўзаро таъсирланганда ригид гелъ ҳосил қиладиган амилозадан кўра. Масалан, асосан амилопектиндан ташкил топган крахмалга, чамаси бозорда турли хил тўлдиргич сифатида модификацияланган крахмал ишлатиладиган озуқа аралашмаларига ишлаб чиқарувчилар томонидан талаб катта бўлади. Пластида ва митохондрияларнинг ҳам геномлари ўзгартирилиши мумкин. Бундай

тизимлар трансген материалда маҳсулот миқдорини анчагина ошириш имконини беади.

Гербицидга чидамли ўсимликлар яратиш

Янги, интенсив кишлок хўжалиги технологияларида гербицидлар жуда кенг қўлланилади. Бу шу билан боғлиқки, илгариги сут эмизувчилар учун хавфли бўлган ва ташқи муҳитда узок сақланадиган кенг таъсир спектрига эга хавфли гербицидлар ўрнига янги, янада такомиллашган ва хавфсиз бирикмалар келади. Бироқ уларда ҳам камчиликлар бор – нафақат бегона ўтлар, балки маданий ўсимликларнинг ҳам ўсишини секинлаштиради. Глифосат, атразин каби юқори самарали гербицидлар чидамли бўлган баъзи бегона ўтларнинг уларга толерантлиги механизмини аниқлаш учун жадаллик билан ўрганилмоқда. Шундай қилиб, атразиндан кенг фойдаланиладиган экин майдонларида кўпгина ўсимликлар турларида атразинга чидамли биотиплар пайдо бўлади.

Гербицидларга чидамлиликини ген муҳандислиги усуллари билан ушбу хусусиятга эга маданий ўсимликлар олиш мақсадида ўрганиш қуйидаги босқичлардан иборат: гербицидлар таъсирларининг ўсимлик хужайрасидаги биокимёвий нишонларини аниқлаш; мазкур гербицидга чидамлилик гени манбаи сифатида организмларни танлаб олиш; ушбу генларни клонлаш; уларни маданий ўсимликларга киритиш ва уларнинг фаолиятини ўрганиш.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Ўсимликлар ГМ йўналишлари
2. Трансген ўсимликларни яратиш

§ 18. Трансген ўсимликлар биохавфсизлиги муаммолари

Трансген озиқ-овқат маҳсулотларига қарши асосий эътирозлардан бири уларнинг кўпчилигида дастлабки ДНК тузилмаларида селектив сифатида антибиотикларга (хусусан канамицинга) чидамлилиқ гени борлигидир.

Тахмин қилинишича, ушбу чидамлилиқ генлари овқат ҳазм қилиниши жараёнида эндоген, шу жумладан патоген микрофлорага ўтказилади, бунинг натижасида микроблар мазкур антибиотикка резистентлик хусусиятига эга бўлади. Бироқ воқеликда бундай ҳодиса эҳтимоли жуда кам – генларни шунга ўхшаш горизонтал кўчирилиши ҳозирги вақтгача фақат салбий натижа берган.

Шуни унутмаслик лозимки, ўсимликларга ўрнатилган чидамлилиқ генлари бактериал эмас, балки фақат эукариотик ҳужайраларда экспрессиялаш учун “созланган”. Яна шуни ҳам ҳисобга олиш лозимки, бу селектив генлар микроорганизмларнинг табиий популяцияларидан олинган, бу ерда ҳозир улар тиббиёт амалиётида антибиотикларни фаол қўллаш натижасида кенг тарқалган. Шунинг учун антибиотикка чидамлилиқ генининг табиий резервуардан инсон микрофлорасига тушиш эҳтимоли трансген ўсимликларни истеъмол қилгандагидан юқори даражада асослироқ. Бироқ, жамоатчилик кайфиятини ҳисобга олиб, тижоратлаштирилган трансген шаклларда “шубҳали” генлар мавжудлигини истисно қилиш учун ёндашувлар ишлаб чиқилмоқда.

Ҳозирда кўпчилик ҳолларда *антибиотикларга чидамлилиқнинг маркер генлари* гербицидларга чидамли генларга алмаштирилмоқда. Ҳақиқатдан, “гербицид” генларнинг қўлланилиши ҳам эътирозларга, лекин энди атроф-муҳит ҳимоячиларининг эътирозига учрамоқда. Трансген ўсимликни яраткандан кейин керак бўлмай қолган (маркер) гени ажратган ҳолда элиминациялашнинг бир неча усуллари таклиф этилган.

Ўсимликлар трансген шакллари танлашда селектив генларни репортер генларига алмаштириш, ёки фитогормонлар синтези ёки културал муҳитда етиштирилган полисахаридларнинг алоҳида шакллари гидролизи генлари каби альтернатив селектив генлардан фойдаланиш истиқболли ҳисобланади. Шундай қилиб, ҳатто

антибиотикларга чидамлилиқ генлари билан боғлиқ мана шу виртуал хавфнинг мавжуд бўлиши яқин вақтларда тўхтайди.

Трансген ўсимликларнинг мумкин бўлган токсиклиги ёки аллергиялигига келсак, бу ерда маданий ўсимликларнинг анъанавий йўл билан олинган янги навлари ёки озиқ-овқат маҳсулотларининг янги турлари учун бўлгани каби ўша қаттиқ стандартлар қўлланилади. Трансген ўсимликлар бу параметрлар бўйича одатийларидан фарқ қилмайди (балки токсинлар ёки аллергиялар синтезини блоклаганда яхши тарафга).

Атроф-муҳитга кўрсатилиши мумкин бўлган зарар муаммоси бир неча жиҳатларга эга. Биринчидан, гербицидларга чидамли маданий ўсимликлар турлар аро чатиштиришда ушбу генларни яқин қариндош бегона ўтларга ўтказишлари мумкин ва улар йўқ қилиб бўлмайдиган супер бегона ўтларга (superweeds) айланиши мумкин. Кўпчилик қишлоқ хўжалиги экинлари учун воқеаларнинг бундай номақбул ривожланиши эҳтимоли жуда кам бўлса ҳам, ген муҳандислари бундай хавфни бартараф қилиш учун ёндашувлар устида фаол иш олиб бормоқдалар. Бу ерда ҳақиқатдан, қайд этиш лозимки, қишлоқ хўжалиги амалиётида аллақачон анъанавий селекция йўли билан олинган гербицидларга чидамли навлардан фойдаланилаётгани каби ушбу савол ҳам янгиэмасдир. Бунда шундай чидамли навлардан кенг фойдаланиш ҳозиргача ҳеч қандай экологик ҳалокатни келтириб чиқармади.

Шундай бўлсада, бу ҳолатда ҳам, трансген ўсимликлардан ҳар қандай эътирозларни олиб ташлаш учун, масалан, ўсимликка бир эмас балки бир нечта гербицидларга чидамлилиқ генларини киритиш синаб кўрилади. Бегона ўтларга бир нечта генларни ўтказиш эҳтимоли бир генни ўтказишдан нисбатан анчагина кам. Бундан ташқари, мультигербицид чидамлилиқ экинларга ишлов беришда турли гербицидларни алмаштириб туриш имконини беради, бу эса қандайдир муайян чидамлилиқ генининг бегона ўтларда тарқалишига имкон бермайди.

Чидамлилиқ генини яна ядровий эмас, балки хлоропласт геномига киритиш таклиф этилади. Бу генларнинг номақбул дрейфини чанглор орқали бартараф этиши мумкин, чунки хлоропластлар фақат она томонидан ирсийланади.

Бегона ўтларга қарши умуман гербицидларга резистентлик генларидан фойдаланмасдан курашишнинг яна бир ген муҳандислик йўлларида бири – биотрансген йўлдир. Гап майда ҳайвонлар, масалан, куёнларнинг экин майдонидан бегона ўтларни еб битириши ҳақида боради. Бунда маданий ўсимликларни еб битирмасликлари учун ўсимликларга уларни ўша ҳайвон учун жозибасиз (ҳиди, таъми) қилиб қўядиган қандайдир генни киритиш мумкин. Бундай биотрансген ёндашув ҳозирда трансген ўсимликларга қарши илгари сурилаётган кўпгина эътирозларни дарҳол йўққа чиқарган бўлар эди.

Моҳиятига кўра яқин бўлган экологик эътирозлар зараркунанда ҳашаротларда оммавий резистентлик пайдо бўлишининг келиб чиқишига сабаб бўлади, деб ҳисобланган киритилган “инсектицидли” генларга тегишли. Бу ерда яна хавфни камайтириш учун фойдали усуллар, масалан, ҳашаротлар ўсимликларга хужум қилганда тезлик билан фаоллашадиган турли хил токсинлар ва/ёки индуцибел промоторларнинг генларидан фойдаланиш таклиф этилган. Мазкур муаммо умуман олганда янги эмас, чунки ҳозир “ген даражасида” фойдаланилаётган инсектицидларнинг кўпчилиги тоза модда кўринишида экинларни пуркаш учун алақачонлардан бери қўлланилади.

Инсектицидлар генлари бўлган трансген ўсимликларнинг яна бир ноҳуш оқибати шундан иборатки, бу ўсимликларнинг чанглари улар билан озиқланадиган фойдали ҳашаротлар учун заҳарли бўлиши мумкин. Баъзи тажрибалар маълумотларига кўра, шундай хавф ҳақиқатдан ҳам бор, гарчи унинг мумкин бўлган кўлами ҳақида гапириш қийин бўлса ҳам. Бироқ бу ерда ҳам адекват ген муҳандислиги қарорлари, масалан, трансгеноздан хлоропласт ДНК, ёки чангда ишламайдиган промоторлар орқали фойдаланиш синовдан ўтказиб ва таклиф этиб бўлинган.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. ГМО хавфсизлигининг асосий муаммолари

§ 19. Хужайра селекцияси ва хужайра муҳандислигининг асосий усуллари

- 1. in vitro уруғлантириш*
- 2. етилмаган гибрид уруғкуртак ва муртакларни етиштириш*
- 3. экспериментал гаплоидия.*

Хужайра муҳандислиги – илм-фан ва селекцион амалиётнинг йўналиши бўлиб, ҳар ҳил турларга мансуб соматик хужайраларни гибридизациялаш усуллари, алоҳида хужайралардан тўқималар ёки бутун бир организмларни клонлаш имкониятларини ўрганади.

Ўсимликлар селекциясининг тарқалган усулларида бири – гаплоидлар усули – спермий ёки тухум хужайралардан тўлақонли гаплоид ўсимликлар олиш.

Хужайра селекцияси. Хужайра селекцияси усуллари

Хужайра технологиясининг йўналишларидан бири – бу улардан селекцияда ўсимликларнинг янги шакллари ва навларини яратишда анъанавий селекцион жараёни енгиллаштириш ва тезлаштириш учун фойдаланиш. Алоҳида ажратилган хужайра ва тўқималарнинг *in vitro* етиштиришнинг мавжуд усуллари шартли равишда икки гуруҳга бўлиш мумкин.

Биринчи гуруҳ – одатдаги селекциянинг ўрнини босмайдиган, балки унга хизмат қиладиган ёрдамчи технология. Уларга қуйидагилар киради: *in vitro* уруғлантириш (прогам мос келмасликни енгиш), уруғкуртак ва етилмаган гибрид муртакларни етиштириш (постгам мос келмасликни енгиш), чангдон ва микроспораларни ўстириш йўли билан гаплоидлар олиш, алоҳида ажратилган хужайралар, тўқима ва аъзоларни криосақлаш, узоқлаштирилган гибридларни клонал микрокўпайтириш.

Усулларнинг иккинчи гуруҳи мустақил, анъанавий усуллари билан боғлиқ бўлмаган селекцияга, ўсимликларнинг янги шакллари ва навларини олишга олиб келади: каллус тўқимасидан фойдаланган ҳолда хужайра селекцияси, соматик гибридизация (алоҳида ажратилган протопластларни қўшиш ва жинсий бўлмаган гибридлар олиш), ген муҳандислиги усуллари қўллаш (расм. 19.1).

Узоқ дурагайлашда *in vitro* уруғлантириш, эмбриокультура (сунъий озуқа муҳитида алоҳида ажратилган муртакларни етиштириш), қимматли гибридларни клонал микрокўпайтириш,

шунингдек, *in vitro* гаплоидларни олиш ва криосаклаш каби алоҳида ажратилган тўқималарни етиштириш усуллари ҳам қўлланилади.

In vitro уруғлантириш (прогам мос келмасликни енгиш) табиий шароитларда танланган жуфтликлар ўртасида уруғланишни амалга оширишнинг имконияти бўлмаган ҳолатларда ўтказилади. Бу бир нечта сабаблар туфайли келиб чиқади: 1) физиологик (гулчанг етилиши вақти бўйича мос келмаслик ва бошқ.); 2) морфологик (калта гулчанг найчаси ёки унинг ўсишини ривожланишнинг турли босқичларида тўхташ ва бошқ.).

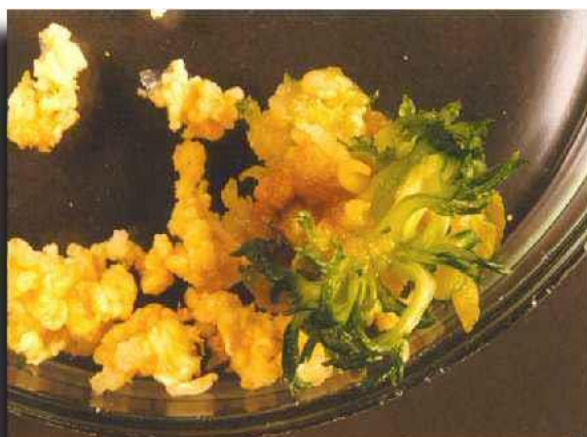
In vitro уруғлантиришни икки усул билан амалга ошириш мумкин: а) тугунчага суртилган тайёр гулчанг билан сунъий агарланган муҳитда етиштириш; б) тугунча очилади ва озуқа муҳитига плацентанинг парчалари уруғкуртаклар билан биргаликда кўчирилади, уларнинг яқинида ёки бевосита плацента тўқимасида тайёр гулчанг етиштирилади. *In vitro* уруғлантириш содир бўлганлиги ёки бўлмаганлигини ўлчамлари тез катталашаётган уруғкуртакларга қараб визуал аниқлаш мумкин. Шаклланган муртак, одатда тинч ҳолатга ўтмайди, балки дарҳол униб чиқади ва гибрид авлод пайдо бўлишига олиб келади. Плацентар *in vitro* уруғлантириш маданий тамаки *N. tabacum* ва ёввойи турлари *N. rosulata* ва *N. debneyi* билан чатиштиришдаги мос келмасликни енгиш имконини берди ва М.Ф. Терновский ва бошқ. (1976), Шинкарева (1986) тажрибаларида тамакининг турлараро гибридини олишга имконият яратди.

Турлараро гибридизацияда постгам мос келмаслик уруғлантиришдан кейин юзага келади. Кўпинча бунда нимжон ўхшамаган уруғлар ҳосил бўлади. Муртак ва эндосперм ривожланиши вақти бўйича тафовут сабаб бўлиши мумкин. Эндосперм кучсиз ривожланганлиги сабабли муртак нормал униб чиқа олмайди. Бундай ҳолатларда етилган нимжон дондан муртак алоҳида ажратиб олинади ва озуқа муҳитида етиштирилади.

Муртакларни сунъий озуқа муҳитида етиштириш **эмбриокультура** деб номланади. Етилган муртакни ўстириш учун озуқа муҳити оддий, физиологик фаол моддалар қўшилмаган (масалан, Уайт муҳити) ёки минерал тузлар ва сахароза бўлган бошқа ҳар қандай муҳит бўлиши мумкин. Янада узоқлаштирилган чатиштиришларда муртак ривожланишидаги бузилишлар эрта босқичларидаёқ кузатилиши мумкин, бу дифференцировка йўқлиги,

ўсишнинг секинлашишида намоён бўлади. Бу ҳолатда муртак етиштириш икки босқичдан иборат – муртакнинг дифференциаллашиши давом этадиган эмбрионал ўстириш, ва етилган муртакнинг униб чиқиши. Биринчи босқич учун таркиби бўйича янада мураккаброқ озуқа муҳити сахароза миқдори оширилган, турли хил аминокислоталар, витаминлар ва гормонлар қўшилган талаб этилади.

Эмбриокультураларнинг селекцияда қўлланилиши кейинги вақтда донли, бошоқли ва бошқа қишлоқ хўжалиги экинларининг генетик тарафдан узоқлаштирилган гибридларини олиш катта аҳамиятга эга (расм.19.2). Буғдой-жавдар гибридларини етилмаган муртакларни ўстириш йўли билан чиқимини ошириш, шунингдек, эмбриокультурадан буғдой билан колосняк гибридизациясида постгам мос келмасликни бартараф этиш учун фойдаланиш имконияти кўрсатилди.



Расм. 19.1 Мақсадли моддаларни барқарор синтез қилиш хусусиятига эга женьшеннинг трансген илдиз культуралари

(<http://www.fegi.ru/PRIMORYE/BIOLOGY/hodya.htm>)

Расм. 19.2 *N. sibirica* ниҳолларининг эмбриокультура шароитида ривожланиши: ниҳоллар етиштиришнинг 7-суткасида кейин

(https://www.researchgate.net/profile/Tatiana_Zhelezniichenko/publication/).

Эмбриокультура усули сабзаёт ўсимликларининг турлараро гибридизациясида янада кенгроқ қўлланилмоқда. Пиёз учун эмбриогенезнинг турли босқичларидан гибрид уруғлардан ўсмай қолган абортив муртакларни, қисман фертил турлараро гибридлардан муртакларни *in vitro* ўстириш усуллари ишлаб чиқилган. Алоҳида ажратилган муртакларнинг культураларидан помидор ва бошқа сабзаёт ўсимликларининг селекциясида фойдаланилади.

Помидор муртагининг ўсиши ва ривожланишининг гормонал бошқаруви *in vitro* тадқиқ қилинди. Кунгабоқарнинг турараро гибридларини олиш учун қўллаш эмбриокультурани имкониятлари муҳокама қилинмоқда, кунгабоқарнинг чанглангантирилгандан кейин турли муддатларда ажратиб олинган куртакларини *in vitro* ўсиши ва ривожланишини назорат қилувчи омиллар ўрганилмоқда.

Алоҳида ажратилган куртакларни етиштириш узоқлаштирилган гибридизацияда ёрдамчи усул сифатида нафақат постгам мос келмасликни, балки яна қимматли гибридларни микроқўпайтириш мақсадида ҳам қўлланилади. Бу ҳолатда микроқўпайтириш каллусогенез, морфогенез индукцияси ва каллус тўқимасидан ўсимлик-регенерантлар олиш йўли билан боради. Етилмаган муртакларни клонлаш техникаси ўсимликлар қимматли генотипларини ҳаёт циклининг эрта босқичларида қўпайтириш имконини беради. Муртаклар культурасининг яна бир имконияти – ундан хужайра селекциясида фойдаланишдан иборат.

Хужайра селекциясини ўтказиш учун қуйидаги усуллардан фойдаланилади:

бевосита (позитив) селекция, бунда фақат керак бўлган мутант турдаги хужайралар тирик қолади;

билвосита (негатив) селекция, ёввойи турдаги танланган хужайраларнинг ҳалокати ва метаболизм жихатдан фаол бўлмаган хужайраларнинг тирик қолишига асосланган, лекин уларда мутацион ўзгаришларнинг қўшимча идентификацияси талаб этилади;

тотал селекция, бунда барча хужайра клонлари индивидуал текширилади;

визуал селекция ёки селектив бўлмаган танлаш, қачонки, вариант қатори хужайралар бутун популяцияси орасида идентификацияланиши мумкин бўлганда ёки биокимёвий усуллардан (юпқа қаватли ёки суюқликли хроматография, радиоиммун таҳлил, микроспектрофотометрия ва бошқ.) фойдаланилганда.

Хужайра селекциясининг юқорида санаб ўтилган усулларида бири бўлган бевосита селекция энг кенг тарқалган усуллардан ҳисобланади ва ундан асосан масалан, гербицидлар, антибиотиклар, токсинлар, оғир металллар, тузлар ва бошқа антиметаболитларга чидамли ўсимлик-регенерантларни ажратишда фойдаланилади.

Ўсимликлар гаплоид хужайралари культуралари, уларнинг генетика ва селекциядаги аҳамияти

Селекционерлар учун гаплоид ўсимликлар катта қизиқиш уйғотади. Гаплоидлар икки усул билан олинади.

Биринчи классик усул – турлараро дурагайлашда, қачонки турлараро гибрид зиготасида турлардан бирининг хромосомалари элиминацияланади.

Иккинчи усул *in vitro* етиштиришга асосланган, бу ерда редукцияланган хромосомалар тўплами билан уруғланмаган жинсий хужайралардан бутун ўсимликларни тиклаш мумкин. Одатда улар стерил, чунки уларда эркак ва аёл гаметаларининг шаклланиши бузилган. Бироқ, *in vitro* етиштиришда, хромосомаларнинг тасодифан икки ҳисса кўпайиши содир бўлиши мумкин, ёки масалан, хужайралар ва ўсимликларга колхицин билан ишлов бериб уни сунъий равишда чақириш мумкин. Дигаплоидлар фертил ва тамоман яшовчан бўлади.

Гаплоидлар ва дигаплоидлар селекцион ишда бир қатор устунликларга эга:

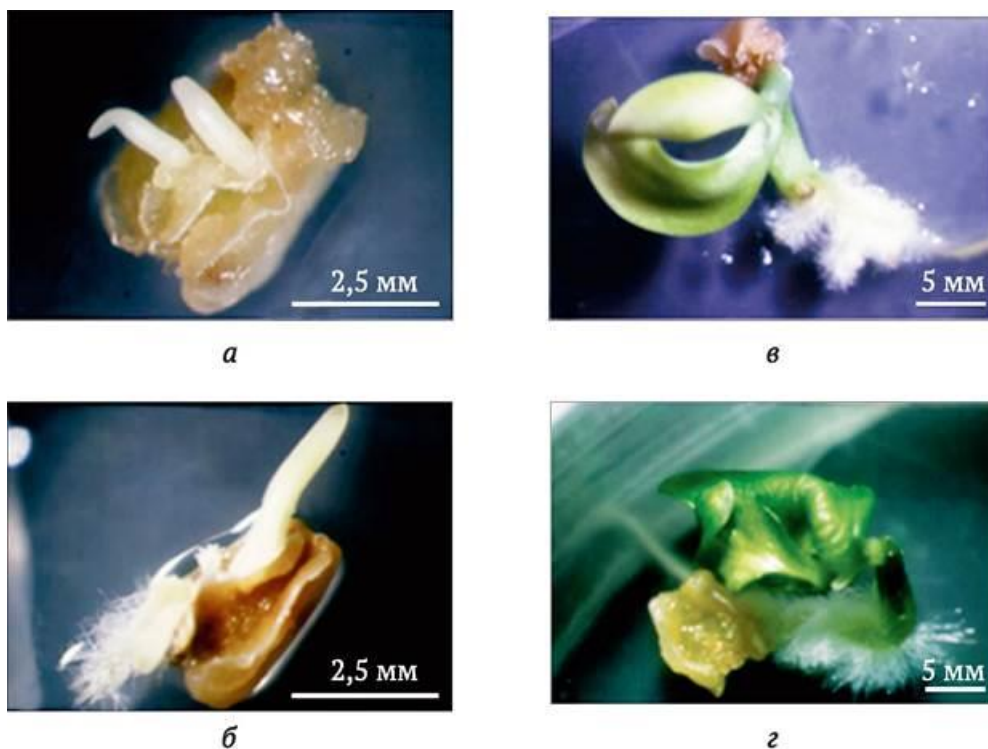
гаплоид ўсимликлар хромосомаларнинг гаметалар учун характерли битта тўпламига эга, бу селекционерларга мутацияларни гаплоид ўсимликларни кўздан кечириш мобайнида дарҳол кузатиш имконини беради, чунки гаплоид организмлардаги барча рецессив ген мутациялари доминант аллеллар билан яширилмайди;

агар гаплоид хужайралар колхицин ёрдамида полиплоидизацияга дучор қилинса, мутлоқ гомозиготалилик билан характерланадиган дигаплоидлар пайдо бўлиши мумкин. Гомозиготали қаторларни чатиштириш, одатда юқори маҳсулдор насл беради. Бошқа томондан, ҳозирги вақтда картошка уруғлар орқали кўпаймайди, чунки насли хилма-хил бўлиб қолади, балки гаплоидлари ёрдамида гомозиготали қаторларни яратиш бу камчиликни бартараф этади;

гомозиготали ўсимликлардан селекционерлар бошқа мақсадларда ҳам фойдаланадилар: миқдорий генетик таҳлил, генларнинг ўзаро таъсирини ўрганиш, генетик ўзгарувчанликни ўрганиш, бирлашган гуруҳларини аниқлаш, миқдорий белгиларга таъсир кўрсатадиган генлар сонини аниқлаш, полигенлар жойлашувини аниқлаш ва бошқ.

Гаплоид ўсимликлар наслнинг ҳалокати ёки сустлашишига олиб келувчи летал ёки сублетал мутациялардан маҳрум бўлган.

Юксак ўсимликлар гаплоидларини гаметофит ривожланишининг ҳар қандай босқичида чангдон спороген тўқимаси ҳужайраларининг редукцион бўлинишидан кейин олинган эксплантлардан олиш мумкин (расм.19.3).



Расм. 19.3. *Capsicum annuum* L. қалампири чангдони културасида гулчанг эмбриогенези: а, б – културадан 30 кун ўтиб чангдондан эмбрионид ажралиши: дастлаб илдизчалар пайдо бўлади (а), кейин қуртак тўлалигича (б); в – гулчангдан келиб чиққан ниҳол уруғпаллалари билан; 2 –ниҳол барглар билан (J. Varany бошқ. бўйича, 2005)

Гаплоидларни индукциялашнинг энг кенг тарқалган усуллари қуйидагилар:

чангдонлар ва гулчанглар културасида индукцияланган андрогенез;

гибрид муртакда хромосомаларнинг селектив элиминацияси. Бу усулдан кўпинча бошоқлилар селекциясида фойдаланилади;

псевдогамия – гаплоид муртакнинг тухум ҳужайра уруғланишисиз ёд гулчанг билан уруғлангандан кейин ривожланиши ёки алоҳида ажратилган уруғқуртакнинг ривожланиши (гиногенез).

Ҳужайра муҳандислигида кўпинча биринчи усул қўлланилади. Биринчи марта гаплоид ўсимликлар 1964 йилда ҳинд тадқиқотчилари

С. Гуха ва С. Магешвари томонидан бангидевона чангдонини етиштиришда олинган. Ўша вақтдан бери бундай усул билан 200 дан ортиқ турларда, шу жумладан буғдой, арпа, жавдар, гуруч, картошка ва бошқа экинларда гаплоид ўсимликлар олинди. Чангдонларни етиштириш учун ривожланишнинг муайян фазасида ғунчалардан стерил ажратиб олинган бутун бошли чангдонлардан фойдаланилади. Улар қаттиқ озуқа муҳитига, ёки суяқ озуқа муҳитининг юзасига жойлаштирилади. Кам ҳолларда гулғунчалар ёки тўпгуллар етиштирилади.

Алоҳида ажратиб олинган чангдонлардан гаплоид ўсимликлар олиш икки йўналиш бўйича бориши мумкин: соматик муртакларнинг бевосита регенерацияси ва билвосита – каллусогенез орқали. Биринчи ҳолатда чангдонлар ичида алоҳида гулчанг дончаларидан проэмбрионал тузилмалар шаклланади ва улардан етиштиришнинг маълум шароитларида гаплоид ўсимликларга асос берувчи эмбрионидлар пайдо бўлади. Эмбрионидлар – муртакларга ўхшаш тузилмалар. Иккинчисида – гулчанг бўлинади, лекин бўлиниш натижасида ҳосил бўлган ҳужайралар ўлчамлари тез катта бўлади ва гулчанг донаси қобиғини ёриб, каллус ҳосил қилади. Кейинги морфогенез натижасида мазкур каллус ҳужайраларидан ўсимликлар регенерацияланади. Бунда ўсимликлар турли ҳил даражадаги плоидлик - ди-, поли-, анеуплоидликка эга бўлиши мумкин. Охиргилари кўпинча стерил, лекин ўсимликларга колхицин билан ишлов берилгандан кейин хромосомалар сони икки ҳисса кўпаяди, бунинг натижасида фертил гомозиготалар олиш мумкин.

Гулчанг культураси чангдон соматик тўқималаридан озод қилинган микроспораларни суяқ озуқа муҳитида ўстиришдан иборат. Гулчанг чангдон соматик тўқимасидан бир неча усул билан ажратилади:

Тасодифан (спонтан) ажралиб чиқиш (пассив усул) – чангдонларга маълум усул билан ишлов берилади, суяқ муҳитда инкубацияланади, бу ерда ёрилади, гулчанг эса ажралади ва юқорига сузиб чиқади.

Гомогенизация ва фильтрация. Суяқ муҳитда етиштирилган чангдонларни скальпель билан тилиб ва эҳтиёткорлик билан эзиб жароҳат етказилади, кейин филтрланади (филтр тешикчалари 50-

100 мкм) ва центрифугаланади. Чўкма ювилади ва суяқ муҳитда суспензияланади.

