ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ

ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

БОТАНИКА КАФЕДРАСИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ
фанидан

РАҚАМЛИ-УСЛУБИЙ ТАЪМИНОТ

(Кундузги таълим шакли 4-курс талабалари)

Тайёрловчи доцент: САТТАРОВ А.С

Термиз-2022

Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги томонидан 2019 йил “7” 01 даги “1”-сонли буйруғи билан тасдиқланган фан дастури асосида ишлаб чиқилган.

Тузувчи:

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

Тақризчи:

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

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

Термиз давлат университети Илмий-Услубий кенгашининг 27-avgust 2022 йил даги 1-сонли баёни асосида фойдаланишга тавсия этилган.

МУНДАРИЖА

№	Ўқув-услубий мажмуа бўлимлари	бет
1.	**Маърузалар матни**	
1.1	**Кириш. Биотехнология фанининг предмети, мақсади ва вазифалари.(4с)** 1.1 Кириш. Биотехнология фанининг предмети, мақсади ва вазифалари.(2 с) 1.2биотехнология фанининг тадқиқот усуллари, асосий объектлари, замонавий йўналишлари. (2с)	
1.2.	**Ферментлар мухандислиги (4с)** 2.1 ферментларни олиш технологияси. Ўсимлик ва ҳайвон органларидан ферментлар ажратиб олиш усуллари. (2с) 2.2 ферментларни тозалаш. Биоспетсифик хроматография ва бу усулни ўта тоза ферментлар олишда қўллаш. (2с)	
1.3.	**Ферментларни иммобиллаш.иммобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари. (6с)** 3.1 иммобилланган ферментлар. Иммобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари.(2с) 3.2 қўлланиладиган ташувчилар турлари, табиий органик, аногранік ва синтетик усулда олинган полимерларни ташувчилар сифатида ишлатиш.(2с) 3.3 иммобиллаш жараёнига таъсир этадиган омиллар. Иммобилланган фермент хоссаларининг ўзгариши ва фермантлар барқарорлигини ошириш.(2с)	
1.4.	**Ферментлар иштирокидаги технологик жараёнлар(4с)** 4.1. Амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш. Глюкоза-фруктозали шинни олиш. .(2с) 4.2 амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш. Лактозасиз сут олиш. Сут зардобидан шакарсимон моддалар олиш. Крахмал ва селлюлозани ферментлар ёрдамида парчалаш. .(2с)	
1.5.	**Ген мухандислиги (6 с)** 5.1 организм (ин виво) ген инженерлиги. Генлар тузилиши ва экспрессиянинг бошқарилиши. Ген мухандислигида қўлланиладиган ферментлар рестриктазалар. Рестриктсия ва модификатсия тизимлари.(2с) 5.2 ген инженерлигида қо`лланиладиган ферментлар. Рестриктазалар. 5.3 плазмидалар ва вируслар вектор сифатида. Плазмидаларнинг автоном репликатсияга учраши. Суперпродутсент штаммалар яратиш. (2с)	

1.6.	**Ўсимлик ген мухандислиги (6 с)** 6.1 ўсимлик ген мухандислиги. Протопластлар.каллус тўқима.(2с) 6.2 ўсимлик гибридларини олиш.бегона генларни ўсимликларга киритиш йўллари.(2с) 6.3 ўсимлик ген мухандислигида қўлланиладиган маркер генлар. Трансген ҳужайраларни саралаб олиш.(2с)	
1.7.	**Ҳайвон ген мухандислиги (4 с)** 7.1ҳайвон ген мухандислиги. Ҳайвон ҳужайраларининг ўзига хос маркерлари ва бактериал генларни киритиш. (2с) 7.2 трансген ҳайвонлар яратиш.трансген ҳужайраларни саралаб олиш. Одам геноми. Ген хариталари.(2с)	
1.8.	**Ҳужайра мухандислиги (6 с)** 8.1 микроорганизм биокимёвий фаолликларини бошқариш ё`ллари. (2с) 8.2 ҳужайраларни ўстириш ва сақлаш. Ҳужайра культуралари. (2с) 8.3 биотехнологияда одам ва ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш.(2с)	
	Жами маъруза соат 40	
Лаборатория машғулотлари мавзулари		
2.1	**Амилолитик фермент фаоллигини аниқлаш.** 1.1 Амилолитик фермент фаоллигини аниқлаш (2с) 1.2 амилолитик фермент фаоллигини аниқлашда қо`лланиладиган усуллар (2с)	
2.2	**Чиқиндилар асосида сорбент олиш**. 2.1 қишлоқ хо`жалиги чиқиндилари асосида сорбент олиш (2с) 2.2 саноат чиқиндилари асосида сорбент олиш (2с) 2.3 кунлик чиқиндилар асосида сорбент олиш (2с)	
2.3	**Ферментларни ковалент иммобиллаш.**	
2.4	**Полимераза занжир реаксиялари.** 4.1 пзр да қо`лланиладиган асбоб ускуналар. (2с) 4.2 пзр қо`лланиладиган анализлар, реактивлар (2с) 4.3 пзр ни о`тказиш технологияси (2с)	
2.5	**Фитовирусларни ажратиш ва тозалаш.** 5.1 фитовирусларни ажратиш усуллари (2с) 5.2 фитовирусларни тозалаш усуллари (2с)	
2.6	**Усимликларни микроклонлаш учун озуқа мухити тайёрлаш ва экиш.** 6.1 о`симликларни микроклонлаш усуллари (2с) 6.2 о`симликларни микроклонлаш учун озуқа мухити тайёрлаш усуллари (2с) 6.3 о`симликларни микроклонлаш учун экиш усуллари (2с)	

Жами Лаборатория машғулотлари соати 28 соат		
Амалий машғулот мавзулари		
3.1	Ферментлар барқарорлигига та`сир этувчи омиллар.	
3.2	Иммобилланган ферментларни тиббиётда ва технологияда қо`ллаш.	
3.3	Иммуноензим таҳлилининг гомоген ва гетероген усуллари.	
3.4	Векторларни конструксиялаш.коинтегратив векторлар.	
3.5	Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оқсил ва гормонлар (интерферон, инсулин) олиниши.	
3.6	Фитовируслар. Уларнинг биотехнологиядаги аҳамияти.	
3.7	Биосенсорлар. Ферментли ва иммуносенсорлар.	
3.8	Биоёқилғи олиш техналогияси.	
Жами амалий машғулот мавзулари соати 10 соат		
	Семинар машғулоти мавзулари	
4.1	Замонавий тадқиқот усуллари. Пзр асосида турли генетик касалликларни аниқлаш.	
4.2	Доривор усимликлардан олинадиган биологик фаол моддалар ва уларни аниқлаш усуллари.	
4.3	Трансген балиқ яратиш технологияси	
4.4	Озиқ – овқат саноатида ферментлардан фойдаланиш.	
4.5	Хроматография усуллари ва уларни амалиётда қо`ллаш	
4.6	Фармасевтика саноатида ферментларнинг ишлатилиши ва аҳамияти	
4.7	Биоуғит олиш технологияси	
Жами семинар машғулоти мавзулари 18 соат		
5	**Мустақил таълим машғулотлари**	
6	**Глоссарий**	
7	**Иловалар**	
8	Фан дастури	
9	Ишчи фан дастури	
10	Тарқатма материаллар	
11	Тестлар	
12	Баҳолаш мезонлари	

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

ТАБИИЙ ФАНЛАР ФАКУЛЬТЕТИ

БОТАНИКА КАФЕДРАСИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАНИДАН

МАЪРУЗАЛАР МАТНИ

Тузувчи: **б.ф.н. А.Сатторов**

Термиз – 2022

1-МАЪРУЗА.
КИРИШ. БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАНИНИНГ ПРЕДМЕТИ, МАҚСАДИ ВА ВАЗИФАЛАРИ.(4С)

1.1 Кириш. Биотехнология фанининг предмети, мақсади ва вазифалари.(2с)
1.2 Биотехнология фанининг тадқиқот усуллари, асосий объектлари, замонавий йўналишлари.(2с)

Режа:

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

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

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

1.Биотехнологиянинг предмети ва вазифалари

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

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

“Биотехнология” терминини 1917 йилда венгер инженери Карл Эреки киритган. Унинг таърифига кўра “**биотехнология** – бу тирик организмлар ёрдамида хом ашёдан у ёки бу маҳсулот олинадиган ишларнинг барча туридир”, яъни биотехнологик жараёнларнинг схемаси қуйидагичадир:

Хом ашё
↓
Бошланғич ишлов бериш
↓
Ферментация ва биотрансформация
↓
Охирги ишлов бериш
↓
Маҳсулот

Биотехнологияни 3 та асосий қисмга бўлиш мумкин:

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

2. Ҳужайра муҳандислиги. Бу қисмнинг асосий мақсади – ҳужайра культурасини олиш ва бу объектлардан амалиётда фойдаланиш Билан таништиришдир. Бунда ҳайвон ва ўсимлик ҳужайралари культурасини олиш усуллари билан таништирилади. Ҳужайра биотехнологияси ёрдамида селекцияда чидамли, маҳсулдорлик ва сифатли ўсимлик ва ҳужайраларнинг муҳим формалари ва линияларини олиш, қимматли генотипларни кўпайтириш, озиқ овқат, ем ва тиббиётда ишлатиладиган қимматли биологик фаол моддаларни олиш тезлашди.

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

Биотехнологиянинг вазифалари:

- Керакли маҳсулотларни ишлаб чиқариш учун биологик объектлар, система ва жараёнлардан фойдаланиш;
- Микроорганизмлар, ҳужайра культуралари ва уларнинг алоҳида компонентларидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш мақсадида биохимик, микробиологик ва инженерлик билимларини комплекс қўллаш;
- Турли типдаги фойдали маҳсулотларни олиш ва кўпайтириш учун биологик жараёнлардан фойдаланиш;

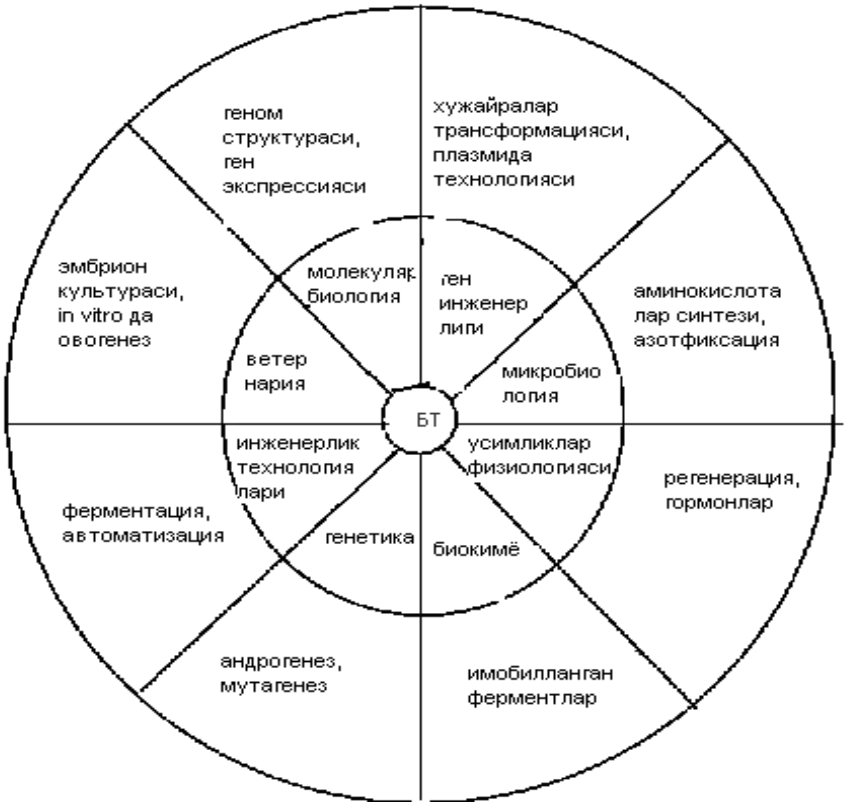
- Керакли маҳсулотлар олиш ёки сервис технологиясини яратиш мақсадида биологик агентлар ёрдамида ишлов бериш учун илмий ва инженерлик принциплардан фойдаланиш.

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

Биотехнология йўналишларининг вазифалари қуйидагилардир:

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

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



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

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

Биотехнологиянинг ривожланиш тарихи

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

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

Ўзбекистонда биотехнологияни фан сифатида икки йўналишини кўриш мумкин:

1. Ҳозирги замон биотехнологияси.
2. Классик биотехнология.

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

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

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

технологияси ишлаб чиқилиб, Ўзбекистон Республикасининг кўпчилик ёғ-мой экстракция заводларида лицензия асосида қўлланилмоқда.

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

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

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

Микробиология институти олими Ж.Тошпўлатов сомон ва ғўзапояни парчалашда «Триходерма ҳарзнанум" замбуруғи ферментларидан фойдаланиш мумкинлигини илмий асослаб берди. Бу технология қўлланилганда сомонда шакар миқдори 6-7% га етгани, витаминлар,

аминокислоталар пайдо бўлиб, сомонни озуқа бирлиги бир неча баробар ошганлиги исботлаб берилган.

Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиш тарихи

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

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

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

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

Ўзбек олимларидан Т.Г.Гуломова, З.Р.Ахмедова, С.М.Ходжибоева, З.Ф.Исмоилов, И.Ж.Жуманиёзов ва бошқалар мамлакатимизда микроб биотехнологиясининг ривожлантириш устида чуқур илмий ва амаллий ишлар олиб бормоқдалар. Шунингдек, марҳум профессорлар

М.М.Муродов ва Т.Ю.Юсуповлар олиб борган чуқур илмий изланишлар асосида катта илмий амалий назариялар яратилган.

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

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

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

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

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

3. Биотехнология фанинг ривожланиш истиқболлари ва муаммолари

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

Антибиотиклар ишлаб-чиқариш билан бир қаторда аминокислоталар, ферментлар, гармонлар ва бошқа физиологик фаол бирикмалар тайёрлаш технологияилари ҳам яратила бошланди. Бугунги кунда медицина ва қишлоқ хужалиги учун зарур бўлган аминокислоталар (айниқса организмда

синтез булмайдиган аминокислоталар), ферментлар ва бошқа физиологик фаол моддалар ишлаб чиқариш технологиялари йулга қуйилган.

Охирги 20-30 йилда, айниқса микроб оқсилини олиш технологияси ривожланиб кетди. Қишлоқ хужалиги учун ута зарур булган бу махсулотни ишлаб чиқариш билан бир қаторда ундан унумли ва оқилона фойдаланиш йуллари амалга оширилмоқда. Оқсил ишлаб чиқаришда ҳар хил чиқиндиларидан (зардоб, гушт қолдиқлари) ва парафиндан фойдаланиш мумкинлиги тасдиқланган. Ҳозирги пайтда бунинг учун метан ва метанолдан фойдаланиш мумкинлиги ҳам курсатиб ўтилган.

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

Микроорганизмлар фаолияти ва имкониятидан фойдаланиш, уларни ҳосилдор турларини (штаммаларини) яратиш билан боғлиқ. Бундай вазифани микробиологлар билан узвий ҳамкорликда генетиклар ва ген мухандислиги усулларидан хабардор булган бошқа мутахассислар амалга оширадилар. Микроб препаратларини ишлаб чиқаришни фаоллаштиришнинг яна бир йули икки ёки ундан ортиқ булган, бири-иккинчисини фаоллигини ошириб бераоладиган (симбиозда ишлайдиган) микроорганизмлар ассоциациясидан фойдаланишдир. Бу йул ҳозирги вақтда ферментлар, антибиотиклар, витаминлар ва метан гази олишда ҳамда оқова сувларни тозалаш жараёнларида кенг қулланилиб келинмоқда.

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

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

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

Назорат учун саволлар

1. Биотехнология фани нимани урганади ?

2. Классик биотехнология усулларини тушинтиринг?

3. Молекуляр биотехнологиянинг ривожланиш тарихи?
4. Биотехнология йўналишларининг вазифалари?
5. Биотехнологиянинг вазифалари?

2-МАЪРУЗА.
ФЕРМЕНТЛАР МУХАНДИСЛИГИ.(4С)

2.1 ферментларни олиш технологияси. Ўсимлик ва ҳайвон органларидан ферментлар ажратиб олиш усуллари. (2с)
2.2 ферментларни тозалаш. Биоспетсифик хроматография ва бу усулни ўта тоза ферментлар олишда қўллаш. (2с)

Режа:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Микробиологик усулда олинган ферментлар пластмасса ишлаб чиқаришда ҳам ўрин эгаллайди.

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

Озиқ-овқат саноатининг бир қанча тармоқларида (нон, пиво, вино, пишлоқ, крахмал ва шарбат экстракция қилувчи), ҳамда текстил, мўйна ва

микробиологик саноатларда, шу жумладан тиббиётда балласт моддалардан қисман ёки тўлиқ тозаланган, яъни фақат тоза фермент препаратлари ишлатилади.