Кесиш – чангдон девори кесилади. Бу усул кам қўлланилади, чунки сермашаққат ва узок вақт талаб этади.

Гулчанг эмбриогенези гулчанг ядроси ва гаметофит хужайраларининг функционал ҳамда структуравий детерминацияси билан боғлиқ, шу сабабдан ривожланишда иштирок этишлари мумкин: - фақат вегетатив хужайралар, - фақат генератив хужайралар, - иккала турдаги хужайралар, агар вегетатив ва генератив хужайралар қўшилса, бунда диплоид эмбрионид ҳосил бўлади. Итузумлилар учун фақат эмбриогенез, бошоқли ўсимликлар учун – каллуслар каби эмбрионидлар ҳосил бўлиши ҳам характерли. Гаплоидлар орасида (айниқса бошоқли ўсимликларда) альбинослар кўп учрайди. Регенерант-альбиносларнинг энг кўп чиқиши гулчанг культурасида чамаси, гулчанг ривожланишининг бузилиши билан боғлиқ. Сабаби аниқланмаган, бу ўстириляётган вақтда микроспоралардаги мутациялар натижаси бўлиши мумкин.

Баъзи бир турларнинг узоклаштирилган дурагайлашида гибрид муртак ривожланишининг эрта босқичида ота-оналардан бирининг хромосомаси селектив элиминацияси ҳодисаси аниқланди. Бу ҳодиса арпа ўсимлигида яхши ўрганилди. *Hordeum vulgare* (маданий) ва *H. bulbosum* (кўп йиллик пиёз томирли ёввойи) диплоид арпалар чатиштирилганда муртак ва эндосперм ўсиши босқичида (уруғланишдан кейин 5 кун ўтиб) ёввойи типдаги хромосомаларининг йўқолиши содир бўлади. *H. vulgare* хромосомалар тўплами бўлган гаплоид пайдо бўлади. Уруғланишдан кейин 15 сутка ўтиб она ўсимликда гибрид муртак ривожланиши тўхтайдди, лекин *in vitro* ўстиришда бундай муртаклардан ниҳоллар ривожланади. Бундай усулда ҳосил бўлган ўсимликлар учраш даражаси ва сони жуда юқори. Бундан ташқари, ўсимлик-альбинослар ҳосил бўлмайди. Ушбу усул ёрдамида одатда 10-12 йил давом этадиган селекция ўрнига 4 йилда Исток ва Одесса-115 навлари яратилди. Канадада шундай усул билан Минго ва Родео навлари яратилди.

Хромосомалар элиминацияси бошқа авлодларда ҳам учрайди. Агар чангловчи сифатида ёввойи арпадан фойдаланилса, жавдар ва буғдойда гаплоидларни индукциялаш мумкин.

Урғочи гаметофитлар культурасида гаплоидлар олиш бўйича илмий ишлар 50-йиллардан бошланди. Охирги вақтда уларга бўлган қизиқиш ошди. Эркак-стерил ўсимликларда уруғланмаган уруғкуртакларни ўстириш гаплоидлар олишнинг ягона имконияти ҳисобланади. Каллус тўқимасининг морфогенетик потенциали паст бўлган ёки агар каллус тўқимаси ўсимлик-альбиносларни регенерацияласа урғочи гаметофит ўсимликларда ҳам гаплоидлар манбаи бўлиши мумкин. Баъзи бир ўсимликларда, масалан арпа ёки гуручда яшил ўсимликлар индукцияси гиногенезда андрогенезга нисбатан анчагина юқори.

Муртакнинг қайси ҳужайрасидан янги организм пайдо қилишига қараб, партеногенез ва апогамия фарқланади. Партеногенез – тухум ҳужайранинг уруғланишсиз ривожланиши. Апогамияда муртак синергидалар ёки антиподалардан ривожланади. Дастлабки ишларда муртак сумкасининг соматик тўқималари пролиферацияси кузатилган. Биринчи марта гаплоид каллус уруғланмаган уруғкуртакдан 1964 йилда Тулек томонидан гингко культурасидан олинган, лекин органогенезни амалга ошириб бўлмаган. Бу ҳодиса фақат 1976 йилга келиб, Сан Ноум арпанинг уруғланмаган уруғдонлари культураси билан ишлаб, нормал яшил гаплоид ўсимликни олганда содир бўлди.

Гиногенез икки йўл билан – эмбриогенез ва каллусогенез орқали кечиши мумкин. Сан Ноумнинг арпа билан олиб борган ишларида гаплоид эмбриоидлар асосан антиподалардан, каллус эса – синергидалардан ҳосил бўлган. Гуручда эмбриогенезни ҳам, каллусогенезни ҳам синергидлар ҳосил қилган, антиподалар эса пировардида дегенерацияланди. Тамакида гаплоид эмбриогенез тухум ҳужайралар учун, скердларда эса – антиподалар учун характерли.

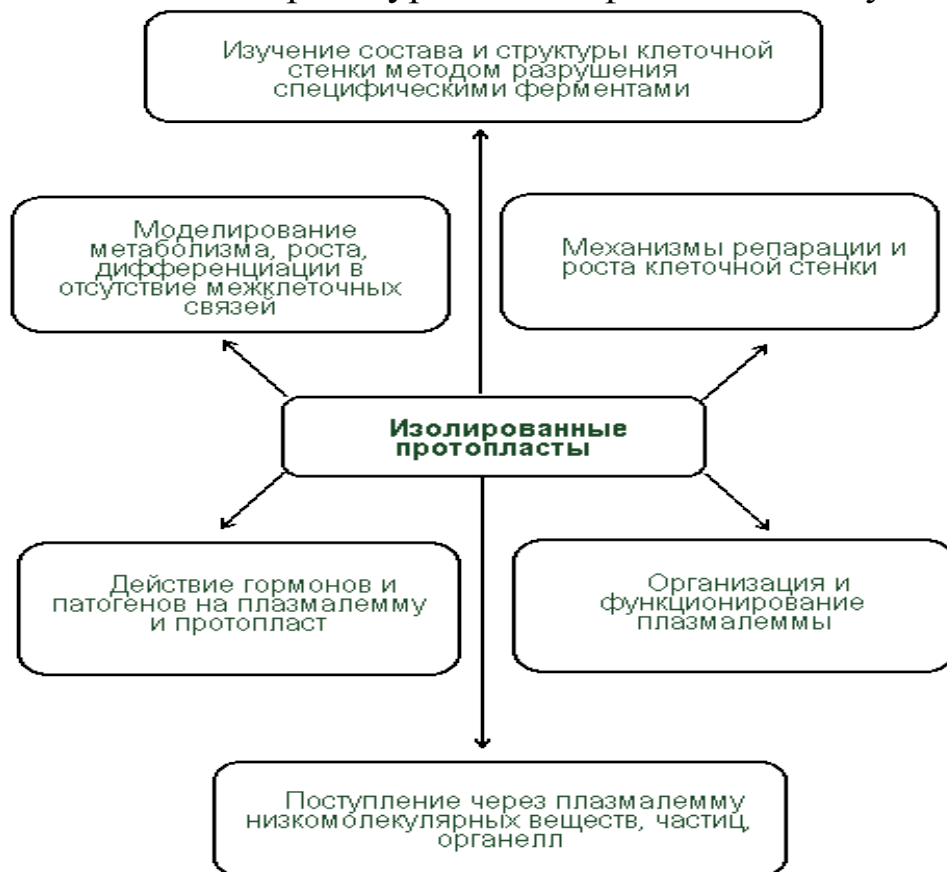
НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Ҳужайра муҳандислиги нима? Ҳужайра муҳандислигининг асосий усулларини айтиб беринг.
2. Ўсимликлар ҳужайра муҳандислигининг қўлланилиш соҳалари.
3. Эмбриокультура нима?
4. Гаплоид ҳужайралар культурасининг аҳмияти.

§ 20. Ўсимлик хужайраларининг протопластлари

1. Протопластлардан фойдаланиш
2. Протопластларни ажратиш ва бирлаштириш
3. Ўсимликларнинг микроклонал кўпайиши

Бактериялар, ўсимликлар ва ҳайвонларда протопластларни бирлаштириш усуллари янги қаторлар ёки янги турлар яратиш учун имкониятлари барча тирик хужайралар генетик аппаратининг бегона генетик материални жалб этиш хусусияти, шунингдек ҳар хил турлар хужайраларининг генетик материал билан алмашиш хусусиятини ўрганишга йўл очиб беради. Протопластлар ўсимликларда фундаментал физиологик муаммоларни ўрганиш учун ноёб модель ҳисобланади. Уларни плазмалеммаларнинг нормадаги таркиби, тузилиши ва ишлаши, ҳамда уларга гормонлар, ингибиторлар, фитототоксинлар билан таъсир кўрсатилганда, шунингдек, популяцияда протопластларнинг ўзлари ўзаро таъсирида ўрганишда алмаштириб бўлмайди. Бундан ташқари, протопластлардан хужайра бирламчи девори таркиби ва архитектоникасини аниқлаш ҳамда унинг емирилишдан кейинги репарацияси механизмларини ўрганишда фойдаланиш мумкин.



Расм. 20.1. Алоҳида ажратилган протопластлар – физиологик тадқиқотларнинг объекти ва модели (Р.Г. Бутенко бўйича, 1981)

Схемада (расм 20.1) алоҳида ажратилган протопластлар культураларидан фойдаланиб ўтказилган физиологик тадқиқотларнинг асосий йўналишлари акс эттирилган.

Шундай қилиб, алоҳида ажратилган протопластлар татбиқ этилишнинг ҳам назарий, ҳам амалий характерга эга бир қатор жабҳаларига эга:

1. Хужайра деворининг кимёвий хусусиятлари ва тузилишини ўрганиш (емирилшида ҳам, «de novo» синтезида ҳам).

2. Плазмалемма хусусиятлари, трансмембранали ҳаракатларни ўрганиш.

3. Органеллаларни «юмшоқ» ажратиш.

4. Протопластлар бирлашишида хужайралар дифференциаллашиши қонуниятларини назорат қилиш, олинган гибрид хужайрада ядро ва цитоплазманинг ўзаро таъсирини кузатиш, соматик гибридларни ўрганиш.

5. Бегона органеллаларни киритиш.

6. Ўсимлик хужайрасига бегона генларни киритиш (трансгенез).

Протопластларни ажратиш

Протопласт – целлюлоза қобиғини йўқотган, цитоплазматик мембрана билан ўралган, ўсимлик хужайрасига хос бўлган барча хусусиятларини ўзида сақлаб қолган хужайра. Хужайра деворининг ёқлиги хужайрага бегона генетик материалнинг кириб келишини жуда осонлаштиради. Илк бор протопластларни 1892 йилда Дж. Клеркер **механик** усулдан фойдаланиб ажратган. Бундай усулда плазмолизланган хужайраларда хужайра девори кесилади, протопластлар муҳитга чиқади. Ҳозирги вақтда бу усул модификацияланган, яхшиланган, лекин бир қатор чекланишларга эга:

- унчалик юқори бўлмаган унумдорлик,
- фақат экстенсив плазмолизли тўқималардан фойдаланиш мумкин,
- кўп меҳнат талаб қилиши ва узок давомийлик.

Протопластларни ажратишнинг бошқа усули – **энзиматик**, ферментлардан фойдаланиш усули. 1952 йилда Салтон лизоцим ферменти ёрдамида илк бор бактерияларнинг хужайра деворини парчалади. 1960 йилда Коккинг помидор илдизи учларига моғор

замбуруғлари (*Myrothecium verrucaria*) культурал суюқлигидан олинган гидролитик фермент билан ишлов берди ва илк бор юксак ўсимликларнинг энзиматик усул билан алоҳида ажратиб олинган протопластларини олишга муваффақ бўлди.

Энзиматик усулнинг механик усулга нисбатан устунлик жиҳати:

- бир вақтнинг ўзида кўп сонли протопластлар ажратиб олинади (тўқима ёки ҳужайраларнинг 1 граммидан 10 млн. гача),
- ҳужайралар кучли осмотик стрессга дучор этилмайди,
- ҳужайралар зарарланмайди,
- усул нисбатан тез амалга оширилади.

Ҳужайра деворини йўқ қилиш учун уч турдаги ферментлардан фойдаланилади: целлюлазалар, гемицеллюлазалар ва пектиназалар. Ферментлар комбинацияси ва уларнинг нисбати ҳужайраларнинг ҳар бир тури учун ўзига хосдир.

Протопластларни ажратиш уч босқичда олиб борилади:

1. ферментлар билан ишлов бериш,
2. ҳужайра деворидан протопластларни ажратиш,
3. интакт (бузилмаган) протопластларни ҳужайра бўлакларидан ажратиш.

Nicotiana tabacum барги тўқималаридан протопластларни ажратишнинг стандарт усули (Такебе бўйича):

Етилган, шаклланган барг 60-80 кунлик ёшдаги етилган ўсимликдан ажратиб олинади, 70%ли этанолга ботирилади, кейин эса 15-20 дақиқага кальций гипохлоритининг 10%ли эритмасига солиб қўйилади ва кўп марта дистилланган сув билан ювилади. Пинцет ёрдамида пастки эпидермис олиб ташланади, эпидермисдан тозаланган барглар скальпел билан 4 см² ли унчалик катта бўлмаган бўлакчаларга бўлинади. Эпидермисни яхшилаб олиб ташлаш учун баргларни бир оз сўлителиди, баргларни кесишдан олдин сув билан таъминлашни чеклаш ҳам мумкин.

Кейин тўқималарга кетма-кетлик билан ёки бир вақтнинг ўзида мацерация келтириб чиқарадиган пектиназа ва ҳужайра деворини парчалайдиган целлюлаза билан ишлов берилади. Ферментларнинг оптимал концентрацияси ишлов бериш вақти каби турли хил тўқималар учун индивидуалдир. Протопластлар ферментлар эритмасида минимал вақт давомида сақланиши лозим, шундан кейин

хафсала билан яхшилаб ювиш зарур. Ферментлар бактериал филтърлар орқали стерилланади.

Хужайрада сув алмашинувининг тартибга солиниши хужайра девори мавжудлиги билан боғлиқ. Протопласт “яланғоч” бўлганда сув алмашинувини тартибга соладиган компонентлардан бири йўқолади, шу сабабдан ажратиш ва етиштириш муҳитларининг осмотик хусусиятлари муҳим аҳамиятга эга бўлади. Протопластлар енгил плазмолизланган ҳолатда бўлиши учун муҳит бир оз гипертоник бўлиши керак. Бу шароитлар метаболизм ва хужайра девори регенерациясини секинлаштиради. Осмотик стабилизаторлар сифатида 0,3-0,8 моль/литр концентрацияли шакар (глюкоза, маннит, сорбит, ксилоза), ионли осмотиклар (CaCl_2 , KCl) фойдаланилади. Концентрациялар ҳар бир ўсимлик объекти учун индивидуал танланади.

Тўқималарга ферментлар билан 15° бурчак остида ушлаб турилган Петри ликобчасида ишлов бериш қулайроқ. Протопластлар билан ферментлар аралашмаси центрифуга пробиркаларига ўтказилади. Протопластларни ферментлар аралашмасидан ажратиш икки усул билан амалга оширилади: центрифугалаш йўли билан филтрлаш, ёки флотация. Филтрлашда аралашма тешикчаларнинг ўлчамлари 40 мкм бўлган филтрдан ўтказилади. Бунда филтлда хужайралар майда парчалари ва уларнинг катта бўлаклари қолади. Кейинги центрифугалашда протопластлар чўкади, бўлаklar супернатантда қолади. Қайта центрифугалашда ферментлардан ювиб тозаланади, шундан кейин протопластлар етиштириш муҳитига ўтказилади.

Флотация усули О. Гамборг ва ҳамкасблари томонидан 1981 йилда таклиф этилган ва заифлашган протопластлар учун мўлжалланган. Усул протопластлар органеллалар ёки хужайра девори қолдиқларига нисбатан пастроқ зичликка эга эканлигига асосланган. Дастлабки аралашмага сахароза эритмаси қўшилади ва 40-80 дан 350 g гача бўлган тезликда центрифугаланади. Тоза протопластлар сузиб чиқади, бўлаклари тубига чўкади.

Протопластларни шунингдек суспензия ва хужайра культуридан ҳам ажратиш олиш мумкин. Энг яхшиси – логарифмик ўсишнинг кечки босқичида хужайра девори осон парчаланадиган пайтда, протопластлар янада яшовчан бўлганда ажратиш.

Кейин протопластлар хужайралар етиштириладигани каби шароитларда етиштирилади. Тузлар таркиби бирмунча ўзгартирилиши мумкин. Муҳит осмотик стабилизатор, анорганик бирикмалар, углерод, азот, витаминлар, фитогормонлар манбаларидан ташкил топган. Етиштириш шароитлари: муҳит рН 5,4-5,8, ҳарорат 22-28°C, юқори бўлмаган ёритилганлик даражаси (2000 лк дан юқори бўлмаган).

Протопластлардан чиққан хужайралар пролиферациясига 4 омил таъсир кўрсатади:

- турларнинг ўзига хослиги ва ўсимлик бошланғич тўқимасининг физиологик ҳолати,
- протопластларни ажратиш усуллари ва шароитлари,
- протопластларни экиш зичлиги,
- озуқа муҳити таркиби.

Протопластларнинг бирлашиши

Ҳали хужайра деворини ҳосил қилмаган алоҳида ажратиб олинган протопластлар ўзаро бирлашиши мумкин. Алоҳида ажратиб олинган протопластлар осон бирлаштирилади, бу эса ҳар қил турларнинг геномларини аралаштиришга имкон беради. Бирлашиш нафақат турли ҳил ўсимлик турларининг хужайралари ўртасида, балки ҳар қил турдаги замбуруғ хужайралари ўртасида, ўсимликлар ва забуруғлар ўртасида, ўсимликлар ва хайвонларнинг хужайралари ўртасида ҳам мумкин. Протопластларнинг бирлашиши — гибридизациянинг парасексуал ёки соматик гибридизация деб номланган ўзига хос усули. Жинсий хужайралар (гаметалар) бирлашадиган одатий гибридизациядан фарқли ўлароқ, парасексуал гибридизацияда ота-она хужайралар сифатида ўсимликларнинг диплоид хужайраларидан фойдаланилади. Юксак ўсимликларнинг кўпчилигида жинсий жараёнда ядродан ташқари генетик детерминантлар қатъий бир ядролик ва оналик тарафидан ирсийланади. Парасексуал гибридизация техникаси қуйидагиларга имкон яратиши мумкин:

- ўсимликларнинг (организмларнинг) филогенетик узоқ бўлган турларини чатиштириш,
- ота-онасидан бирининг генлар тўплами билан бир қаторда бошқасининг бир нечта хромосомалари, органеллалари ёки цитоплазмасини ташувчи асимметрик гибридларни олиш,

- уч ёки ундан кўп хужайраларни бирлаштириш,
- ота-она генотиплари йиғиндисини ифодаловчи гибридлар олиш,
- мутацияларни протопластлар бирлашишида яшовчан шакллари олиш имконини берадиган гетерозигота ҳолатига ўтказиш, чунки мутагенез етарлича кўп ҳолатларда морфогенези бўйича дефекти бўлган ўсимлик беради,
- ядродан ташқари генлар бўйича гетерозиготали бўлган ва бошқа ўсимликларни олиш.

Парасексуал гибридизация ядро генлари учун ҳам, ядродан ташқари геномлар учун ҳам муҳим. Цитоплазматик геном бир қатор белгилар – фотосинтез тезлиги, патогенларга, абиотик омилларига чидамлилиқ ва бошқаларни кодлайди. Генлар косегрегациясининг мавжудлиги (ядродан ташқари геномни назорат қилувчи белгилар биргаликда сегрегацияланади) генларнинг физик бирлашишидан далолат беради.

Бирлашиш тасодифан (кўпинча ёш тўқималар ёки суспензион культуралардан олинган протопластларда) ва индуцирланган бўлиши мумкин. Протопластлар бирлашишини стимуляциялаш учун бир қатор физик усуллар каби кимёвий усуллар ҳам таклиф этилган.

Протопластларни бирлаштиришнинг 1981 йилда Г. Циммерман ва ҳамкасблари томонидан ишлаб чиқилган физик усулида протопластлар ҳар хил электр майдони бўлган камерага жойлаштирилади. Электродларда 2-3 протопластлардан иборат агрегатлар, ёки электродлар орасида 5-6 протопластлардан иборат занжирчалар ҳосил бўлади. Ўзгармас токнинг ягона қўшимча импульси кучли сиқилган мембраналарда тешикчалар ҳосил бўлишига олиб келади, чунки ўзгарувчан ток протопластларни бирмунча вақт биргаликда ушлаб туради, ва протопластлар бундай агрегатларда бирлашади. Ўчиб бораётган ток бирлашган протопластларда шарсимон шакл қайтишига олиб келади.

Бирлашиш асосида ўзгармас ва ўзгарувчан токнинг плазмалеммага турлича таъсир кўрсатиши ётади. Ўзгармас электрик майдон мембраналарни сиқиб, уларнинг локал емирилишига олиб келади, ўзгарувчан электр майдони эса мембрана оксилларининг латерал диффузиясини келтириб чиқариб, бу билан қарама-қарши

мембраналар контакт ўрнатиши мумкин бўлган жойда гликопротеидлардан ҳоли бўлган соҳалар ҳосил қилади.

Протопластлар ҳам жуфт-жуфт бўлиб, ҳам кўп миқдорда бирлашиши мумкин. Бирлашишнинг кўп ядроли маҳсулотлари одатда парчаланади. Ўсимликлар даражасида соматик гибридлар олинганлиги ҳақидаги биринчи хабар 1972 йилда олинган (Карлсон ва унинг ҳамкасблари), СССРда шунга ўхшаш тадқиқотлар 1975 йилда Бутенко Р.Г. лабораториясида амалга оширилган.

Шундай қилиб, протопластларнинг бирлашиши гибрид ёки цибрид ҳосил бўлишига олиб келади. Соматик гибрид – иккала протопластнинг ҳам цитоплазмаси, ҳам ядролари бирлашиши маҳсулидир. Цибрид (цитоплазматик гибрид) – иккала ота-она цитоплазмаси ва улардан бирининг ядросига эга бўлган ўсимлик-регенерант.

Цибридлар ядрони парчалаш учун протопластлардан бирини бирлашишдан олдин γ-нурлар билан нурлантириш йўли билан олинади. Бундай ҳужайралар скрининги – ядровий ва цитоплазматик (митохондриал ва хлоропластли) геномларининг маркер генлари бўйича ўтказилади. Гибрид ҳужайраларда митохондриялар ва хлоропластларнинг ДНК рекомбинациясига кўрсатмалар бор (Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник, 1984).

Ўсимликларнинг микроклонал кўпайиши.

Табиатда ўсимликлар кўпайишининг 2 усули мавжуд: жинсий (уруғлик) ва вегетатив. Ушбу иккала усул ўзининг устунлик томонлари каби, камчиликларга ҳам эга.

Уруғланиб кўпайишнинг камчиликларига уруғ материалининг генетик хилма-хиллиги ва ювенил даврнинг узоклиги киради.

Вегетатив кўпайишда она ўсимлик генотиби сақланиб қолади, шунингдек ювенил давр давомийлиги қисқаради. Бироқ турларнинг аксарияти вегетатив усул билан ёмон кўпаяди, уларга кўпчилик дарахт турлари киради. Масалан, ҳатто ювенил даврида ҳам эман, қарағай, қорақарағай, ёнғоқ мевалиларнинг кўпайиш самарадорлиги унчалик юқори эмас. Бундан ташқари, қаламча пайванд қилиш ёрдамида 10-15 дан катта ёшли дарахт ўсимликларининг кўпчилик турларини кўпайтириш имконсиз. Стандарт экиладиган материални олиш қийин, чунки инфекция йиғилиши ва ўтказилиши имконияти

мавжуд. Пайванд қилиш ёрдамида кўпайтириш бўйича операциялар қийин ва машаққат билан амалга оширилади.

Хужайралар ва тўқималарни етиштириш соҳасидаги ютуқлар вегетатив кўпайишнинг умуман янги усули – клонал микрокўпайишни яратишга олиб келди. Клонал микрокўпайиш – *in vitro*, жинссиз йўл билан ўсимликнинг дастлабки намунасига генетик жиҳатдан айнан ўхшаш бўлган ўсимлик олиш. Усулнинг асосида ўсимлик хужайрасининг ноёб қобилияти ўзига хос бўлган тотипотентликни амалга ошириш ётади. “Клон” атамаси (грекча klon – ўсимликларни кўпайтириш учун яроқли бўлган қаламча ёки новда) 1903 йилда Уэбстер томонидан таклиф этилган. Илмий терминологияга мувофиқ клонлашда ягона хужайралардан айнан ўхшаш организмлар олиш тушунилади. Мазкур усул кўпайишнинг мавжуд бўлган анъанавий усуллари олдида бир қатор устунликларга эга:

- генетик жиҳатдан ўхшаш экиш материални олиш;
- ўсимликларни меристема культурасидан фойдаланиш ҳисобига вируслардан ҳалос этиш;
- юқори кўпайиш коэффиценти (10^5 - 10^6 – ўтсимон, гулли ўсимликлар учун, 10^4 - 10^5 – бутасимон дарахт ўсимликлар учун ва 10^4 – игнабарглилар учун);
- селекция жараёни давомийлигини қисқартириш;
- ўсимликларни ривожланишнинг ювенил фазасидан репродуктив фазасига ўтишини тезлаштириш;
- анъанавий усул билан кўпайиши қийин бўлган ўсимликларни кўпайтириш;
- бутун йил давомида иш олиб бориш имконияти;
- ўстириш жараёнини автоматлаштириш имконияти.

Клонал микрокўпайиш жараёнини 4 босқичга бўлиш мумкин:

1. Ўсимлик-донорни танлаш, эксплантларни алоҳида ажратиш ва яхши ўсадиган стерил культура олиш.
2. Микрокўпайиши ўзи, қачонки максимал миқдорда меристематик клонларни олишга эришилганда.
3. Кўпайтирилган новдаларни кейинги тупроқли шароитга мослаштириш билан илдиз оттириш, зарур бўлганда эса ўсимлик-регенерантларни пасайтирилган ҳароратда ($+2^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$) депонирлаш (узоқ муддатли сақлаш).

- 4. Ўсимликларни иссиқхона шароитида ўстириш ва уларни реализация қилишга ёки дала майдонида экишга тайёрлаш.
- Тўқималарни тўрт босқичдан ҳар бирида етиштириш учун муайян таркибли озуқа муҳити талаб этилади.

Клонал микроўпайишнинг кашфиётчиси бўлиб XX асрнинг 50-йилларида орхидеянинг биринчи ўсимлик-регенерантларини олган Жан Морель ҳисобланади. Бу вақтда апикал меристемларни *in vitro* етиштириш техникаси яхши ишлаб чиқилган эди. Одатда тадқиқотчилар бирламчи эксплант сифатида ўтсимон ўсимликлар: чиннигул, хризантема, кунгабоқар, нўҳот, маккажўхори ва бошқа ўсимликларнинг учки меристемаларидан фойдаланганлар.

Дарахт ўсимликлари тўқималарини етиштириш бўйича биринчи ишлар XX асрнинг 20-йилларининг ўрталарида эълон қилинган ва баъзи ўсимликларнинг камбий тўқималари *in vitro* каллусогенез хусусиятига эга эканлигини кўрсатган Готре номи билан боғлиқ. Лекин осинанинг тупроқ экинигача олиб борилган биринчи ўсимлик-регенерантлари фақат 60-йилларнинг ўрталаридагина Матес томонидан олинган.

Игнабарглилар тури тўқималарини *in vitro* етиштиришдан узок вақт давомида тадқиқот объекти сифатида кам фойдаланилди. Бу ўсимликдан алоҳида ажратилган тўқималарни етиштиришдаги ўзига хос қийинчиликлар билан боғлиқ бўлган. Маълумки, дарахт, айниқса игнабаргли ўсимликлар секин ўсиши, илдиз отиши қийинлиги, алоҳида ажратилган тўқималарда фаоллашадиган кўп микдорда иккиламчи бирикмалар (феноллар, терпенлар ва бошқ.) сақлаши билан характерланади. Оксидланган феноллар одатда ҳужайраларнинг бўлиниши ва ўсишини ингибирлайди, бу эса бирламчи эксплантнинг ҳалок бўлишига ёки дарахт ўсимликлар тўқималарининг ўсимлик-донор ёши ортиб бориши билан деярли батамом йўқ бўлиб кетадиган адвентив гул куртакларининг регенерацияланиш хусусияти камайишига олиб келади. Ҳозирги вақтда, айтиб ўтилган қийинчиликларга қарамай, дарахт ўсимликларнинг 40 оиласидан *in vitro* кўпайтирилган 200 дан ортиқ турни ташкил қилади (каштан, эман, қайин, клен, қарағай, қорақарағай, секвойя ва бошқ.).

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Протопласт нима? Протопластларни ажратиш усуллари.
2. Протопластлар қандай етиштирилади? Усуллари.
3. Протопластларнинг бирлашиши. Асосий ёндашувлар.
4. Ўсимликларнинг микроклонал кўпайиши нима? Усулнинг тавсифи.
5. Соматик гибридлар олишда ҳужайра муҳандислиги техникаси. Асосий босқичлари.

§ 21. Молекуляр маркерлар: таснифи ва қўлланилиши

1. *Молекуляр маркерларнинг асосий турлари*
2. *Молекуляр маркерлардан фойдаланишнинг асосий йўналишлари*
3. *ДНК-маркерлардан фойдаланишга асосланган селекция усуллари*
4. *Молекуляр маркерларнинг асосий синфлари*
5. *Монолокусли маркерлардан фойдаланишнинг асосий йўналишлари*
6. *Мультилокусли маркерлардан фойдаланишнинг асосий йўналишлари*

Генетика ривожланишининг дастлабки ўн йилликларидаёқ маълум бўлдики, генетик маркерлар мураккаб белгилар таҳлилида фойдали бўлиши мумкин. Бироқ учраш даражасининг пастлиги ва бошқа бир қатор камчиликлар генетик маркерларга, кейинчалик эса оксил маркерларига ҳам селекция амалиётига кенг кириб келишига имкон бермади. Генетик маркерларнинг охирги авлоди (молекуляр, ёки ДНК-маркерлар) геномда учраш даражасининг анча юқорилиги билан характерланади ва универсал, демак, талаб кенг бўлган ҳамда узлуксиз ривожланиб борадиган таҳлил усулларига асосланган. Бу генетика ва селекциянинг ДНК-маркерлардан фойдаланиш билан боғлиқ йўналишларининг тез ривожланишига кафолат бўлди.

Молекуляр маркерларнинг асосий турлари

Молекуляр маркерлар ҳозирги замон генетикасида муҳим ўрин тутди. Улар ёрдамида инсон ҳамда ўсимлик ва ҳайвонларнинг ўнлаб турлари геномининг батафсил молекуляр хариталари тузилган. Хариталарга организмнинг ўсиши ва ривожланиши, морфологик белгилари, касалликларга чидамлилиқ ва бошқа хусусиятларга жавоб берадиган генлар белгиланган. Молекуляр маркерлардан популяцион генетика, солиштирма генетика ва геномика, филогенетик

тадқиқотларда кенг фойдаланилади. Молекуляр маркерлар туфайли тиббий диагностика имкониятлари кенгаймоқда, ҳайвонлар зотлари ва ўсимликлар навларини паспортлаштиришнинг янги янада аниқроқ усуллари пайдо бўлмоқда. Молекуляр маркерлардан фойдаланиш селекция жараёнини сезиларли даражада тезлаштириш имконини беради.

Молекуляр маркерлар (синоним – ДНК-маркерлар) – бу ДНК даражасида таҳлил қилинадиган генетик маркерлар. ДНК-маркерлар генетик маркерларнинг учинчи авлоди ҳисобланади. Улардан олдин оксил маркерлари, янада илгарироқ эса классик генетик маркерлар бўлган. Биринчи марта генетик маркерлардан (“сигнальлар”) фойдаланишни назарий асосини тахминан бир аср илгари А.С. Серебровский тушунтирган: «... сигнальлар деб биз менделистик кузатувлар учун қулай, жойлашуви озми-кўпми маълум бўлган, ўрганиладиган трансгрессияланувчи белгига таъсир кўрсатмай ва етарлича муайян тарзда таъсир этиб, хромосомаларнинг мазкур сигнальлар жойлашган соҳаларини наслдан наслга ўтишини кузатиш имконини бериб, мазкур белгининг генетик таҳлилини осонлаштирадиган альтернатив генларни атаймиз» (Серебровский, 1970).

Ҳозирги вақтда молекуляр маркерларнинг ўнлаган турлари маълум. Асосий таҳлил усулига мувофиқ улар уч гуруҳга бўлинади: (1) блот-гибридизация, (2) ПЗР ва (3) ДНК-чиплар ёрдамида текшириладиган маркерлар (расм.21.1).

Бу маркерлар синфи учун таҳлил қилишда фойдаланиладиган асосий усул	Монолокусли	Мультилокусли
Блот-гибридизация	RFLP 1980	минисателлитлар 1985
Полимеразна занжир реакциси (ПЗР)	SSR 1989 STS 1989 SSCP 1989 CAPS 1993 SCAR 1993	RAPD 1990 ISSR 1994 AFLP 1995 SSAP 1997 IRAP 2006
ДНК-чиплар	SNP 1998	DArT 2001

Расм. 21.1 Молекуляр маркерларнинг схематик таснифи ва нашрларда биринчи марта кўрсатилган йили. (Е.К.Хлесткина бўйича)

Мазкур тасниф ДНК-маркерлар “эволюцияси”ни акс эттиради. Юқорида келтириб ўтилган гуруҳлардан биринчиси ДНК-маркерларнинг 1980 йилларда кенг тарқалган биринчи авлодини билдиради. 1990 йилларда ПЗР-маркерлар асосий ўринни эгаллади, 2000 йилларда уларни ДНК-чиплардан фойдаланишга асосланган молекуляр маркерлар сезиларли даражада сиқиб чиқарди. Охирги 2-3 йил давомида ДНК полиморфизми таҳлили учун геном ёки унинг алоҳида соҳаларини бевосита секвенирлаш усулидан янада кенгрок фойдаланилмоқда.

Молекуляр маркерларга классик генетик маркерлар билан барабар «локус», «аллель», «доминант», «кодминант» атамалари қўлланилади. Молекуляр маркерлар монолокусли ва мультилокусли маркерларга ажралади. Монолокусли маркерлар ҳаммадан кўп кодминант тип бўйича наслдан наслга ўтади, мультилокуслилар – доминант тип бўйича.

Молекуляр маркерлардан фойдаланишнинг асосий йўналишлари

Молекуляр маркерлар орасида жойлашган ўрни маълум бўлган маркерлар (муайян хромосомада ёки хромосоманинг муайян соҳасида, ёки конкрет генга яқин) ва жойлашган ўрни ҳақида ҳеч нарса маълум бўлмаган маркерлар (одатда булар мультилокусли маркерлар) фарқланади. Уларнинг иккаласи ҳам генетик тадқиқотларда ва селекцияда ўз ўрнини топмоқда. Жойлашган ўрни номаълум бўлган молекуляр маркерлардан муайян ген ёки хромосомани белгилашда фойдаланиб бўлмайди, лекин улар филогенетик тадқиқотларда ўсимликлар навлари ва ҳайвонлар зотларини паспортлаштиришда муваффақият билан қўлланилади. Баъзи мультилокусли маркерлар генетик хариталар яратиш (DArT ва AFLP-маркерлар), шунингдек геномик селекция учун (DArT) тўғри келади. Конкрет вазифани ҳал қилиш учун тўғри келадиган ДНК-маркерларни танлашга тур ичидаги полиморфизм ва ДНК полиморфизми таҳлили жараёнини автоматлаштириш имконияти каби тавсифлар таъсир кўрсатади.

ДНК-маркерлар татбиқ этилиши билан бошқа шу кабилари орасида алоҳида хромосома ва геномлар хариталарини тузиш, уларда микдорий белгилар ген ва локусларини (QTL) хариталаш каби

йўналишлар кенг кулоч ёйди. 1980 йилда Дэвид Ботштейн Р. Уайт, М. Школьник ва Р. Дэвислар билан биргаликда ДНК полиморфизми (айнан рестрикцион фрагментлар – RFLP узунлиги полиморфизми) таҳлили асосида биринчи монолокусли генетик маркерларни ишлаб чиқди ва улар ёрдамида генетик хариталар тузиш мумкинлигини кўрсатди (Botstein et.al., 1980). Ушбу кашфиёт иши кетидан ҳайвон ва ўсимликлар хилма-хил турларининг RFLP-хариталари тузиш бошланди. RFLP-маркерлар геномларни хариталашда қанчалик самарали силжиши имкониятини қуйидаги мисол акс эттиради. Буғдой геномининг биринчи RFLP-харитаси (Liu, Tsunewaki, 1991) кўпчилик тадқиқотчиларнинг бир неча ўн йиллар давомида олиб борган ишларининг натижаси бўлган олдинги классик геном харитасидан 1,5 баробар кўп локусларга эга бўлган ва 1,2 баробар узун бўлган.

Бир тур учун ишлаб чиқилган RFLP-маркерлардан қариндош тур ва навлар геномини таҳлил қилишда фойдаланиш мумкинлиги аниқ бўлди. Шундай қилиб, геномларни солиштирма хариталаш мумкин бўлди, шу туфайли алоҳида оилалар ичида ортологик генлар қаторларини аниқлаш ва умумий аجدоддан алоҳида турлар геноми тузилишининг эволюция жараёнида қайта ўзгаришини кузатишга муваффақ бўлинди. Мазкур ишлар натижалари солиштирма геномика соҳасидаги замонавий тадқиқотлар учун ниҳоятда муҳим (Moore et.al., 1995).

RFLP-хариталардан фойдаланиш туфайли геномда алоҳида генларнинг аниқ жойини аниқлаш ва уларнинг кетма-кетликларини хариталаш асосида (map-based gene cloning – генларни позицион клонлаш) клонлаш имконияти пайдо бўлди. Позицион клонлаш соҳасида пионер бўлиб америкалик тадқиқотчи Стивен Тэнксли ҳисобланади. Унинг раҳбарлигида мазкур усулдан фойдаланишда биринчи марта помидор меваларининг бактериал олачипорлигига чидамли ген клонланди (Martin et al., 1993). С. Тэнксли генотип бўйича танлашнинг потенциал устунликларини баҳолаганлар ўртасида биринчи бўлди ва 1983 йилда Жак Бекман билан бир вақтда ДНК-маркерлардан селекцияда фойдаланишни таклиф этди (Beckmann, Soller, 1983; 1983; Burr et.al, 1983; Tanksley, 1983).

Бироқ, генлари хариталаш бўйича ишларнинг кенг тарқалиши, шунингдек миқдорий белгилари локуслари (QTL quantitative trait loci)

RFLP маркерлар даврида эмас (уларнинг юқори нархи ва радиоактив белгиланган намуналардан фойдаланиш зарурати туфайли), балки арзонроқ ва ишлатишда қулайроқ ПЗР маркерларнинг пайдо бўлганда содир бўлди. ПЗР-маркерлар орасида генлар ва геномларни хариталаш учун энг тўғри келадигани ва талаб катта бўлгани микросателлит маркерлар (SSR маркерлар) бўлди. Оддий такрорланишлардан ташкил топган гипервариабел кетма-кетликлардан маркерлар сифатида фойдаланишни биринчи марта 1989 йилда немис тадқиқотчиси Дитхард Таутц (Tautz, 1989) таклиф этди.

Айнан ПЗР-маркерлардан ДНК-маркерларни селекцион жараёнга кенг жорий этилиши бошланди. Анъанавий селекцияда индивидуумларни чатиштириш учун танлаш фенотип таҳлили асосида амалга оширилаётган бир вақтда молекуляр маркерлар ёрдамида генотип бўйича танлов олиб бориш мумкин. Генотип бўйича танлаш фенотип бўйича танлашга нисбатан бир қатор устунликларга эга. Автоматик фенотиплаш усуллари жуда секин ривожланаётган бир вақтда, генотиплаш жараёни тўлиқ ёки қисман автоматлаштирилиши мумкин. Фенотипни автоматик таҳлил қилиш ускуналари тор йўналиш бўйича ихтисослашганлиги ва нархи қимматлиги билан фарқ қилади, айти вақтда генотипни таҳлил қилиш учун керакли ускуналар уларга нисбатан арзон ва универсал ҳисобланади. Бирор бир белгининг намоён бўлишини таҳлил қилиш ривожланишининг қатъий белгиланган босқичида амалга оширилади. Генотиплаш учун намуналарни деярли ҳар қандай қулай вақтда танлаш мумкин. Танланилаётган организмлар ривожланишининг эрта босқичларида намуналарни танлаш учун ДНКнинг керакли миқдорини ажратиш таҳлилга ва ундан кейин ортиқча сарф-харажатларсиз селекция жараёнидан анча мунча миқдорда материални ўз вақтида чиқариш имконини беради.

Фенотиплаш натижаларига атроф муҳитнинг турли хил омиллари таъсир кўрсатади. Генотип муҳит шарт-шароитлари ўзгариши билан боғлиқ эмас. Агар танлаш фенотип таҳлили асосида олиб борилса, у ҳолда тўлиқ устунликда доминант гомозиготаларни гетерозиготалардан фарқлаш ва, бинобарин жорий авлодда чатиштириш учун индивидуумни ажратиб олиш мумкин бўлмайди. ДНК-маркерлар ёрдамида бу вазифани осон уддалаш мумкин.

Ўсимликларнинг бир қатор муҳим белгиларини таҳлил қилиш ривожланишнинг гибридизацияни амалга ошириш мумкин бўлган босқичидан кейин олиб борилади, шу сабабдан танлаб олинган намуналарни чатиштириш навбатдаги вегетация даврдаёқ олиб борилади. ДНК-маркерлардан фойдаланишда тўғри келадиган жуфтликларни танлаб олиш ва жорий авлодда гибридизацияни амалга ошириш мумкин. Бу ҳам селекция жараёнини тезлаштиради. Мазкур устунликлар туфайли молекуляр маркерларни қўллаш дунёнинг кўпгина мамлакатларида селекция жараёнининг ажралмас қисмига айланди (Moose, Mumm, 2008; European Cereals Genetics, 2012).

ДНК-маркерларидан фойдаланишга асосланган селекция усуллари

ДНК-маркерлари қўлланиладиган селекция усуллари икки асосий гуруҳга бўлинади: MAS (маркерлар ёрдамида танлаш) (MAS – markerassisted selection) ва геномик селекция. MAS усулида мақсадли ген билан чамбарчас боғланган ДНК-маркерлардан фенотипик таҳлил ўрнига ёки биргаликда фойдаланиш кўзда тутилган. Мақсадли ген билан чамбарчас боғланган маркерлар фенотипни прогнозлаш учун ишончли восита ҳисобланади. Мақсадли геннинг керакли аллелини танлаб олиш қўшни маркер локусининг у билан чамбарчас боғланган аллели асосида амалга оширилади. Танлашда ген яқинида ундан иккала томонларда жойлашган маркерлар жуфтлигидан фойдаланилганда катта аниқликка эришилади (яъни, мақсадли геннинг ён томонларидан ҳимоя қиладиган маркерлар). Агар ген секвенирланган ва мазкур ген турли аллелларининг нуклеотид кетма-кетликларида фарқлар аниқланган бўлса, у ҳолда “ген ичи маркери” деб номланган маркер ишлаб чиқиш мумкин. Бундай маркердан фойдаланиш энг юқори аниқликка эга керакли генотипни танлаб олиш имконини беради. Ген ичи ёки ген билан чамбарчас боғланган ДНК-маркер бўлмаганда янада узоқлаштирилган маркерлардан фойдаланиш мумкин, бироқ бундай ҳолатларда MASни кейинги фенотиплаш билан бирга ишлатишга мақсадга мувофиқ. Бундай комбинацияланган ёндашув “тандем” (tandem selection) ёки маркер-йўналтирилган фенотиплаш (marker-directed-fhenotyping) деб аталади. MAS усули беккросс ва қаторли селекцияда, шунингдек

генлар пирамидасини яратишда ўзини яхши кўрсатди (Moose, Mumm, 2008).

Беккросс селекцияда танлашни ген ичи маркери (foreground selection), ген билан чамбарчас боғланган маркерлар (recombinant selection), генетик фон (background selection) бўйича олиб бориш мумкин, шунингдек, генетик фон бўйича танлашни ген ичи маркери бўйича танлаш ёки ген билан чамбарчас боғланган маркер бўйича танлаш билан комбинациялаш мумкин. Дастлабки икки усул керакли аллелни беккросс авлодлар давомида донордан реципиентга ўтказилишини назорат қилиб, фақатгина мақсадли ген бўйича танлов олиб бориш имконини беради. Геном бўйича тенг тақсимланган кўп сонли маркерлардан фойдаланиш нафақат мақсадли генни донордан реципиентга ўтказилишини назорат қилиш, балки реципиент геномининг қайта тикланишини тезлаштириш имконини ҳам беради. ДНК-маркерлардан бирор-бир белгисидан селекцияда фойдаланиш учун мазкур белгини назорат қиладиган генларнинг нуклеотид кетма-кетлиги ҳақида, ёки ҳеч бўлмаганда уларнинг геномдаги жойлашуви, шунингдек, улар билан чамбарчас боғланган маркерлар ҳақида ахборот талаб этилади. Агар бирламчи маълумотлар бўлмаса, у ҳолда тайёрлов тадқиқот ишлари бир йилдан ортиқ вақт давом этиши мумкин (расм. 5). Вақт ва маблағни тежаш мақсадида молекуляр-генетик таҳлил ва танлашни бир вақтда олиб бориш мумкин. Беккросс селекцияни QTL-таҳлил ва генотип бўйича танлашни бирлаштирадиган (advance backcross QTL analysis) бундай ёндашувдан фойдаланишни 1996 йилда С. Тэнксли ва Дж. Нелсон (Tanksley, Nelson, 1996) таклиф этганлар.

Нуклеотид кетма-кетликларини секвенирлаш нархини пасайтириш ва юқори маҳсулдор секвенирлаш усулларини ривожлантириш тўлиқ геномни секвенирлаш дастурларини оммавий амалга ошириш имкониятларини очиб берди. Геноми тўлиқ секвенирланган ўсимлик ва ҳайвонлар (ҳам модель, ҳам қишлоқ хўжалигида фойдаланиладиган) сони жадаллик билан ортиб бормоқда. Айни бир турнинг турли хил вакиллари геномини секвенирлаш ва солиштириш (геномни ресеквенирлаш) геномнинг полиморф соҳаларини аниқлаш ва геномни бир хилда ва зич қоплайдиган маркерларни (одатда SNP) ишлаб чиқиш имконини беради. Ҳозирги вақтга келиб қишлоқ хўжалигида аҳамият касб этган

хайвон ва ўсимликлар баъзи турлари ДНК полиморфизмининг автоматик таҳлили учун тўлиқ геномли SNP-чиплар ишлаб чиқилган. Қишлоқ хўжалиги объектларини генотиплашнинг юқори самарали усуллариининг татбиқ этилиши селекциянинг геном бўйича текис тақсимланган кўп сонли ДНК-маркерларининг таҳлилига асосланган янги усули – **геномик селекцияни** қўллаш учун йўл очиб берди (Смарагдов, 2009).

Геноми секвенирланиб бўлган турлардан ташқари, геномлари ҳали секвенирланмаган, ёки умуман ўрганилмаган ўсимлик ва ҳайвонлар турларига нисбатан ҳам геномик селекцияни қўллаш истиқболлари пайдо бўлди. Яқинда геномик селекцияда юқори самарали DArT-маркерлар усулидан фойдаланиш мумкинлиги буғдой мисолида намоиш этилди (Charmet, 2012). DarT усули SNPдан уларни ишлаб чиқиш учун геномни секвенирлаш бўйича маълумотлар талаб этилмаслиги билан фарқ қилади.

Геномик селекциядан MAS каби ДНК-маркерлардан фойдаланиш ва генотип бўйича танлаш тушунилади. Геномик селекция MAS дан нимаси билан тубдан фарқ қилади? Биринчидан, геномик селекция учун белгиларга таъсир кўрсатадиган генлар ҳақидаги билимлар талаб этилмайди, демак, селекция жараёнидан олдин кўп йиллик генетик тадқиқотлар керак эмас. Иккинчидан, геномик селекция мураккаб полиген назоратга эга белгилар бўйича танлашда устунликка эга, айти вақтда MAS одатда фақат белгиларнинг моно- ёки олигоген назорати ҳолатида самарали. Шунга қарамасдан, агар геномик селекция жараёни белгиларнинг номақбул коселекциясига олиб келса (масалан, йирик қорамолда сут ишлаб чиқарилишининг ошиши ва маститга мойиллик) MAS учун талаб этиладиган тадқиқотларга ўхшаш тадқиқотлардан воз кечиб бўлмайди.

Геномик селекция жараёни уч босқични ўз ичига олади: фенотиплаш ва генотиплаш усулларидан фойдаланиб “машқ авлодлари” таҳлили, фенотип ва генотип ўртасидаги корреляцияни аниқлаш, “селекцияга номзодлар” (selection candidates) орасидан генотип бўйича кейинги танлаш. ДНК-маркерлар ёрдамида авлодларда сақланиб қоладиган барқарор генлар тармоқларини танлаб олиш мумкинлиги аниқланди. Бироқ геномик селекцияни муваффақиятли амалга ошириш учун зарур шарт-шароитлар

фойдаланилаётган маркерлар машқ авлодларининг адекват сони ҳамда текширилаётган генотиплар ва маркерлар сонининг тўғри нисбатидан иборат.

Ҳозирги вақтда чўчка (ТОPIGS Голландияда ва INRA Францияда, КазАгроИнновация Қозоғистода, VikingGenetics Дания ва Швецияда, LFL-LGL ZuchtData Германия ва Австрияда, шунингдек АҚШда бир қатор компания ва ташкилотлар) ва буғдой (INRA Францияда, CIMMYT Мексикада) геномик селекцияси бўйича дастурлар энг фаол ривожланмоқда. Геномик селекциядан келадиган иқтисодий фойдани йирик қорамолни селекциялаш бўйича маълумотлар яхши акс эттиради. Геномик селекция буқаларни баҳолашга сарфланадиган маблағнинг 92%ини иқтисод қилиш ва баҳолаш вақтини 6 йилдан 1 йилгача ва 9 ойгача қисқартириш имконини беради (Смарагдов, 2009).

Шундай қилиб, молекуляр (ёки ДНК-) маркерлар – бу илгаригиларидан эукариотлар геномларида кўп сонли бўлиши ва кўп учраши билан фарқ қиладиган ва универсал, демак талаб юқори бўлган ва доимо ривожланиб борадиган таҳлил усулларига асосланган генетик маркерларнинг янги авлоди. ДНК-маркерлардан амалий соҳаларда, хусусан селекцияда фойдаланиш мақсадга мувофиқ ва иқтисодий жиҳатдан асосли бўлиб чиқди, уларнинг фундаментал тадқиқотларда қўлланилиши эса ўрганилаётган объектлар геномларини тузилиши ва эволюциясини тушунишнинг янги даражасига чиқиш имконини берди.

Классик генетик маркер аллеллари фенотип даражасида аниқ ифодаланган фарқларга эга генга мос келади.

Оқсил маркери аллеллари оқсил маҳсулоти даражасида фарқларга (молекуляр массаси ҳар хил) эга генга мос келади.

Молекуляр маркер турли хил вариантлари (аллеллари) ДНК даражасида фарқ қиладиган ген ёки геномнинг кодламайдиган соҳасига мос келади. ДНК даражасидаги фарқлар (**ДНК полиморфизми**) аниқланиши мумкин:

– маълум нуклеотид кетма-кетлиги билан гибридизациялаш ёрдамида;

– нуклеотид кетма-кетлигини секвенирлашда;

- полимераза занжирли реакция (ПЗР) ёрдамида олинган фрагментлар узунлиги таққосланганда;
- ДНКга рестрикция эндонуклеазалари билан ишлов берилганда.

Молекуляр маркерларнинг асосий синфлари

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – амплификацияланган фрагментлар узунлиги полиморфизми.

CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – парчаланган амплификацияланган полиморф кетма-кетликлар.

DArT (diversity array technology) – хилма-хилликни ўрганиш учун ДНК-чип технологияси.

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – ретротранспозонлар орасидаги амплификацияланган кетма-кетликлар полиморфизми.

ISSR (inter simple sequence repeats) – микросателлитлараро кетма-кетликлар.

RAPD (random amplified polymorphic DNA) – тасодифан амплификацияланган полиморф ДНК.

RFLP (restriction fragment length polymorphism) – рестрикцион фрагментлар узунлиги полиморфизми.

SCAR (sequence characterized amplified region) – нуклеотид кетма-кетликлари билан тавсифланган амплификацияланган соҳа.

SNP (single-nucleotide polymorphism) – бир нуклеотидли полиморфизм.

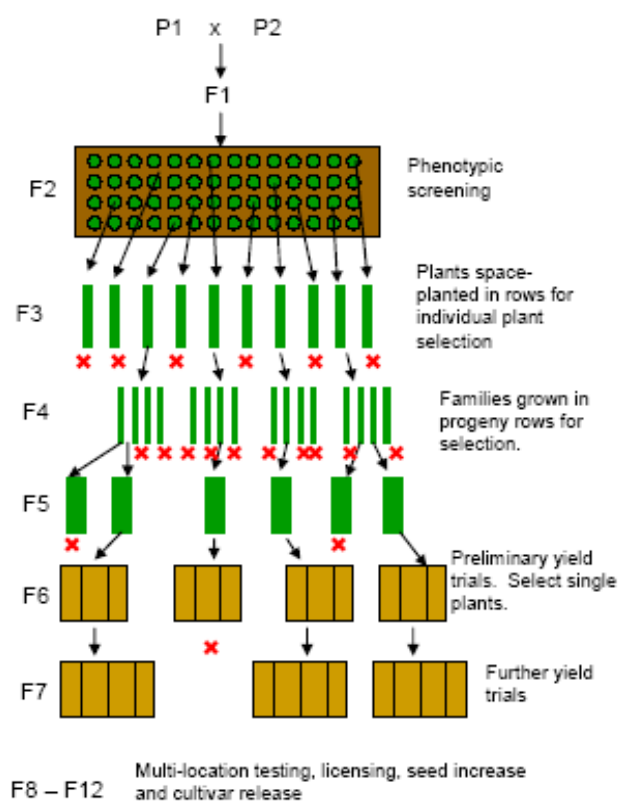
SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – сиквенс-специфик амплификация полиморфизми.

SSCP (single strand conformation polymorphism) – бир занжирли ДНК конформацияси полиморфизми.

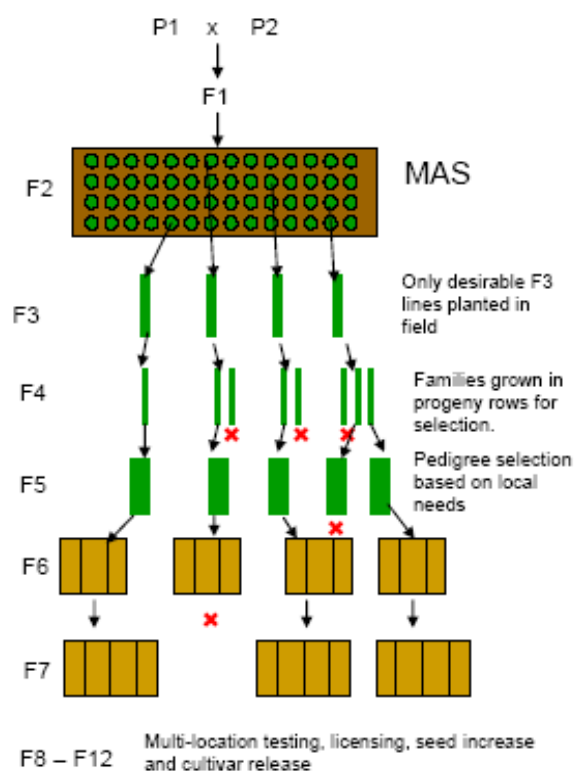
SSR (simple sequence repeats) – оддий такрорланувчи кетма-кетликлар (микросателлитлар).

STS (sequence tagged site) – нуклеотид кетма-кетлиги билан белгиланган сайт/локус.

PEDIGREE METHOD



EARLY GENERATION SELECTION MARKER ASSISTED SELECTION



Монолокусли маркерлардан фойдаланишнинг асосий йўналишлари:

- хромосомалар ва геномларнинг молекуляр хариталарини тузиш;
- генлар ва QTLни хариталаш;
- генлар, хромосомалар ва геномларни маркерлаш;
- солиштирма генетика ва геномика;
- селекцияда ДНКмаркерлар ёрдамида танлаш;
- геномик селекция (фақат SNP маркерлар);
- навлар/зотларни молекуляр паспортлаштириш;
- касалликларни ташхислаш;
- экологик мониторинг;
- генетик хилма-хилликни тадқиқи қилиш;
- филогенетик тадқиқотлар;
- популяцион генетика.

Мультилокусли маркерлардан фойдаланишнинг асосий йўналишлари:

- хромосомалар ва геномларнинг молекуляр хариталарини тузиш (фақат AFLP ва DArT маркерлар);
- генлар ва QTLни хариталаш (фақат AFLP- ва DArT маркерлар);
- геномик селекция (DArT маркерлар);

- навлар/зотларни молекуляр паспортлаштириш;
- экологик мониторинг;
- генетик хилма-хилликни тадқиқ қилиш;
- филогенетик тадқиқотлар;
- популяцион генетика.

Генни хариталаш – боғланиш гуруҳи ва хариталанаётган геннинг ушбу хромосома бошқа генлари ва маркерларига нисбатан жойини аниқлаш. QTL (quantitative trait locus) – миқдорий белгини аниқлаш билан боғлиқ локус.

Молекуляр маркерлар ёрдамида:

селекция жараёнини тезлаштириш;

селекция материали билан банд бўлган майдонларни қисқартириш; танловнинг энг юқори аниқлигига эришиш; меҳнат ва моддий ресурсларни иқтисод қилишга эришиш мумкин.