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

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

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

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

Микроорганизм культураларини қуритиш учун тасмали, тоннелли, шахтали, барабанли, жавонли (шкафли) ва тебранувчан қуритгичлардан фойдаланиш мумкин. Ишлаб чиқаришда, юқорида қайд қилинганларига нисбатан кўпроқ тўғри йўналтирилган барабан типидаги қуритгичлар ишлатилади. Бунда хўл культура иссиқлик берувчи қурилма билан биргаликда 80-85^{o}C да қуритгичга тушади. Бундай юқори ҳароратда қуритилувчи хўл микроорганизмларнинг майда бўлакларидаги намни буғланиши ҳисобига қаттиқ қизиб кетиш ҳолати кузатилмайди ва ундаги ферментларнинг фаоллиги тўлиқ сақланади. Кўпчилик барабанли қуритгичларнинг ички томонида парраксимон куракчалар мавжуд бўлиб, бараба̀н 6-8 мин$^{-1}$ тезликда айланиши ҳисобига қуритилаётган материални бир текисда тарқалишини ва қуритилишини таъминлайди. Шунинг учун бундай типдаги қуритгичда қуритилган маҳсулот бутун массаси бўйлаб бир хил намликка эга бўлади. Ушбу қуритгичда микроорганизм бўлакчалари 3-7 мин. давомида қуритилади, берилаётган иссиқлик тезлиги 2-3 м/с, 80-85^{0}C ҳароратда ҳамда чиқишда эса 60-65^{o}C бўлади ва қуритилаётган материал ҳарорати 40^{0}Сдир. Қуритиш жараёнида атиги 3-10% гача фермент фаоллиги йўқотилиши мумкин.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Одатда ферментлар буғлантириш ҳароратига жуда таъсирчан бўлади. Шунинг учун қуюқлаштиришнинг асосий шарти паст ҳароратда қайнатиш ва жараённи қисқа муддатда олиб бориш билан бирга, буғлантирилаётган суюқликни қизиб кетиши ва ферментлар инактивацияга учрашини олдини

олишдир. Агарда қуюқлаштирилаётган эритма қанчалик тоза бўлса, шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутади ва ундаги фермент юқори ҳароратга жуда ҳам таъсирчан бўлади. Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган организм экстрактида жуда кўп миқдорда ҳимояловчи бирикмалар бўлади ва улар қуюқлаштириш жараёнида фермент инактивациясини олдини олади, лекин культурал суюқликни қуюқлаштиришда бунинг аксини кузатиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда фаоллигини йўқотади. Қуюқлаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бирмунча ўзгаради, қуруқ модда ҳисобига эса 11-20 %га камаяди ва қуюқлашган экстрактнинг pH кўрсаткичи ҳам ўзгаради. Продуцентнинг турига қараб уларнинг культурал суюқликлари ҳам ҳар хил кимёвий таркибга ва ферментлар комплексига эга бўлганлиги учун, вакуум-буғлантиришнинг ҳарорат режимлари тадқиқот йўли билан аниқланади.

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

Фермент эритмаларини мембраналар ёрдамида тозалаш Мембранали тозалаш усулига диализ ва электродиализ, баромембранали усулга эса қайтарилувчи осмос, ультрафильтрация, микрофильтрация ва нозик фильтрация кабилар киради.

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

$$Қ = Дд C \Delta C$$

Бунда, *Қ* – маълум вақт ичида мембранадан ўтган модда миқдори, *Дд* – диализ коэффициенти, *С* – мембрана сиртининг юзаси, *ΔС* – мембрананинг ҳар икки томонидаги моддаларнинг концентрацияси фарқи.

Диализдан фермент препаратларини кичик молекулали моддалардан тозалашда фойдаланилади. Масалан, фермент эритмаларини шакар, аминокислоталар, минерал тузлар ва бошқалардан 60-100% гача бўлган миқдорда тозалашга эришиш мумкин. Айниқса, ферментлар юқори концентрацияли тузлар билан чўктирилганда диализдан ва элетродиализдан унумли фойдаланиш керак. Лекин тўртламчи структурага эга бўлган

ферментларни ва металлоферментларни ажратишда электродиализдан фойдаланиш мумкин эмас, яъни фермент ушбу жараёнда ўз фаоллигини йўқотади.

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

Баромембрана усули ишлатиладиган мембраналар тирқишларининг катта-кичиклигига қараб синфланади. Масалан, қайтарилувчан осмос (≈3хИ0-4 мкм); гельфильтрация (15х10,5 мкм); микрофильтрация (0,2 мкм) ва нозик фильтрация (10 мкм) дир.

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

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

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

Маълумки, оқсилнинг гидрофоб гуруҳлари оқсил молекуласи ичида тўпланиб ҳаракат жойлашади. Оқсилнинг ҳар хил эритувчиларда эриш даражаси молекула сиртида гидрофоб ва гидрофил қолдиқларнинг тарқалиши билан белгиланади. Оқсилларни асосий эритувчиси бўлган сувнинг баъзи хусусиятларини (ҳарорат, рН, ион кучи, нейтрал тузлар, органик эритувчиларни ёки инерт бирикмаларни қўшиш йўли билан) ўзгартириш ҳисобига оқсил молекуласининг гидрат ёки сольват қатламига

таъсир қилиб агрегацияга учратиш ва чўкмага тушириш мумкин. Саноатда асосан органик эритувчилар ёки тузлар билан чўктиришдан фойдаланилади. Бу усуллар бир-биридан чўктириш механизми билан фарқланади.

Нейтрал тузлар ёрдамида чўктириш. Бу жараён асосан оқсил молекуласининг гидрофоблиги даражасига боғлиқ. Типик оқсил молекуласи сиртида бир қатор аминокислоталар (тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, метионин, валин ва фенилаланин) занжири шаклида ёпишган гидрофоб қисмларга эга. Оқсил молекуласининг гидрофоб қисми сув билан тўқнашганда сув молекулалари билан ориентирланган қават ҳосил бўлади ва шу жойлар «музлатилган» ҳолатда бўлади. Бундай тартибли структуралар термодинамик жиҳатдан чидамли эмасдир. Агар сув молекулаларини оқсил табиатига ўхшамаган моддалар билан иммобилизация қилинса, оқсил молекулалари ўзаро таъсирлашиб агрегатлар ҳосил қила бошлайди. Маълумки, тузларнинг ионлари гидратланади. Агар оқсил эритмасига маълум миқдорда сув қўшилса у сув билан боғланади ва сувдан бўшаган оқсил молекулалари агрегат ҳосил қилади. Туз ионлари қанча кўп бўлса, оқсилларнинг агрегатланиши ҳам шунча кучаяди ва чўкмага тушиши ортади.

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

Оқсилларни тузли эритмаларда эрувчанлиги Коннинг эмпирик тенгламасига бўйсунади:

$$лгC = лгC_o - к_c\mu$$

бунда C, C_o - оқсилнинг тузли эритма ва тоза сувдаги эрувчанлиги; $к_c$ – тузлаш константаси, μ – эритманинг ион кучи.

Тузлар билан чўктириш жараёнини унумли ўтказиш учун $к_c\mu$ кўрсаткичи иложи борича катта бўлиши керак. $к_c$ кўрсаткичи тузнинг табиатига боғлиқ бўлиб, водород ионлари концентрациясига боғлиқ эмас.

Ушбу жараён гидрофоб ўзаро таъсирга асосланган бўлсада унинг боришига таъсир қилувчи бошқа омиллар ҳам мавжуддир. Улар: муҳит pH и, ҳарорат. Фермент эритмаси тозалиги даражаси, жараённи ўтказиш муддати ва бошқалардир.

Туз билан чўктиришда асосан ишқорий металларнинг нейтрал тузлари ишлатилади. Ҳар хил ионларнинг чўктириш эффекти уларнинг ион кучига боғлиқ. Натрий тузлари анионларини тузлаш таъсири кучига қараб қуйидагича жойлаштириш мумкин: CO_4^{2-}>$Ч_3COO^-$>$Сл^-$>HO_3^->$Бр^-$>$Ж^-$>$СНС^-$, ҳамда катионларни эса қуйидагича $Ли^+$>Na^+>$К^+$>$(НҲ_4)^+$.

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

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

Нейтрал тузлар билан оқсилларни чўктириб фермент препаратларини олиш усуллари асосан чет элларда кенг тарқалгган.

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

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

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

Чўктириш учун ишлатиладиган органик эритувчи сув билан тўлиқ аралашиши ва фермент билан эса алоқада бўлмаслиги керак. Асосан бу жараён учун этил спирти, ацетон ва изопропил спирти кенг қўлланилса, метанол, н-пропанол, диоксан, 2-метоксиэтанол ва бошқа спиртлар, кетонлар, эфирлар ва уларнинг аралашмалари камроқ ишлатилади. Эритувчиларни танлашда уларнинг токсиклигига, портлаш хавфидан холислигига ва пегенерация бўлиш қобилиятига эътибор бериш керак. Ишлаб чиқариш учун энг яроқлилари бўлиб этил спирти ва изопропанол ҳисобланса, ацетоннинг

кўрсаткичлари эса сал пастроқдир. Булар орасида энг истиқболлиси изопропанолдир. Бу эритувчилар ёрдамида ферментларни комплексларга ажратиш ёки фракциялар ҳолида чўктириб олиш мумкин.

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

Фермент эритмаси ва эритувчининг ҳарорати фермент чўктириш жараёнида паст бўлишига ҳаракат қилиш керак. Спирт ва ферментнинг сувли эритмаси аралаштирилганда иссиқлик ажралиб чиқиши ва аралашма ҳарорати 5-10^0C га кўтарилади. Агарда спирт олдиндан совўтилган бўлмаса ферментларнинг инактивациясини кузатиш мумкин. Бу ҳодиса нафақат термоинактивацияга, ҳаттоки фермент молекуласини денатурациягача олиб келади.

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

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

Юқорида қайд қилинган омиллар қаторида фермент зритмаларини эритувчи билан алоқада бўлиш муддати ҳам катта аҳамиятга зга. Фермент саноатида тўхтовсиз ишлайдиган чўктирувчиларда ушбу вақтни жуда ҳам қисқартиришга эришилгандир, бу албатга фермент фаоллигини камайишини олдини олади.

Органик эритувчилар билан чўктириш самарадорлиги шу жараёнга мўлжаллланган ускунага ҳам узвий боғлиқдир. Бундай ускуналар асосан

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

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

Ферментларни тозалаш усуллари.

Ферментлар ва бошқа оқсил моддалари ҳар хил эримайдиган адсорбция (сурилиш) қобилиятига эга. Бу хусусият оқсил аралашмаларини бирикмаларга ажратишда ва айниқса ферментларни лаборатория шароитида тозалашда, ҳамда гомоген бўлган фермент препаратларини олишда ишлатилади. Адсорбция усули, шу билан бирга колонкали хроматография усуллари ферментларни юқори даражада тоза ва кўп миқдорда олиш имконини беради.

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

Ионалмашув хроматография усули. Бу усулда оқсиллар электростатик куч ёрдамида боғланадилар, яъни бу ҳодиса зарядланган оқсил сиртлари ва зарядланган ионалмашув бирикма гуруҳларининг зич қатлами ўртасида юзага келади. Типик ионалмашувчи сифатида бўктирилган диэтиламиноэтил (ДЭАЭ-) ёки карбоксиметил (КМ) целлюлозани кўрсатиш мумкин. Улар бўктирилган ҳолатда зарядли гуруҳларнинг 0,5 М концентрациясига зга бўлади. Бу зарядлап колонкада қапама-қарши бўлган ионларни (металл ионлари, хлор ионлари, буфер ва ҳ.к. нейтраллайди. Одатда оқсилнинг

умумий заряд белгиси ион алмашувчига ўтирган ион белгиси билан бир хил бўлади ва колонкадан ўтиш жараёнида айнан уни сиқиб чиқаради. Шунинг учун ҳам бу жараён хусусиятига қараб "ион алмашув" жумласи қўлланилади.

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

Иккинчи усул кенг миқёсда фойдаланилаётган калий ёки натрий хлорид тузлари ёрдамида градиент тузишга асосланган. Туз ионлари иштирокида мустақил оқсил на адсорбентлар ўртасидаги ўзаро тортиш кучи камаяди. Туз ионлари концентрациясини ошиши билан адсорбентга боғланган оқсиллар ўз ўринларини уларга бўшатадилар ва ўзлари колонкадан ювилиб чиқа бошлайдилар. Шу билан бирга туз ионлари таъсирида адсорбентлар ўзаро яқинлашиб оқсил ҳаракати учун тор йўлкалар ҳосил қилади ва бу ҳодиса ферментларни колонкадан чиқишида фракцияларга ажратиб олиш имконини беради.

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

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

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

Махсус ювувчилардан ёки жараён шароитлари фарқи асосида лигандни ферментга бўлган хусусиятини ўзгартириш йўли билан оқсилни десорбцияга

учратиб, тозалаш натижасида битта юқори тозаликка эга бўлган ферментни олиш мумкиндир. Лекин лиганд ва уни ушлаб турувчини танлаш жуда қийин вазифадир. Кўпчилик ҳолларда аффинли адсорбентларни синтез қилишда тозаланаётган ферментнинг хусусиятларини эътиборга олиш керак. Аффинли хроматография учун ҳар хил турдаги эримайдиган сорбентлардан фойдаланади, лекин энг кўп тарқалгани кўндаланг қилиб уланган агароза доначаларидир. Улар юқори босимда ўз шаклини сақлайди ва буферларни ҳамда эритувчиларни алмаштиришга бардошлидир.

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

*Гельхроматография усули***.** Гельфильтрация жараёнини амалга ошириш учун декстран асосида олинган геллардан фойдаланилади ва улар ёрдамида размерига қараб ҳар хил макромолекулаларни тез ажратиш мумкин. Гель очиқ ҳолдаги кўндаланг тикилган уч ўлчамли молекула тури бўлиб, колонкаларни осон тўлдириш учун юмалоқ доначалар (гранула) кўринишида бўлади. Доначаларда кичик тешикчалари бўлиб, уларга фақат жуда кичик молекулали бирикмалар киради ва йирик молекулалар эса кирмайди. Бу усул гелларнинг айнан шу хусусиятига асослангандир.

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

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

остида суюқ хроматография услуби қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охирги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

Назорат учун саволлар

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

3-МАЪРУЗА.
ФЕРМЕНТЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ. ИММОБИЛЛАШНИНГ ФИЗИК КИМЁВИЙ УСУЛЛАРИ.(6С)

3.1 иммобилланган ферментлар. Иммобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари.(2с)
3.2 қўлланиладиган ташувчилар турлари, табиий органик, аногранік ва синтетик усулда олинган полимерларни ташувчилар сифатида ишлатиш.(2с)
3.3 иммобиллаш жараёнига таъсир этадиган омиллар. Иммобилланган фермент хоссаларининг ўзгариши ва фермантлар барқарорлигини ошириш.(2с)

Режа:

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

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

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

Охирги 15-20 йиллар мобайнида кимёвий энзимологиянинг ривожланиши натижасида биологик катализаторларнинг янги типи – **иммобилланган ферментлар** яратилди. Маълумки тоза ферментлар, биринчидан, узоқ вақт сақланмайди, ҳамда турли таъсирларга, айниқса

иссиқликка чидамсиз, ҳамда иккинчидан, уларни қайтадан ишлатиш имкони йўқ. Иммобилланган ферментларнинг яратилиши билан саноат ишлаб чиқаришида тоза ферментлар фойдаланишда юзага келадиган қийинчиликлар бартараф этилди.

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

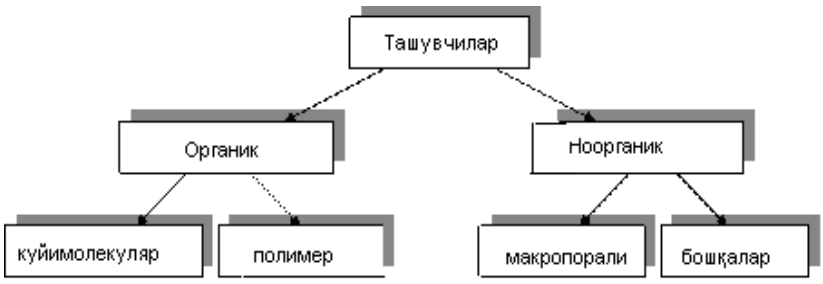
“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оқсил молекулари ҳаракатланиш эркинлигини исталган чекланишини англатади.