MAS – маркерлар ёрдамида танлаш (MAS –marker assisted selection); синонимлари: MAC (маркер ассоциацияланган селекция) ва MOC (маркер воситали/ориентирланган селекция). Ўсимлик ва ҳайвонларнинг замонавий селекциясида селекцияланаётган ген билан чамбарчас боғланган ДНК-маркерлардан фойдаланишда генотип бўйича танлаш имконини берадиган ёндашув.

Геномик селекция (genomic selection). Ўсимлик ва ҳайвонларнинг замонавий селекциясининг геном бўйича текис тақсимланган ДНК-маркерлардан фойдаланишда белгига таъсир кўрсатувчи генлар тўғрисида маълумотлар бўлмаганда танлов ўтказиш имконини берадиган усули.

MAS асосида беккрос селекция (marker assisted backcrossing) – селекциянинг усули бўлиб, бунда кетма-кет беккросс читиштиришлар жараёнида донор навидан реципиент навига 1-2 мақсадли ген ўтказилади ва геномнинг қолган қисмида реципиент нави генотипининг қайта тикланиши содир бўлади; бунда ҳар бир кейинги чатиштириш учун ўсимлик танлаш ДНК-маркерлар ёрдамида амалга оширилади.

MAS асосида бир мартали генотиплаш билан қаторли селекция (singlelarge scale markerassisted selection – SLS MAS) – эрта авлодларнинг бирида маркерлар ёрдамида баъзи белгилар бўйича номақбул генотипларни дарҳол чиқариб кейинги селекция учун ўсимликларни танлаш ва бу билан кейинги ишлар ҳажмини

анчагина камайтириш имконини берадиган қаторли селекциянинг анъанавий усулидан (ёки педигри усулидан) фарқ қиладиган селекция усули. Масалан, танлаш ўтказиладиган бир асосий ген ҳолатида F2 авлодида кейинги таҳлилдан 75% (3/4) номақбул генотипларни, 2 ген ҳолатида – 94% (15/16) номақбул генотипларни, 3 ген ҳолатида – 98% (63/64) номақбул генотипларни чиқариб ташлаш мумкин.

Генлар пирамидаларини яратиш (marker assisted pyramiding) – селекциянинг усули бўлиб, бунда ДНК-маркерлар ёрдамида бир вақтнинг ўзида ўхшаш белгиларни аниқлайдиган бир нечта генлар бўйича танлаш ўтказилади (одатда бундай ҳолатларда фенотип бўйича танлаш қийин): масалан, айнан бир патогеннинг турли хил ирқларига ёки айнан бир аъзони зарарлайдиган турли хил патогенларга чидамлилиқни аниқлайдиган бир нечта генлар бўйича танлаш.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. MASнинг устунлик ва камчиликлари.
2. Монолокусли ва мультилокусли маркерлар?

§ 22. Трансген ҳайвонлар

1. *Сут эмизувчилар ҳужайраларига бегона генларни киритиш бўйича стратегия*
2. *Трансген сичқонлар: методология*
3. *Ретровирус векторларидан фойдаланиш*
4. *ДНК микроинъекцияси усули*
5. *Модификацияланган эмбрионал ўзак ҳужайралардан фойдаланиш*
6. *Ядрони кўчириш ёрдамида клонлаш*

Муайян сифатларга эга ҳайвонлар ва паррандаларнинг мавжуд бўлганларини яхшилар ва янги шакллари (янада кўпроқ сут берадиган сизирлар, сифатли жунли қўйлар, юқори сертухумли товуқлар ва бошқ) етиштириш учун чора-тадбирлар комплекси олиб борилмоқда. Таъкидлаш лозимки, ҳайвонларда насл сони ўсимликларга нисбатан кўп марта кам. Шу сабабдан ҳар бир организм ўз қийматига эга, оммавий танлашнинг эса имкони йўқ. Шундай

бўлсада, анъанавий селекция – гибридизация ва танлаш ҳозирги вақтгача чорва моллари ва паррандаларни янги зотларини яратиришнинг муваффақиятли усули ҳисобланади.

Бироқ мазкур усул билан янги етиштирилган зотларни янада яхшилаш муайян қийинчиликлар билан боғлиқ. Ҳақиқатдан ҳам, янги “қимматли” генга эга қатор “зарарли” генларга ҳам эга бўлиши мумкин. Селекциянинг оралиқ босқичларидан бири маълум белгиларнинг гомозиготали ҳолатини олиш мақсадида ўтказиладиган яқин қариндошли чатиштиришдан иборат. У организм яшовчанлигининг пасайишига олиб келиши мумкин. Шунинг эса тутиш лозимки, ҳайвонлар орасида селекция ишларини олиб бориш учун кўп вақт талаб этилади (организм жинсий етукликка эришмагунча), чунки юксак ҳайвонлар организми ривожланиши узоқ вақт давом этади.

Ген муҳандислиги қаторларни яхшилашнинг дастлабки фойдали белгилари сақлаб қолинадиган мутлоқ янги стратегиясини таклиф этади. Агар кўп ҳужайрали организмга ДНК киритилса, у ҳолда трансформациянинг натижаси фақат янги ген ёки генларга эга бўлган кам сонли ҳужайралар хусусиятларининг ўзгариши бўлади. Шундай экан, бутун бир организм хусусиятларини ўзгартириш учун авлодларга янги хусусиятларни ўтказадиган жинсий ҳужайралар геномини ўзгартириш зарур.

Қўлланиладиган стратегия қуйидагилардан иборат.

- Клонланган ген уруғлантирилган тухум ҳужайра ядросига киритилади.
- Инокуляцияланган уруғлантирилган тухум ҳужайралар реципиент урғочи жинсли зотга имплантацияланади (чунки сут эмизувчилар эмбрионнинг ривожланишини бошқа шароитларда муваффақиятли яқунлашнинг имкони йўқ).
- Имплантацияланган тухум ҳужайралардан ривожланган, барча ҳужайраларида клонланган генга эга бўлган насллар танлаб олинади.
- Эмбрионлик қатори ҳужайраларида клонланган генга эга бўлган ҳайвонлар чатиштирилади ва янги генетик қатор олинади.

Ҳайвонларни уруғлантирилган тухум ҳужайрага генларни киритиш йўли билан генетик ўзгартириш ғояси амалиётда 1980-йилларда амалга оширилган. Илм-фаннинг кўпгина бошқа янги соҳаларидаги каби, олимлар ўртасида ахборот алмашилишини

соддалаштириш учун бир қатор янги атамалар жорий этилди. Демак, генотиби бегона (экзоген) ДНК киритиш йўли билан ўзгартирилган ҳайвон трансгенли, киритилган ДНК – трансген, бутун жараён эса – трансген технология, ёки трансгеноз деб номланди.

Кўп хужайрали организмларни уларга трансгенлар киритиш йўли билан генетик модификациялаш бўйича тажрибалар кўп вақт талаб этади. Шунга қарамай, трансгеноздан сут эмизувчилар генларини экспрессиялашнинг молекуляр асосларини тадқиқ қилиш ва уларни ривожланиши, инсонлар касалликларини ўрганиш имконини берадиган модель тизимларини яратиш, шунингдек, сут билан тиббиёт учун муҳим бўлган оқсилларни олиш мақсадида сут безлари хужайраларини генетик модификациялаш учун фойдаланилади.

Сутдан шунинг учун фойдаланиладики, у ҳайвон организмида кўп миқдорда ҳосил бўлади ва уни ҳайвонга зарар етказмасдан эҳтиёжга қараб соғиб олиш мумкин. Сут безида ишлаб чиқариладиган ва сутга чиқариладиган янги оқсил бунда трансген ҳайвон организмига ҳеч қандай нозўя таъсир кўрсатмаслиги ва посттрансляцион ўзгаришларга дучор бўлмаслиги керак. Бундан ташқари, таркибида бошқа оқсиллар ҳам бўлган сутдан янги оқсилни ажратиш кўп меҳнат талаб қиладиган бўлмаслиги керак.

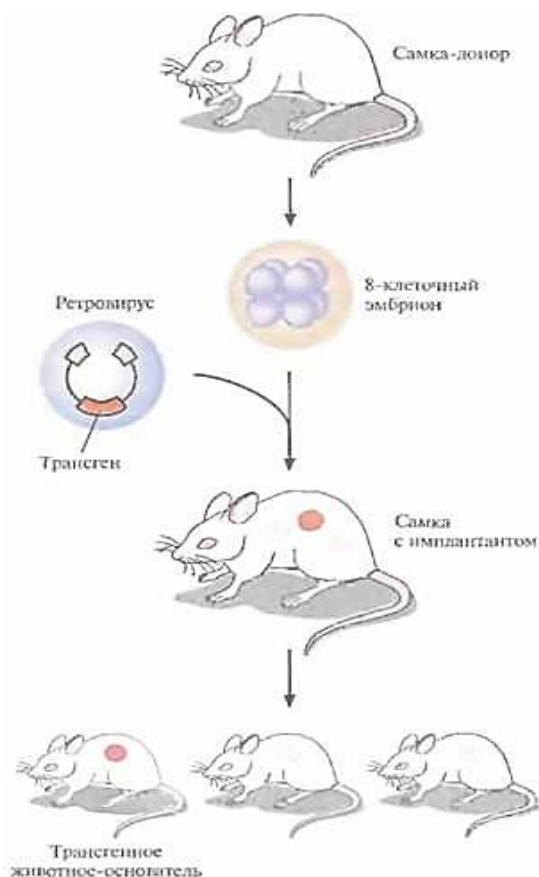
Трансген сичқонлар: методология

Сут эмизувчилар, пашшалар ва баъзи ўсимликларнинг эмбрионал хужайраларига генларни киритиш усуллари ишлаб чиқилган. Амфибияларнинг анча йирик тухум хужайралари билан ишлашдан генетик жиҳатдан энг ўрганилган сут эмизувчи бўлган сичқонларнинг тухум хужайралари ва эмбрионларини ўрганишга ўтилди. Трансген технологиялар лаборатор сичқонларда ишлаб чиқилди ва такомиллаштирилди. 1980 йилларнинг бошидан бошлаб сичқонларнинг турли хил қаторларига юзлаб генлар киритилди. Ушбу тадқиқотлар генларни бошқариш ва ўсмалар ривожланиш механизмлари, иммунологик спецификлик табиати, ўсиш ва ривожланишнинг молекуляр генетикаси, бошқа фундаментал биологик жараёнларни аниқлаш имконини берди. Трансген сичқонлар дори воситаларини кенг кўламда синтезлаш имкониятини тадқиқ қилишга, шунингдек, инсоннинг турли хил касалликларини

моделлаштириш имконини берадиган трансген қаторлар яратишга ўз хиссаларини қўшдилар. Сичқонларга бегона ДНКни киритиш турли хил усуллар билан амалга оширилади: 1) урғочи-реципиентга эмбрионни имплантациялашдан олдин эмбрион ҳужайралари ривожланишининг эрта босқичларида инфекция юктирувчи ретровирус векторлари ёрдамида; 2) катталаштирилган спермий ядросига (эркак пронуклеуси) уруғлантирилган тухум ҳужайра микроинъекцияси билан; 3) ривожланишнинг эрта босқичларида гени ўзгартирилган эмбрионал ўзак ҳужайраларни олдиндан имплантацияланган эмбрионга киритиш билан.

Ретровирус векторларидан фойдаланиш

Ретровирус векторларидан фойдаланишга асосланган усулнинг трансгенознинг бошқа усулларидан устунлиги унинг самарадорлигидан иборат (расм. 22.1). Бироқ бу ҳолатда киритма ўлчами 8 т.н.ж. билан чекланади, бунинг оқибатида трансген унинг экспрессияланиши учун зарур бўлган ёнидаги регулятор кетма-кетликлардан маҳрум бўлиб қолиши мумкин.

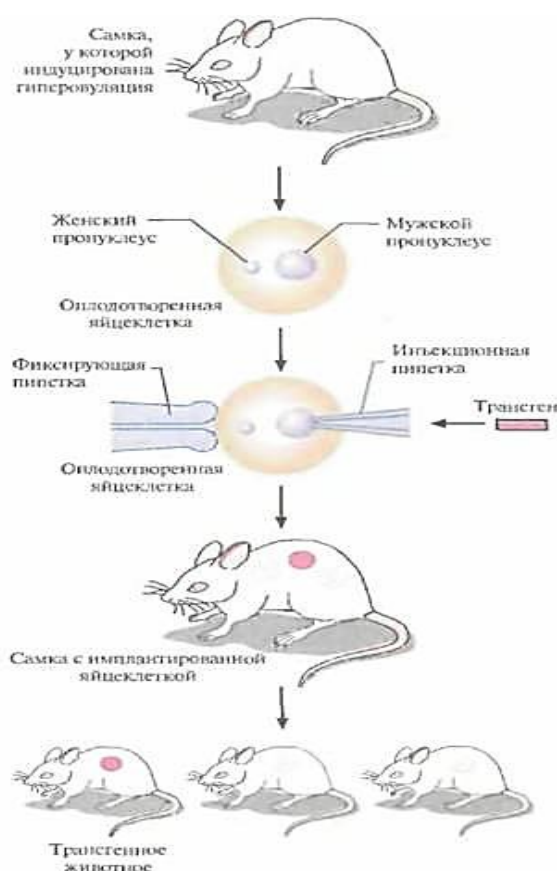


Расм. 22.1. Ретровирус векторларидан фойдаланиб трансген сичқонлар қаторини олиш. Одатда 8 ҳужайра босқичида турган эмбрионга трансген ташувчи рекомбинант ретровирус юктирилади. Эмбрион имплантация қилинган урғочилар (“суррогат” оналар) трансген авлодни дунёга келтирадилар. Эмбрионлик қатори ҳужайраларида трансген ташувчи сичқон болаларини идентификациялаш учун бир қатор читиштиришлар ўтказилади.

Бироқ ретровирусли векторлар усули битта катта камчиликка эга. Ушбу векторлар репликацияланмайдиган қилиб яратилган бўлса ҳам, векторли ДНКнинг катта миқдорини олиш учун зарур бўлган ретровирус (вирус-ёрдамчи) штамми геноми трансген тушган ядрога тушиши мумкин. Кўрилган барча чораларга қарамай, ретровирус-ёрдамчилар трансген ҳайвон организмда репликацияланишлари мумкин, лекин агар бу ҳайвонларнинг овқатга ёки тижорат маҳсулоти олиш учун восита сифатида ишлатилиши мўлжалланаётган бўлса бунга умуман йўл қўйиб бўлмайди. Ва модомики, трансгенознинг альтернатив усуллари мавжуд экан, тижорат қийматига эга трансген ҳайвонлар яратишда ретровирус векторларидан кам фойдаланилади.

ДНК микроинъекцияси усули

Ҳозирги вақтда трансген сичқонлар яратиш учун кўпинча ДНК микроинъекциялари усулидан фойдаланилади. Усул қуйидагилардан иборат (расм. 22.2).



Расм. 22.2. Микроинъекциялар усули билан трансген сичқонлар қаторларини олиш. Тухум ҳужайралар гиперовуляция индукция қилинган ва эркеклари билан жуфтлаштирилган урғочи-донорлардан тухум ҳужайра ажратиб олинади. Трансген конструкция уруғлантирилган тухум ҳужайранинг эркек протоплазмга инъекция қилинади. Тухум ҳужайралар трансген қаторлар асосчиси – трансген сичқонларни дунёга келтирадиган “суррогат” онага имплантация қилинади. (Глик ва Пастернак бўйича)

1. Урғочи-донорларда бегона ДНК инъекция қилинадиган тухум хужайралар сонини гиперовуляцияни стимуллаш йўли билан ошириш. Гиперовуляция натижасида 5-10 танинг ўрнига тахминан 35 та тухум хужайра ҳосил бўлади.

2. Эркаклар билан гиперовуляцияли урғочиларни чатиштириш ва уларни жонсизлантириш. Тухум йўлларида уруғланган тухум хужайраларни чиқариш.

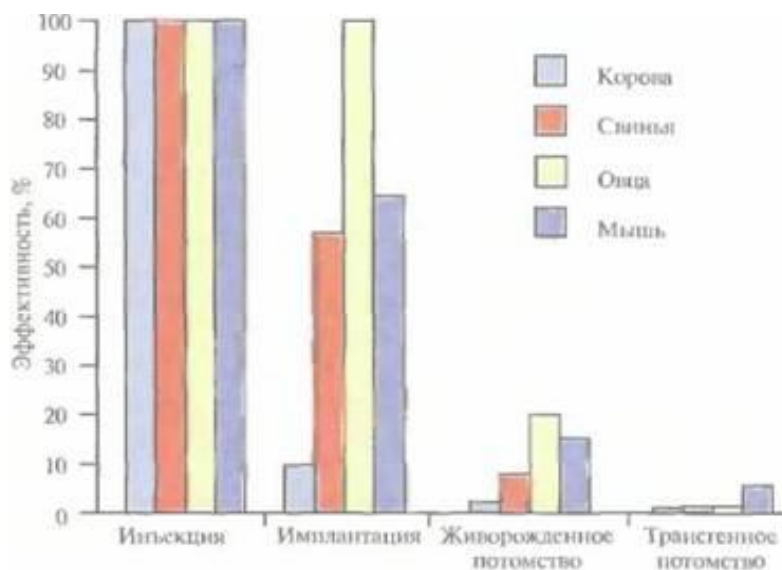
3. Уруғланган тухум хужайраларга ДНКни микроинъекция қилиш – одатда ажралган заҳоти амалга оширилади. Кўпинча киритиладиган трансген конструкция чизикли шаклда бўлади ва прокариотик векторли кетма-кетликларга эга бўлмайди.

Клонланган генларнинг микроинъекцияси янги уруғлантирилган сичқон тухум хужайрасининг бир ёки ҳар иккала пронуклеусига ўтказилади. Кўпинча сперматозоид томонидан киритилган пронуклеус танланади, чунки унинг ўлчамлари каттароқ. Инъекциядан кейин тухум хужайра дарҳол қабул қилувчи онанинг тухум йўлларида жойлаштирилади, ёки культурада бластоцистагача ривожланишига имкон берилади, шундан кейин бачадонга жойлаштирилади.

Генни сперматозоидларга киритиш ва кейин улар билан уруғлантиришни амалга ошириш мумкин. Интерферон ва инсон инсулини генлари, қуённинг β-глобин гени, оддий герпес вирусининг тимидинкиназаси гени ва сичқон лейкомияси вирусининг кДНКси шу тарзда инъекцияланган. Бир инъекцияда киритилган молекулалар сони 100 дан 300 000 гача, уларнинг ўлчами эса 5 дан 50 кб гача ўзгариб туради. Одатда 10-30% тухум хужайра омон қолади, трансформацияланган тухум хужайралардан туғилган сичқонлар улуши эса бир нечтадан 40% гача ўзгариб туради. Шундай қилиб, ҳақиқий самарадорлик 10%ни ташкил қилади. Тажрибали экспериментатор бир кунда бир неча юз тухум хужайрани инокуляциялаши мумкин. Лекин у ҳам энг яхши ҳолатда инокуляцияланган тухум хужайраларнинг атиги 5%идан яшовчан трансген ҳайвонларни олиши мумкин (расм. 22.3).

Расм. 22.3. Трансгенознинг

микроинъекциядан кейин умумий самарадорлиги. Сигир, чўчка, кўй ва сичқоннинг барча уруғлантирилган тухум хужайралари (100%) трансген билан инокуляцияланган, бироқ муваффақиятли имплантация ва наслнинг пайдо бўлиши кам учрайдиган ҳодиса бўлди: ишлов берилган хужайраларнинг 5% дан кам қисми насл берди. (Глик ва Пастернак бўйича)



Трансген ҳайвонларни идентификациялаш учун ДНКни сичқон думнинг кичик бир бўлагидан ажратиб олинади ва Саузерн бўйича блот-гибридизация ёрдамида ПЗР усули билан трансген борлигини аниқлаш учун тестдан ўтказилади. Трансген ҳайвоннинг эмбрион қатори хужайраларида эканлигини аниқлаш учун трансген сичқон бошқа сичқон билан чатиштирилади. Кейинчалик тоза (гомозиготали) трансген қатор олиш учун наслларни чатиштириш мумкин.

Шундай қилиб, 1000 имплантацияланган уруғлантирилган тухум хужайралардан 30 дан 50 тагача трансген сичқон болалари ривожланади. Бундан ташқари, киритилган ДНК геномнинг исталган жойида интеграциялиши мумкин, ва кўпинча унинг кўпгина нусхалари битта сайтга киритилади. Ва ниҳоят, керакли хусусиятларга барча трансген сичқонлар эга бўлавермайди. Баъзи бир зотлар организмида трансген интеграция сайтининг мос келмайдиган муҳити туфайли экспрессияланмаслиги мумкин, бошқаларининг организмида эса бегона ген нусхаларининг сони жуда кўп бўлиши мумкин, бу оқсилнинг кўп ишлаб чиқарилишига нормал физиологик жараёнларнинг бузилишига олиб келиши мумкин. Ва шуларнинг барчасига қарамай, микроинъекция усулидан функционал трансгенлар ташувчи сичқонлар қаторини олиш учун етарлича кўп фойдаланилади.

Трансгенозда кутилмаган муаммолар пайдо бўлиши мумкин. Масалан, ҳайвонларнинг генетик трансформацияси бўйича биринчи ишларнинг баъзи бирлари ўсиш гормони генларини киритиш йўли билан амалга оширилган. Каламуш ўсиш гормонини сичқонларга ўтказилиши сичқонлар ўсишини 2 баробар оширган. Буқа ўсиш гормони генларининг қуёнларга трансгенози бўйича тажрибалар ҳам муваффақият қозонди. Йирик қорамолни модификациялаш бўйича аналогик тажрибалар ўсишни атиги 10-20%га ошишига олиб келди. Чамаси, бу сичқонларда реакция меъёрининг кенг сақланиши, ва гормонлар миқдорини оширувчи генларни киритилиши генотипни максимал даражада тўлиқ амалга ошишига мажбур қилиши билан боғлиқ. Чорва молларида йўналтирилган селекция натижасида организмлар реакция меъёрининг юқори чегарасида ишлайди, шунинг учун кутилган самарага эришилмади.

Модификацияланган эмбрионал ўзак хужайралардан фойдаланиш

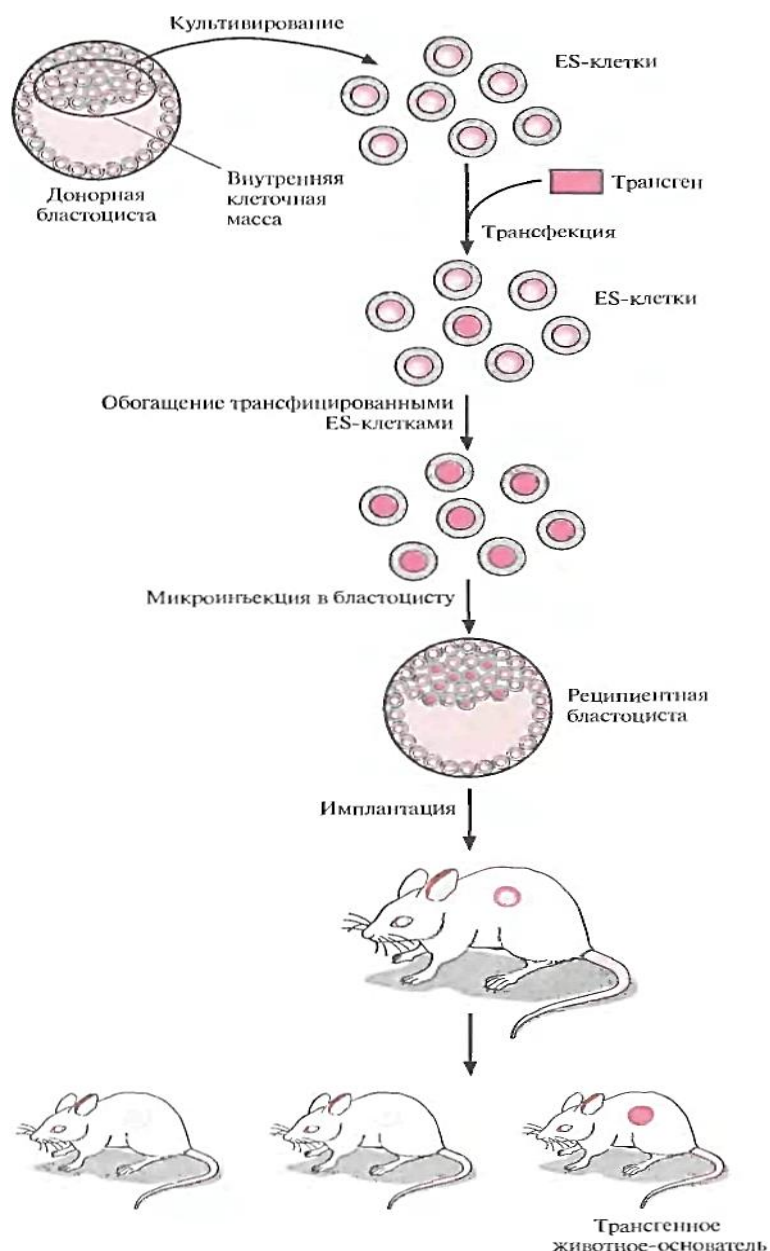
Сичқон эмбрионларидан бластоциста босқичида ажратиб олинган хужайралар бошқа эмбрионга бластоциста босқичида киритилганда културада ҳар қандай турдаги хужайраларга, жумладан эмбрион қатори хужайраларига дифференциацияланиш хусусиятини сақлаб қолган ҳолда пролиферацияланиши мумкин. Бундай хужайралар плюрипотент эмбрионал **ўзак хужайралари** деб номланади (ES). 1999 йилда “Science” журнали эмбрионал ўзак хужайралари кашф этилишини биологияда аҳамияти бўйича ДНК қўш спирали ва “Инсон геноми” дастурини декодлашдан кейин учинчи ўриндаги воқеа деб эътироф этди. Ўзак хужайралари мисли кўрилмаган имкониятларга бой: зарарланган аъзо ва тўқималар регенерациясидан тортиб дори-дармонлар билан даволаб бўлмайдиган касалликларни даволашгача. Энг универсал ES - ўзак хужайралар асосий тавсифи қуйидагилардан иборат бўлганлар ҳисобланади: 1. Тотипотентлик – организмнинг ҳар қандай тўқимасини ҳосил қилиш хусусияти. 2. Хоуминг – организмга киритилганда зарарланган соҳани топиш ва йўқотилган функцияни бажариб, ўша жойда фиксацияланиш. 3. Теломераза фаоллиги. 4. Цитоплазмада эмбрионнинг эрта ривожланиши учун жавоб берадиган барча генларнинг мРНКси мавжуд бўлиши.

ES-ҳужайраларни културада ген муҳандислиги усуллари билан уларнинг плюрипотентлигини бузмаган ҳолда осон модификациялаш мумкин. Масалан, уларнинг геномидаги унчалик аҳамияти йўқ геннинг муайян сайтига функционал трансгенни жойлаштириш мумкин. Кейин ўзгарган ҳужайраларни танлаб, уларни кўпайтириб ўстириш ва трансген ҳайвонлар олиш учун фойдаланиш мумкин (расм. 22.4). Бу микроинъекция ва ретровирус векторлари тизимлари учун хос бўлган тасодифий киритишдан қутулиш имконини беради.

Хромосома сайтида интеграцияланган векторлари бўлган ҳужайралар сонини кўпайтириш учун позитив-негатив селекция деб номланган усулдан фойдаланилади. Ушбу стратегия керакли сайтда векторли ДНК ташувчи ҳужайраларнинг позитив селекцияси ва тасодифий сайтда интеграцияланган векторли ДНКли ҳужайраларнинг негатив селекциясидан иборат.

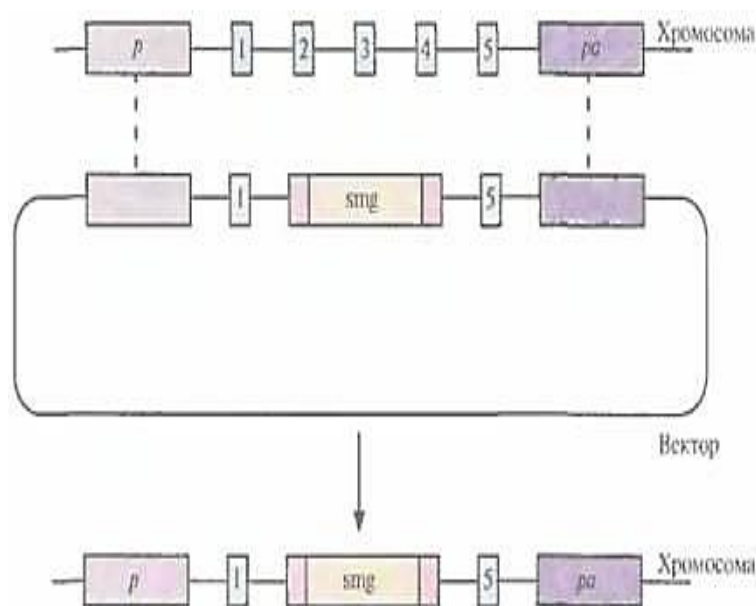
Бегона ДНК интеграцияси ривожланиш жараёни ёки ҳужайра функцияларига таъсир кўрсатмаслиги учун сайт-нишон геномли ДНКнинг муҳим оксилларини кодламайдиган соҳасида жойлашиши лозим. Бундан ташқари, трансгенни киритиш геномнинг мос келувчи соҳаси трансляциясини блокламаслиги жуда муҳим. Шунга ўхшаш сайтларни қидириш ишлари узлуксиз олиб борилмоқда.