Ферментларни иммобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

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

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

Қуйидаги 1-расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



1-расм

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

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

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

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

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

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

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

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

Фермент ва ҳужайраларни фазовий тўрли структурали полиакриламид гелга киритиш методи ҳозирда кенг қўлланилмоқда. Полиакриламид гели кимёвий таъсиротларга чидамлидир. Полиамид ташувчи гуруҳи ҳам қизиқарлидир. Бу амид гуруҳи (-С(О)-НҲ-) қайтарилиб келадиган турли гетерозанжирли полимерлар гуруҳидир. Масалан, Н-винилпирролидон асосидаги полимерлар организмда секин парчаланадиган ферментларни

иммобиллаш учун ишлатилади. Бундан ташқари улар биологик инерт бўлганлиги учун тиббиётда ҳам ишлатилади. Камчилиги эса унинг организмда тўпланиб қолишидир. Бу жиҳатдан ферментлар таъсирида гидролизланадиган табиий полимерлар аҳамиятлидир. Шунинг учун длори воситаларига декстран, синтетик ташувчилардан Н-винилпирролидон асосида полимерлар қўшилади.

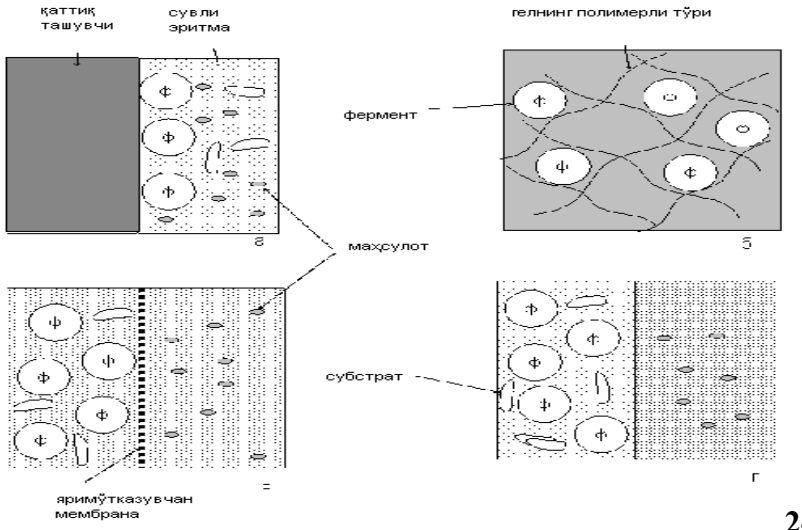
Ферментларни иммобиллаш методлари.

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

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

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

Бу усуллар қуйидаги 2-расмларда келтирилган.



2-Расм.

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

Адсорбцион иммобилизация ферментларни иммобиллашнинг қадимги усули бўлиб, унга 1916 йили асос солинган. Бу усул жуда осон ва у ферментнинг сувли эритмаси билан ташувчи орасидаги контакт ҳисобига амалга ошади. Адсорбцияланмаган оқсил ювиб ташлангандан сўнг фермент ишлатишга тайёр бўлади. Ташувчининг юзасида ферментнинг

адсорбцияланган молекуласи ташувчи ва оқсилнинг юзаки гуруҳларининг Ван-дер-ваальс ўзаро таъсирлашуви, водород боғлари, электростатик ва гидрофоб ўзаро таъсирлашувлар ҳисобига ушланиши мумкин. Ҳар бир боғланиш ташувчининг кимёвий табиати ва фермент молекуласининг юзасидаги функционал гуруҳларга боғлиқдир.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

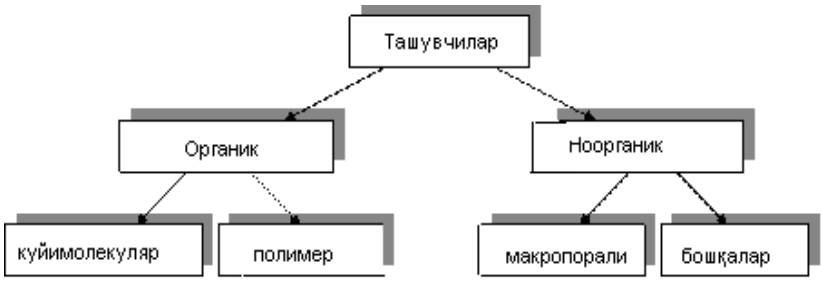
Ферментларни иммобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

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

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

- арзон нархда бўлишидир.

Қуйидаги расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



3-расм

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

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

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

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

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

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

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

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

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

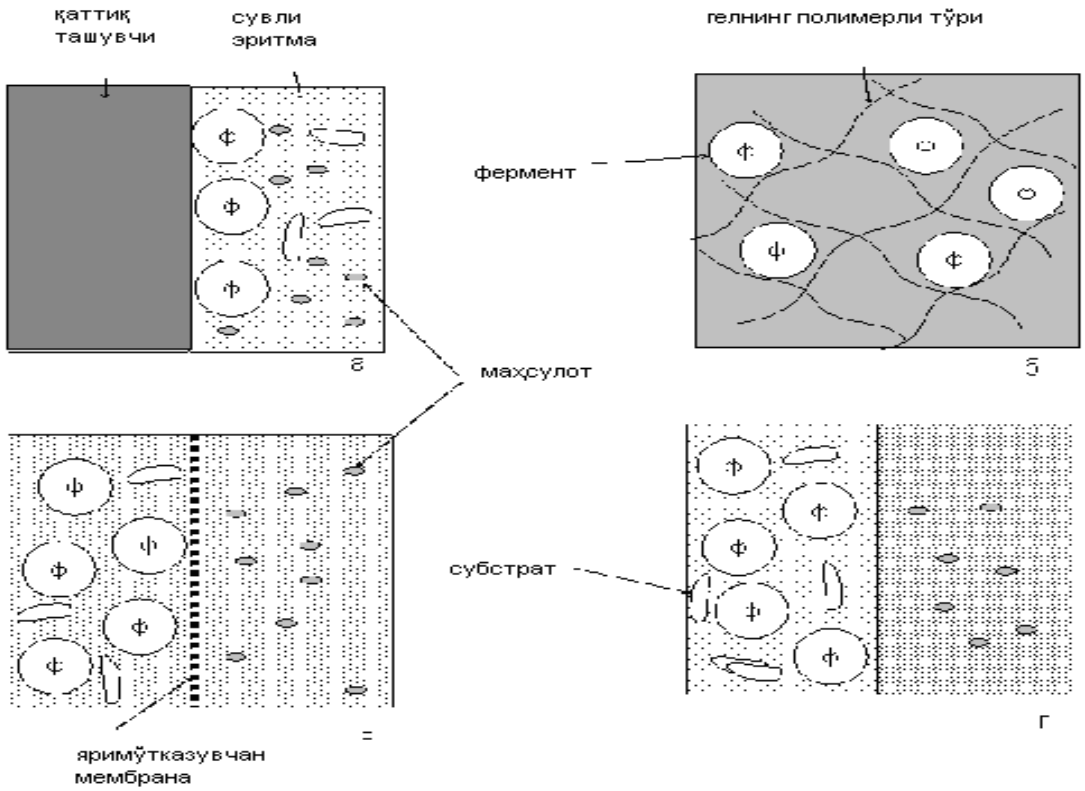
Ферментларни иммобиллаш методлари.

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

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

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

Бу усуллар қуйидаги расмларда келтирилган.



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

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

Ташувчи билан фермент ўртасидаги таъсир кучли бўлиб, биокатализаторнинг сорбцияси унинг структурасини бузиши мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик ҳужайраларини ситодекс гранулаларида адсорбцияланишида ҳужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг релефени такрорлаб деформацияланиши мумкин. Адсорбцион иммобилизациянинг афзаллиги унинг қулайлиги ва сорбентларнинг арзонлигидадир. Уларга исталган конфигурацияни бериш ва керакли даражада ғовак қилиш имконияти мавжуд. Энг муҳими - бу методнинг оддийлигидир. Адсорбцион

боғланишда ферментни тозалаш ҳам мумкин. Ушбу методнинг камчилиги ташувчи, ҳамда аниқ бир ферментни иммобиллаш учун оптимал шароитни тўғри танлай имконини берадиган умумий йўриқноманинг йўқлигидир.

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

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

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

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

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

Кимёвий метод билан иммобиллашда фермент молекуласи, хусусан оқсил, билан ташувчи ўртасида янги ковалент боғ ҳосил бўлади. Ушбу йўл билан иммобилланган ферментларнинг препаратлари 2 та муҳим ютуққа ега. Биринчидан, ташувчи билан фермент ўртасидаги ковалент боғ ҳосил бўлган конъюгатнинг мустаҳкам бўлишини таъминлайди, ташқи муҳит омиллари, масалан pH, ҳарорат ўзгарганда фермент ташувчидан десорбцияланмайди, олинаётган маҳсулотларни ифлослантирмайди. Бу еса тиббиёт ва озиқ

овқатга мўлжалланган жараёнларни амалга оширишда жуда муҳим. Иккинчидан, ферментларни кимёвий модификациялаб уларнинг каталитик фаоллиги, барқарорлиги каби хоссасини ўзгартириш мумкин. Бунда ферментнинг фаол марказини иложи борича сақлаб қолиш керак.

Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллаш

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

Иммобилланган ҳужайралар иммобилланган ферментлар, ҳамда эркин ҳужайралардан ҳам бир қатор афзалликларга эгадир. Булар қуйидагилардир:

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

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

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

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

Физикавий методлардан адсорбция ва агрегациядир.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иммобилланган ҳужайралар бир қанча афзалликка эга:

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

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

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

4. Каллус ва суспензион культуралар ўстирилаётган муҳитни ўзгартиришда уларни зарарлаш ёки культурани ифлослантириш мумкин. Бу қийинчиликларни физик жиҳатдан ҳаракатсиз ҳужайралар атрофидаги катта ҳажмдаги озуқа муҳитини циркуляция қилиш билан бартараф этилади.

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

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

Иммобилланган ҳужайралар культурасини олиш 2 хил системада амалга оширилади:

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

Иккала системада ҳам суюқ муҳит ҳаракатсиз ҳужайралар атрофини циркуляциялайди.

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

"Ҳужайра-тутувчи" контакти қутбли ва ионли ўзаро таъсири, дисперсион таъсир остида адсорбсияда кучли бўлади.

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

Аминосилазани саноатда Л- ва Д аминокислотаси аралашмасини ажратишда адсорбсияланади.

Керамика ва бошқа тутувчиларда адсорбсияланган ачитқи ҳужайралари, еркин ачитқи ҳужайраларидан кўп нафас олиш активлигига ега. (В. Вожтисеҳ, В. Йирҳу, 1984).

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

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

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

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

Биокатализаторни тутувчи билан мустаҳкам химиявий тикилишига келадиган бўлсак, бу усул назарий тадқиқотлар билан боғлиқ узун тарихга ега. У кўп сонли модифинансияларни имконини беради. Дярли барча оқсилларни функсионал гуруҳлари биокатализатор ва тутувчини топиши учун қўлланилиши мумкин. Қисман кенг биокатализатор амино гуруҳи ва тутувчи корбанси гуруҳи орасида пепдид баъзилар ҳосил бўлишига олиб келадиган реаксиялар қўлланилади. Реаксия учун сувни тортиб олувчи агент керак. Уларга сулфихролид, гидрозин ва бошқалар киради. Улар биокатализатор ва тутувчи орасидаги турли боғлар ҳолсил қилади.

Мисол учун биронсиан ва Сл-С-О-$Ч_2$-$Ч_3$ гидрооксин ва аминогуруҳни тикади. Тутувчи ва биокатализатор орасида тикувчи агентларсиз реаксиялар ўтказилади. Бу хилдаги реаксиялардан бири тутувчининг химиявий структурасида О=С-О-С=О гуруҳ борлигига боғлиқ. Бу хилдаги реаксияларни амалга ошириш учун сикинлашган материалларга малеин ангидрид тутувчи қўшимча структуралар қўшилади. Шу усул билан буқани сыворотка албумини глюнооксидаза ишқорли фазфатаза Бациллус стеротҳермопҳилус ҳужайраси омадли иммобилизасияланади.

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

Биокатализаторнинг тутувчига химиявий бириктиш йўли билан иммобилизасияси юқори эффективлиги билан ажралиб туради. Иммобилизасияни фермент активлигига

таъсири турлича ва фермент структурасини ўзгариши учун уни корформасияси субстрат кириши учун дифузион чиксаниш билан белгиланади. Диффузион қийинчиликларни камайтириш мақсадида биокатализаторни айрим ҳолларда тутувчи молекуласи таркибидан чиқарилади. Уни спайсер орқали тутувчига тикилади. Мисол учун сефарозони галатозилтрансджраза иммобилазисиясидан тутувчи ва фермент орасида - $Ч_2НҲ$ $(Ч_2)_5СО$- кетма-кетлиги қўшади (Д. Г. Демеррс, С.С. Wонг, 1989).

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

Тикувчи агенциз қўлланиладиган асосий ҳол сифатида ҳужайраларни полимер серканигидрооксиди титан, олова ва темир тутувчиларда иммибилизасияланади. (В. Вожтисеҳ, В. Йирҳу, 1984). Гидроогкид гуруҳлар ҳужайра деворини у ёки бу метал функсионал гуруҳлари кординасион сферасидан чиқарилади. Тутувчи ва биокатализатор орасида кординасион ёки ковалент боғ ўрнатилади.

Ферментлар ва ферментлар системаси амалий фаолиятнинг ҳар хил сохаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат сохаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органиқ синтез, кимиёвий тахлил ва. хзо. Шунга қарамасдан амалий ензимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жахон бозорида жуда қиммат еди. Микробиологиянинг ривожланиши натижасида ферментларни керакли миқдори ишлаб чиқариш мумкин бўлди. Ферментларнинг қўлланилишини яна 2та сабаб қийинлаштиради. Биринчидан - ферментларни сақлаш қийин ва ҳар хил таъсирлар, айниқса иссиқликка чидомсиз. Иккинчидан, ферментлардан кўп маротаба фойдаланиш, уларни реагентдан ва реаксия маҳсулотларидан ажратишнинг мураккаблиги натижасидадир. Лекин хозирги шунда бу муаммолар хал қилинган.

Иммобилизасияланагн ферментларнинг яратилиши натижасида амалий ензимология олдида янги принсипиал истиқболлар очилди. Дж. Нелъсон ва Э. Гриффин 1916 йилдаёқ кумирда адсорбсияланган (яъни иммобилизасияланган) инвертаза каталитик фаоллигини сақлашини аниқладилар. 1936 йилда Дж. Пфанмйўллер ва Г.Шлейх ёгоилик кипигида адсорбсияланган протеолитик ферментлар (терини ошлашда ишлатилади) га патент олдилар. Ферментлар билан ташувчиларининг мустахкам конъюгатлари 1953 йилда Н.Грубхофер ва Д. Шлейт томонидан олинди.

Ферментларни ташувчиларга бириктириш натижасида гетероген катализаторлар яратилиб уларга 1971 йилда иммобилизасияланган ферментлар деб кам берилди. Унинг маъноси анча аниқ бўлиб, бу фермент препаратларининг еримайдиган ташувчиларга бириктиришдир. Лекин иммобилизасия тушунчасини анча кенгтушуниш керак: бу оқсилл молекуласининг (ёки унинг франгментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. еримайдиган ташувчига бириктиришдан ташкари буни оқсил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки молекулалар ўртасидаги боглар қуйи молекуляр бифунксионал реагентлар ёки ферментни ерувчи полимерга бириктириб еришиш мумкин.

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

Учинчидан: ферментнинг иммобилизасия ва модификасияси катализатор хусусиятини мақсадга мувофик ўзгаришига олиб келади каталитик активлигининг пҲга, ион таркибига ва муҳитининг бошқа параметрларига богликлиги, унинг ҳар хил денатурасияловчи таъсирларга нисбатан баркаролигини таъминлайди.
Туртинчидан: ферментларнинг иммобилизасияси уларнинг каталитик активлигини ташувчи хусусиятларига ҳар хил физик омиллар таъсир еттириб (нур. товуш) бошқариш мумкин. Бу асосда механо ва товушга сезгир датчиқлар, паст

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

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

Кўпчилик алкоголли ичимликлар бошоқли ўсимликларнинг уруғини ёки бошқа крахмал сақловчи маҳсулотларни қайта ишлаш орқали тайёрланади. Россия, Голландия, Олмония, Полша, Скандинавия мамлакатлари ва бошқа кўпгина мамлакатларда пиво ва бошқа бақувват ичимликларни бошоқлардан тайёрлаш анъанага айланган. Европанинг жанубий мамлакатлари: Испания, Италия, Франсия, Гресия, Югославия (собиқ), Грузия, Арманистон, Молдова – бундай ичимликларни асосан узумдан тайёрлашади. Ҳар хил қувватга ега бўлган ичимликларни ҳар хил мевалар (олма, олхўри, тут меваси, шафтоли, тропик ва субтропик ўсимликларнинг мевалари) ва асалдан тайёрлаш ҳам анъанага айланиб бормоқда.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Дистиллясия – ***бу етил спиртни консентрасия қилиш ва унинг тоза фраксиясини ажратишдир***. Мана шу босқич кенг маънода алкоголли ичимликларнинг сифатини белгилаб беради.

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

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

Ферментланган, дистилланмаган алкоголли ва алкоголсиз ичимликлар

1-жадвал.

Субстрат	Ичимлик	Ишлаб чиқарадиган мамлакатлар
Бошоқлилар, арпа (крахмал)	Пиво Эл	Марказий Европа Белгия, Германия, Канада
Арпа, шоли, жавдар, шакар лавлаги	Квас	Россия, Украина, Германия
Просо	Боуза Тумба	Украина Индия
Шоли, мевалар, узум, чиқиндилари (грапагача)	Водка Саке Сонт	Яқин шарқ, Хиндистон, Россия, Италия, Грузия Япония. Хиндистон.
Шоли	Ганг-чу	Хитой

Узум	Вино	Яқин шарқ. Европа, Хитой, Австралия, Жанубий Америка, АҚШ, Марказий Осиё.
Олма	Сидр	Буюк Британия, Франсия.
Асал		Буюк Британия, Россия.

Ферментланган қувватли ичимликлар

2-жадвал

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

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

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

$$CO(НҲ_2)_2 + ҲОҲ = CO_2 + 2НҲ_3$$

$$CO_2 + 2НҲ_3 + ҲОҲ = (НҲ_4)_2CO_3$$

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

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

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

Соя уруғидан уреаза ферменти екстрактини ажратиб олиш. Қуруқ соя уруғини яхшилаб янчиб майдаланади ва кўп карра петролей ефири билан ишлов берилиб, ёғидан холис қилинади. Соянинг ёғсизлантирилган уни ҳаво ҳароратида филтр қоғози устида қуритилади ва унга 5 ^{0}C да беш ҳажм бирлигида дистилланган сув қўшилади. Аралашма сентрифугаланади ва ҳосил бўлган сентрифугатнинг таркиби айнан уреаза ферментли екстракт ҳисобланади.

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

Ферментларнинг термолабиллиги ва пҲ кўрсаткичларининг ферментататив реаксияга таъсири

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

Ферментатив реаксияларнинг термолабиллигини аниқлаш

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

Уччала пробирка ҳам 20-25 минутга 37 ^{0}С ли термостатга жойлаштирилади. Пробиркалар термостатдан шиқарилиб, муз солинган идишга ўтказилиб совитилади ва уларнинг ҳар бирига 1-2 томчи ёднинг калий ёддаги еритмасидан томизилади. Бунда биринчи пробиркадаги крахмалнинг парчаланиши юз бериши туфайли ёд еритмаси билан кўк ранг ҳосил бўлмайди. Иккинчи пробиркада сўлак таркибидаги амилаза фаолсизланганлиги туфайли реаксия юз бермаганлиги, яъни ранг ўзгармаганлиги, учинчи пробиркада муҳит нордон бўлганлиги сабабли реаксия секинлашганлиги кузатилади. Демак, иккинчи ва учинчи пробиркалар ёд ва калий ёдли аралшма таъсирида кўк рангга бўялади.

Ферментатив реаксия тезлигига ҳароратнинг таъсирини аниқлаш

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

Кейин ҳамма пробиркалардаги аралашмаларга 3-4 мл дан 1 н $Ҳ_2CO_4$ қўшилади ва совитилади. Уччала пробиркаларга ҳам ёднинг калий ёдли еритмасидан 2-3 томчи томизилади. Бунда иккинчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши ниҳоясига етади ва ранг ҳосил бўлмайди, биринчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши қисман юз бериб

қизғиш ранг ҳосил бўлади, учинчи пробиркада крахмал умуман парчаланмайди ва кўк ранг ҳосил бўлади.

Ферментатив реаксиялар тезлигининг фермент консентрациясига боғлиқлигини аниқлаш

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

Сўлак амилазаси фаоллигига фаолловчилар ва ингибирловчиларнинг таъсирини ўрганиш

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

***Иш тартиби*:** Учта пробирка олиб, уларга 5 томчидан 0,5 % ли крахмал еритмасидан томизилади, биринчи пробиркага 10 томчи дистилланган сув, иккинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли HaCL эритмаси, учинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли $CuCO_4$ еэритмаси томизилади, ҳаммасига 5 марта суюлтирилган сўлакдан 10 томчидан қўшиб, яхшилаб аралаштирилиб, хона ҳароратида қолдирилади. 5 минутдан кейин уччала пробиркага ҳам 10 томчидан дистилланган сув, 1-2 томчидан 0,1 % ли ёд еритмасидан солиб аралаштирилади, уларнинг устига тажрибадаги уччала пробиркадаги аралашманинг ҳар биридан 2-3 томчидан алоҳида пробиркаларга томизилади. Ёд билан қилинадиган реаксия 10-15 минутда яна такрорланади. Биринчи пробиркадаги суюқлик бинафша ёки қизил рангга, иккинчиси қизил ёки сариқ, учинчиси еса кўк рангга киради. Демак, иккинчи пробиркада крахмал яхшироқ гидролизланган, учинчисида умуман гидролиз кетмаган. Иш натижаси жадвалда (4-Жадвал) қайд қилинади.

3-жадвал

Амилаза фаоллигига фаолловчи ва ингибирловчиларнинг таъсири

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

Статистик усул енг осон йўл бўлиб "ташувчи" фермент еритмасига ташланиб (солиниб) ҳосил бўлган аралашма, маълум вақтга ташлаб қўйилади. Иммобилизасия ферментни ўз ўзидан диффузияси туфайли бошланиб, адсорбсия билан тугалланади. Бу усулни камчилиги, фермент еритмаси билан "ташувчи" аралашмаси узоқ вақт (бир неча кунга) ташлаб қўйилиши лозим. Лаборатория шароитида кўпроқ аралаштириш усули

ишлатилади. Бу усулда статистик усулдан фарқли ўлароқ фермент еритмаси билан "ташувчи" доимий равишда аралаштириб турилади.

Аралаштириш учун магнит аралаштиргич, механик аралаштиргич ёки микробиологик тебратгичдан фойдаланиш мумкин. Бу усул олдингисидан анча устун туриб "ташувчи" сатхида ферментни бир текис жойланишини белгилаб беради. Баъзида адсорбсион иммобилизасия қилиш учун електрочўктириш усулидан фойдаланилади. Бунинг учун фермент еритмасига иккита електрод туширилади, улардан биттасини сатхида бир қатлам "ташувчи" суртилган бўлади. Электродлар токка уланганда фермент сатхидаги фаол гуруҳлар (-НҲ2; -СООН ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган електрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатхида чўкади.

Технологияда фойдаланиш учун енг қулай усул - колонкалардан ўтказиш усулидир.

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

Фермент ва "ташувчи" орасидаги адсорбсион ўзаро таъсирнинг табиати

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

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

Ферментлар адсорбсиясига таъсир етувчи омиллар

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

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

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

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

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

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

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

Назорат саволлари

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

4-МАЪРУЗА.

ФЕРМЕНТЛАР ИШТИРОКИДАГИ ТЕХНОЛОГИК ЖАРАЁНЛАР.(4С)

4.1. Амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш. Глюкоза-фруктозали шинни олиш.

4.2 амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш. Лактозасиз сут олиш. Сут зардобидан шакарсимон моддалар олиш. Крахмал ва селлюлозани ферментлар ёрдамида парчалаш.

Режа:

1. Амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш
2. Глюкоза-фруктозали шинни олиш
3. Ферментларини саноат қўлланиши
4. Қишлоқ-хўжалиги қўлланиши
5. Медицинада қўлланиши.
6. Ферментлар ингибиторлари
7. Биотехнологияда ферментларни аҳамияти

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

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

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

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

Ферментлар саноатда биологик ҳом-ашёни ишлашда (нон ёпиш, вино, пиво пишириш, пишлок тайёрлашда , чой, тамаки, тери ва муйнага ишлов

беришда, кулинарияда -гўштни юмшатишда) кенг қўлланилади.

Кейинги вактларда оксидланиш, кайтарилиш, дегидратация конденсация, декарбоксилланиш реакцияларини бошқариш учун ҳам қўлланилмокда.

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

ФЕРМЕНТЛАРНИ ТИББИЁТДА ҚЎЛЛАНИШИ

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

Ферментларни медицинада қўлланишини теоретик асослари чексиздир.

***Ферментлар медицинада 5 йўналишда қўлланилади*:**

5-расм

ЭНЗИМОПАТОЛОГИЯ

• *Энзимопатология* медицина энзимологиясини *теоретик ва фундаментал қисми* ҳисобланади.

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

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

• Касалликларда ферментлар фаоллигининг ўзгариши қуйидаги омилларга боғлиқ бўлади:

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

• Ферментлар биосинтезини пасайтирувчи токсик омиллар.

• Алиментар омиллар (витамин, оқсил, микроэлементларнинг етишмаслиги, овқат рационида ўзгаришлар).

• Ферментатив жараёнларнинг хужайра ичидаги содир бўлишининг бузилиши.

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

• Юрак қон-томир касалликлари, онкологик патология, диабет, хомиладорлар токсикози, асаб касалликлари патогенезида аъзо ва тўқималардаги оқсил, нуклеин кислота, углевод, липид, аминокислоталар биокимёвий ўзгаришларининг бузилиши ётиши исботланган. Панкреатит, куйиш травмаси, нефроз, аллергик ва бошқа касалликларда калликреин-кинин системаси функциясининг бузилиши аниқланган.

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

6-расм

ИРСИЙ ЭНЗИМОПАТИЯЛАР

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

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

• Тери касаллик белгилари юздаги кулранг аралаш жигарранг доғлар, бўғинлардаги тоғайлар сариқ-бинафша рангга киради, қулоқ супраси ва бурун тоғайлари қораяди, бўйинда, кафтда, кўз, лаб ва қоринда доғлар пайдо бўлади. Алкаптонуриянинг типик белгиларидан бу қулоқнинг қалинлашиши ва кулранг аралаш ҳаворанг бўлиши. Бу касаллик 1:250 минг, 1:1 млн. нисбатда учрайди. Германия, Чехия, Славакия, Хиндистон ва АҚШ да эркаклар орасида учрайдиган касаллик.

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

• ФКУ – Фенилкетонурия. Бунда фенилаланин-гидроксилаза ферменти етишмайди. Бунинг натижасида фенилаланинни тирозинга айланиши бузилади ва организмда тўпланиб қолади. Касалликда неврологик симптомлар пайдо бўлади, тери ва органлар томонидан ўзгаришлар пайдо бўлади. Бола ўз тенгдошларилан оркада қолади ва унда психиканинг ва

интелектнинг бузилиши кузатилади. Сийдикда фенилпируват хисобига ўзига хос сичқон хид бўлади. Болалар сочи малла териси оқиш, кўзлари мовий, кўпинча экзема, дерматитлар кузатилади, вазни тез кўшилиб боради, лекин болалар кам харакатли, катта ликилдоги тез битади.

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

- *Энзимодиагностика* –касалларни биологик суюқликларида (*қон сивороткаси, ошқозон ости бези соки, орқа мия суюқлиги, сийдик ва б*.) фермент ва изоферментлар активлигини аниқлашнинг *замонавий ферментатив диагностик тестлари яратиш* билан шуғулланади.
- Изланишлар икки йўналишда олиб борилади.
- *Биринчиси,* бутун организм, органлар системаси ва айрим органлар учун *специфик органатроп ва тўқиматроп ферментларни аниқлаш* бўлса,
- иккинчиси, биомуҳитларда *ферментлар активлигини аниқлаш методларини мукаммаллаштириш* билан шуғулланади.
- Қон плазмасининг фермент таркиби соғлом организмда доимий бўлиб, айрим патологик холатларнинг вужудга келишида сезгир ва нозик индикатор бўлиб хисобланади. Турли холатларда кузатилади:
- гиперферментемия
- гипоферментемия
- дисферментемия
- Ташхиснинг ферментатив усуллари ишончли ферментатив усуллар бўлиб, шифокорга қийин холатларда тўғри қарор қабул қилишга ёрдам беради.
- Ферментатив анилиз нозик анализ бўлиб, бошқа диагностик тестлардан қолишмайди. Шунинг учун хозирги вақтда қон плазмасидаги ферментларнинг фаоллигини аниқлашдан касалликларни ташхис қилишда кенг фойдаланиқлмоқда. Хозирги вақтда ферментатив анализ автоматлаштирилган ва махсус аппаратларда ўтказилади. Бундай аппаратларга «Техникон», «Лаб-система» ва бошқалар кириб, иш куни давомида 200 гача текширувларни ўтказиш мумкин. Ташхиснинг ферментатив усуллари бошқа ташхис усулларидан фарқли равишда специфик бўлиб, касалликнинг турли босқичларида фойдаланиқлади.
- Бу усуллар қондаги фермент спекторларининг юқори даражадаги аъзога нисбатан спецификлиги каби афзалликларга эга.
- Қонда қатор ферментлар фаоллигининг ортиши хаёт учун мухим бўлган аъзоларнинг оғир жарохатланиши, хужайраларнинг ҳалок бўлиши, мембраналар ўтказувчанлигининг бузилиши хақида хабар бериши мумкин. Бундай ферментларга: ЛДГ, бетта-оксибутиратДГ, изоцитратДГ, МДГ, альфа-глицератдегидрогеназа, фосфогексоизомераза, 1,6-фруктозодифосфатаза, АсТ, АлТ, ва бошқалар киради:
- Хозирги вақтда айрим касалликларнинг ишончли фермент симптомларини аниқлашга имкон бўлмоқда. Масалан, ўткир гепатитлар АсТ и АлТларнинг фаоллиги ошиши билан характерланади.

• Механик (обтурацион) сариқлик учун ишқорий фосфатаза, аминотрансферазалар фаоллигининг ошиши хосдир.

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

ЭНЗИМОТЕРАПИЯ

• Энзимотерапия- бу ферментларни доривор моддалар сифатида қўллашдир.

• Энзимотерапия қуйидаги йўналишлар бўйича актив ривожланмоқда:

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

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

ФЕРМЕНТЛАРДАН КАСАЛЛАРНИ ДАВОЛАШДА ФОЙДАЛАНИШ

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

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

• Қон ва бошқа суюқликларда фермент етишмаганлигида фермент препаратлари юборилади.

• Томирлардаги тромбларни эритиш учун (инсульт, ИБС, инфаркт миокардда) протеолитик ферментлардан фойдаланиқлади: фибринолизин, бриназа, бринолаза (актиномицетлардан), стрептокиназа ва урокиназа.

• Зарарли ўсимталарни комплекс даволашда. Масалан аспарагин лимфобласт лейкозларни даволашда қўлланилади (бу хужайралар аспарагиннинг етишмаслигига сезгирдирлар, чунки аспарагинсинтетаза ферментини сақламайдилар).

Ферментлар ингибиторлари

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

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

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

Назорат учун саволлар

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

5- МАЪРУЗА.
ГЕН МУХАНДИСЛИГИ. (6 С)

5.1 организм (ин виво) ген инженерлиги. Генлар тузилиши ва экспрессиянинг бошқарилиши. Ген мухандислигида қўлланиладиган ферментлар рестриктазалар. Рестриктсия ва модификатсия тизимлари.(2с)
5.2 ген инженерлигида қо`лланиладиган ферментлар. Рестриктазалар.
5.3 плазмидалар ва вируслар вектор сифатида. Плазмидаларнинг автоном репликатсияга учраши.

Режа:

1. Организм (ин виво) ген муҳандислиги
2. Ген тузулиши ва экспрессиясининг бошқарилиши.
3. Кодланган ва кодланмайдиган нуклеотидларнинг жойлашиши.
4. Интронлар
5. Транспозонлар
6. Генларнинг тузилиши: интронлар ва экзонлар
7. Рестриктазалар ва уларнинг таснифи.
8. Рестрикцися ва модификация тизимлари
9. ДНК полимеразалари ва уларнинг турлари
10. Праймерлар. ДНК лигазалар
11. Векторларнинг умумий хусусиятлари
12. Плазмидалар.
13. Микроорганизмлар иштирокида бирламчи ва иккиламчи метоболитлар ишлаб чиқариш

Таянч сўзлар: ДНКнинг тузилиши, ДНК синтези, репликация, трансляция, транскрипция, полимеразалар, генларнинг тузилиши. ДНК фрагментлари, ген муҳандислигининг ферментлари,

микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар, ингибиторлар, маркерлар, изошимеразалар

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

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

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

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

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

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

Эукариотлар ҳужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан овальбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информацион РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872та нуклеотидан1158 тасигина оқсилнинг 386та аминокислотасини кодлаши, шу билан бирга 5ъ-учдаги 64 та нуклеотид ва 3ъ-учдаги 650 та нуклеотид трансляцияланмаслигини аниқланган. и-РНКдан овальбумин генига мос келувчи ДНК нусхасини олиб уни плазмидага жойлаштирганлар ва уни *Э.цоли* ҳужайрасида клонлаштирганлар. Франциялик олимлар эса ДНК нусхасини рестриктазалар ёрдамида парчаланмаслигини аниқлаганлар, чунки улар ушбу ферментлар танийдиган 6 та нуклеотидли ДНК кетма-кетлигини ўзида тутмаганлар. 1977 йили франциялик олимлар овальбуминнинг информацион РНКси билан

транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фараз қилганлар. Геннинг узлукли тузилиши кейинчалик бошқа генларда ҳам кузатилган.