Расм. 22.4. Эмбрион ўзак (ES) хужайраларини генетик модификациялаш ёрдамида трансген сичқонлар олиш. ES-хужайралар сичқон бластоцистаси ички хужайра массасидан олинади. Улар трансген ташувчи вектор билан трансфекцияланади ва ўстирилади, трансфекцияланган хужайралар позитив-негатив селекция ёки ПЗР усули билан идентификацияланади. Трансфекцияланган хужайралар популяцияси яна ўстирилади ва бластоцисталарга киритилади, улар кейин “суррогат” она бачадонига имплантация қилинади. Эмбрион қатори хужайраларида трансген ташувчи хайвонларни чатиштириб трансген сичқонлар қаторини олиш мумкин. (Глик ва Пастернак бўйича)



Геномига керакли сайтда трансген киритилган ES-хужайраларни ўстириш ва бластоциста босқичида эмбрионга киритиш, кейин эса бундай эмбрионларни бластоциста босқичида сохта ҳомиладор “суррогат” оналар бачадонига имплантациялаш мумкин. Эмбрион қатори хужайралари ҳосил бўлишида иштирок этган генетик жихатдан модификацияланган ES-хужайраларига эга сичқон болалари трансген қаторларни келтириб чиқаришлари мумкин. Бунинг учун уларни айнан шу қаторнинг зотлари билан чатиштириб, кейин эса уларни трансген авлодларини ўзаро чатиштириш керак. Натижада трансген бўйича гомозиготали трансген сичқонлар ҳосил бўлади.

ES-хужайраларнинг специфик хромосома сайтига нафақат қандайдир янги функцияни кодловчи трансгенни киритиш, балки мазкур сайтни специфик кетма-кетликнинг (одатда селектив маркер геннинг) уни кодловчи соҳасига интеграцияси орқали мақсадли бузиш мумкин (расм. 22.5). Генни мақсадли бузиш (“нокаут”) вазифаларидан бири мазкур жараённинг организм ривожланишига таъсири ва унда кечаётган физиологик жараёнларни ўрганишдан иборат. Бундан ташқари, муайян генида бузилиш бўлган трансген ҳайвонлардан инсонларда учрайдиган касалликларни молекуляр даражада ўрганишда модель сифатида фойдаланишга умид бор.

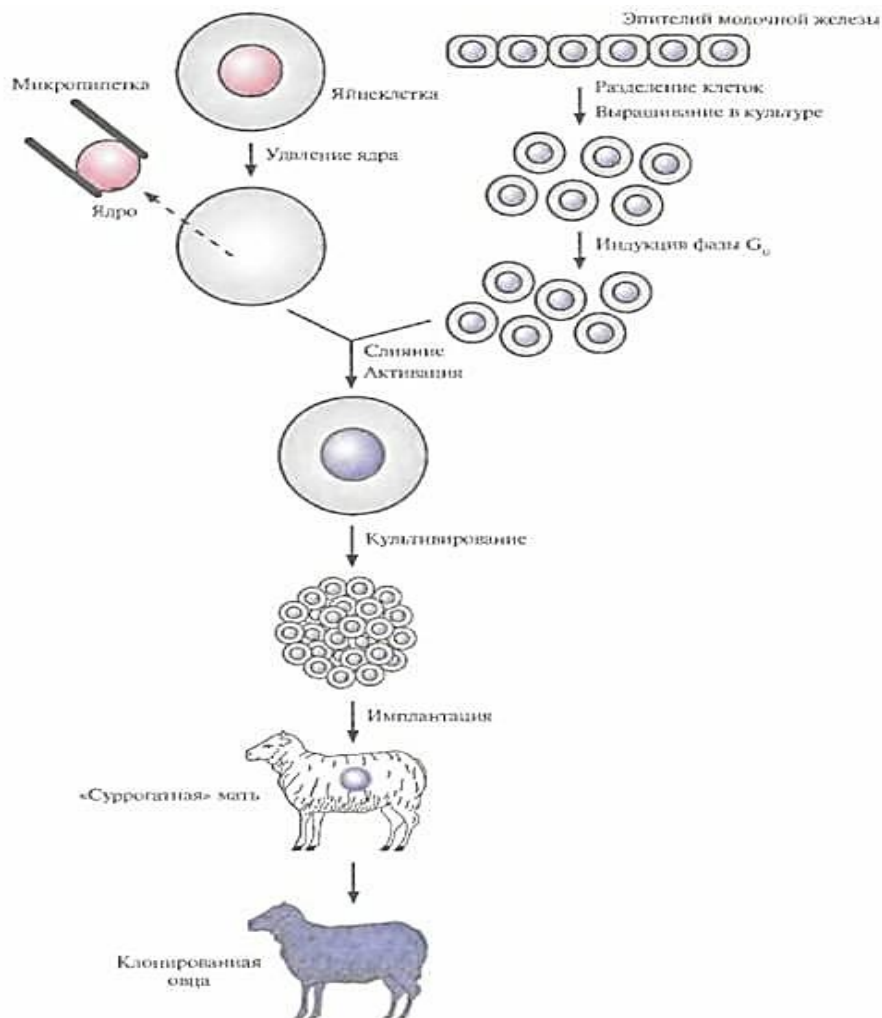


Расм. 22.5. Йўналтирилган гомологик рекомбинация ёрдамида генни “нокаут” қилиш. Вектор селектив маркер ген (smg) ҳамда ген-нишоннинг мувофиқ соҳаларига гомологик бўлган фланкирловчи кетма-кетликларни ташийд. Ген-нишонда бешта экзон мавжуд (1-5). Гомологик рекомбинация натижасида (штрихли чизиқлар) ген-нишон узилади (“нокаут” бўлади). (Глик ва Пастернак бўйича)

Ядрони кўчириш ёрдамида клонлаш

Агар тест қилинаётган ҳужайра ядросини ядроси олиб ташланган тухум ҳужайрага ўтказилса ва кейин ўша тухум ҳужайранинг ривожланиш ва яшовчан насл ҳосил қилиш хусусиятлари тадқиқ қилинса плюрипотентликни аниқлаш мумкин. Бир нечта лабораторияларда эмбрион ҳужайралари қаторларининг, ҳомила ва етук организм ҳужайралари плюрипотентлиги ҳар хил

муваффақият билан тадқиқ қилинди. Эмбрион ҳужайралари ядролари – паст самарадорлик билан бўлса ҳам – ривожланишни таъминлаши кўрсатилди. Масалан, йирик қорамолнинг узок бўлмаган вақт давомида ўстирилган эмбрион ҳужайралари ядросини кўчириб, яшовчан организмлар олинди. Ҳаммага таниқли Долли номли қўй етилган ҳайвон сут бези (елини) ҳужайраси ядросини кўчириш ёрдамида клонланган (расм. 22.6).



Расм. 22.6. Ядрони кўчириш усули билан қўйни клонлаш. Тухум ҳужайра ядроси микропипетка ёрдамида олиб ташланади. Етилган ҳайвон сут безининг эпителиал ҳужайралари ўстирилади ва уларнинг G₀ фазасига ўтишига туртки берилади. G₀-фазадаги ҳужайралар ва ядроси олиб ташланган ҳужайраларни бирлаштириш амалга оширилади, ва тикланган тухум ҳужайралар культурада ёки лигатура қўйилган тухум йўлида эмбриогенезнинг эрта босқичларигача ўстирилади, кейин эса кейинги ривожланиши кечадиган “суррогат” она бачадонига жойлаштирилади. Уилмут ва бошқалар (Wilmut et al., 1997) томонидан тавсифланган тажрибада ядроси олиб ташланган 277 тухум ҳужайраларини сут безининг G₀-фазадаги ҳужайралари билан бирлаштирилган, 29 эмбриондан фақат биттаси яшовчан ҳомилагача ривожланган. (Глик ва Пастернак бўйича)

Шу тарзда дифференциалланган етук хужайра ядросининг плюрипотентлилиги тасдиқланган. Шундай бўлса ҳам, аслида донор ядроси организм-донор сут беги эпителийсида мавжуд бўлган дифференциалланмаган хужайрадан олинганлигини инкор қилиб бўлмайди.

Доллини дифференциалланган хужайрадан ва бошқа учта қўйни эмбрион хужайралари ядросидан клонлашни дам олиш босқичда (G_0) бўлган хужайралар ядросини қўчириш, ва эҳтимол, ушбу жонзотнинг эмбриогенез хусусиятлари туфайли амалга оширишга муваффақ бўлинди. Гап шундаки, қўй зиготасининг бир неча сутка давом этадиган дастлабки учта бўлиниши давомида фақат ДНК репликацияси содир бўлади, генлардан бирортаси экспрессияланмайди. Эҳтимол, бу вақт давомида киритилган ДНК хужайра учун специфик бўлган регулятор оксиллардан ҳалос бўлади, эмбрионал ривожланишнинг мувофиқ генлари тухум хужайра цитоплазмасидаги инициатор эмбрионал оксил омиллари билан боғланади.

Трансген ҳайвонларни ядролар қўчириш усули ёрдамида ҳақиқатга айланиши учун ҳал қилиниши керак бўлган асосий муаммо – бу хужайраларнинг узлуксиз културада плюрипотентлилигини сақлашдан иборат. Агар бунга муваффақ бўлинса, у ҳолда бундай хужайраларни генетик жиҳатдан ўзгартириш ва трансген организмларни яратиш деярли оддий усул бўлиб қолади. Бироқ эмбриогенез ва транскрипция инициациясининг эрта босқичларида турларнинг жараён давомийлигидаги фарқлари натижасида бу даврда қўйлардан ташқари бошқа бирор-бир уй ҳайвонларида агар донор ядроси ҳам тухум хужайра бўлган босқичда бўлса ядрони қўчиришни амалга оширишга муваффақ бўлиниши ёки бўлинмаслиги аниқ эмас.

Моноклонал антитаналар

Ҳайвонлар баъзи хужайраларини етиштириш технологияси шунчалик яхши ишлаб чиқилганки, ундан ишлаб чиқариш мақсадида турли маҳсулотлар олишда фойдаланиш мумкин. Улардан тиббиёт препаратлари сифатида фойдаланилади.

Гибридома технологиясининг муҳим ютуқларидан бири моноклонал антитаналарни олиш усулини ишлаб чиқишдан иборат. Антигенни организмга киритишда унинг ҳар хил детерминантларига

йўналтирилган турли хил антитаналарнинг катта оиласи пайдо бўлади. Бироқ, баъзан антигеннинг фақат битта детерминантига специфик бўлган ва айнан ўша тавсифларга эга антитаналарнинг муайян тури талаб этилади. Моноклонал антитаналар – бу қатъий муайян спецификликка эга, ҳужайралар битта клонининг маҳсули бўлган антитаналар. Моноклонал антитаналар спецификлиги каби, физик-кимёвий хоссалари бўйича ҳам гомогендир. Моноклонал антитана антиген молекуласида фақат битта антиген детерминанти билан боғланади. Табиатда ҳақиқий моноклонал жавоб деярли кузатилмайди. 1984 йилда Нобель мукофоти соҳиблари бўлган Георг Келер ва Цезарь Мильштейнлар ишлари туфайли моноклонал антитаналар ишлаб чиқаришга имкон пайдо бўлди.

Г. Келлер ва Ц. Мильштейн лимфоид ўсма (миелома) ва нормал лимфоцитдан гибрид ҳужайралар олишга эришдилар. Гибрид ҳужайралар нормал лимфоцит хромосомаларининг бир қисми ва бир қисм – ўсмадан олинган хромосомаларга эга бўлдилар. Шундай қилиб, гибридома нормал ҳужайрадан антитана синтезлаш хусусиятини, ўсма ҳужайрасидан эса чексиз бўлиниш хусусиятини мерос қилиб олди. Шундай қилиб, моноклонал антитаналар олишнинг гибридома технологияси – олдиндан муайян антиген билан иммунизацияланган лимфоцит тўқималарни (кўпинча талоқнинг) чексиз бўлиниш хусусиятига эга ўсма ҳужайралари билан бирлаштиришдан иборат. Гибридомалар – лимфоид тўқима ҳужайраларининг моноклонал антитаналарни синтезловчи ўлмас клонларидир. Бир клон томонидан ишлаб чиқариладиган моноклонал антитаналар қуйидаги хусусиятларга эга:

- юқори специфик ва спецификлик фақат маълум детерминантага қаратилган;
- аллотип ва идиотип, шунингдек аффинлик ва физик-кимёвий тавсифлари бўйича айнан ўхшаш. Гибридомаларнинг барқарор культуралари чексиз кўп сонли моноклонал антитаналар ишлаб чиқариш хусусиятига эга. Ўзининг ноёб хусусиятлари туфайли моноклонал антитаналардан биология ва тиббиётнинг кўпгина долзарб вазифаларини ҳал қилишда муваффақият билан фойдаланилмоқда. Бугунги кунда ишлаб чиқарилаётган биофармацевтик препаратларнинг 20%дан ортиғи гибридома технологиясининг маҳсулотлари ҳисобланади.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Трансген сичқонлар қандай олинади?
2. Позитив-негатив селекциянинг тамойили нимадан иборат?
3. “Нокаутланган” генли сичқонлар қандай сичқонлар? Бундай сичқонлар қандай қилиб ва нима учун олинади?
4. Трансген сичқонларнинг инсон касалликларини ўрганиш учун модель тизими сифатида устунлик ва камчиликлари нималардан иборат?
5. Моноклонал антитаналар тавсифи.

§ 23. Молекуляр биотехнология соҳасидаги тадқиқотларни назорат қилиш. Биотехнологик ихтироларни патентлаш

Биотехнологик усуллар қўлланилишини назорат қилиш

Инқилобий технологиялар, шу жумладан молекуляр биотехнологияларнинг жорий этилиши ҳамisha жамоатчилик томонидан юқори эътибор билан боради. Баъзилар учун янги технологиялар – бу жамиятнинг асосларига путур етказадиган яқинлашиб келаётган муқаррар офатларнинг даракчиси. Бундай одамлар ҳар қандай янгиликда муқаррар хавф яширинган, ва ундан фақат ҳар қандай ривожланишни тўхтатиб қутулиш мумкин, деб ҳисоблайдилар. Бошқа одамлар янги технологияларга таърифга сиғмайдиган неъматлар ёғиладиган мўл-кўлчилик деб қарайдилар, ва уларнинг ривожланиш йўлидаги ҳар қандай тўсиқ жамиятни баҳоси йўқ фойдалардан маҳрум қилади, деб ҳисоблайдилар. Улар янги технология жуда ҳам “мўрт” нарса ва кутилган мевани бера олиши учун ҳимояга мухтож. Учинчи гуруҳ одамлар ораликдаги нуқтаи назардан қарайдилар. Бу гуруҳ вакиллари аслини олганда ҳеч қандай янги нарса умуман мавжуд эмас ва ҳар қандай “янги” технология – бу эскисининг ривожланиши, деб ҳисоблайдилар. Бундай одамларни назоратнинг хавфни камайтирувчи мавжуд бўлган усуллари тўлиқ қаноатлантиради, янги технологиянинг самараси эса у оёққа туриши билан муқаррар кўринади.

Модомики, молекуляр биотехнология ҳозирги жамият ҳаётининг турли тарафларига, шу жумладан қишлоқ хўжалиги ва тиббиётга таъсир кўрсатар экан, бунда юзага келадиган барча муаммолар – этик, ҳуқуқий, иқтисодий ва ижтимоий муаммоларни

ҳисобга олиш зарур. 1973 йилдаёқ рекомбинант ДНК технологияси хавфсизлиги бўйича шубҳа-гумонлар билдирилган. Олимларга ҳатто бу соҳадаги баъзи тадқиқотларга рекомбинант микроорганизмлар билан ишлашнинг расмий қоидаларини ишлаб чиқишгача мораторий ўрнатилган. Мазкур қоидаларга мувофиқ, тажрибаларни фақат лабораториядан ташқарида қўпайишга қодир бўлмаганлари билан ўтказилиши, тадқиқотчиларнинг ўзлари эса ҳар қандай хавфдан ҳимояланган бўлишлари керак эди. Қоидалар 1974-1975 йилларда очик музокаралар вақтида ва матбуотнинг жиддий эътибори остида ишлаб чиқилган, шундай бўлгач, жамоатчилик тирик организмларни генетик манипуляция қилишнинг ҳам негатив ҳам позитив оқибатлари ҳақида тўлиқ тасаввурга эга бўлди. Шунга қарамай, 1970 йилларнинг охирида рекомбинант ДНК билан ишлашнинг хавфсизлиги ҳақида ҳали ҳам шубҳа-гумонлар айтиб турилган эди. Хусусан, гени ўзгартирилган организмларнинг ташқи муҳитга тушиши уларнинг экотизимларда назоратсиз тарқалишига олиб келади деган фикр мавжуд бўлган. Бундай воқеаларнинг бусиз ҳам кичик эҳтимолини камайтирадиган қўшимча меъёрларни киритишга тўғри келди.

Одамларда генетик тажрибалар ўтказиш этикаси бўйича кенг музокаралар бўлиб ўтди. Унинг мақсади нимага мутлақо йўл қўйиб бўлмайдиган ва нима бутунлай мақбул эканлигини фарқлашдан иборат. Афсуски, молекуляр биотехнологиянинг турли хил қўлланилиши билан боғлиқ туғилган бу барча этик, ҳуқуқий ва ижтимоий саволларга бир хилда аниқ жавоб бериш мумкин эмас. Бироқ, ўйиндаги ставкалар жуда юқори, шу сабабдан муаммони батафсил таҳлил қилиш лозим.

Рекомбинант ДНК билан ўтказиладиган тажрибаларни назорат қилиш

1974 йилда рекомбинант ДНК технологиялари ёрдамида бегона ген ташувчи организмлар яратиш мумкинлиги аниқ бўлиб қолганда, олимлар, жамоатчилик ва расмий шахслар ушбу янги йўналишнинг хавфсизлиги ва уни қўллашнинг мумкин бўлган этик оқибатлари ҳақида бонг урдилар. “Худо билан ҳазиллашиш”, “ҳаёт билан манипуляция қилиш”, “ҳозирги кунгача ўтказилган илмий-тадқиқотлардан энг хавфлилари”, “инсон томонидан яратилган эволюция” каби иборалар матбуотда тўхтовсиз ёритиб борилди.

Келажакда тасодифан, балки атайлаб, ҳарбий мақсадлар учун ноёб, илгари табиатда бўлмаган эпидемиялар ва экологик ҳалокатларга сабаб бўладиган микроорганизмлар яратилиши ҳаммадан кўп хавотирга солади. Ушбу ваҳимали кутишларга жавобан бир гуруҳ молекуляр биологлар рекомбинант ДНК билан ўтказиладиган баъзи тажрибаларга, айниқса патоген микроорганизмлардан фойдаланиладиганларига мораторий ўрнатдилар.

1976 йилда Соғлиқни сақлаш Миллий институтлари (NIFU от National Institutes of Health), тиббиёт ва соғлиқни сақлаш соҳасидаги ишларга пул маблағларини ажратадиган АҚШ етакчи тадқиқот муассасаси улар томонидан пул билан таъминланадиган рекомбинант ДНК билан тажрибалар ўтказишни регламентга соладиган кўрсатма ишлаб чиқдилар. Унда лабораторияда рекомбинант ДНК билан ишлаш шартлари қатъий белгилаб қўйилди ва бегона ДНК учун хўжайин сифатида лабораториядан ташқарида кўпайиш ва ўзининг ДНКсини бошқа микроорганизмларга ўтказишга қодир бўлмаган микроорганизмлардан фойдаланиш талаби илгари сурилди. Маълум патоген организмлар билан экспериментлар учун, масалан, махсус ташкил этилган, доимий назорат остида турадиган, манфий босим ушлаб туриладиган алоҳидаланган бокслардан фойдаланиш, ва хавфи нисбатан камроқ организмлар билан ишларни юқори самарали фильтрация тизими билан жиҳозланган биноларда олиб бориш тавсия этилди. НИН кўрсатмалари ҳуқуқий статусга эга эмаслигига қарамай, рекомбинант ДНК технологияларидан фойдаланиб иш бошлаган кўпчилик компаниялар кўрсатилган барча талабларни ихтиёрий равишда бажардилар. Бундан ташқари, бошқа мамлакатлар НИН кўрсатмаларини асос учун қабул қилиб, рекомбинант ДНК билан ўтказиладиган тажрибалар учун ўз чекловларини ишлаб чиқдилар.

1980 йилга келиб бошланғич НИН кўрсатмалари асосан NIH-RAC ва НИН томонидан молиялаштирилган изланишлар давомида олинган тажрибалар маълумотлари туфайли талабларни юмшатиш фойдасига қайта кўриб чиқилди. Масалан, рекомбинант ДНК билан ишлар олиб боришда ҳаммадан кўп фойдаланилган *Escherichia coli* K-12 микроорганизми лабораториядан ташқарида кўпайиш ва узоқ вақт яшашга қодир эмаслиги аниқланди. Бундан ташқари, микробиологлар молекуляр микробиологларни ва бошқа манфаатдор шахсларни

патоген организмлар билан ишлашда қўлланиладиган хавфсизлик чоралари энг юқори стандартларга мос келиши ва янада қаттиқроқ меъёрлар талаб этилмаслигига ишонтирдилар. Ва ниҳоят, агар клонлашда фойдаланиладиган ген ўзи ажратиб олинган организмнинг патоген хусусиятларига “жавобгар” бўлмаса, патоген организм пайдо бўлиши эҳтимоли ниҳоятда кам эканлиги тан олинди. Кўпчиликнинг фикрига кўра, лаборатория кераклича жиҳозланганда ишловчи персоналнинг хавфсизлигини таъминлаш мумкин. Бироқ НН кўрсатмаларига гени ўзгартирилган организмларнинг уларни кенг қўламли етиштиришда ташқи муҳитга тасодифан тушиб қолишига йўл қўймайдиган эҳтиёт чораларини таъминлаш бўйича махсус қоидалар қўшилди.

Кўпчилик кундалик тажрибалар учун хавфсизлик чораларига талаблар юмшатиладиган кейин рекомбинант ДНК технологияси тезлик билан ривожлана бошлади. Ишлаб чиқилган НН-РАС ва НН қоидалар илгари мавжуд бўлган хавотирни қисман йўққа чиқарди. Бироқ икки муҳим муаммо қолди. Биринчидан, ишлаб чиқариш ва таркибида гени ўзгартирилган организмлар бўлган ёки улардан фойдаланиб ишлаб чиқарилган маҳсулотларни истеъмол қилишни қандай қилиб назорат қилиш мумкин? Иккинчидан, ГМО атроф-муҳитга атайлаб чиқариб юборилишини қандай қилиб аниқлаш мумкин?

Назорат қилувчи идоралар рекомбинант ДНК технологияси ёрдамида олинган дори препаратлари анъанавий усуллар билан олинган препаратларга ўхшаш, деган хулосага келганларида мумкин бўлган учинчи муаммони ҳал қилишга муваффақ бўлинди. Кўпчилик мамлакатларда препаратни олиш усулидан (анъанавий технология ёки рекомбинант ДНК технологияси) қатъий назар ишлаб чиқарувчилар каби истеъмолчиларни ҳам хавфсизлигини сақлаш учун дори препаратларидан тижорат мақсадида фойдаланишни регламентлайдиган нормалар етарли деган аниқ кўрсатма мавжуд. Хавфсизлик ва самарадорликка фақат дори препаратининг ўзигина текширилиши керак деган қоида рекомбинант ДНК технологияси ёрдамида ишлаб чиқарилган дори воситалари, вакциналар, диагностика тизимлари ва бошқа маҳсулотларнинг маъқулланишига олиб келди.

Озиқ-овқат маҳсулотлари ва овқат қўшимчаларини ишлаб чиқариш ҳамда истеъмол қилишни назорат қилиш

АҚШда озиқ-овқат маҳсулотлари, дори ва тиббиёт воситаларини ишлаб чиқариш ва бозорга келиб тушишини назорат қилиш озиқ-овқат маҳсулотлари, медикаментлар ва косметик воситалар сифатини назорат қилиш бошқармаси томонидан амалга оширилади (FDA, ингл. Food and Drug Administration). Озиқ-овқат маҳсулотлари ва озиқ-овқат таркибий қисмлари, шу жумладан маҳсулотларга специфик таъм ва ҳид берадиган қўшимчаларнинг хавфсизлиги уларни савдога қўйилишига рухсат берадиган ва бундай маҳсулотларни овқатга ишлатиш мумкинлигини тасдиқлайдиган лицензия олишдан олдин қафолатланиши керак. FDA ўз фаолиятида янги озиқ-овқат маҳсулотлари овқат компонентларини сертификациялашнинг кўп марта апробацияланган, лекин унчалик тўлиқ бўлмаган даражада қонунлаштирилган тизимига таянади. Унинг рақиблари бу ташкилот саноат корхоналарининг манфаатларини ҳимоя қилишга ҳаракат қилади ва ўзининг хусусий меъёрий далолатномаларини ҳаракатга келтиришга унчалик ҳам шошилмайди, дея таъкидлайдилар. Манфаатларини Озиқ-овқат биотехнологияси бўйича халқаро кенгаш тақдим қиладиган FDA каби озиқ-овқат маҳсулотларини ишлаб чиқарувчилар ҳам рекомбинант ДНК технологияси ёрдамида олинадиган озиқ-овқат маҳсулотлари ва овқат компонентларини ишлаб чиқаришни тартибга соладиган янги меъёрий далолатномаларни ишлаб чиқишга ҳеч қандай эҳтиёж йўқ, деган нуқтаи назарни ҳимоя қиладилар (нимададир жуда ишончли), чунки ҳар қандай лицензияланмаган озиқ-овқат маҳсулоти ёки овқат ингредиенти (ишлаб чиқариш усулидан қатъий назар) шундай ҳам токсиклиги, тозаллиги ва аллергиялигига текширувдан ўтиши керак. Агар генетик манипуляциялар (масалан, селекция жараёни ёки рекомбинант ДНК технологиясининг ўзи билан боғлиқ бўлган) натижасида озиқ-овқат маҳсулотлари ёки овқат ингредиентларининг FDA тасдиқлаган таркиби ўзгарадиган бўлса, у ҳолда ишлаб чиқарувчи компания бундай маҳсулотларни текшириб, уларни янги маҳсулот анъанавийсидан фарқ қилиши ҳақида хабар берувчи махсус белги билан таъминланиши керак.

Биотехнологик ихтироларни патентлаш

Биотехнологиянинг асосий вазифаси – бу турли хил тижорат маҳсулотларини ишлаб чиқариш. Бироқ, ҳеч бир компания агар унинг ишланмалари рақобатчилар томонидан ишлатилишидан ишончли ҳимояланганлигига ишонмаса, хавф даражаси юқори бўлган узоқ муддатли лойиҳаларни реализация қилмайди. Давлат ўз томонидан саноатни ривожлантиришга қаратилган инновацияларни рағбатлантиришга ҳаракат қилади. Иккала томон манфаатларини бирлаштирадиган стратегия шундан иборатки, давлат ихтирочиларга янги маҳсулотлар ёки уларни ишлаб чиқариш усулларига алоҳида ҳуқуқлар беради. Бундай рухсат этилган имтиёзлар интеллектуал мулк ҳуқуқи деб номланади ва тижорат сирлари, муаллифлик ишланмалари, савдо белгилари ва ихтироларни ўз ичига олади. Тижорат сирлари – бу маҳсулотларнинг компания махфий сақлашни истайдиган ва учинчи шахслар томонидан фойдаланилишдан ҳимоя қиладиган ишлаб чиқариш усулининг специфик хусусиятлари ва маҳсулот таркиби ҳақидаги конфиденциал ахборот. Муаллифлик ишланмалари, хусусан эълон қилинган ишларидан муаллифлик ҳуқуқи институти томонидан рухсатсиз ва ноқонуний фойдаланилишдан ҳимояланади. Савдо белгилари – бу маълум бир компания томонидан ишлаб чиқилган маълум маҳсулот ёки усулни идентификациялашга қаратилган сўзлар ёки белгилар. Масалан, Gigapack савдо белгиси *in vitro* тажрибалари учун мўлжалланган бактериофаг λ нинг қадокловчи экстрактини ўз ичига олган ва Stratagene биотехнологик компанияси томонидан ишлаб чиқариладиган тўпламга тегишли. Бошқа фирмалар шунга ўхшаш тўпламларни ўзларининг хусусий савдо белгилари остида сотадилар.