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

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

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

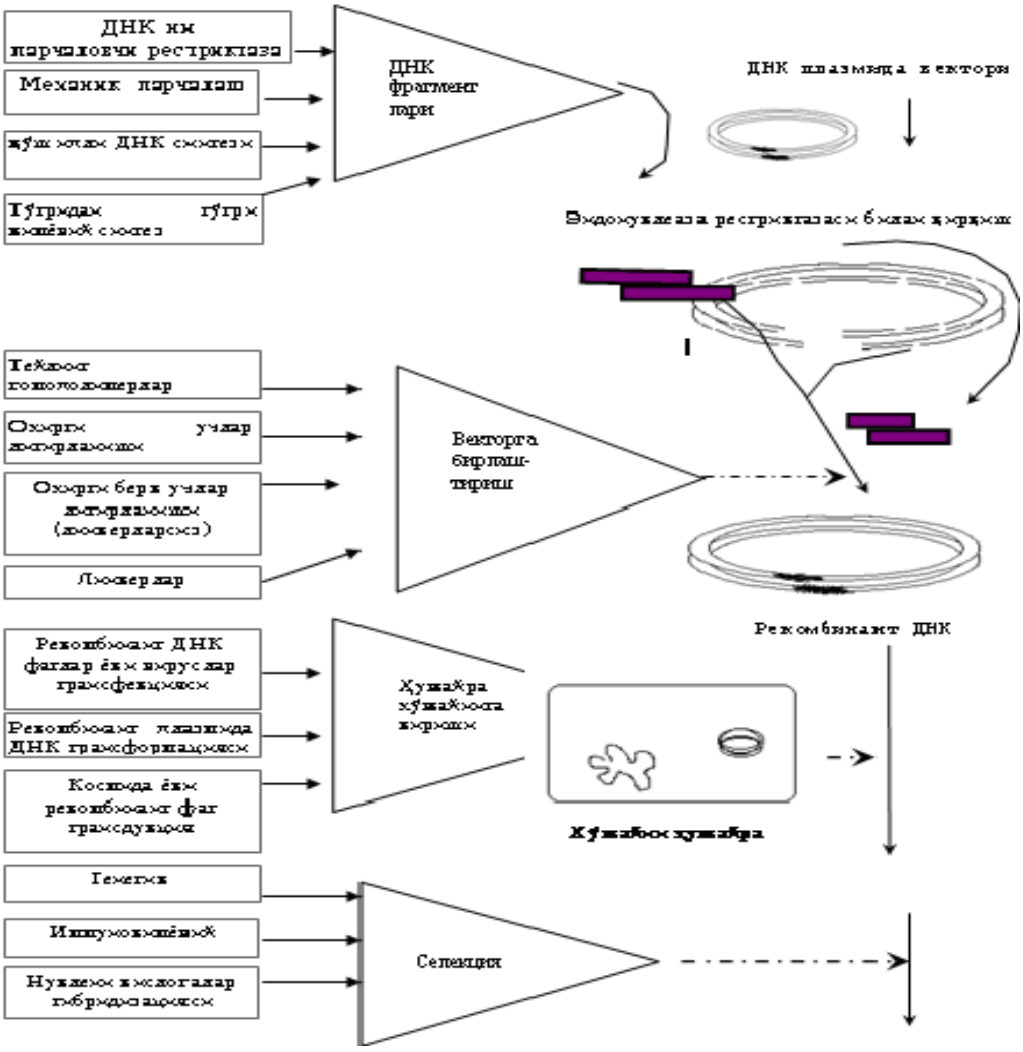
Транспозонлар

Транспозонларнинг кашф этилиши генетик мухандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлди.

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

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

Транспозаза ферменти ҳужайрадаги ДНК молекуласини " ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесади ва айни пайтда транспозон учларига қовуштиради. Ҳосил бўлган хромосома ДНКси ва транспозон ДНКсидан иборат қовушма ҳужайра ДНК бўлакларини боғловчи фермент лигаза таъсирида ўзаро боғланади. Транспозонларнинг ҳужайра ДНКсига интеграцияси қуйидагича амалга ошади.
(7-расм)



7-расм

Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

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

Микроорганизмлар асосида биотехнологик жараёнлар яратиш усуллари

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

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

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

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

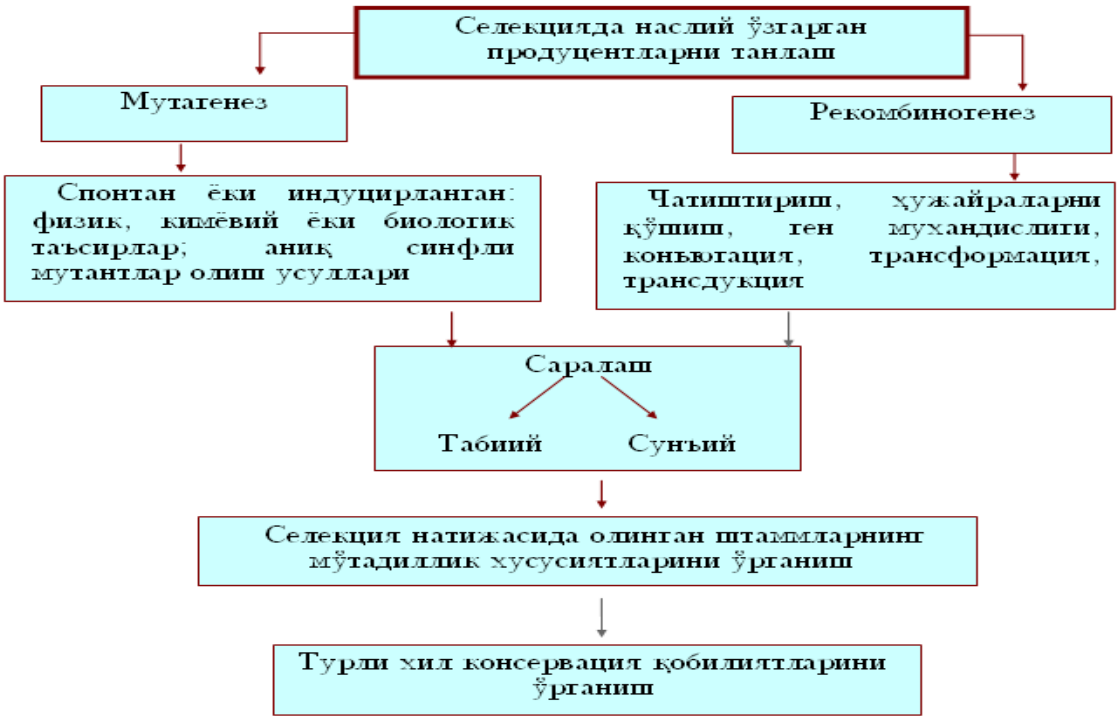
✓ ***юқори ҳосилдорлиги.***

2. Продуцентларни яратиш усуллари

Микроорганизмларнинг табиий штаммларини ҳосилдорлиги кўпинча талаб даражасидан паст бўлади.

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

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



8-расм. Микроорганизмлар селекцияси

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

Кўпинча трансдукция (бактерия вируслари-бактериофаглар ёрдамида бир бактериядан бошқа бактерияга генлар ўтказиш) ва амплификация (керакли генларни нусха сонини кўпайтириш) усулларидан кенг фойдаланиш орқали ҳар хил физиологик фаол моддалар синтез қилувчи ҳосилдор штаммлар яратилган. Кўпгина микроорганизмларда антибиотик синтез қилувчи генлар ва уларни бошқарувчилари хромосомаларда емас,

балки плазмидаларда (хромосомадан ташқаридаги ДНК) жойлашган бўлади. Бундай пайтда амплификация орқали ҳужайрадаги плазмидалар сонини кўпайтириш орқали штаммларни ҳосилдорлигини ошириш мумкин.

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

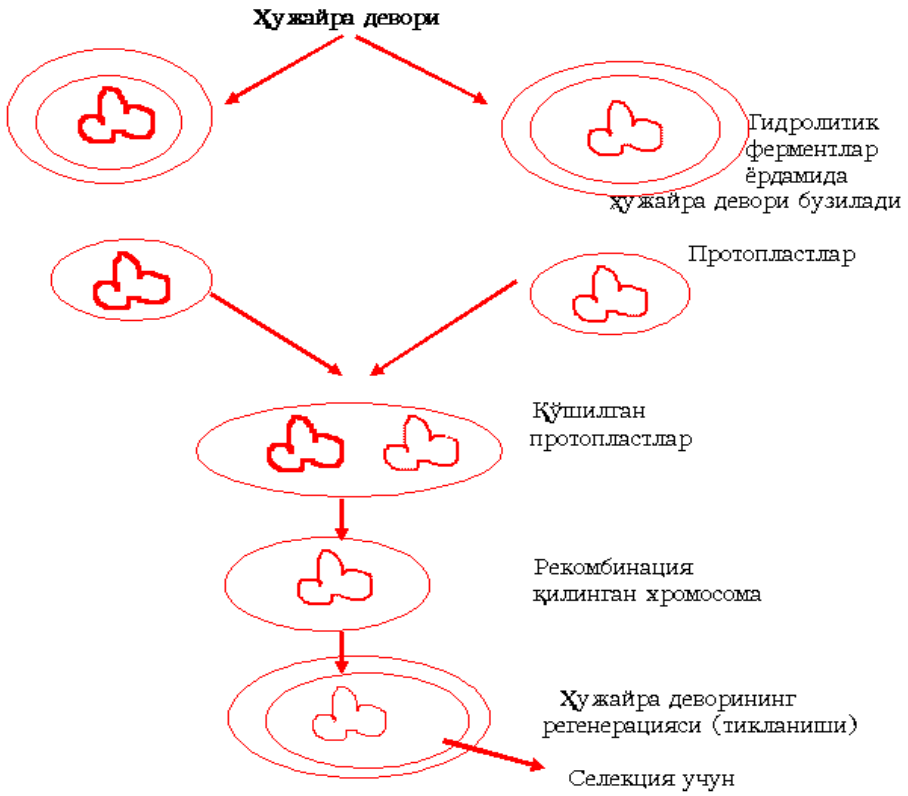
9-расм. Генларни клонлаш стратегияси

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

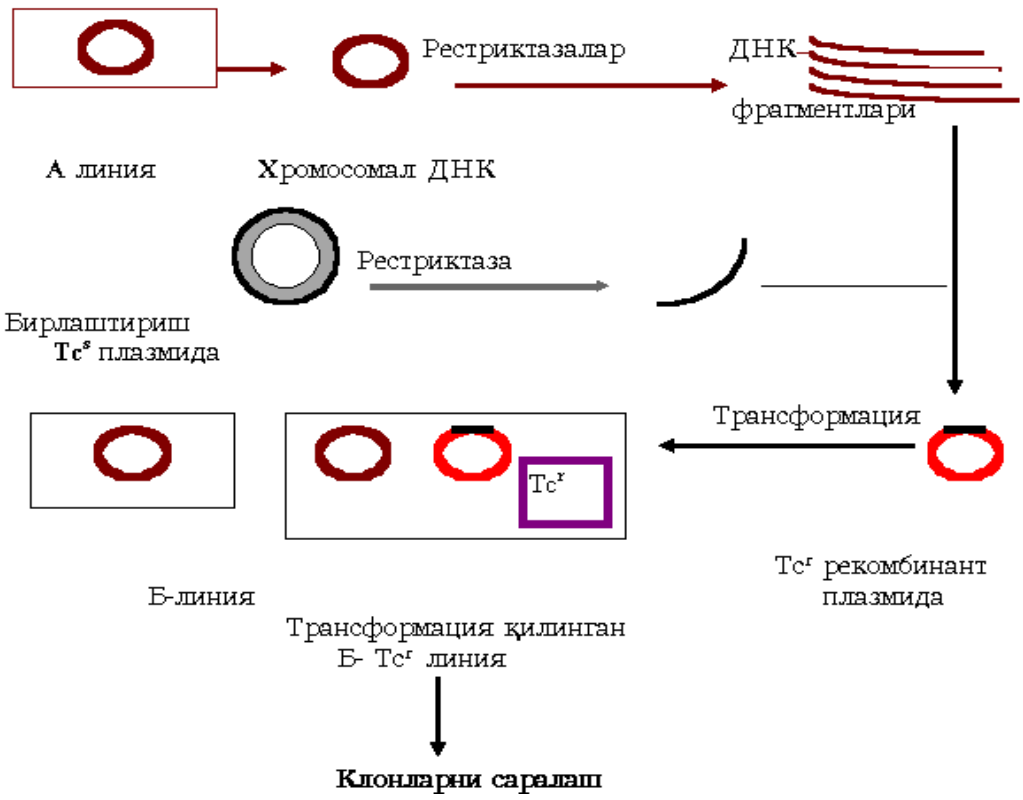
Протопластларни қўшилиши орқали табиий шароитда бир-бирлари билан қўшилмайдиган микроорганизмларни генетик материалларини бирлаштириш ҳам мумкин.

Микроорганизм – продуцентларни ген мухандислиги усуллари ёрдамида яратиш

Ўтган асрнинг 70 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) мухандислик яратилди. Бу усулнинг асосида ҳужайрадан ташқарида рекомбинант ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оқибатида генларни соф ҳолда ажратиш, уларни модификация қилиш, бирини иккинчисига улаш, "генлар мажмуаси" яратиш, оқибатида бутунлай янги хусусиятига ега бўлган оқсил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оқсиллар муҳандислиги деб аталади (**10-расм**).



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



11-расм. Плазмида ДНК си ва бактерия ҳужайрасидан фойдаланиб, генни клонлаш чизмаси

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

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

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

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

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

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

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

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

Ген мухандислиги муаммолари билан шуғиланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараённи асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ емас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оқсил моддаларини керакли меъёрда ушлаб туриш, уларни модификацияга учраб, микроорганизм ҳужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғликдир.

БИОТЭХНОЛОГИЯДА ГЕН МУХАНДИСЛИГИ

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

Биотехнологик ишлаб чиқаришда бугунги кунда микроорганизмларни минглаб штаммларидан фойдаланилмоқда.

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

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

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

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

1. Ҳужайра даражасидаги генетик мухандислик икки ҳужайрани ўзаро қўшиш йўли билан амалга оширилади.
2. Хромосома даражасидаги генетик мухандислик ҳужайра ядросига қўшимча хромосомалар киритиш орқали амалга оширилади.
3. Ген даражасидаги генетик мухандислик ёки ген мухандислиги енг мураккаб бўлиб, қуйидаги босқичлар асосида амалга оширилади:

а. Қимматли хўжалик аҳамияти касб етадиган ген функцияси орқали қидириб топилади, ажратиб олинади, клонланади ва тузилиши ўрганилади.

б. Ажратиб олинган ген хромосома ДНК си билан рекомбинацияланувчи бирор фаг геноми, траспозон ёки плазмид ДНК си билан бириктирилиб вектор конструкция яратилади.

с. Вектор конструкция трансформация усули билан ҳужайрага киритилади ва трансген ҳужайра олинади.

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

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

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

5-жадвал.

Янги биотехнологиянинг дастлабки асосий босқичлари

Кашф етилган вақти	**Бажарилган ишлар**
1973 йил	Биринчи ген клонланган
1974 йил	Биринчи бактерия генларини клонлаш експрессияси амалга оширилди.
1975 йил	Биринчи гибридома яратилган

1976 йил	Рекомбинант ДНК технологиясидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш бошланган.
1980 йил	Ген мухандисли усуллари ёрдамида олинган микроорганизм штаммларини патентлаш ҳақидаги қарор қабул қилинган.
1981 йил	Моноклонал антителла тўпламларидан фойдаланиш мумкинлиги тўғрисидаги қарор қабул қилинган. Биринчи марта генларни автоматик синтезатори сотувга чиқарилди.
1982 йил	Тиббиётда рекомбинант ДНК - инсулини ва ҳайвонлар учун биринчи рекомбинант ДНК дан фойдаланишга рухсат берилди.
1983 йил	Биринчи маротоба ген експрессиясидан бир ўсимликдан бошқа турида фойдаланиш мумкинлиги исботланди.

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

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

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

1. ДНК, РНК ва оқсил молекулаларининг биосинтези.

ДНК репликацияси.

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

Репликация жараёни ДНК-полимераза И, ИИ, ИИИ, ДНК-лигаза ва ревертаза ферментлари ёрдамида амалга ошади. реп-белок ёрдамида ДНК қўш занжири ажралади ва ДНКга боғланадиган оқсил молекулалари ёрдамида ДНКанинг ажралган занжирлари стабил ҳолатда сақланиб турилади. ДНК-полимераза ИИИ ферменти ДНК нинг 3ъ учидан 5ъ учигача ДНКнинг битта занжирини тўла синтез қилиш қобилиятига ега. ДНК синтези фақат ДНК нинг 3ъ учидан 5ъ учига қараб бориши туфайли ДНК нинг иккинчи занжири праймаза, ДНК-полимераза И ва ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида амалга ошади.

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

РНК синтези жараёни транскрипция деб аталади. Ҳар учала типдаги РНК синтези турли типдаги РНК-полимраза (РНК-полимераза И,ИИ,ИИИ) ферментлари ёрдамида

амалга оширилади. пРНК синтези РНК-полимераза И ферменти, иРНК РНК-полимераза ИИ ферменти ва тРНК ҳамда кичик ўлчамли ядро РНК си молекулалари РНК-полимераза ИИИ ферменти ёрдамида амалга оширилади. Ҳамма РНК молекулалари синтези учун ДНК нинг битта ипи матрица вазифасини ўтайди.

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

12-расм

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

Оқсил молекуласига кирадиган аминокислоталар 20 та бўлганлигидан кодонлар сони ҳам 20 дан кам бўлиши мумкин емас. Бунда ҳосил бўладиган комбинациялар сони $64\text{-}4^3$, кодланадиган аминокислоталар сонидан анча кўп, лекин маълум бўлдики 20 та аминокислотадан 18 таси биттадан ортиқ 2, 3, 4, ва 6 кодон билан кодлана олар екан. Бундан ташқари, учта кодон УАА, УАГ, УГС аминокислоталарни кодламайди ва полипептид занжирининг тугаганидан дарак беради, улар терминаторлар «тугатувчилар» деб аталади. Полирибосомаларда оқсил синтези иРНКнинг 5ъ охиридан бошланиб 3ъ охирида тугайди. Оқсил синтези тугагач иРНК рибосомадан ажралиб чиқади ва рибосома иккита субпарчаларга диссоциацияланади.

Мутация жараёни ва ДНК репарацияси.

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

6-жадвал.

Ауксотроф мутантлар ёрдамида Л-аминокислоталарининг бирламчи метаболитларини олиниши

Амино-кислота	Продуцент	Тансиқ модда	Субстрат	Культурал суюқликда аминокислоталар миқдори, г/л
Л-лизин	Бревиабактериум флавум	Треонин, метионин ёки гомосерин	Глюкоза сахароза	60-100
Л-трионин	Эсчеричиа цоли	Лизин, метионин, изолейцин	Глюкоза	20

Л-орнитин	Сорйнеобацтериум глутамицум	Аргинин	Глюкоза	26
Л-фенил-аланин	Артҳробацтер парафинеус	Тирозин	Ҳ-алканлар	15
Л-тирозин	Сорйнебацтериум сп.	Фенилаланин	Ҳ-алканлар	19
Л-валин	Сорйнеобацтериум глутамицум	Изолейцин	Глюкоза	11

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

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

2. ГЕН МУХАНДИСЛИГИНИНГ МОҲИЯТИ ВА ВАЗИФАЛАРИ

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

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

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

7-жадвал

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

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

препаратларни синтез қилиш ва хакозо ғоялар ва технологияларнинг йиғиндисидир (6-чизма).

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

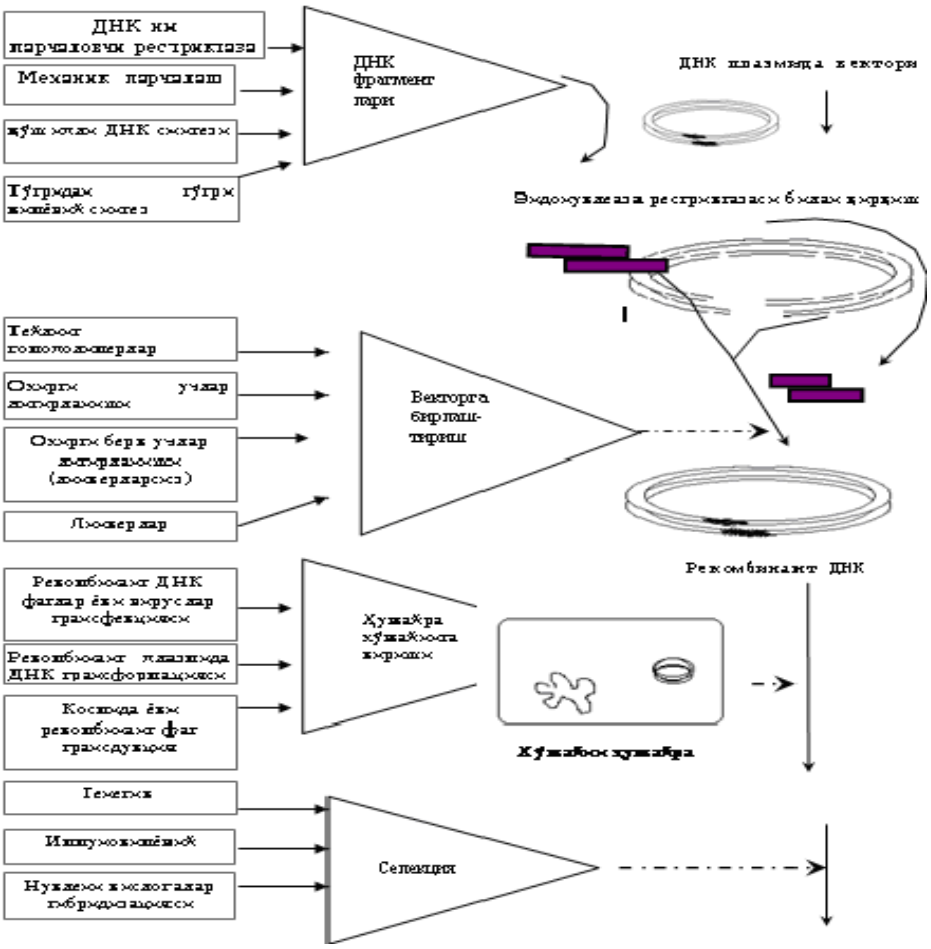
2.1. Транспозонлар

Транспозонларнинг кашф етилиши генетик мухандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга ега бўлди.

Кўчиб юрувчи генетик елементлар-транспозонларни ўсимлик организмида АҚШ олимаси Барбара Мак Клинток, микроорганизмларда АҚШ олими Ахмад Бухорий ва хашаротларда Россия олими Георгий Георгиев кашф етган.

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

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



13-расм. Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

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

Ген мухандислигида қўлланиладиган плазмид ва фаг векторлар, рестриктазалар

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8-жадвал.

Ген мухандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

Рестриктазалар	**Рестриктаза олинган микроорганизмлар**	**Рестриктазаларнинг “аниқлайдиган” ва кесадиган охирги учлари**
Эцо РИ	Эсчеричиа цоли РИ	-Г-А-А-Т-Т-С- -С-Т-Т-А-А-Г-
Ҳинд ИИИ	Ҳаемопҳилус инфлуензае	-А-А-Г-С-Т-Т- -Т-Т-С-Г-А-А-
Сал И	Стрептомйцес албус	-Г-Т-С-Г-А-С- -С-А-Г-С-Т-Г-
Бам И	Бациллус амйлолиқуефациенс	-Г-Г-А-Т-С-С- -С-С-Т-А-Г-Г-
Ҳпа ИИ	Ҳаемопҳилус	-С-С-Г-Г-

	параинфлуензае	-Г-Г-С-С-
Алу И	Артҳробацтер лутеус	-А-Г-С-Т- -Т-С-Г-Т-
Ҳаем ИИИ	Ҳаемопҳилус аегйптиус	-Г-Г-С-С- -С-С-Г-Г-
Сма	Серратиа марцесценс СД	-С-С-С-Г-Г-Г- -Г-Г-Г-С-С-С-

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

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

Рекомбинант ДНК олиш усуллари

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

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

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

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

Рестриктаза-лигаза усули енг содда ва осон рекомбинант ДНК олиш усули ҳисобланади. Бу усулда ДНК молекуласи ва вектор плазмида «ёпишқоқ« учлар ҳосил қилувчи рестриктаза билан қирқилади ва аралаштирилган ҳолда маълум шароитда

реассоциация қилинади. Комплементарлик хусусиятига кўра ДНК молекулалари ўзаро водород боғлари ёрдамида бирикиб халқасимон структура ҳосил қилади ва ДНК занжирининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади.

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

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

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

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

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

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

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

Бактерия ҳужайраларига ДНКни киритиш 2 усулда амалга оширилади:

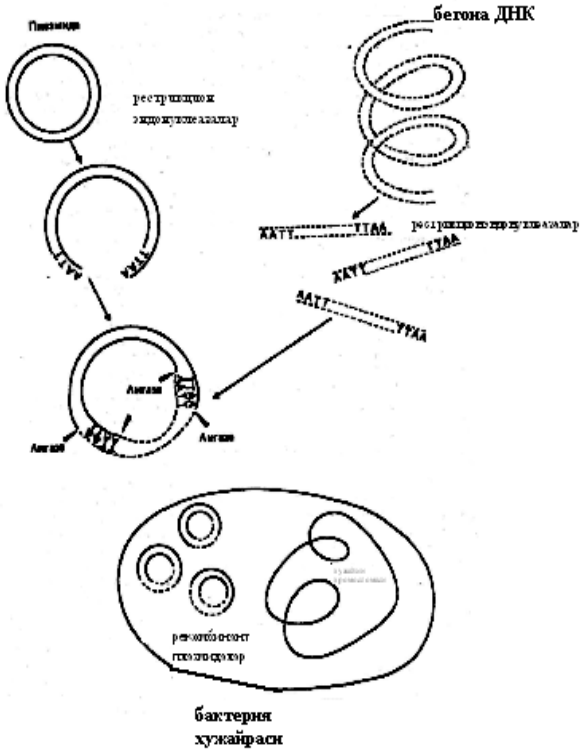
1. Вектор сифатида плазмидадан фойдаланиш
2. Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиш.

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

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

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

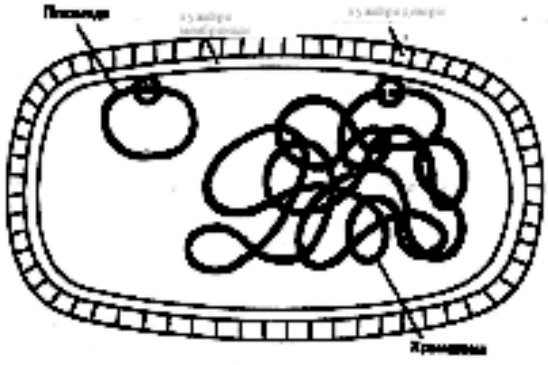
Ҳужайрада плазмидалар сони 1 ва 100 ортиқ бўлиши мумкин, плазмида қанчалик катта бўлса, унинг ҳужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



14-расм

Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия ҳужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактерияларарo плазмидалар алмашиниши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плазмидадаги генларнинг ўзаро алмашинувига олиб келади. Натижада реципиент ҳужайралар донор ҳужайралар ҳисобига тирик қолади.



15-расм

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

Бактерия ҳужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ген муҳандислигида рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

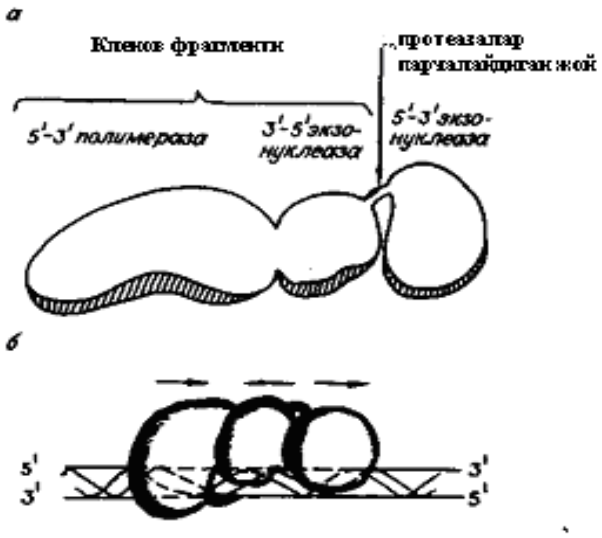
- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК матрицасида ДНКни (полимеразалар) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

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

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

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

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



16-расм

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

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

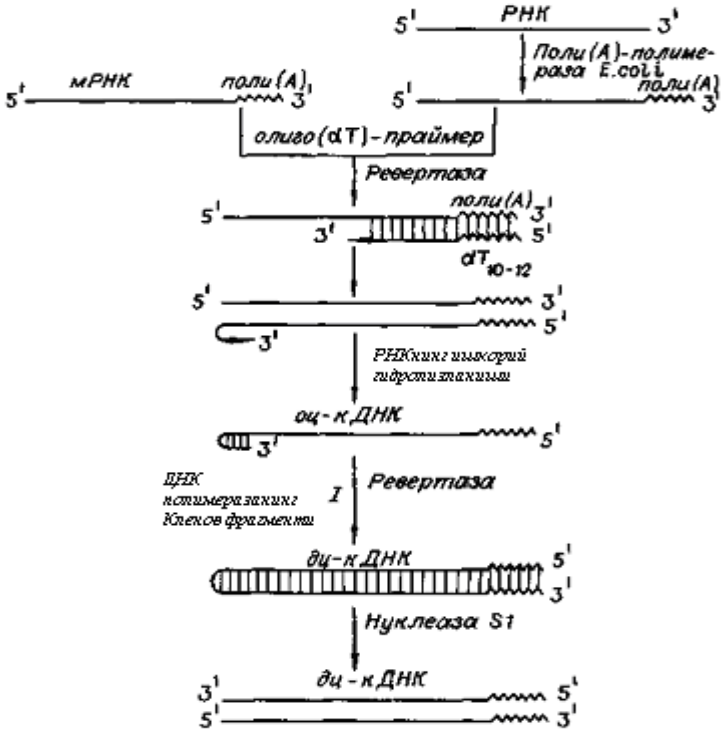
2-синф ферментлари 2 та алоҳида оқсиллардан: рестрикцияловчи эндонуклеаза ва модификацияловчи метилазалардан ташкил топган. Шунинг учун ген инженериясида асосан 2- синф ферментлари ишлатилади. Булар учун кофактор сифатида магний ионлари зарурдир.

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

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

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

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



17-расм

РНК молекуласининг икки занжирли ДНК- нусхасини синтезлаш схемаси.

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

бирлаштиради. ДНК-лигазалар ДНК репарацияси жараёнларида, репликацияда жуда керакдир.

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

Ген муҳандислиги ферментлари

Ген муҳандислигида қўлланиладиган қарийб барча ферментлар бактериялар ҳужайрасидан ажратиб олинади ва прокариот ҳамда еукариотлар ҳужайрасидаги ДНК лар устида "қирқиш" ёки "тикиш" каби ишлар бажарилади.

Рекомбинант ДНК конструксиясини яратишда қўлланиладиган ферментлар бир неча гуруҳга ажратилади:

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

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

Рестриктазалар асосан бактериялардан лекин, айримлари ачитқи ва бир ҳужайрали сувўтлардан ҳам ажратиб олинади. Рестриктазаларнинг номенклакутаси 1973 йилда С.Симит ва Д.Натанслар томонидан таклиф етилган.

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

Рестриктаза ферментларининг табиий функсияси бактерияни ёд ДНК молекуласидан ҳимоя қилиш (авалам бор ҳужайра ичига кириб унда трансформация чақирувчи бактериофаг ДНК сидан) ҳисобланади. Улар фаг ДНК сини бўлакларга ажратиб уни кўпайишини чегараб туради. Бартериянинг шахсий ДНК си ДНК – метилаза ферменти билан метилланган (модификацияланган) бўлганлигидан рестриктазалар унга таъсир етмайди.

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

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

РНК га боғлиқ ДНК – полимеразалар яъни **ревертазалар** бу комплиментар ДНК занжирини мРНК дан синтезловчи ферментлар бўлиб, биринчи марта 1970 йилда Г.Темин ва С.Мизуталар томонидан ўсма вирусларидан ажратиб олишган. Ревертаза ёрдамида ситезланган қўш занжирли *комплиментар ДНК* (кДНК) молекуласини векторларга киритиб гибрид ДНК лар шаклида кўпайтириш йўли билан кейинги тадқиқотларда фойдаланиш мумкин. *кДНК* генларининг тузилишини ўрганиш бу генларнинг геномдаги тўлиқ нусхаларини аниқлаш имконини беради.

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

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

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

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

Нуклеотидлар кетма – катлигини аниқлаш (секвенирлаш)

Нуклеотидлар кетма – кетлигини аниқлаш ДНК нинг генетик муҳим қисимларини белгилашда муҳим аҳамият касб етади. Секвенирлаш усули 100 – 150 нуклеотидлар жуфтига ега ДНК фрагментининг нуклеотидлар изчиллигини анча тез аниқлаш имконини беради. Бу еса

рекомбинацияларнинг структураси, функсияси ҳамда имкониятларини ва молекулалар ампликациясини ёки нуклеин кислота молекулаларининг фрагментларини ўрганишда муҳим аҳамиҳатга ега. Секвенирлашининг иккита асосий, кимёвий ва ферментатив секвенс усуллари мавжуд.