Биотехнология учун интеллектуал мулкнинг энг муҳим шакли – бу ихтиро. Ихтиро патент эгасининг ихтиродан тижорат мақсадида алоҳида фойдаланиш ҳуқуқини таъминлайдиган қонуний ҳужжат ҳисобланган патент билан қўриқланади. Бундан ташқари, патент билан ҳимояланган ихтиро формуласига таяниб, патент эгаси ўзи яратган ихтиро асосида олиниши мумкин бўлган бошқа маҳсулотларни ишлаб чиқиш ҳуқуқига эга бўлади, айтилиши вақтда рақобатчилар ихтиродан фойдаланиш учун ҳуқуқни сотиб олишга мажбурдирлар. Бошқа томондан, патент – ихтирони батафсил баён

қилувчи ҳужжат ва шу билан учинчи шахсларни янгиликнинг моҳияти ва унинг чекловлари ҳақида хабардор қилади. Бу кўрсатиб ўтилган шахсларга мазкур йўналишдаги ишлар давом эттиришга арзийдими ёки патентланган ихтиродан бошқа мумкин бўлган ишланмалар учун старт бериладиган майдон сифатида фойдаланишга уриниб кўриш керакми, деган саволни ечишга имкон беради.

Патенлаш ишлари ва патент қонунлари уларни унификациялаштиришга бўлган уринишларга қарамай, турли хил мамлакатларда бир хил эмас. Масалан, яқин вақтгача АҚШда алоҳида патент ҳуқуқи патент берилган вақтдан бошлаб 17 йил, Канадада – 20 йил, кўпчилик Европа мамлакатларида – 20 йил давомида сақланиб турди, лекин патентга ариза берилган вақтдан бошлаб. Ҳозирги вақтда халқаро битимга мувофиқ, кўпчилик мамлакатларда, жумладан АҚШда, патентнинг амал қилиш муддати ариза берилган кундан бошлаб 20 йилни ташкил қилади. Бироқ, бошқа кўпчилик мамлакатлардан фарқли ўлароқ, АҚШда патентни бериш вақти ариза бериш вақтидан муҳимроқ, деган фикрга амал қилинади.

Одатда ихтирога ариза бериш вақтидан патент олишгача бўлган давр икки йилдан беш йилгача вақтни ташкил этади. Ҳар қандай ҳолатда патентга эга бўлиш анчагина дивиденд келтириши мумкин ва уни олишнинг ўзи бўлмайди, шу сабабдан патент учун аризага ва ихтиронинг ўзига қаттиқ талаблар қўйилади.

1) Изоҳ. Мазкур боб АҚШда ихтироларни патентлаш амалиётига бағишланган ва улар бошқа мамлакатлар амалиётидан фарқ қилиши мумкин.

Ихтироларни патентлашнинг умумий саволлари

Қандайдир маҳсулот ёки усул патент олишга лойиқ бўлиши учун тўрт асосий талабга жавоб бериши керак.

1. Амалиётда қўлланилиши мумкинлиги исботланган ҳар қандай ихтиро янги бўлиши керак. Мазкур ҳолатда “янгилик” тушунчаси ихтиро ҳеч қаерда патентланмаганлиги, ҳозирда мавжуд бўлган маҳсулотлар ва усулларга мансуб эмас ёки патентга ариза берилгунга қадар матбуотда у ҳақида ҳеч қандай маълумот берилмаганлигини билдиради. Охирги ҳолат АҚШдан бошқа барча мамлакатларга тегишли, АҚШда эса ихтирочи патент учун ўша

ихтиро ҳақида маълумотлар эълон қилинганидан кейин бир йилдан кечикмасдан патент олиш учун ариза бериш ҳуқуқига эга.

2. Патент илгари шунчаки маълум бўлмаган нарсага берилиши мумкин эмас; ихтиро ихтирочилик даражасига эга бўлиши керак, яъни, мазкур соҳа мутахассислари учун очик-равон бўлмаслиги керак (ихтиронинг патентга мувофиқлик “ихтирочилик даражаси” шартларига мослиги ҳақидаги хулосани Патент идораси чиқаради).

3. Ихтиро усул, ускуна, модда, микроорганизм ёки кўп ҳужайрали организм ҳақида гап кетаётганлигидан қатъий назар, “фойдали” бўлиши шарт.

4. Патент олиш учун аризада уни тўлиқ очиб берадиган, мутахассислар томонидан қўлланилиши учун етарли бўлган тавсиф мавжуд бўлиши шарт.

Патент олишга лойиқ бўлмаган ихтиро ва кашфиётларга илмий назариялар, математик усуллар, эстетик назариялар ҳамда инсон ва ҳайвонларни терапевтик даволаш усуллари киради. Бундан ташқари, патент ҳуқуқининг асосий қоидаларига кўра “табиат маҳсулотларига” патент берилиши мумкин эмас. Бу шу нарса билан боғлиқки, жамият табиатда мавжуд бўлган ва ҳаммага тегишли бўлган нарсаларга монополия ҳуқуқи тақдим этилишидан манфаатдор эмас. Бироқ компаниялар ва хусусий шахслар бу чекловни назарга илмайдилар, масалан, кўпинча маҳсулотни тозалаш усулига патент аризасини бериб, ва бу билан патент билан ҳимояланиш: мазкур маҳсулот табиат маҳсулоти ёки ушбу маҳсулотдан олинган организм ҳақидаги саволдан ўзларини четга оладилар.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Соғлиқни сақлаш Миллий институтлари ва рекомбинант ДНК (NIH-RAC) бўйича Маслаҳат қўмитасининг рекомбинант ДНК соҳасидаги тадқиқотларни назорат қилишдаги роли қандай?

2. FDA рекомбинант оқсилдан озиқ-овқат маҳсулоти ёки овқат қўшимчаси сифатида фойдаланиш имконияти ҳақида фикр билдиришда қайси мезонлардан фойдаланади?

3. «Ген муҳандислиги... – бу табиатнинг асосий қонунларига зид бўлган технология», деган фикрни муҳокама қилинг.

4. Атроф-муҳитга чиқаришга мўлжалланган гени ўзгартирилган организмларни яратиш қандай назорат қилинади, ва нима учун бундай назорат зарур?

АТАМАЛАР ЛУҒАТИ

Адаптор (Adaptor) 1. Синтетик битта тўмтоқ ва битта ёпишқоқ учли икки занжирли олигонуклеотид. ДНК-нишонга тўмтоқ учи билан адаптер бирлаштирилгандан кейин уни қўлга киритилган ёпишқоқ учи ёрдамида мос векторга киритиш мумкин. 2. Ўз-ўзидан гибридланишдан кейин ёпишқоқ учлар ва рестрикцияловчи эндонуклеаза учун ички сайт пайдо бўладиган синтетик бир занжирли олигонуклеотид. Адаптерни клонланган векторга киритканда, унда янги рестрикция сайти пайдо бўлади.

Аденин, А (Adenine) Тимин ва урацилга комплементар бўлган пуринли асос. ДНК ва РНК таркибига кирувчи азотли асослардан бири.

Азот фиксацияси (Nitrogen fixation) Атмосфера азотининг аммиакка айланиши. Фақат прокариотларда аниқланадиган нитрогеназа ферменти томонидан катализланади.

Активатор (Activator) 1. Специфик ген ёки оперон транскрипциясини стимуллайдиган модда. 2. Оператор билан боғланадиган ва транскрипцияни тезлаштирадиган оқсил; шунингдек, “фаоллаштирувчи оқсил” номи ҳам ишлатилади.

Аллель (Allele) Геннинг икки (ёки бир нечта) альтернатив структуравий шаклларида бири.

Аллель частотаси (Allelic frequency) Берилган локус аллелларидан бирининг учраш даражасининг берилган популяциядаги етарлича кўп сонли индивидуумларидаги барча аллеллар учраш даражасининг йиғиндисига нисбати.

Альтернатив сплайсинг (Alternative splicing) Мазкур ген экзонларининг турли комбинацияларда мРНКнинг фарқ қилувчи етук молекулаларини ҳосил қилиб боғланиши.

Аминоацил-тРНК (Aminoacyl-tRNA) 3'-учига специфик аминокислота бириктирилган тРНК молекуласи.

Аминокислота (Amino acid) Оқсил молекулаларининг мономер бирлиги (“қурилиш блоки”).

Ампликон (Amplicon) Амплификация жараёнида синтезланадиган ДНК нишоннинг копиялари, ПЗР маҳсулотлари.

Анаэроб микроорганизмлар (Anaerobes) кислород йўқ шароитда ўсувчи микроорганизмлар.

Антибиотик (Antibiotic) Бир микроорганизм томонидан синтезланувчи ва бошқа микроорганизмлар ҳамда ўсма ҳужайраларига ингибирловчи таъсир кўрсатадиган модда.

Антиген (Antigen) Организм томонидан бегона сифатида қабул қилинадиган ва специфик иммун жавоб – антитаналар ишлаб чиқарилишига олиб келади.

“Антимаъновий” занжир (Antisense chain) 1. Хромосома ДНКсида транскрипцияланувчи (кодловчи) занжир. 2. Нуклеотид кетма-кетлиги мос келувчи мРНКдаги шундай кетма-кетликка комплементар бўлган ДНК икки занжирли молекуласидаги занжирлардан бири.

Антипараллел ориентация (Antiparallel orientation) Нуклеин кислоталар икки занжирли молекулаларининг (5'→3' ва 3'→5') қарама-қарши йўналганлиги.

Антитана (Antibody) В-лимфоцитлар томонидан организмга турли хил антигенлар тушишига жавобан синтезланадиган ва улар билан ўзаро специфик таъсирланадиган оқсил (иммуноглобулин).

Arabidopsis thaliana Ўсиш ва ривожланиш жараёнларини ўрганишда модель тизими сифатида фойдаланиладиган жуда кичик геномли ўсимлик.

Аутосома (Autosome) Жинсий бўлмаган ҳар қандай хромосома. Инсон соматик ҳужайраларида 22 жуфт аутосомалар ва бир жуфт жинсий хромосомалар мавжуд.

Аутосомали ирсийланиш (Autosomal inheritance) Қандайдир белгининг жинс билан боғлиқ бўлмаган ҳолда.

Аэроб микроорганизмлар (Aerobes) Фақат кислород мавжуд бўлган шароитда ўсувчи микроорганизмлар.

Бактериофаг (фаг) (Bacteriophage) Бактерияларга инфекция юктирувчи вирус.

Барқарор хужайра қаторлари (Established cell lines) in vitro шароитида чексиз ўсишга қодир хужайралар культуралари. Кўчириб ўтказиладиган хужайра культураларидан олинади, улар хужайраларининг бир қисми селектив афзалликларга эга ва ўсиш суръати юқори.

Белги (Label) Радиоактив изотоп ёки макромолекула билан боғланадиган биокимёвий ёки иммунологик усуллар билан идентификацияланадиган лиганд (масалан, флуорофор). Намунада белгиланган моддани аниқлаш имконини беради.

Бетаин (Betaine) Метионин биосинтезида метил гуруҳ донори бўлиб хизмат қиладиган паст молекулали бирикма.

Биодеградация (Bioremediation) Тирик микроорганизмлар ёрдамида атроф-муҳитга тушадиган ифлослантирувчи моддаларнинг парчаланиши.

Биомаркер (Biomarker) Патологик жараённинг авж олиши ёки даволаш самарадорлиги ҳақида фикр юритишга имкон берадиган биологик белги.

Биомасса (Biomass) 1. Тирик организмлар ҳаёт фаолияти натижасида ҳосил бўладиган хужайрали массаси. 2. Энергия манбаи ёки кимёвий бирикмалар сифатида фойдаланиладиган органик модда.

Бионазорат (Biocontrol) Тирик организмлардан патоген микроорганизмлар ўсиши ва ривожланишини чеклаш учун фойдаланиладиган жараён.

Биореактор, ферментер (Bioreactor) Тирик микроорганизмлар, хужайра экстрактлари ёки ферментлар иштирокидаги биокимёвий жараёнлар кечадиган ускуна. Кўпинча бу атама микроорганизмлар ўстириладиган идишга тегишли.

Бир занжирли узилиш (Nick) ДНК бир занжиридаги қўшни нуклеотидлар ўртасидаги фосфодиэфир боғламларнинг узилиши.

Бир хужайрали организмлар оксили, БХОО (Single-cell protein) Микроорганизмлар монокультураси томонидан синтезланадиган ва ҳайвонлар рационидида овқатга қўшимча сифатида фойдаланиладиган оксил маҳсулотлари.

Биринчи антитана (Primary antibody) Иммунологик таҳлил ўтказилишида молекула-нишон билан боғланадиган антитана (масалан, ELISA усули ёрдамида).

Бирламчи культура (Primary culture) Бевосита организмдан олинган ҳужайра ёки тўқималар культураси.

Бирламчи транскрипт (Primary transcript) Эукариотик структуравий гендан транскрипцияланган ва процессингга дучор қилинмаган РНК молекуласи (яъни, барча экзонлар ва интронларга эга).

Блоттинг (Blotting) Ажратилган молекулаларни бир муҳитдан (масалан гелдан) қаттиқ ташувчига (қоғоз, нитроцеллюлозали фильтр) кўчириш.

Боғлиқ (Linkage) Бир хромосомада жойлашган генларнинг ҳужайрадан ҳужайрага ўзаро боғлиқ ҳолда ўтказилиши.

бунда уларнинг ҳар бири ўз функциясини бажаради, баъзи ҳолларда ўзаро фойдали.

Бўш жой, очик жой, брешь (рус.), (Gap) Икки занжирли ДНК занжирларидан бирида бир ёки бир нечта нуклеотидларнинг бўлмаслиги.

Вакцинация (Vaccination, preventive Immunization) Организмга инфекция юқтириши мумкин бўлган агентга нисбатан антитаналар ишлаб чиқарилишига туртки бериш учун антигенни киритиш.

Вектор (Vector) ДНКнинг ген муҳандислигида генларни организм-донор дан организм-реципиентга кўчириш учун, шунингдек, нуклеотид кетма-кетлигини клонлаш учун фойдаланиладиган ўз-ўзидан репликацияланувчи молекуласи (масалан, бактериал плазмида).

Вестерн-блоттинг (Western blotting) Гель-электрофорез ёрдамида ажратилган оксил молекулаларини қаттиқ тагликка кўчириш.

Вирион (Virion) Вирус заррачаси.

Вирулентлик (Virulence) Микроорганизм патогенлигининг характеристикаси.

Вирус-ёрдамчи (Helper virus) Вируснинг вирулент штамми бўлиб, унинг иштирокида дефектли вирус хужайра-хўжайинда кўпайиши мумкин.

Вставка (Insert) ДНКнинг клонловчи векторга ўрнатилган сегменти.

В-хужайралар (B cells) Антитаналар ишлаб чиқарадиган ва суяк кўмигидан келиб чиқадиган лимфоцитлар.

Гамета (Gamete) Кўп хужайрали организмнинг репродуктив гаплоид хужайраси.

Гаплоидли (Haploid) Хромосомаларнинг битта тўплами бўлган организмни (хужайрани) тавсифлайдиган атама.

Гаплотип (Haplotype) Диплоид организмнинг битта хромосомасидаги аллеллар комбинацияси.

Ген (Gene) Хромосоманинг функционал оксил ёки тРНК ёки рРНК кодловчи транскрипцияланадиган соҳаси.

Ген билан даволаш ex vivo (Ex vivo gene therapy) Генни (ёки генларни) беморнинг алоҳида ажратилган хужайраларига киритиш. Ўстириш ёки трансформациялашдан кейин бемор организмга трансфузия, инфузия ёки инъекция ёрдамида киритилади. Мазкур муолажа генетик дефектларни бартараф қилиш имконини беради.

Ген билан даволаш in vivo (In vivo gene therapy) Генетик бузилишни бартараф этиш мақсадида бевосита тўқимага ёки аъзога генни (генларни) киритиш.

Генерация вақти (Generation time) Бир хужайрали организмлар популяциясида хужайралар сони икки баробар кўпайиши учун кетадиган вақт. Икки ҳисса ортиш вақти деб ҳам аталади.

Генетик код (Genetic code) Генетик ахборотни нуклеотидлар кетма-кетлиги кўринишида ёзиш тизими бўлиб, унда кодонни ташкил этувчи ҳар уч нуклеотид битта аминокислотани кодлайди. 20 та аминокислотанинг барчасини кодлайдиган 64 кодон ва терминацияловчи кодонлардан ташкил топган.

Генетик полиморфизм (Genetic polymorphism) Алоҳида генларнинг икки ёки ундан ортиқ аллель шаклларининг мавжудлиги.

Генетик харитадаги масофа (Map distance) Таҳлил қилинаётган соҳада учраш даражаси бўйича аниқланадиган иккита ген орасидаги масофа. Хариталаш бирлиги сифатида орасидаги рекомбинация эҳтимоли 1%га (бир сантиморганидага) тенг бўлган генлар орасидаги масофа қабул қилинади.

Генларни клонлаш (Gene cloning) Клонланган ДНК олишда фойдаланиладиган усуллар тизими: бирор-бир организмдан керакли генни ажратиш, уни плазмидага (векторга) киритиш, организм-хўжайин хужайрасига киритиш, кўп марталик репликация.

Генларни хариталаш (Gene mapping) Ушбу геннинг хромосомадаги бошқа генларга нисбатан ҳолатини аниқлаш.

Генларнинг мустақил тақсимланиши (Independent assortment) Турли хил хромосомаларда жойлашган генларни гаплоид гаметалар бўйича бўлиши мумкин бўлган барча генлар комбинацияларини ҳосил қилиб тақсимланиши. Белгиларнинг мустақил тақсимланиши тўғрисидаги Мендель қонунининг асосини ташкил қилади.

Ген-нишон (Target gene) 1. Клонланган ген. 2. Специфик таъсирлантириладиган ген. 3. Тадқиқотчиларни қизиқтирадиган ген.

Геном (Genome) Мана шу организм хромосомалари гаплоидли тўплами генларининг мажмуи.

Геномик кутубхона, генлар банки (кутубхонаси) (Genome library) ДНК клонланган фрагментларининг индивидуал (гурухга, турга мансуб) геном тўплами. Агар йирик геном (сут эмизувчилар) ҳақида сўз борса, у ҳолда хромосомоспецик кутубхона яратилади.

Генотип (Genotype) Организмнинг генетик конструкцияси, барча аллеллар тўплами.

Генотиплаш (Genotyping) Мазкур хромосома барча локусларининг барча аллелларини аниқлаш.

Ген-регулятор (Regulator gene, repressor gene) Оператор билан боғланадиган ва “ўз” оперони транскрипциясини тартибга соладиган оксил-репрессорни кодлайдиган ген.

Ген-репортер (Reporter gene) Осон аниқланадиган маҳсулотни кодлайдиган ген. Бундай генлардан масалан, мазкур

генетик конструкция хужайра, аъзо ёки тўқимага муваффақиятли киритилганлигига ишонч ҳосил қилиш учун фойдаланилади.

wir-Генлар (wir Genes) Тi-плазмиданинг Т-ДНКни ўсимлик хужайрасига кўчиришини таъминлайдиган генлар гуруҳи.

Гетерозигота (Hétérozygote) Геномида бир ёки бир нечта жуфт фарқ қилувчи аллеллар бор организм.

Гетеромерали оқсил (Heteromeric protein) Икки ёки ундан кўп полипептид занжирлардан (суббирликлар) ташкил топган оқсил.

Гибрид ген (Hybrid gene, chimeric gene) Икки ёки бир нечта генларнинг қисмларидан ташкил топган ва гибрид (химер) оқсил ҳосил қилиб бир бутун ҳолда экспрессияланадиган ген.

Гибрид оқсил, химерли оқсил (Fusion protein) Турли хил генлардан биргаликда клонланган икки ёки ундан кўп кодловчи кетма-кетликлар маҳсулоти. Битта полипептид занжирдан иборат.

Гибридизация (Hybridization) Иккита полинуклеотид занжирларни, кўпинча турли хил манбалардан олинган водород боғламлари билан мустаҳкамланадиган ДНК/РНК- ёки ДНК/ДНК-гибридлар ҳосил қилиб тиклаш (отжиг).

Гибридизация ДНК (DNA hybridization) ДНКнинг иккита молекуласининг, кўпинча турли хил манбалардан, комплементар нуклеотидлар ўртасида водород боғламлари ҳосил бўлиши туфайли жуфтлашиши. ДНК препаратида специфик нуклеотид кетма-кетликларини аниқлаш учун ишлатилади.

Гиперўзгарувчан соҳа (Hypervariable region) Иммуноглобулин молекуласи оғир ёки енгил занжири ўзгарувчан қисмининг турли хил спецификликка эга антитаналарда унинг бошқа сегментлари – каркасли соҳаларига нисбатан кўпроқ ўзгарувчанлик билан характерланадиган сайт.

3'-гидроксил гуруҳи (3'-hydroxyl group) Нуклеин кислота молекуласининг охириги нуклеотида шакарли қолдиғининг (рибоза ёки дезоксирибоза) углероднинг 3'-атоми билан боғланган гидроксил гуруҳи.

Гомозиготалилик (Homozigosis) Бир ёки бир нечта локусларда айнан ўхшаш аллелларнинг мавжуд бўлиши. Бундай

аллеллари бўлган хужайра ёки организм гомозиготали деб номланади.

Гомологик (Homologous) Бир манбадан келиб чиқадиган ёки структураси ёки эволюцион келиб чиқиши ўхшаш бўлганлар.

Гомологик хромосомалар (Homologous chromosomes) Бир-бирига нисбатан бир ҳилда жойлашган генларнинг айнан ўхшаш генлар тўпламларини ўз ичига олган хромосомалар. Ота-оналар хромосома жуфтликлари дупликацияси натижасида ҳосил бўлади.

Гуанин, G (Guanine) Цитозинга комплементар пуринли асос. ДНК ва РНК таркибига кирадиган тўртта азотли асослардан бири.

Гуморал иммун жавоб (Humoral immune response) Организмда бегона антитаналар мавжудлигига жавобан иммун тизимнинг В-хужайралари томонидан антитаналар синтезланиши.

Дезоксирибоза (Deoxyribose) ДНК таркибига кирадиган беш углеродли моносахарид.

Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаза I (Deoxyribonuclease I, DNase I) Икки занжирли ДНКни парчаловчи фермент. РНК препаратлари ва хужайрасиз экстрактларни тозалаш учун фойдаланилади.

Делеция (Deletion) Хромосоманинг ички соҳасидан бир қисмининг тушиб қолиши.

Денатурация (Denaturation) 1. ДНК ёки РНК икки занжирли молекуласи занжирларининг ажралиши. 2. Ковалент бўлмаган боғламлар (водородли) узилиши натижасида биологик макромолекулалар натив конформациясининг бузилиши.

Дидезоксинуклеотид, ddNTP (Dideoxynucleotide) Сунъий йўл билан олинган, шакарли халқа углерод атомларидаги 2'- ва 3'-гидроксил гуруҳларидан маҳрум бўлган нуклеозидтрифосфат.

Диплоид (Diploid) Хужайраларида хромосомаларнинг иккита гомологик тўплами бўлган организм.

ДНК фрагментацияси (Shearing) ДНК молекуларининг гидродинамик кучлар (масалан, ДНК эритмасини шприц нинасидан ўтказилганда) таъсири остида узилиши. Гидродинамик кучлар

эритмада суюклик бир қаватининг бошқасига нисбатан сирпаниши натижасида пайдо бўлади.

ДНК-зонд (DNA probe) Бирор бир тарзда белгиланган ва ДНК молекуласидаги специфик қисм билан гибридизацияланиши учун фойдаланиладиган ДНК фрагменти. Унга комплементар бўлган нуклеотид кетма-кетлигини идентификациялаш имконини беради.

ДНК-лигаза (DNA ligase) Қўшни нуклеотидларнинг ДНК молекуласи бир занжирли узилишлар жойидаги 3'-гидроксил гуруҳи ва 5'-фосфат билан фосфодиэфир боғлам ҳосил бўлишини катализлайдиган фермент.

ДНК-маркерловчи сайт, STS (Sequence tagged site) Ушбу локус учун ноёб бўлган ПЗР усули билан уни идентификациялашда фойдаланиш мумкин бўлган олигонуклеотид.

ДНК-полимераза (DNA polymerase) Полинуклеотид занжирни алоҳида нуклеотидлардан бошқа матрица сифатида ва эркин 3' –ОН гуруҳи бўлган ДНК-праймердан фойдаланган ҳолда синтезлашни катализациялайдиган фермент.

ДНК-полимераза Taq (Taq DNA polymerase) *Thermus aquaticus* бактериясининг термостабил ДНК полимеразаси (95 °Сда ҳам фаоллигини сақлаб қолади). Кўпинча ПЗР усулида қўлланилади.

Домен (Domain) Полипептид занжирнинг муайян функцияни бажарадиган қисми (масалан, цитоплазматик домен, трансмембрана домени ва бошқ.).

Доминант ген (Dominant gene) Геномда ушбу геннинг бошқа аллели бор бўлишидан қатъий назар фенотипда намоён бўладиган ген.

Доминант ген бўйича гомозиготалилик (Homozygous dominant) Ушбу локуснинг ҳар иккала аллели доминант бўлган организм.

Доминантлик (Dominancy) Гетерозиготали организмда белгини аниқлашда фақат битта аллелнинг иштирок этиши.

Ёввойи тип (Wild type) Табиат популяциясида энг кўп учрайдиган ”нормал” (мутант бўлмаган) аллеллар томонидан детерминацияланган белгилари бўлган фенотип.

Ёпишқоқ учлар (Cohesive ends) ДНКнинг икки занжирли молекула учлари бўйича чиқиб турадиган учлари; икки занжирли ДНК поғонали узилишлари натижасида ҳосил бўлади.

Ётакчи кетма-кетлик (Leader sequence) мРНКнинг 5'-учи ва AUG инициацияловчи кодон ўртасида жойлашган трансляцияланмайдиган кетма-кетлиги.

Зонд (Probe) 1. У ёки бошқа усул билан белгиланган ва мураккаб намунада қариндош биокимёвий молекулаларни аниқлаш учун фойдаланиладиган бирикма. 2. Гибридизация ёрдамида комплементар кетма-кетликларни аниқлашда фойдаланиладиган олигонуклеотид.

Излар (реплик) усули (Replica plating) Микроорганизмлар колонияларини бир Петри ликобчасидан бошқасига бахмал “қўлқоп” ёрдамида колонияларнинг ўзаро жойлашувини сақлаган ҳолда кўчириш.

Иккиламчи метаболит (Secondary metabolite) Хужайранинг ўсиши ёки функциясини бажариши учун бўлиши шарт бўлмаган, лекин стационар фазада синтезланадиган модда (одатда хужайра ёки микроорганизмларни у ёки бў таъсирлардан ҳимоялашда иштирок этади).

Иммун жавоб (Immune response) Организмга бегона антигенлар тушганда содир бўладиган физиологик жараёнлар йиғиндиси.

Иммунологик скрининг (Screening by immunological assay) Геномик кутубхонанинг ген-нишон маҳсулотини иммунологик усуллар билан аниқлашга асосланган скрининги. Тўғри келадиган ДНК-зонд бўлмаганда ўтказилади.

Иммунологик таҳлил (Immunoassay) Антитананинг биологик намунада специфик компонентни таниб олиш хусусиятига асосланган усул.

Иммуносупрессия (Immunosupression) Организм иммун тизимининг у ёки бошқа антигенга иммун жавоб бериш хусусиятининг йўқолиши.

Иммунтерапия (Immunotherapeutic procedure) Антитанани боғлайдиган сайтга эга бўлган антитана ёки химер оқсилдан беморни даволаш ёки ахволини енгиллаштиришда фойдаланиш.

Индолил-3-сирка кислотаси, ИСК (Indole-3-acetic acid) Ауксинлар синфига мансуб бўлиб, ўсимликлар ўсишини стимуляциялайдиган ўсимлик гормони.

Индуктор (Inducer, Inductor) Регулятор оқсил-репрессор билан боғланадиган унчалик катта бўлмаган молекула. Бу боғланиш мувофиқ генларнинг депрессиясига олиб келади.

Индукция (Induction) Индуктор таъсири остида ген ёки генлар гуруҳининг дерепрессияси.

Инициация (Initiation) Биополимер синтезининг бошланиши.

Инициацияловчи кодон (Initiation codon) Полипептид занжирлар синтезини бошлаб берадиган (инициация) метионинни (прокариотларда N-формилметионин) кодлайдиган мРНК таркибидаги кодон AUG.

Инициацияловчи комплекс (Initiation complex) Рибосомалар томонидан полипептид занжир синтезини инициациялаш учун зарур бўлган тузилма. Рибосоманинг кичик суббирликлари, формилметионинли тРНК, GTP ва мРНК томонидан трансляцияланадиган инициацияловчи омилларидан ташкил топган.

Инсектицид (Insecticide) Ҳашаротларни ўлдирадиган модда ёки тирик организм.

“Инсон геноми” лойиҳаси (Human Genome Project) Мақсади инсон геномининг генетик ва физик хариталарини тузиш ва ДНКнинг тўлиқ нуклеотид кетма-кетлигини аниқлашдан иборат бўлган халқаро дастур.

Интеграция (Integration) Хўжайин хужайраси хромосомасига бегона ДНКни киритиш (одатда гомологик рекомбинация ёрдамида).

Интеграцияловчи вектор (Integrating vector) Унинг ёрдамида клонланган ДНКни ҳужайра-хўжайин геномига киритиш (интеграциялаш) учун махсус конструкцияланган вектор.