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

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

Ушбу усул ёрдамида қисқа муддат ичида *СВ40* вируси, *пБР322* плазмидаси ва бошқа кўплаб организмлар ДНК си нуклеотидлари кетма-кетлигини тўлиқ аниқлашга муваффақ бўлинган. Бироқ Максам-Гилберт усули муолажаларининг сезиларли даражада қийинлиги ва узоқ давом етиши билан боғлиқ бир қатор камчиликларга ега. Ҳозирги вақтда кимёвий деградация ёрдамида секвенирлаш асосида нуклеотид кетма-кетликларни тез ва мукаммал аниқлаш усуллари ишлаб чиқилган бўлиб, қаттиқ фазали секвенирлаш ва айланма фазали хромотографиядан фойдаланиш орқали секвенирлаш шулар жумласидандир.

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

Репликасияни тўхтатишга сабаб бўладиган терминация агентлари дидезокситрифосфатлар (дд АТП, ддГТП, ддТТП, ддСТП) ҳисобланади. Мазкур модификация қилинган азотли асослар кейинги дезоксирибонуклеотид билан фосфодиефир боғлами ҳосил қилолмайди.

Пробиркаларга тўртта бир. хил таркиб: нуклеотид кетма-кетлиги олдиндан аниқлаб олинган ДНК матрицанинг денатурланган бўлаги, тўртта дезок-синуклеотид, ДНК-матрицага комплементар бўлган ва ундан ДНК полимераза И синтезини давом еттирадиган ҳамда ДНК полимераза И ферментининг ўзи, радиоактив нишонланган қисқа праймер (16-24 н.ж) дан иборат реаксион аралашма солинади. Шундан сўнг ҳар бир пробиркага дидезоксинуклеотидлардан бири қўшилади. Ҳар бир пробиркада синтезлаҳадиган занжир ДНК полимераза И дидезоксинуклеотидни бириктириб оладиган жойда терминацияланади. Дидезоксинуклеотид реаксия аралашмасига қўшилган бўлиб, битта пробиркадаги синтез комплементар занжирнинг ддАТП билан боғланиши ҳисобига, иккинчисида ддГТП ҳисобига узилади ва ҳ.к. Занжир узилиши тасодифий нуқталарда амалга ошиши ҳисобга олинадиган бўлса, праймердан бошлаб секвенирланадиган бўлак охирига қадар узунликдаги фрагментлар йиғиндиси ҳосил бўлади.

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

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

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

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

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

Генни ажратиш ва текшириш усуллари

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

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

Бактерияларнинг трансформацияси

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

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

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

Трансдуксия

Трансдуксия – маълум шароитда махсус тузилишга ега бўлган бактериофаг ДНК бўлагининг бактерия хромосомасига бирикиши ва ундан ажралиб чиқиш жараёнида бактерия хромосомасининг бир бўлагини ўзига бириктириб олиб чиқиш жараёни.

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

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

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

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

Вектор молекулалар. Трансформация. Таркибида қўшимча ирсий ахборотлар тўтувчи рекомбинант ДНК молекулаларини ҳужайраларга

киритиш ва унинг барқарорлигини сақлаш ген муҳандислигининг асосий калит операцияси ҳисобланади. Буни амалга ошириш учун вектор молекулалардан фойдаланилади. Агар ДНК шундайлигича ҳужайрага киритилса, бактерия ҳужайраларидаги ферментлар уларни нуклеотидларга парчалаб ташлайди. Баъзи ҳолларда ДНК ҳужайрага кириб ўрнашиши мумкин, лекин ҳужайранинг бўлиниши жараёнида у наслдан-наслга берилмай йўқолиб кетади. Рекомбинант ДНК ҳужайранинг генетик аппаратини ташкил қилувчи қисмига айланиши учун у геномга бирикиши (хромосомага интеграцияси) ва шунинг ҳисобига репликацияланиши ёки автоном репликацияланиш хусусиятига ега бўлиши керак.

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

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

2. Экспрессион векторлар. Улардан генларнинг муайян кетма-кцтлигини аниқлаш ва уларнинг оқсил маҳсулотларини таҳлил қилиш, муайян оқсилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Шунингдек, сутемизувчилар, ўсимликлар ва ачитқи ҳужайраларида генлар експрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган. Эукариот организмлар учун кўп лонли експрессион тизимлар яратилган експрессион векторлар полиаде-нилланиш сайти ва мазкур организмда ишлаш қобилиятига ега промотордан иборат експрессион кассета тутади.
3. Трансформация учун векторлар. Бу векторлардан реципиент гцномига бегона ДНК фрагментларини киритиш учун фойдаланилади.

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

Вектор молекулаларнинг таркибида маркер ген бўлиши, бу ген ҳужайрада вектор иштирок етаётгани ҳақида маълум қилувчи фенотип бериши, яъни вектор селектив ирсий белгига ега бўлиши керак. Кўпинча сцлектив белги сифатида табиатда кенг тарқалган антибиотикка чидамлиик ^енидан фойдаланилади. Бу генларнинг оқсил маҳсулоти-ферментлар антибиотикларни модифлкациялайди ва уларнинг таъсирини

инактивлаштиради (кучсизлантиради). Масалан, нптлл гени канамицин антибиотигини инактивлаштирувчи неомицин фосфотрансфераза генини кодирлайди. Ҳактерия ҳужайраси нптлл гени иштирокида канамицинга нисбатан чидамлиик ҳосил қилади ва шу антибиотик озиқа муҳитларида ўсиб, клон ва луижайралар колониясини ҳосил қилади. Одатда таркибида нптлл гени лио[6]!магаии ҳужайралар бундай озиқа муҳитларида ўса олмайди ва нобуд бўлади. Демак, вектор конструксия таркибида нптлл генини тутиши вектор иштирок етаётган ҳужайраларни аниқлаш ва уларни танлаб олиш имконини беради.

Ген мухандислигида қўлланиладиган плазмид ва фаг векторлар, рестриктазалар

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8-жадвал.

Ген мухандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

Рестриктазалар	**Рестриктаза олинган микроорганизмлар**	**Рестриктазаларнинг “аниқлайдиган” ва кесадиган охирги учлари**
Eco RI	Escherichia coli RI	-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-
Hind III	Haemophilus influenzae	-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-
Sal I	Streptomyces albus	-G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G-
Bam I	Bacillus amyloliquefaciens	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-

Hpa II	Haemophilus parainfluenzae	-C-C-G-G- -G-G-C-C-
Alu I	Arthrobacter luteus	-A-G-C-T- -T-C-G-T-
Haem III	Haemophilus aegyptius	-G-G-C-C- -C-C-G-G-
Sma	Serratia marcescens SD	-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-

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

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

Рекомбинант ДНК олиш усуллари

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

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

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

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

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

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

Вектор молекулалар, генлар библиотекасини яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси

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

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

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

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

$$Нқ \text{ ----------} \frac{\text{лн (1-п)}}{\text{лн (1-х/й)}}$$

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва рқ0,99 га тенг бўлса 99% хромосомал ДНК нинг мос қисми клонланади.

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

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

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

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100^0С ҳароратда 5 мин., 0,2 Н НаОҲ эритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза фильтрига

бириктирилади. Олинган фильтр [г$^{-32}$П] АТФ нуклеотиди билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

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

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

МИКРООРГАНИЗМЛАР ИШТИРОКИДА БИРЛАМЧИ ВА ИККИЛАМЧИ МЕТОБОЛИТЛАР ИШЛАБ ЧИҚАРИШ

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

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

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

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

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

Иккинчи гуруҳ: пролактинлар ва ўстириш гормонлари. Бу гормонлар 170–195 амнокислоталардан иборат бўлади, бу гормонлар прегормон сигнал

пептидида узунлиги 25 аминокислота ҳолда парчаланади. Ген муҳандислиги тажрибаларида бу гормонлар ҳам узун молекула ҳолида синтез қилиб олинади ва кейин маълум участкасидан кесилади. Ҳужайранинг мРНК сида синтезланувчи ўсиш гормонлари генлари ҳам сунъий ҳолда олинади.

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

Учинчи гуруҳ: гликозилланган гормонлардан ташкил топган бўлиб, иккита субъединицадан иборат. Бу гуруҳ: фолликульстимулятор, лютсонизирловчи ва тиреотропинли гормонлар киради.

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

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

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

Кўпинча қандай шароитда гармонлардан фойдаланилади?:

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

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

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

Ҳайвонлардан олинадиган оқсил табиатли гармонлар инсон оқсилларидан иммунологик фарқ қилади ва шу сабабли инсонларда ҳар хил аллергик реакциялар чиқишига сабаб бўлади. Бундай реакцияларнинг кучи

гармон табиатига ҳамда уни қабул қилувчи касалларни табиати билан узвий боғлиқдир.

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

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

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

Ўстириш гармони. Бу гормон организмда гипофиз безининг олди қисми ҳужайраларида синтез бўлади. Эътибор қилинг, гипофиз безининг бу қисмининг оғирлиги 0,1 граммдан камроқ бўлиб, унинг ҳам бир қисмигина шу гормонни ишлаб чиқаришга хизмат қилади. Организмда бу гормонни етмаслиги ўсиш тезлигини пасайтиради, масалан ўсиши секинлашган сичқоннинг оғирлиги, оддий сичқон оғирлигидан 2 маротаба кам бўлади. Шу гормонни ўз вақтида, керакли миқдорда организмга киритилиши ўсишни мўтадил қилади. Тиббиётда битта касални даволаш учун ҳафтасига 7 мг тозаланган гормон ишлатилса кифоя. Бу гормонни илгарилари одамларни (ўлик одамларни) гипофизидан ажратиб олишган. Ҳозирги пайтда бу гормонни ишлаб - чиқаришни микробиологик, тўғрироғи ген - мухандислик усули яратилган бўлиб, 1 л культурал суюқликдан 100 миллиграммгача тоза ҳолдаги гормонни ажратиб олиш мумкин. Умуман олганда ген мухандислиги усулларидан фойдаланиб, яратилган трансген микроб штаммлари ёрдамида, нафақат гормонлар балки, барча керакли биологик моддалар ишлаб чиқариш мумкинлиги микробиологик усулни рентабел соҳага айлантирди. Бунинг устига бу соҳа об-ҳаво, иссиқ-совуқ, фасл, табиат инжиқликларига боғлиқ эмаслиги бу йўлнинг келажаги порлоқ

эканлигидан далолат беради. Бир мисол, атиги 25-30 мкг. “секкетин” деб аталмиш гормонни ажратиш учун 1 т. қорамол ичагини қайта ишлаш керак бўлса, шу миқдордаги гормон оддий микробиология лабораториясида бемалол ажратиб олиниши мумкин. Ишлаб чиқариладиган гормонларни рўйхати доимий равишда ошиб бормоқда. Уларни ишлаб чиқариш энг аввало шу гормонларга бўлган муҳтожлик ҳамда, илмий лабораторияларни бу жараёнларни бажаришга тайёр эканлиги билан белгиланади. Бугунги кунда эрибропоэтин (эритроцитларни, демак гемоглобинни ҳосил бўлишини бошқарувчи гормон) энкефалинлар ва эндорфинлар (инсонни кайфиятини, эслаш қобилиятини кўтарувчи, тонусини оширувчи асаб тизимини бошқарувчи гормонлар) ишлаб чиқариш бошлаб юборилган. Микроб ҳужайралари баъзи бир стероидли гормонларни ишлаб чиқаришга ҳам қодир. Масалан, Артҳробацтер глобиформис бактерияси гидрокортизонни преднизолонга айлантириш учун ишлатилади. Шунингдек, микробиологик трансформация усули, буйрак усти безининг гормони бўлган кортизон кимёвий синтезини бир неча этапини қисқартиришга олиб келади.

Интерферонлар -ҳужайранинг иммун тизимини фаоллаштирувчи, оқсил табиатли биостимуляторлардир. Бундан ташқари, улар вирусга қарши фаолликка эга бўлиб, рак ҳужайраларини кўпайишдан тўхтатиш хусусиятига эга. Одам интерферонларининг уч синфи маълум : а, б ва г. Ўтган асрнинг 70- йилларидаёқ, инсон б-интерферонини синтез қилувчи гибрид ДНК ни бактериал ҳужайрага ўтказишга мувофиқ бўлинган эди. Орадан кўп ўтмай бунга ўхшаш конструкциялар а- ва г- интерферонлар учун ҳам тузилди. *Э.цоли* бактерияси ҳужайрасига, бактериал триптофан ёки лактоза оперони ва интерферон гени сақловчи, гибрид ДНК ўтказилиши билан у ёки бу хусусиятга эга бўлган интерферон синтез қилувчи бактерия штаммлари яратилган эди. Кейинроқ эса, штаммларни ҳосилдорлигини ошириш ҳамда вирусга қарши хусусиятларини кўпайтириш мақсадида рекомбинант ДНК да модификация (хусусан баъзи-бир аминокислоталарни алмаштириш) қилинди ва хўжайин ҳужайранинг генотипи ҳамда уларни ўстириш шароитлари танланди. Ҳар уч синфга мансуб интерферонлар синтез қилувчи бактериялар штаммлари Россиянинг кўпгина олимлари томонидан ҳам яратилган эди. Хусусан, а- ва г- интерферонлар штаммлари биорганик кимё институтида б - интерферон штамми эса Россия ФА Генетика ва саноат микроорганизмлари селекцияси институтида яратилган эди. Интерферонлар ишлаб чиқариш учун Э.цоли дан ташқари Метҳйломонас, Салмонелла, Псеудомонас каби грамманфий бактериялардан ҳам фойдаланиш мумкин. Масалан, Псеудомонас сп. штамми асосида б- интерферон ишлаб чиқариш биринчилардан бўлиб Россияда йўлга қўйилган эди. Интерферон синтез қилувчи ачитқи замбуруғларини трансмутантлари ҳам яратилган бўлиб,

уларнинг бактериал штаммлардан анча афзаллик томонлари ҳам бор. Хусусан, ачитқи замбуруғлари арзон озиқа талаб қилади, фаглар таъсирига ва лизисга чидамли, осон чўкади, энг муҳими преинтерферонлар ҳосил бўлишини тўғри ташкил қилади.

Интерлейкинлар -қисқа полипептидлар бўлиб, улар организмда иммун жавоб ташкил бўлишида қатнашадилар. Ген мухандислиги усуллари асосида Э.цоли нинг ҳар хил типга мансуб, Интерлейкинлар ишлаб чиқарувчи штаммлари яратилган. Латвияда (Органик синтез институтида) Интерлейкин-2 синтез қилувчи штамм яратилган бўлиб, буйрак раки хасталигини даволашда кенг ишлатилиб келинмоқда. Шунингдек, Интерлейкин - 1 синтез қилувчи Э.цоли штамми ҳам яратилган. Бу оқсил нафақат иммун реакция бузилганда шунингдек, баъзи бир шишларни қайтаришда ҳам ишлатилмоқда. Юқори сифатли ва юқори фаолликка эга бўлган дори - дармонлар ишлаб чиқариш учун охирги вақтда ген мухандислиги усулларидан фойдаланиб бифункционал (яъни, икки хил фаолликка эга бўлган) оқсиллар яратилмоқда. Масалан, аминокислоталарнинг кетма-кетлиги Интерлейкин-2 га ва макрофаг ҳамда гранулоцитларни колонияларини мўътадил қилувчи факторга ўхшаган оқсил моддалардир. Тиббиёт учун зарур бўлган оқсил пептид препаратлари ишлаб чиқариш замонавий биотехнологиянинг энг гуркираб ривожланаётган йўналишларидан бири ва бу йўналишга ривожланган мамлакатлар кўплаб маблағ ажратиб турибдилар. Мисол тариқасида рақамларга мурожаат этамиз: биргина АҚШ даволовчи полипептидларни ишлаб чиқариш учун 1987 йил 568 млн. доллор; 1995 йил 1.117 млн. доллор ажратган бўлса 2000 йилда бу рақам 100 млрд. доллорни ташкил этди.