Интрон (Intron) Геннинг кодонга эга бўлмаган ва бирламчи транскриптдан процессинг давомида функционал РНК ҳосил қилиб ажралиб чиқадиган транскрипцияланадиган соҳаси.

Ионли канал (Ion channel) Маълум ионларнинг транспортини енгиллаштирадиган трансмембрана оқсили.

Капсид (Capsid) Вирусли заррачаларнинг оқсилли қобиғи.

Кассета (Cassette) Чамбарчас бириккан, функционал боғлиқ тандем локуслар гуруҳи. Хамиртурушларнинг жинсий типларида мисол – кассета модели.

кДНК кутубхонаси (cDNA library) Битта тўқима ёки ҳужайралар популяциясидан келиб чиқадиган мРНК матрицаларида *in vitro* синтезланадиган кДНК клонлари коллекцияси.

Кенжа тур (Subspecies) Тур доирасидаги гуруҳ бўлиб, мазкур тур популяцияси аъзоларининг қолган қисми учун характерли бўлмаган белгиларга эга.

Киритиш (клонлаш) сайти (Cloning site) Векторли молекуланинг специфик соҳаси бўлиб, унга бегона ДНК фрагменти киритилади. Жуда кўп ҳолларда бу ноёб рестрикция сайти.

Киритиш таначалари (Inclusion bodies) Бактерия ҳужайрасида унинг вирус билан зарарланиши ёки хўжайин-ҳужайра ДНКсига вирус геноми киритилганда ортиқча миқдорда ҳосил бўлган кристаллашган оқсилнинг майда заррачалари. Уларнинг мавжудлиги ҳужайрадаги патологик ўзгаришлар ҳақида гувоҳлик беради.

Кленов фрагменти (Klenov fragment) *E.coli* ДНК-полимеразасининг унинг протеолитик парчаланиши натижасида ҳосил бўлган икки фрагментидан йирикроғи. 5'-»3' йўналишида полимераза фаоллигини ва 3'-»5' йўналишида экзонуклеаза фаоллигини сақлайди. Хусусан ДНКни секвенирлашда фойдаланилади.

Клон (Clone) Битта асос солувчи ҳужайра ёки молекула билан ўхшаш ҳужайра ёки молекулалар популяцияси.

Клонлаш (Cloning) Клонлар етиштириш учун фойдаланиладиган процедуралар йиғиндиси.

Клонловчи вектор (Cloning vector) ДНК-нишонни клонлаш учун мўлжалланган ДНК (плазмидали ёки вирусли ДНК) молекуласи.

Кодон (Codon) Муайян аминокислотани кодловчи учта қўшни нуклеотидлар. Кодонларда нуклеотидларнинг ҳаммаси бўлиб 64 та комбинациялари мавжуд; улардан 61 таси 20 та аминокислотани кодлайди, 3 таси нонсенс-кодонлар ҳисобланади.

Кодонлардан фойдаланиш частотаси (Codon usage) Ушбу организм кодонидан фойдаланишнинг структуравий генларнинг катта танлови учун олинган ўртача частотаси.

Кодонларни оптималлаштириш (Codon optimization) Ушбу геннинг кодонлар ҳўжайин организм томонидан самарали ўқилиши учун йўналтирилган ўзи билан кодланадиган аминокислотали кетма-кетликни ўзгартирмаган ҳолда модификацияланиши.

Коинтегратив вектор тизими (Cointegrative vector system) Клонланган генларни ўсимлик ҳўжайраларига кўчиришда фойдаланиладиган икки плазмидали тизим. Клонловчи вектор Т-ДНКнинг клонланган генга эга бўлган соҳасини ташийди. *Agrobacterium* ҳўжайрага киритилгандан кейин, резидент “куролсизлантирилган” (онкоген бўлмаган) Ti-плазмида билан Т-ДНК генетик ўзгартirilган соҳасини ўсимлик ҳўжайрасига кўчириш учун зарур бўлган генетик ахборотни ташувчи битта плазмида ҳосил қиладиган гомологик рекомбинацияга дучор қилинади.

Компетенция (Competence) Бактериал ҳўжайраларнинг трансформацияловчи ДНКни (одатдаги плазмида) қабул қилиш хусусияти.

Комплемент (Complement) Қон зардобининг оқсил комплекси, туғма иммунитетни ташкил қилувчиларидан бири. Яллиғланиш жараёнларини тартибга солиш, фагоцитозни фаоллаштириш ва ҳўжайра мембранасига литик таъсир кўрсатишда иштирок этади. Иммун комплекс билан ўзаро таъсирлашиб фаоллашади.

Комплемент тизими (Complement cascade) Комплементни (қон зардобидаги мураккаб оксил комплекси) фаоллаштириш кетма-кет жараёнлари ва антиген-антитана комплекси ҳосил бўлишига жавобан ишга тушириладиган реакциялар серияси.

Комплементар ДНК, кДНК (Complementary DNA) РНК-матрицада РНК-боғлиқ ДНК-полимераза (тескари транскриптаза) иштирокида синтезланган ДНК молекуласи.

Комплементар нуклеотид кетма-кетликлари (Complementary base sequences) Асосларнинг жуфтлашиши қоидалари билан мос равишда ўзаро таъсирланадиган полинуклеотид кетма-кетликлари: аденин (А) тимин (Т) билан жуфтлик ҳосил қилади [ёки урацил (U) билан РНКда], гуанин (G) - цитозин (C) билан.

Комплементарлик бузилиши (Mismatch, mis pairing) ДНК икки занжирди молекуласида бир ёки бир неча жуфт комплементар бўлмаган асослар мавжуд бўлиши.

Конъюгация (Conjugation) Жинсий жараён шакли. Бактерияларда – ДНКни контактланувчи хужайраларнинг биридан иккинчисига кўчириш.

Конъюгатив плазмидалар (Conjugative plasmids) Конъюгация вақтида бир хужайрадан бошқасига ўтказилишига қодир бўлган плазмидалар.

Косегрегация (Cosegregation) Шундай феноменки, бунда икки белги боғланган ҳолда ирсийланади, яъни уларнинг генлари кроссинговерда ажралмайди.

Космида (Cosmid) Плазмида вектори ва фаг λ асосидаги вектор хоссаларини бирлаштирадиган вектор. Cos-сайтларга эга.

Косупрессия (Cosuppression) Ўсимликни трансформациялашда специфик ўсимлик гени экспрессиясини ушбу геннинг “маъновий” ориентациясига қўшилган қўшимча нусхаси билан бостириш.

Кофактор (Cofactor) Муайян ферментатив реакциянинг кечиши учун зарур бўлган паст молекулали модда.

Коферментация (Cofermmentation) Битта биореакторда иккита микроорганизмларнинг бир вақтда ўсиши.

Кроссинговер (Crossing-over) Гомологик хромосомалар соҳаларининг хроматидалар узилиш-бирлашишига ва аллелларнинг янги комбинацияларига олиб келишига асосланган ўзаро алмашинуви. Рекомбинация деб ҳам аталади.

Ксенобиотик (Xenobiotic) Тирик организм томонидан синтезланган эмас, балки сунъий йўл билан олинган бирикма.

Ксилоза (Xylose) Беш бурчакли шакар, гемицеллюлозанинг асосий компоненти.

Култура (Culture) Хужайра ва микроорганизмларнинг in vitro шароитларида ўстириладиган ва назорат қилинадиган популяцияси.

Културал муҳит (Culture medium) Микроорганизмларни in vitro ўстириш учун фойдаланиладиган қаттиқ ёки суюқ муҳит.

«Кэп» (Cap) Кўпчилик эукариотларнинг 5'-учида метилирланган гуанозин.

Қисқа тандем такрорланишлар полиморфизми, STRP (Short tandem repeat polymorphism) Тандем ди-, три- ёки тетрануклеотидли такрорланувчи элементлар блокларининг бу элементлар сони бўйича блокларнинг йирик популяцияда учраш даражаси 1%дан кам бўлмагандаги ўзгарувчанлиги. STRP-локуслар мазкур локусларни фланкиризацияловчи ноёб кетма-кетликларга комплементар бўлган праймерлардан фойдаланиб ПЗР ўтказилгандан кейин гель-электрофорез ёрдамида аниқланади.

Қўшалок гетерозигота (Double heterozygote) Бир вақтнинг ўзида икки ген локуслари бўйича гетерозиготали организм.

Қўшалок кроссинговер (Double crossingover) Бир вақтнинг ўзида гомологик хромосомалар жуфтлигининг икки нуктасида содир бўладиган кроссинговер.

Лигирлаш (Ligation) ДНК икки молекуласини фосфодиэфир боғламлар ёрдамида бирлаштириш. Фаг Т4 ДНК-лигазаси ферменти томонидан in vitro катализацияланади.

Лигноцеллоза (Lignocellulose) Лигнин, гемицеллюлоза ва целлюлозанинг ўсимликлар хужайраси деворининг структуравий каркасини ташкил этадиган комплекси.

Лизис (Lysis) Хужайралар деворининг лизосомалар ёки бошқа агентларда мавжуд бўлган ферментлар таъсири остида емирилиши.

Линкер (Linker) Рестрикция сайтига эга бўлган синтетик олигонуклеотид. Учларига тўмтоқ учларни бириктириш усули билан линкерлар бирлаштирилган векторли ва клонланадиган ДНКларни бирлаштириш учун ишлатилади.

Липаза (Lipase) Липидларни парчалайдиган фермент.

Липополисахарид (Lipopolysaccharide) Полисахарид билан боғланган липид сақловчи бирикма. Бактериялар хужайраси деворининг компонентларидан бири.

Липосома (Liposome) Липид молекулаларидан ташкил топган бир ёки икки қатламли мембранали пуфакча. Ушбу молекулаларнинг гидрофоб қисми пуфакчанинг ичкари томонига, гидрофил қисми ташқарига қараган. Пуфакча ичида липосома томонидан манзилга етказиладиган нуклеин кислоталар, дори моддалари ва бошқалар жойлашган бўлиши мумкин.

Литик цикл (Lytic cycle) Хужайра-хўжайинда вируснинг хужайра парчаланиши билан якунланадиган кўпайиши.

Локус (Locus) Хромосомада специфик геннинг жойлашган ўрни.

Макромолекула (Macromolecule) Молекуляр оғирлиги бир неча мингдан бир неча юз миллион дальтонгача бўлган полимер (оқсиллар, нуклеин кислоталар, полисахаридлар ва бошқ.).

Макрофаг (Macrophage) Фагоцитоз қилиш хусусиятига эга бўлган йирик лейкоцит.

Маркерли ген (Marker gene) Хромосомада жойлашиши маълум бўлган, аниқ фенотипик белгига (антибиотикка сезувчанлик, ферментатив фаоллик ва бошқ.) эга бўлган ген.

Маркерли пептид (Marker peptid) Гибрид оқсил молекуласининг оқсилни идентификациялаш ёки тозалашни осонлаштиручи соҳаси.

Маркерли экспрессияланадиган кетма-кетликлар, EST (Expressed sequence tag) Инсоннинг ҳар бир экспрессияланадиган гени учун характерли бўлган қисқа маркерли кетма-кетликлар.

Инсоннинг экспрессияланадиган генларининг ўлчамлари, хилма хиллиги ва транскрипцион фаоллигини ўрганиш имконини беради.

Матрикс занжири (Template strand) Комплементар занжир синтези учун ДНК-полимераза томонидан матрица сифатида фойдаланиладиган ДНК занжири ёки бошқа полинуклеотид.

Матрикс РНК, мРНК (Messenger RNA) Муайян оксил молекуласининг аминокислоталар кетма-кетлиги ҳақидаги ахборот жойлашган РНК молекуласи.

Мезофил микроорганизмлар (Mesophile) 20 дан 50°C гача бўлган ҳароратда ўсишга қодир бўлган организмлар; оптимал ўсиш ҳарорати 37°C.

Меристема (Meristematic tissue) Фаол бўлиниш хусусиятига эга ўсимлик тўқимаси. Ёш ўсимликларда одатда илдизлар ва новдаларнинг учидан жойлашади.

Метаболизм (Metabolism) Организмда содир бўладиган ва унинг ҳаёт фаолиятини таъминлайдиган физик ва кимёвий жараёнлар йиғиндиси. Метаболизм маҳсулотлари метаболитлар деб аталади.

Метаболик зўриқиш (Metatotic load) Организм-хўжайин геномига бегона ДНКнинг киритилиши ва экспрессияси натижасида метаболизмнинг бузилиши.

Метилирланиш (Methylation) Макромолекулага метил гуруҳининг бирикиши. Масалан, ДНК метилирланишида цитозиннинг, баъзан эса адениннинг специфик қолдиқларига шундай гуруҳ бирикиши содир бўлади.

Микроинъекциялар (Microinjection) Алоҳида ажратилган эукариотик ҳужайрага ингичка игна ёрдамида ДНК ёки бошқа молекулаларни киритиш.

Миссенс-мутация (Missense mutation) Мутация бўлиб, унинг натижасида бирор-бир аминокислотани кодловчи кодон бошқа аминокислотани кодловчи кодон ҳосил қилиб ўзгаради.

Мицелий (Mycelium) Замбуруғнинг ингичка шоҳланадиган ипларидан ташкил топган вегетатив танаси.

Мобил генетик элемент (Transposable element) ДНКнинг геномда ўз ўрнини ўзгартиришга қодир соҳаси. Бундай элементлар орасида IS-элементлар ва транспозонлар фарқланади.

Мобилизация (Mobilization) Бир бактерия хужайрасидан бошқасининг хужайрасига конъюгатив плазмидалар иштирокида хромосома генлари ёки конъюгатив бўлмаган плазмидаларнинг ўтказилиши.

Молекуляр диагностика (Molecular diagnostic) Молекуляр-биологик усуллар билан патоген микроорганизм, специфик модда ёки бошқа касалликка жавобгар ўзгарган нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш.

Моноклонал антитаналар (Monoclonal antibodies) Битта эпитопга (антиген детерминантаси) нисбатан қатъий специфик бўлган бир типли антитаналар. Антитана ҳосил қилувчи нормал хужайраларнинг чексиз кўпайиш хусусиятига эга миелома ўсма хужайралари билан қўшиш натижасида олинган хужайравий гибридлар – гибридомалар томонидан синтезланади. Баъзи бир миелома хужайраларининг ўзлари моноклонал антитаналарни мустақил синтезлайдилар.

Мос келмаслик гуруҳи (Compatibility group) Плазмидалар гуруҳи бўлиб, аъзолари битта бактериал хужайрада бирга яшашга қодир эмас, лекин бошқа ҳар қандай гуруҳ плазмидаси билан мос келади.

Мультилокусли генетик харита (Multipoint map, multilocus linkage map) Ушбу организм хромосомаларида локусларнинг ўзаро жойлашиш схемаси.

Мутагенез (Mutagenesis) Мутацияларни физик ва кимёвий усуллар ёрдамида сунъий равишда киритиш.

Мутант (Mutant) Мутациялар натижасида ўзгартирилган организм; одатда дастлабки шаклидан (ёввойи типидан) фарқ қилади.

Мутация (Mutation) Ген тузилишининг таёки тасодифан ндукцияланган ўзгариши.

Мутация чегара силжиши билан (Frameshift mutation) Ортиқча нуклеотид пайдо бўлиши ёки бир ёки бир нечта нуклеотид

йўқотилиши билан боғлиқ мутация (уч каррали бўлмаган сонда). Учлик код бузилиши ва мутлақо бошқа оқсил синтезига олиб келади (фақат синтез умуман блокланмаса).

Нишон (Target) Энг кенг маънода – тадқиқотчини қизиқтирадиган биологик объект (тўқима, молекула, хужайра, микроорганизм).

Нозерн-блоттинг (Nothern Blotting) Электрофорезга дучор қилинган РНК молекулсини кейинги ДНК-РНК гибридизацияси билан гелдан қаттиқ тағлиқка (нитроцеллюлозали ёки найлонли фильтр) кўчириш.

Номзодларни хариталаш (Candidate gene cloning) Аниқ касаллик генини мазкур геннинг мумкин бўлган маҳсулоти ҳақидаги маълумотларга асосланиб идентификациялаш стратегияси.

«Нокаут» (Knockout) Генларни гомологик рекомбинация ёрдамида парчалаш.

Нуклеаза SI (SI nuclease) Бир занжирли ДНКни специфик деградациялайдиган фермент.

Нуклеозид (Nucteoside) Беш углеродли шакар (пентоза) билан ковалент боғланган азотли пурин ёки пиримидинли асос. Агар шакар рибоза бўлса рибонуклеозид, агар дезоксирибоза бўлса дезоксирибонуклеозид кўзда тутилади.

Нуклеотид (Nudeotide) бир ёки ундан ортиқ фосфат гуруҳи бириккан нуклеозид; бирикиш шакарли халқанинг 5'-углерод атоми бўйича содир бўлади. Рибоза билан боғланган нуклеозидлар рибонуклеозидмонофосфат (rNMP), рибонуклеозиддифосфатами (rNDP) ёки рибонуклеозидтрифосфат (rNTP) деб аталади. Дезоксирибоза билан боғланган нуклеозидлар учун мос келувчи ном қуйидагича: дезоксирибонуклеозидмоно-, ди- ва три фосфатлар (dNMP,dNDP,dNTP).

N-уч (N terminus) Оқсил молекуласида биринчи аминокислота (ёки бир нечта аминокислоталар).

Олигонуклеотид, олигомер (Oligonucleotide) Бир занжирли ДНКнинг қисқа сегменти (6-10 нуклеотидлар). Одатда кимёвий йўл билан олинади.

Онкоген (Oncogene) Экспрессияланиши хужайраларнинг назорат қилинмайдиган пролиферациясига (трансформацияга) олиб келувчи ген.

Оператор (Operator) ДНКнинг бевосита структуравий генга туташган ва репрессор ёки активатор иштирокида унинг транскрипциясини бошқарадиган соҳаси.

Оперон (Operon) ДНКнинг битта полицистрон мРНК ҳосил қилиб транскрипцияланадиган бир нечта структуравий ген сақловчи соҳаси.

Отжиг (тиклаш) (Annealing) Алоҳида полинуклеотид комплементар занжирлардан икки занжирли молекулалар (ДНК-ДНК ёки ДНК-РНК) ҳосил бўлиш жараёни.

Охирги маҳсулот билан ингибирлаш (End-product inhibition) Ферментнинг метаболик йўлнинг метаболит-охирги маҳсулоти томонидан ингибирланиши.

Очиқ ҳисоблаш рамкаси (Open reading frame) Терминацияловчи кодонлари бўлмаган нуклеотидлар кетма-кетлиги; полипептид ёки оқсилни кодлайди.

Палиндром (Palindrome) ДНК икки занжирли молекуласининг, 5'- дан 3'- га қараб ўқиб борилганда иккала учи бир ҳил нуклеотид кетма-кетлигига эга соҳаси. Бундай соҳалар кўпинча II типдаги рестрицирестрикцияловчи эндонуклеазалар томонидан таниб олинади

Пенетрантлик (Penetrance) Қариндош организмлар гуруҳида ушбу аллелнинг намоён бўлиш частотаси. Тўлиқ пенетрантликда танлов гуруҳининг аллелнинг намоён бўлиши барча аъзоларида кузатилади.

Пептид (Peptide) Пептид боғламлари билан боғланган қисқа аминокислоталар занжирчалари.

Пептид боғланиш (Peptide bond) Полипептид занжиридаги бир аминокислотанинг α -углерод атомидаги эркин карбоксил гуруҳи ва қўшни аминокислотанинг худди шундай атомидаги эркин карбоксил гуруҳи ўртасидаги ковалент боғланиш.

Периплазматик бўшлиқ (Periplasmatic space) Бактерия ҳужайрасининг плазматик мембранаси ва ташқи мембрана ёки ҳужайра девори ўртасидаги бўшлиқ.

Пиримидинлар (Pyrimidine) Нуклеин кислоталар таркибига кирувчи азотли асосларнинг икки туридан бири, пиримидинларга тимин, цитозин ва урацил киради. Асосларнинг иккинчи тури – пуринлар; уларга аденин ва гуанин киради.

Плазида (Plasmid) Узоқ вақт автоном ҳаёт кечириш ва репликацияланишга қодир хромосомадан ташқари генетик элемент. Одатда бу узунлиги 1-200 минг.н.ж. бўлган икки занжирли халқали ДНК.

Плазида-ёрдамчи (Helper plasmid) Айни бир ҳужайрада бошқа плазида функциясини тўлдирувчи плазида. Баъзи плазида-ёрдамчилар конъюгатив бўлмаган плазмидаларни донор ҳужайрадан реципиент ҳужайрага кўчириш имконини беради.

Плазмидалар мос келмаслиги (Plasmid incompatibility) Бактерия ҳужайрасида бир турдаги плазмидалар нусхалари сонини бошқариш механизми. Бир мос келувчи гуруҳга мансуб плазмидаларнинг ҳужайра ичида бирга яшай олмаслигини таъминлайди.

Плазмовирус (Plasmovirus) Генетик конструкция бўлиб, 5'-LTR-промотор назорати остида бўлган ретровирусли генларга эга, шунингдек, цитомегаловирусли промотор томонидан бошқариладиган “терапевтик” ген ва ген env.

Пластида (Plastid) Ўсимлик ҳужайралари органеллалари (масалан, хлоропласт). Кўпчилик пластидалар ўз геномларига эга.

Поғонасимон узилиш (Staggered cut) Икки занжирли ДНКни кесиш бўлиб, бунда комплементар занжирлардаги узилишлар қатъий бир-бирига қарама-қарши эмас, балки бир оз силжиб жойлашади.

Позитив танлаш (Positive selection) Ҳужайраларни уларда селектив муҳитда ўсишига ёрдам берадиган маркерли генлар мавжудлиги бўйича танлаш (масалан, антибиотикли муҳит).

Позитив-негатив танлаш (Positive-negative selection) Методика бўлиб, бунда бир вақтнинг ўзида специфик хромосома

сайтида киритмани ташувчи ҳужайралар танлаш (позитив танлаш) ва бошқа носпецифик сайтда киритмани ташувчи ҳужайраларни “яроқсизини ажратиш” содир бўлади.

Полиаденилизация сигнали (Polyadenylation signal)

Транскрипция якунланишига жавобгар ва аденин қолдиқларини мРНК молекуласи 3'-учига ферментатив бирлашишини детерминациялайдиган нуклеотид кетма-кетлиги.

Полиаденилирлаш (polyadenylation) Аденин қолдиқларини эукариотик мРНК молекуласининг 3'-учига ферментатив бирлаштириш. Аденинга бой бу 3'-учи poly(A)-дум беб аталади.

Полилинкер Polylinker ДНКнинг эндонуклеазалар учун бир нечта таниб олиш сайтларига эга соҳаси; бу сайтларга бегона ДНК жойлаштирилади (клонлаш амалга оширилади).

Полимераза занжир реакцияси, ПЗР (Polymerase chain reaction) ДНК специфик сегментини амплификацияланувчи сегментни фланкирзацияловчи ДНК қарама-қарши занжирларининг кетма-кетликларига комплементар олигонуклеотидли ДНК-зондларидан фойдаланиб, термостабил ДНК-полимераза ёрдамида амплификациялаш усули. Жараён циклик такрорланадиган реакциялар сериясидан иборат: ДНК денатурацияси, зондлар отжиги (тикланиши), ДНК синтези.

Полиморф сайт (Polymorphic site) Хромосоманинг популяцияда бирдан ортиқ вариантда намоён бўладиган ва 1% кам частота билан учрайдиган соҳаси.

Полинуклеотид (Polynucleotide) Бир-бири билан фосфодиэфир боғламлари билан боғланган 20 ва ундан ортиқ нуклеотидлардан ташкил топган чизиқли полимер. Полинуклеотидлар бўлиб, масалан, ДНК ва РНК молекулалари ҳисобланади.

Полипептид (Polypeptide) Бир-бири билан пептид боғламлари билан боғланган аминокислоталардан ташкил топган чизиқли полимер. Полипептид бўлиб, масалан, оксил молекуласи.

Посттрансляцион модификациялар (Posttranslational modifications) Оксил молекулалари структурасининг уларнинг

рибосомалар билан синтези якунлангандан кейин ўзгариши. Бундай модификацияларга: фосфорилирланиш, гликозилирланиш, цистеиннинг оксидланиши, сигнал кетма-кетликларининг ажралиши ва бошқ. киради.

Праймер (Primer) Матрица билан гибридизацияланадиган ва уни нусхалашда затравка бўлиб хизмат қиладиган қисқа олигонуклеотид.

Праймер-воситали сайр (Primer walking) ДНК узайган сегментларини (>1 минг.н.ж.) маълум бўлиб бўлган кетма-кетлик учига комплементар праймердан (затравка) фойдаланиб секвенирлаш усулларида бири. Биринчи босқичда олинган маълумотлар асосида секвенирланиб бўлган соҳа учи билан устма уст тушган янги праймер синтезланади, ва ундан клонланган ДНК навбатдаги соҳасининг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш учун фойдаланилади. Бу муолажа бутун сегмент секвенирланмагунча давом эттирилади.

Прибнов бокси (Pribnow box) Прокариотларда транскрипция инициацияси сайтигача 10 нуклеотиддан олдин жойлашган нуклеотид кетма-кетлиги. Одатда 6 нуклеотиддан ташкил топган: ТАТААТ.

Прокариотлар (Procaryotes) Мембрана билан чегараланган ядро ва органеллалари бўлмаган организмлар. Прокариотларга барча бактериялар киради.

Промотор (Promoter) ДНК молекуласининг РНК-полимераза билан боғланадиган қисми бўлиб, мос келувчи генларнинг транскрипция инициацияси билан кечади. Одатда бошқариладиган геннинг 5'-учидан олдин жойлашади.

Протеиназалар, протеолитик ферментлар (Protease) Оксил молекулаларида пептид боғламларни парчалайдиган ферментлар.

Протеолиз (Proteolysis) Оксилларнинг ферментатив парчаланishi.

Протопласт (Protoplast) Девори ферментатив ёки кимёвий йўл билан емирилган бактериал, замбуруғ ёки ўсимлик хужайраси.

Профаг (Prophage) Бактериал хўжайин-хужайра геномига интеграцияланган ва у билан бирга репликацияланадиган ДНК бактериофаги.

Процессинг (Processing) РНК етук молекулалари ва хужайрада оксил ҳосил бўлиши жараёнлари йиғинидиси, молекула-ўтмишдошни эндонуклеаза ёки протеиназа томонидан бир қатор кетма-кет келувчи парчаланишларини ўз ичига олади.

Психрофиллар (Psychrophile) 0-5°C ҳароратда ўсишга қодир микроорганизмлар.

Пуринлар (Purine) Нуклеин кислоталар таркибига кирувчи азотли асослардан бири; пуринларга аденин ва гуанин киради. Асосларнинг иккинчи тури – пиримидинлар; уларга тимин, урацил ва цитозин киради.

Pseudomonas кенг тарқалган грамманфий бактерия. Унинг тупроқда ҳаёт кечирадиган кўпгина турлари УБ-нурларида флуоресценцияланадиган пигмент ишлаб чиқаради.

Регулятор оксил (Regulatory protein) Транскрипцияни “ҳаракатга келтирадиган” ёки “тўхтатадиган” оксил.

Рекомбиант ДНК (Recombinant DNA) ДНКнинг in vitro шароитида турли-туман, табиатда ҳеч қаерда биргаликда мавжуд бўлмаган фрагментларини бирлаштириш орқали олинган ДНК молекуласи.

Рекомбинант оксил (Recombinant protein) Клонланган рекомбинант ДНК томонидан кодланадиган оксил.

Рекомбинант плазида (Recombinant plasmid) Ген муҳандислиги усуллари билан ўзгартирилган плазида. Турли хил плазмидалар қисмларидан ташкил топган ёки бошқа организмлар ДНКси сегментларига эга.

Рекомбинация частотаси, рекомбинацион индекс (Recombination frequency, recombination index) Авлодларнинг (ёки хромосомалар) умумий сонига нисбатан рекомбинантлар (ёки рекомбинант хромосомалар) сони.

Ренатурация (Renaturation) Икки занжирли ДНК занжирларининг денатурация вақтида ажралган занжирларининг қайтадан бирлашиши.

Репликация (Replication, reduplication) ДНКнинг ўз-ўзидан кўпайиш (синтез) жараёни.

Репрессия (Repression) Генларни бошқаришнинг икки альтернатив (индукция билан бир қаторда) механизмларидан бири. Оксил-репрессорни оператор билан боғлаш йўли орқали транскрипция ёки трансляцияни бостиришдан иборат.

Репрессор (Repressor) Берилган геннинг оператори ёки промотори билан боғланувчи ва РНК-полимеразанинг мазкур элементлар билан боғланишини синтезлайдиган оксил.

Рестриктаза, рестрикцияловчи эндонуклеаза (Restriction endonuclease) Икки занжирли ДНК молекуласини специфик сайтларда парчаловчи бактериал фермент.

Рестрикцион фрагментлар узунлиги полиморфизми, РФУП (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) ДНК рестриктазалар томонидан парчаланганида ҳосил бўлган ДНК фрагментлари узунлигининг ўзгарувчанлиги. Рестрикция сайтларининг мутацион ўзгаришлари ёки янги сайтлар пайдо бўлиши билан боғлиқ. Фрагментлар бўлинганда гель электрофорез ёрдамида аниқланади.

Рестрикцион харита (Restriction map) ДНК молекулаларида рестриктазалар билан таниб олиш сайтларининг жойлашиш диаграммаси.

Рестрикция сайти (Restriction site) ДНК молекуласида рестриктаза томонидан таниладиган нуклеотид кетма-кетлиги. Одатда қисқа палиндромдан иборат.

Ретровируслар (Retroviruses) Тескари транскриптазани ўз ичига олган РНК-вируслар гуруҳи; РНК-матрицасида синтезланган икки занжирли ДНК мазкур вирус юктирилган ҳужайра хромосомасига ўрнатилиши мумкин.

Рецессив аллель (ген) [Recessive allele (gene)] Ушбу аллелни фақат гомозиготали ҳолатда ташувчи организмларда намоён бўладиган белгини кодловчи аллель.

Рецессив ген бўйича гомозиготалилик (Homozygous recessive) Ушбу локуснинг ҳар иккала аллели рецессив бўлган организм.

Рибоза (Ribose) Беш углеродли моносахарид. РНК таркибига киради.

Рибозим (Ribozyme) Ферментатив фаолликка эга РНК молекуласи.

Рибонуклеин кислотаси, РНК (Ribonucleic acid, RNA) Рибонуклеотидлардан ташкил топган нуклеин кислотаси бўлиб, шакар қисми рибозадан иборат, пиримидинлардан бири эса – урацил (тимин ўрнига).

Рибосома (Ribosome) Хужайра органелласи, рибонуклеопротеид заррачаси бўлиб, унинг иштирокида оксил синтези амалга оширилади (трансляция). Иккита: катта ва кичик суббирликлардан ташкил топган.

Рибосома РНКси, рРНК (Ribosomal RNA, rRNA) Рибосомалар таркибига кирувчи РНК.

Рибосомаларни боғлаш ички сайти, IRES (Internal ribosomal entry site) Полицистрон мРНК кодловчи соҳаларининг биридан кейин жойлашган трансляцияланмайдиган кетма-кетлик бўлиб, кичик рибосомали суббирлиги билан боғланади ва инициацияловчи комплекс ҳосил қилади.

Ризосфера (Rhizosphere) Ўсимликлар илдизларига бевосита ёпишиб турадиган ва микроорганизмлар кўплиги билан характерланадиган тупроқ қатлами.

РНК-полимераза (RNA polymerase, RNA synthetase) Рибонуклеозидтрифосфатлардан РНК синтезини амалга оширувчи фермент. Матрица бўлиб ДНК ёки РНК хизмат қилиши мумкин, мос келувчи РНК-полимеразалар ДНК- ёки РНК-боғлиқ деб аталади.

Рес А ДНК рекомбинацияси ва репарациясида иштирок этувчи бактериал оксил.

Rhizobium Ҳамма жойда учрайдиган, ўсимликлар илдизларида ёки уларга тегиб турган тупроқ қатламида яшовчи бактериялар.

Сантиморганида, сМ (Centimorgan) Генетик харитада масофани ўлчаш бирлиги. 1 сМ ўртасидаги рекомбинация 1% частота билан содир бўладиган генлар орасидаги масофага тўғри келади. Инсон хромосомаси учун 1 сМ тахминан 10^6 н.ж. га тенг. Бу бирлик Т.Могран томонидан *Drosophila* да генетик боғлиқлар бўйича тажрибалар ўтказган вақтда киритилган.

Саузерн-блоттинг (Southern blotting) Электрофорезга дучор қилинган денатурацияланган ДНК молекулаларини капилляр эффект ва керакли кетма-кетликка комплементар бўлган белгиланган зонд билан гибридизациялаш ҳисобига агароз гелдан нитроцеллюлозали ёки наилонли филтрга кўчириш йўли билан специфик нуклеотид кетма-кетликларини аниқлаш.

Секвенирловчи гель (Sequencing gel) Узунлиги бўйича атиги 1 нуклеотидга фарқ қиладиган олиго- ва полинуклеотидларни электрофоретик ажратиш имконини берадиган полиакриламид гелнинг узун пластинаси.

Секреция (Secretion) Моддаларнинг хужайрадан ташқи муҳитга чиқариш.

Селекция (Selection) 1. Маданий ўсимликларнинг янги навлари ва ҳайвонларнинг янги зотларини яратиш усуллари ҳақидаги фан. 2. Аралаш популяцияда керакли организмларни (хужайраларни) танлаб олиш.

Сигнал кетма-кетлиги (Signal region, initiator element) Генда оқсилни боғлаш жойи (транскрипция омили) бўлиб хизмат қиладиган нуклеотид кетма-кетлиги бўлиб, транскрипцияни бошқаради.

Сигнал пептиди, сигнал кетма-кетлиги, етакчи пептид (Signal peptirie) Оқсил секрециясини таъминлайдиган (мембрана орқали ўтишини), узунлиги 15-30 аминокислотадан иборат оқсил молекуласининг N-учи соҳаси. Секрециядан кейин бу соҳа оқсил молекуласидан ажралади.

Симбиоз (Symbiosis) Турли хил организмларнинг биргаликда ҳаёт кечириши бўлиб,

Скрининг (Screening) Ягона объектни (популяциядаги организмлар, керакли хусусиятларга эга хужайралар, нуклеотид кетма-кетлиги қисми ва бошқ.) кўп сонли объектларни саралаш йўли билан идентификациялаш усули (ёки усуллар комплекси).

содир бўлади.

Соматик хужайра (Somatic cell) Кўп хужайрали организмнинг ҳар қандай жинсий бўлмаган хужайраси.

Сплайсинг (Splicing) мРНКни ўтмишдошидан кесиб олиш ва экзонларнинг мРНКнинг етук молекулаларини ҳосил қилиб ковалент бирлаштириш.

Структуравий ген (Structural gene) Ҳар қандай оқсилни кодлайдиган ген.

Суббирликли вакцина (Subunit vaccine) Патоген микроорганизмнинг фақат алоҳида компонентларига эга бўлган вакцина.

Субклонлаш (Subcloning) ДНК клонланиб бўлган молекуласи бир қисмини бошқа клонловчи векторга кўчириш.

Субстрат (Substrate) Специфик фермент томонидан катализланганда ўзгарадиган модда.

Сунъий бактериал хромосома, ВАС (Bacterial artificial chromosome) F-плазмида E.coli асосидаги узун (100—300 минг.н.ж.) кетма-кетликларни клонлашда фойдаланиладиган вектор тизими.

Сунъий хамиртуруш хромосомаси, YAC (Yeast artificial chromosome) Хамиртуруш плазмидаларидан ва хамиртуруш хромосомаларининг унга киритилган центромерали ва теломерали соҳаларидан ҳамда маркерли генлардан ташкил топган ва репликация инициациясининг бир нечта сайтларига эга бўлган рекомбинант ДНК.

Сунъий хромосома PI (PI artificial chromosome) P_i фаги асосидаги E.coli хужайрасига йирик (100—300 минг.н.ж.) киритмали векторни электропорация ёрдамида киритиш учун фойдаланиладиган вектор тизими.

Супрессия (Supression) Бир мутация таъсирининг иккинчиси билан бостириш туфайли йўқотилган генетик функциянинг қайта тикланиши.

Тандем такрорланиш (Tandem array) Бир-бири билан “бош-думга” бўлиб боғланган бир нечта бир хил элементлардан ташкил топган нуклеотид кетма-кетлиги.

Тасодифий праймерлар усули (Random primer method) Белгиланган ДНК-зондлар олишнинг олти нуклеотиднинг мумкин бўлган барча комбинацияларига эга бўлган синтетик олигонуклеотидларни қўллаш ва уларни денатурацияланган ДНК-нишон билан гибридизациясига асосланган усули, ДНК-нишонга комплементар олигонуклеотидлар у билан жуфтлашади. Реакция аралашмасига барча тўртта дезоксирибонуклеотид (улардан бири белгиланган) ва ДНК фрагментлари синтезини ДНК-нишон занжирларидан матрица сифатида, гибридизацияланган ферментлардан эса – затравка сифатида фойдаланиб катализациялайдиган фермент қўшилади.

ТАТА-бокс (TATA box) Эукариотлар генларининг промотор соҳасида 25 нуклеотидлардан олдин транскрипция инициацияси сайтигача жойлашган соҳаси бўлиб, РНК полимераза у билан боғланади. Бошқа номи – Хогнесс бокси. Прокариотларда Прибнов бокси аналог бўлиб хизмат қилади.

Т-ДНК (T-DNA) Тi-плазмида фрагменти бўлиб, хўжайин-хужайранинг ядровий ДНКсига киритилади ва барқарор ирсийланади. Ўсимликларда ўсма ҳосил бўлишини келтириб чиқаради (тождор галл).

Терминаторни ўқиб бориш, тўппа-тўғри ўқиб бориш (Readthrough) Транскрипциянинг специфик терминатор орқали “ўтиб кетиши”. Аналогик атама трансляцияга нисбатан ҳам ишлатилади.

Терминация (Termination) Макромолекула синтезининг тўхташи.

Терминацияловчи кодон (Terminating codon) Полинуклеотид занжири синтези тугашини (терминациясини) белгилайдиган кодон. Одатда булар UAA, UAG ва UGA кодонлар.

Термофил (Thermophylic) Одатда 50° С дан юқори ҳароратда ўсадиган иссиқликни севадиган организмларни характерлайди. Баъзи

бир термофил организмлар 90 дан 100° С гача бўлган ҳароратда ўсиши мумкин.

Тескари транскриптаза (Reverse transcriptase) ДНК комплементар занжири синтези учун матрица сифатида РНК молекуласидан фойдаланадиган РНК-билан боғлиқ ДНК-полимераза.

Тескари транскрипция – бу бир занжирли РНКдаги ахборот асосида икки занжирли ДНК ҳосил бўлиш жараёни. Мазкур жараён тескари транскрипция деб аталади, чунки бунда генетик ахборотнинг ўтказилиши транскрипцияга нисбатан “тескари” йўналишда содир бўлади.

Тимин, Т (Thymine) Пиримидинли асос; ДНК таркибига кирувчи тўртта азотли асослардан бири.

Тождор галл (Crown gall) Ўсимликларнинг *Agrobacterium* туридаги бактериялар келтириб чиқарадиган ўсмаси.

Трансген организм (Transgenic organism) Геноми ген муҳандислиги усуллари билан киритилган бегона генетик материални сақлаган организм.

Трансгенез (Transgenesis) Бегона генни ўсимлик ёки ҳайвон ҳужайрасига киритилиши ва унинг бир неча авлодларга ўтиши.

Трансдукция (Transduction) Генетик материални бир бактериал ҳужайрадан бошқасига бактериофаг ёрдамида кўчириш.

Транскрипт (Transcript) Специфик ДНКда матрицадаги каби синтезланган РНК молекуласи.

Транскрипция (Transcription) РНК-полимераза томонидан катализланадиган, матрица сифатида ДНК занжирлари биридан фойдаланиладиган РНК синтези жараёни.

Транслокация (Translocation) 1. Хромосомани унинг бир қисмининг айнан ўша ёки бошқа хромосомадаги янги жойга кўчириш ёки бутун бир хромосоманинг бошқа хромосомага кўчирилишидан иборат қайтадан қуриш. 2. мРНК молекуласини трансляция вақтида бир кодонга суриш.

Трансляция (Translation) Рибосома томонидан матрица сифатида мРНКдан фойдаланиб полипептид занжирининг синтезланиши.

Транспозиция (Transposition) Мобил генетик элементнинг бир локусдан бошқасига кўчиши.

Транспозонлар (Transposones) Кўчиб юриш жараёнининг ўзи билан боғлиқ бўлмаган функцияларни детерминациялайдиган структуравий генларни ташувчи мобил генетик элементлар (масалан, антибиотикларга чидамлилик генлари).

Транспорт РНК, тРНК (Transfer RNA) Трансляция жараёнида ўсиб бораётган полипептид занжирига амнокислоталарни специфик кўчиришда адаптер ролида чиқадиган РНК молекуласи.

Трансфекция (Transfection) Эукариотлар хужайраларига ДНКнинг алоҳида ажратиб олинган молекулаларини сунъий равишда киритиш.

Трансформация (Transformation) 1. Генетик ахборотнинг плазмида иштирокида ёки унинг иштирокисиз, аммо хар доим вируслар иштирокисиз бактерия хужайраларига кўчириш; кўпинча реципиент хужайраси фенотипининг ўзгаришига олиб келади. 2. Ҳайвонлар нормал хужайраларининг ўсма хужайраларига айланиши.

Трансформация самарадорлиги (Transformation efficiency) Бегона ДНКни қабул қилган хужайраларнинг трансформацияловчи ДНК миқдорига кировчи сони. Трансформантларнинг 1 мкг ДНК га тўғри келадиган сони билан ифодаланади.

Трансформация частотаси (Transformation frequency) Хужайралар популяциясида бегона ДНКни қабул қилган хужайралар улуши; хужайралар умумий сонига нисбатан трансформантлар сони билан ифодаланади.

Тўлиқ боғланиш (Complete linkage) Хромосомадаги икки ёки ундан ортиқ кўшни генларнинг биргаликда ирсийланиши. Улар ўртасида рекомбинация йўқлиги ва митозда битта гаметага стабил тушиши билан намоён бўлади.

Тўлиқ бўлмаган пенетрантлик (Incomplete penetrance) Қариндош организмлар гуруҳидаги аниқ бир аллелнинг қисман намоён бўлиши. Мутант аллелларнинг кўпчилиги учун характерли.

Тўмтоқ уч (Blunt end) Занжирларидан бирортаси чиқиб турмайдиган ДНК икки занжирли молекуласининг учи.

Ti-плазмида (Ti plasmid) *Agrobacterium tumefaciens* тупроқ бактерияси плазмидаси бўлиб, унинг Т-соҳаси шу бактерияларнинг ядровий ДНКсига кириш хусусиятига эга. Бу ўсма ҳосил бўлишига олиб келади.

Ўзак хужайралар (Stem cells) Митотик фаол хужайралар бўлиб, уларнинг бўлиниши натижасида кўп хужайрали организмда ҳалок бўлган хужайраларнинг ўрни тўлиши

Ўз-ўзидан репликацияланадиган элемент (Self-replicating element) Нуклеин кислотанинг хромосомадан ташқари молекуласи бўлиб, хромосома ДНКси билан боғлиқ бўлмаган ҳолда (автоном тарзда) репликацияланишга қодир. Бундай элементга плазмидани мисол қилиб келтириш мумкин.

“Уй хўжалиги” генлари (Housefold genes) Хужайра ҳаёт фаолиятини таъминлайдиган асосий структуравий генлар тўплами.

Ўқиш рамкаси (Reading frame) Нуклеотидлар кетма-кетлигини триплетлар кўринишида ўқишнинг мумкин бўлган учта усулларида бири. Очiq ўқиш рамкаси терминацияловчи кодонларга эга эмас ва оқсилга трансляцияланиши мумкин.

Урацил, U (Uracil) Пиримидинли асос; РНК таркибига кирадиган тўртта азотли асослардан бири.

Ўриндош терапия (Replacement therapy) Организмга метаболитлар, кофакторлар, гормонларни уларнинг генетик дефект туфайли келиб чиққан дефицитини ўрнини тўлдириш учун юбориш.

Учдаги қисқа такрорланиш, STR (Short tandem repeat) Ди-, три- ёки тетрануклеотидли такрорланувчи элементлардан ташкил топган охириги нуклеотид кетма-кетлиги.

Учлардаги узун такрорлар, LTR (Long terminal repeats) Ретровируслар геномининг ДНК-нусхалари учларидаги тўғри такрорланувчи кетма-кетликлар.

Фенотип (Phenotype) Организмнинг унинг генотиби ва ташқи муҳит ўзаро таъсири жараёнида шаклланадиган барча белгиларининг йиғиндиси.

Фертилик (Fertility) Организмларнинг яшовчан насл бериш қобилияти.

Физик харита (Physical map) Генларнинг хромосомада турли хил усуллар (электрон микроскопия, секвенирлаш, рестрикцион хариталаш) ёрдамида белгиланган жойлашуви. Бундай харитадаги масофа нуклеотидлар жуфти сони билан ўлчанади.

Фитогормон (Phytohormone) Ўсимликлар ўсиши ва бошқа жараёнларни стимулловчи модда. Мисоллар: ауксин, цитокинин, этилен ва бошқ.

Фитопатогенлар (Phytopathogen) Ўсимликларда касаллик келтириб чиқарадиган организмлар (замбуруғлар, бактериялар, вируслар).

Флавоноидлар (Flavonoids) Ўсимликлар томонидан синтезланадиган фенолли бирикмалар. Уларнинг структуравий асосини уч углеродли кўприкчалар билан бирлашган икки ароматик халқа ташкил этади. Ўсимликлар пигментацияси учун жавоб беради, замбуруғлар ва ҳашаротлардан ҳимоя қилади.

Флуоресцеин (Fluorescein) Кўпинча антитаналар учун белги сифатида фойдаланиладиган флуоресцияловчи бўёқ. Антитаналарнинг антиген билан боғланишидан кейин визуализациялаш имконини беради.

Фосфодиэфир боғлам (Phosphodiester bond) Бир полинуклеотид занжирининг қўшни нуклеотидлар 3'- ва 5'-углерод атомидаги фосфат гуруҳлари ўртасидаги боғлам.

Фотосинтез (Photosynthesis) Юксак ўсимликлар ҳужайралари томонидан кўзга кўринадиган ёруғлик энергиясини кимёвий боғланишлар энергиясига айлантирадиган жараён, органик бирикмалар ва углерод диоксида ҳамда сувдан кислород ҳосил бўлиши билан кечади.

Х-боғланган ген (X linked) Фақат Х-хромосомада жойлашган ген.

Хогнесс бокси (Hogness box) Эукариотларда транскрипция инициацияси сайтигача 25 нуклеотиддан кейин жойлашган нуклеотид кетма-кетлиги. Одатда 8 нуклеотиддан ташкил топган.

Хромосома (Chromosome) Асосини ДНКнинг конденсацияланган молекуласи ташкил қилган тузилма; генетик ахборот ташувчи. Насллар қаторида структур-функционал индивидуалликни сақлаб қайта тиклаш хусусиятига эга. Эукариотларда хужайра ядросида, прокариотларда эса – бевосита цитоплазмада жойлашади.

“Хромосома бўйлаб сайр” (Chromosome walking) Маълум генларни фланкиризацияловчи нуклеотид кетма-кетликларини идентификациялаш усули, бу генлар учун олигонуклеотидли зондлар мавжуд. Кейин фланкиризацияловчи кетма-кетликлардан уларга туташган кетма-кетликлар ва бошқаларни идентификациялаш учун зондлар сифатида фойдаланилади.

«Хромосома бўйлаб сакрашлар» (Chromosome jumping) “Хромосома бўйлаб сайр” усулининг вариантларидан бири бўлиб, скрининг учун фойдаланиладиган маркерли ген мутацияси натижасида ҳаракатланади (сакрайди), бу унга янги уланган генларни аниқлаш имконини беради.

Хайвон-асосчи (Founder animal) Эмбрион қатори хужайраларида жуфтлашганда трансген организмларнинг соф қаторига туртки берадиган бегона генни ташийдиган организм.

Хужайра қатори (Cell line) Культурада қайта экишлар йўли билан сақланиб туриладиган хужайралар гуруҳи.

Целлюлоза (Cellulose) (1,4) - боғламлар билан боғланган β-D-глюкоза қолдиқларидан ташкил топган юқори молекулали чизиқли полисахарид. Ўсимлик хужайраларининг структуравий скелети ҳосил бўлишида иштирок этади.

Цистрон (Cistron) Генга эквивалент бўлган ва алоҳида оқсилни кодловчи генетик бирлик.

Цитозин, С (Cytosine) ДНК ва РНК таркибига кирувчи тўртта азотли асослардан бири.

Цитокининлар (Cytokinins) Ўсимликларнинг хужайралар бўлинишини индуцирловчи гормонлари.

Чатиштириш (Gross, crossing, mating) Генетик жиҳатдан фарқ қиладиган организмларни бир марта чатиштириш.

Челнок вектори (Shuttle vector) Икки турли хил типдаги ҳужайраларда репликацияланиш хусусиятига эга плазмида ДНКси (масалан, *E.coli* ва замбуруғлар ҳужайраларида).

Чиқариш (Исключение Excision) Специфик фермент ёрдамида *in vivo* ёки *in vitro* шароитида ДНК сегментини хромосома ёки клонловчи вектордан ажратиб олиш.

Шайн-Дальгарно кетма-кетлиги, рибосомаларнинг боғланиш сайти (Shine—Dalgarno sequence, ribosome-binding site) мРНКнинг (одатда AGGAGG) 5'-учида жойлашган, рибосоманинг кичик суббирлиги РНК-компонентининг (рРНК) комплементар кетма-кетлиги билан жуфтлашадиган нуклеотид кетма-кетлиги.

Штамм (Stain) Генетик бир турли микроорганизмлар культураси.

Экзоген ДНК (Exogenous DNA) Донор-организмдан ажратиб олинган ва организм-хўжайиннинг вектори ёки ДНКсига киритилган ДНК. Бегона (Foreign) ёки гетерологик (Heterologous) ДНК деб ҳам аталади.

Экзон (Exon) Геннинг бирламчи транскрипт таркибига кирувчи ва процессингдан (интронларни ажратиб олиш) кейин унинг таркибида қолувчи қисми. Бошқа экзонлар билан биргаликда етук мРНКни ҳосил қилади.

Экзонуклеаза III (Exonuclease III) *E.coli* нинг икки занжирли ДНКнинг 3'-учидан нуклеотидларни ажратадиган экзонуклеаза.

Экспрессивлик (Expressivity) Ушбу аллель билан кодланадиган ирсий белгининг фенотипик ифодаланиши даражаси. Доимий (белгининг ўзгарувчанлиги бўлмаганда) ва ўзгарувчан экспрессивлик фарқланади.

Экспрессия (Expression) Геннинг транскрипция ва трансляцияси.

Электрофорез (Electrophoresis) Зарядланган молекулаларни (ДНК, РНК ёки оксиллар) ажратиш усули бўлиб, уларнинг электр майдонида турли хил тезликда ҳаракатланишига асосланган.

Элонгация (Elongation) Мономерларнинг полимер занжирига кетма-кетликда бирикиши.

Эмбрион қатори хужайралари (Germ line cells) Аста-секин гаметаларга айланадиган хужайралар (бирламчи жинсий хужайралардан гаметаларнинг ўзига).

Эмбрионал ўзак хужайралар, ES-хужайралар (Embryonic stem cells) Эмбрионлардаги бошқа эмбрион хужайраларига бластоциста босқичида киритилганда ҳар қандай типдаги хужайраларга, хусусан эмбрион қатори хужайраларига дифференциаллашиш хусусиятига эга бўлган хужайралар.

Эндонуклеаза (Endonuclease) Ички фосфодиэфир боғламларни узувчи ва ДНК ҳамда РНК молекулаларини парчаловчи фермент. Эндонуклеазалар рекомбинация, репарация ва рестрикцияда иштирок этади; охириги ҳолатда улар рестриктазалар деб аталади (рестрикцияловчи эндонуклеазалар).

Энхансер (Enhancer) ДНКнинг специфик қисми бўлиб, ДНКнинг айнан шу молекуласида жойлашган генлар транскрипцияси даражасини кўп мартага оширади.

Эриш ҳарорати, T_m (Melting temperature) Полинуклеотидли дуплексдаги водород боғламлари ярмининг узилиши содир бўладиган ҳарорат.

Эукариотлар (Eukaryotes) Қуйидагилар хусусиятларга эга бўлган организмлар: 1) хромосомаларга эга бўлган ядро мавжудлиги; 2) цитоплазмада турли хил органеллалар – митохондриялар, хлоропластлар ва бошқалар мавжуд. Эукариотларги ҳайвонлар, ўсимликлар, замбуруғлар, баъзи бир сув ўтлари киради.

Ядроли клонлаш (Nuclear cloning) диплоид соматик ядро киритилган ядросиз тухум хужайрадан тирик организм олиш.

АДАБИЁТЛАР:

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. – М.: Мир, 1994.

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1173–1195.

Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журн. общей биологии. 2004. Т. 65. С. 278–305.

Бейли Д., Оллис Д. Основы биохимической инженерии, в 2-х частях. М.: «Мир», 2009 г.

Белясова Н.А. Молекулярная биотехнология: электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» – Минск : БГТУ, 2012. – 173 с.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение Пер. с англ. - М.: Мир, 2002. — 589 с.

Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. М.: «Агропромиздат», 2007 г.

Гриневич А.Г., Босенко А.М. Техническая микробиология. Мн.: «Вышэйшая школа», 2006 г.

Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. М., 1988

Егоров Н.С., Самуилов В.Д. Биотехнология, в 8-ми томах. Под ред. М.: «Высшая школа», 2008 г.

Елинов Н.П. Основы биотехнологии. СПб: «Наука», 2005 г.

Жукова А. Г., Кизиченко Н. В., Горохова Л. Г. Молекулярная биология: учебник с упражнениями и задачами.- 2018 г.

Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии Учебное пособие для студентов биологического факультета. 2002.

Коккинг Э. Слияние протопластов растений. Достижения и перспективы применения в сельском хозяйстве // Рекомбинантные молекулы: значение для науки и практики. М.: Мир. 1980. С. 231-245.

Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. и др. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экол. генетика. 2011. Т. 9. С. 32–43.

Сазанов А. А., Романов М. Н., Смирнов А. Ф. Библиотеки протяженных геномных клонов как инструмент молекулярно-цитогенетического анализа генома птиц // Генетика : журнал. М.: Наука, 2005. Т. 41, № 5. С. 581-589.

Сент-Дьердьи А. Новое в клонировании ДНК: Методы. М., 1989.

Серебровский А.С. Генетический анализ. М.: Наука, 1970. 342 с.

М.Сингер, П.Берг. Гены и геномы. (В 2-х т.)- М.: Мир, 1998. - 373с.

Смарагдов М.Г. Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции // Генетика. 2009. Т. 45. С. 725–728.

Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Усп. соврем. биологии. 2004. Т. 124. С. 260–271.

Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. М., 1986

Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, т. 17, №4/2. С.1044-1054.

Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 4. С. 757–768.

Щелкунов С. Н. Клонирование генов. Новосибирск., 1986.

Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. 2-е изд., Новосибирск., 2004.

Якупов Т.Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия/ Учебное пособие. Казань. 2016.

https://spravochnick.ru/biologiya/zadanie_i_metody_selekcii/selekcija_z_hivotnyh/ .

МУНДАРИЖА

1. Молекуляр биотехнологияга кириш.....	3
2. Молекуляр биотехнологиядаги биологик тизимлар	11
3. ДНК тузилиши	17
4. Репликация	22
5. Генетик ахборотнинг дешифрланиши: РНК ва оқсил	30
6. Рекомбинант ДНК технологияси.	44
7. Плазида векторлари. Трансформация ва танлаш.....	55
8. Геномик кутубхонани яратиш	61
9. Гибридизация ёрдамида скрининг қилиш. ДНК полиморфизми	63
10. Эукариотларнинг структуравий генларини клонлаш.....	66
11. Прокариотларнинг генетик трансформацияси. ДНКни <i>E.coli</i> га кўчириш.	69
12. ДНК ни кимёвий синтези, нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш	73
13. ДНК амплификацияси. Полимераза занжир реакцияси	84
14. Гель электрофорези. ДНК гибридизацияси	89
15. Тижорат маҳсулотларини ишлаб чиқаришда рекомбинант микроорганизмлардан фойдаланиш	94
16. Ўсимликларнинг ген муҳандислиги	102
17. Ўсимликлар ген муҳандислиги ютуқлари	111
18. Трансген ўсимликлар биоҳавфсизлиги муаммолари	117
19. Хужайра селекция ва хужайра муҳандислигининг асосий усуллари	120
20. Ўсимлик хужайраларининг протопластлари	129
21. Молекуляр маркерлар: таснифи ва қўлланилиши.	138

22. Трансген ҳайвонлар	150
23. Молекуляр биотехнология соҳасидаги тадқиқотларни назорат қилиш. Биотехнологик тадқиқотларни патентлаш	164
24. Атамалар луғати.	173
25. Адабиётлар	209

Эгамбердиева Саида Абдисаматовна

МОЛЕКУЛЯР БИОТЕХНОЛОГИЯ

Дарслик

Муқовадаги расм муаллифи Hulkar Egamberdieva

Ўзбекистон Матбуот ва ахборот агентлигининг
«FAN ZIYOSI» нашриётига

2021 йил 14 февралда берилган 30819 7041-сонли лицензияси
Буюртма № 16.

Нашриёт манзили: Тошкент шаҳри, А. Навоий кўчаси, 30 уй.
Офсет қоғози. Бичими 60x84/16

Times гарнитурасида офсет усули. Шартли босма табағи 21,25
Баҳоси шартнома асосида. Ададаи 500 нусхада
«MUNIS DESIGN GROUP» МЧЖ босмахонасида чоп этилди.
100000 Тошкент ш., Буз-2 мавзе, 17-А уй.