Ген инженерлигида рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

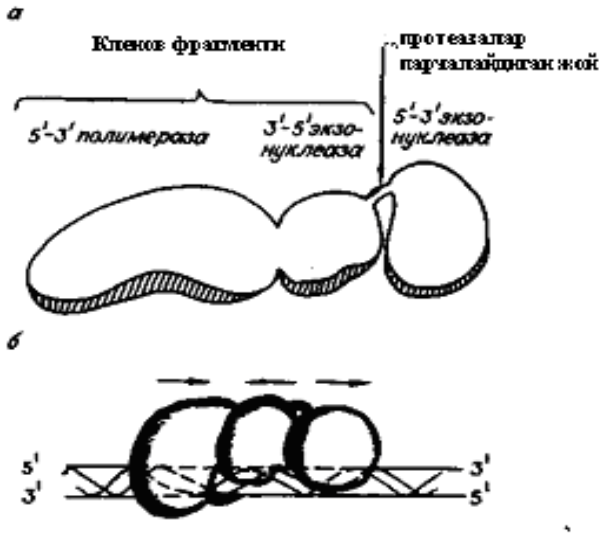
- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК матрицасида ДНКни (полимеразалар) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

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

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

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

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



18-расм

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

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

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

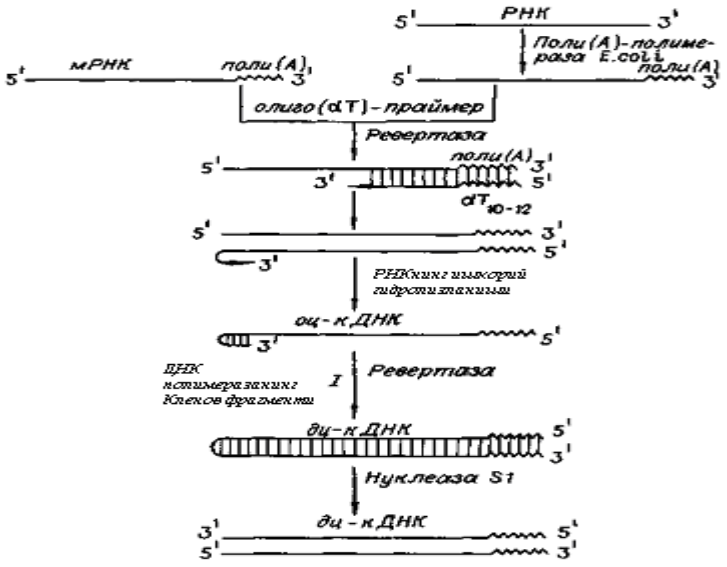
Ҳозирга келиб 500 дан ортиқ 2- синф рестриктазалари ажратиб олинган. Шунга қарамай турли микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар ичида ДНКни муайян бир кетма-кетлигини танийдиган ферментлар учрайди. Бундай жуфтликлар ёки гуруҳлар **изошизомералар** деб аталади. Агар ферментлар ДНКни муайян бир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

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

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

Матрица сифатида кДНКнинг биринчи занжири бўлиши мумкин. Бу реакция ревертаза сингари *Э.Сол*нинг ДНК-полимеразаси ёрдамида катализланиши мумкин. Синтез тугагандан сўнг кДНКнинг 1- ва 2-занжирлари шпилка тугуни билан ковалент

боғланган ҳолда қолади. Бу тугун ендонуклеаза С1 билан парчаланади. Ҳосил бўлган икки занжирли ДНКни клонланаётган векторларга киритиш, ДНКнинг гибрид молекулалари таркибида кўпайтириш ва кейинги тадқиқотларда ишлатиш мумкин.



19-расм

РНК молекуласининг икки занжирли ДНК- нусхасини синтезлаш схемаси.

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

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

Вектор молекулалар, генлар библиотекасини яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси

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

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

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

ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилади ва маълум шароитда реассоциация қилинади. Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади. Олинган рекомбинант ДНК бактерия ҳужайрасига трансформация қилинади. Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла

клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига еътибор бериш керак. Бу кўрсатгич қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади,

$$Нқ \text{ ----------} \frac{\text{лн (1-п)}}{\text{лн (1-х/й)}}^{\text{р}}$$

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва рқ0,99 га тенг бўлса 99% хромосомал ДНК нинг мос қисми клонланади.

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

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

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

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100^0С ҳароратда 5 мин., 0,2 Н НаОҲ еритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза филтрига бириктирилади. Олинган филтр [$г^{-32}$П] АТФ нуклеотиди билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

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

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

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

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

ДНКнинг қўш спирали репликация давомида ДНК иплари бўйлаб иккига ажралади, махсус фермент-полимерлар она ДНКнинг аниқ нусхасини кўчирадилар. Натижада ҳужайра бўлиниши олдидан 2 та бир хил ДНК молекулалари ҳосил бўлади ва улардан бири ҳужайра бўлингандан сўнг қиз ҳужайрага ўтади. Қиз ҳужайра она ҳужайра ташиган

ахборотни ташийди ва у бажарган функцияларни бажаради. Шундай қилиб тирик организм ҳужайраларида ўзига хос реакция – **матрица синтези** рўй беради. Молекулаларнинг бири – матрица, иккинчиси еса шу матрица асосида тузилади. ДНК репликацияси, барча турдаги РНК ва иРНКструктурасига мос равишда оқсил молекулаларининг тўпланиши, буларнинг барчаси матрица синтезининг вариантлари бўлиб, доимо нуклеин кислоталар иштирокида амалга ошади.

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

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

Эукариотлар ҳужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан овалбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информацион РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872та нуклеотидан1158 тасигина оқсилнинг 386та аминокислотасини кодлаши, шу билан бирга 5ъ-учдаги 64 та нуклеотид ва 3ъ-учдаги 650 та нуклеотид трансляцияланмаслигини аниқланган. и-РНКдан овалбумин генига мос келувчи ДНК нусхасини олиб уни плазмидага жойлаштирганлар ва уни *Э.цоли* ҳужайрасида клонлаштирганлар. Франциялик олимлар еса ДНК нусхасини рестриктазалар ёрдамида парчаланмаслигини аниқлаганлар, чунки улар ушбу ферментлар танийдиган 6 та нуклеотидли ДНК кетма-кетлигини ўзида тутмаганлар. 1977 йили франциялик олимлар овалбуминнинг информацион РНКси билан транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фараз қилганлар. Геннинг узлукли тузилиши кейинчалик бошқа генларда ҳам кузатилган.

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

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

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

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

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

Генлар алмашинуви ёки генни ҳужайрага киритиш *Ин витро* шароитидаги генетик рекомбинация орқали амалга оширилиши мумкин. Бу усул бактерияларда, хусусан, ичак

таёқчаси ҳужайраларига ҳайвон ва одам генлари киритилиб, улар репликацияланишига еришиш натижасида ишлаб чиқилган.

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

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

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

Бактерия ҳужайраларига ДНКни киритиш 2 усулда амалга оширилади:

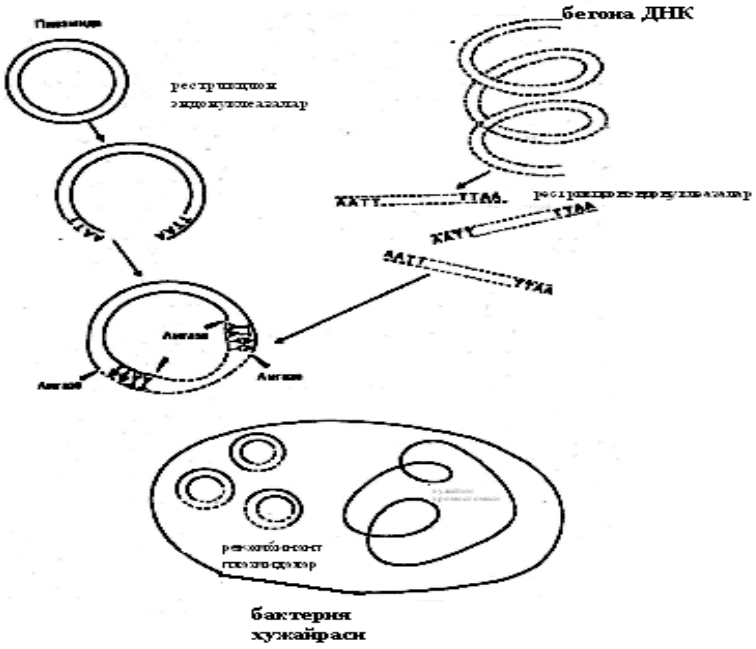
3. Вектор сифатида плазмидадан фойдаланиш
4. Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиш.

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

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

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

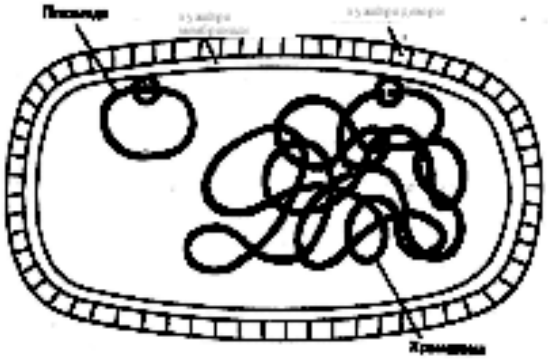
ҳужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



20-расм

Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия ҳужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактерияларараро плазмидалар алмашиниши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плазмидадаги генларнинг ўзаро алмашинувига олиб келади. Натижада реципиент ҳужайралар донор ҳужайралар ҳисобига тирик қолади.



21-расм

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

Бактерия ҳужайрасига рекомбинант ДНКни експрессия қилиниши.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Назорат учун саволлар

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

16. Назорат учун саволлар

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

6- МАЪРУЗА.
ЎСИМЛИКЛАР ГЕН МУҲАНДИСЛИГИ (6с)

6.1 ўсимлик ген мухандислиги. Протопластлар.каллус тўқима.(2с)
6.2 ўсимлик гибридларини олиш.бегона генларни ўсимликларга киритиш йўллари.(2с)
6.3 ўсимлик ген мухандислигида қўлланиладиган маркер генлар. Трансген ҳужайраларни саралаб олиш.(2с)

Режа:

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

Таянч сўзлар: агробактериялар, микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, протопластлар, регенерация, ретровируслар, ҳайвон ҳужайралари.

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

Ўсимлик ҳужайраларига генларни киритиш

Ўсимлик ҳужайраларига генлар турли усул билан киритилади:

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

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

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

Охирги вақтларда комбинацияланган трансформация методи – агролистик методи ҳам яратилиб, амалда қўлланилмоқда. Бунда бегона ДНК тўқимага бирор-бир физик йул, масалан баллистик йўл билан киритилади. Киритилаётган ДНК да Т-ДНК вектор ва маркер гени, ҳамда вирудентликнинг агробактериал гени бўлиши керак. Ўсимлик ҳужайрасида вирулентлик генини вақтинчалик экспрессияси оқсиллар синтезига олиб келади. Бу оқсиллар плазмидадан Т-ДНКни тўғри кесиб, уни агробактериал трансформациядаги сингари ҳўжайин геномига жойлаштиради. Сўнг *ин витро* да таркибида ҳужайраларнинг кўпайиши учун зарур бўлган фитогормонли озуқа муҳитига экилади. Озуқа муҳитида одатда трансген ўсимликлар чидамлиликка эришиши учун селектив маркер бўлиши керак.

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

Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси.

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

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

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

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

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

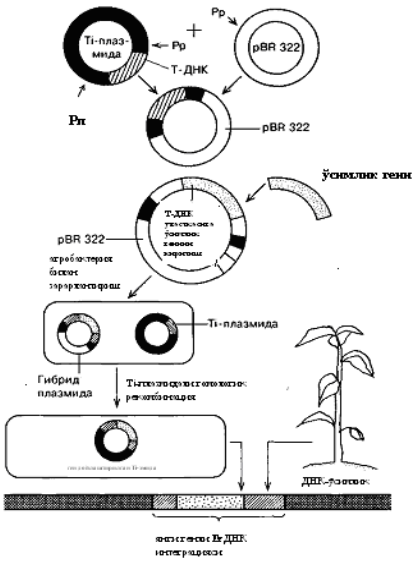
Ти-плазмидадан Т-ДНК рестриктазалар ёрдамида кесилади ва *E. соли* да клонлаш учун пБР 322 плазмидасига жойлаштирилади.Т-ДНК плазмидали бактериялар кўпайтирилади ва плазмида ажратиб олинади. Сўнгра клонланган Т-ДНКга рестриктаза ёрдамида керакли ген жойлаштирилади. Ҳосил булган Т-ДНКли рекомбинант молекула яна бир бор катта миқдорда кўпайтирилади, яъни ичак таёқчасида клонланади. Шундан кейин конъюгация ёрдамида тўлиқ Ти-плазмидани ташувчи агробактерия ҳужайрасига киритилади. Натив Ти-плазмидасининг Т-сегментлари ва оралиқ векторлар ўртасида гомологик рекомбинация рўй беради. Бунинг натижасида ген жойлаштирилган Т-ДНК нормал ДНК ўрнига натив Ти-плазмидага киради. Т-сегментга керакли генлар жойлашган Ти-плазмидани ташувчи *А. Тумефациенс* ҳужайралари ҳосил бўлади. Уларнинг

навбатдаги кўчирилиши агробактерияларга хос бўлган оддий йўл билан амалга оширилади.

Иккинчи метод бинар (қўш) векторлар системасини яратишга асосланган.

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

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



22-расм

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

конструкцияланган штаммларни ўсимликнинг зарарланган қисмига киритишдир.

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

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

Охирги 10 йил мобайнида ташқи бозорда янги хусусиятларга эга бўлган **трансген ўсимликлар** чиқа бошлади. 1996 йили АҚШда трансген ўсимликлар эгаллаган майдон 3

млн. акр бўлса, 2002 йилга бу майдон 80 млн акрга етди. Асосий трансген ўсимликлар: жўҳори, соя, гербицид ва ҳашоротларга чидамли ғўзалардир.

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

Ген муҳандислиги ёрдамида қишлоқ ҳўжалиги учун қуйидаги ўсимликлар яратиш учун таклифлар киритилган:

1. Ҳашоротларга чидамли ўсимликларни яратиш. Уларни яратиш учун ўсимликларнинг геномига *Басиллус тҳурингиенсис* (бу микроорганизм ҳашоротлар организмида ривожланиб тангақанотлиларда касаллик келтириб чиқаради, одамларга таъсир қилмайди)дан ажратиб олинган токсин гени киритилади. Токсинни синтез қиладиган ўсимликлар айрим зараркунандаларга нисбатан чидамли бўлади. Буларнинг бари далаларда пестицидларни ишлатишни ва атроф-муҳит ифлосланишини камайтиради.
2. Озиқ-овқат маҳсулотларини сифатини яхшилаш. Маълумки, қишлоқ ҳўжалиги экинларининг ҳаммасининг таркибида ҳам алмашмайдиган аминокислоталар ва витаминлар етарли миқдорда бўлмайди. Буларнинг ўрнини тўлдириш учун ўсимликларга витамин ёки аминокислоталарни синтезлайдиган генлар киритилади. Ҳозирда таркибида каратиноид кўп бўлган трансген гуруч ва оқсилга бой соя ўсимлиги олинган.
3. Товар сифатини яхшилаш. Гулларга пигмент синтезловчи генлар киритилиб ажойиб рангли гуллар ёки оқсилларни флуоресценцияловчи генларни киритиб қоронғуда нур берувчи декоратив ўсимликлар олинган.
4. Гербицидларга чидамли ўсимликларни яратиш.
5. Ўсимликларнинг чидамлилигини ошириш. Маълумки, айрим балиқ ва ҳашоротлар гидрофил оқсиллар ажратади. Бу оқсиллар гени иссиқсевар ўсимликларни совуққа чидамли қилиш учун уларга киритилади.

Ўсимликларда ген муҳандислиги

Ўсимликлар ер юзасида дастлабки организмлар ҳаёт манбаи бўлиб, куёш енергиясидан окилона фойдаланади. К.А.Темирязов ўсимликлари космик таърифини берган. Ер юзасига барча енергия ишлаб чиқарувчи стансиялар йилига $9x10^{12}$ кВт.с., ўсимликларда еса йилига 1,7 х 10^{18} ккал $2x10^{15}$ кВт.с қуёш енергиясини олади. Кишилар иссиқлик, сув, атом електростансиялари куриб фойдаланса, табиат – 90 А келадиган хлорофилл молекулаларини яратган. Шулардан англаш мумкинки ўсимликларни молекуляр даражада ўрганиш, ҳужайра технологияси, ген инженерлигини ё‘лга куйилиши улкан муаммоларни ҳал қилиш мумкин.

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

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

Плазмида ҳужайраларни сунъий муҳитда ўстиришда уларга регуляторлар керак бўлмайди.

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

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

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

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

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

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

Австралияда ген инженерлиги ёʻли билан ёʻнғичка ўсимлиги олинган, уни қоракўл қўйлари истеъмол қилганда жунларни ўсиши тезлашар екан. Ёʻнғичка ДНК сига горохнинг олтингугурт сақловчи оқсил молекулаларини синтез қилувчи генларини код-лаштириш амалга оширилган. Бу туфайли йилига жун ишлаб чиқариш 5% га оширилган. Ушбу генлар себарга ўсимлигига ўтказиш бўйича тадқиқотлар олиб борилмоқда.

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

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

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

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

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

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

Ўсимликлар куёш енергиясидан келаётган ёруғлик тўлқинини 3 – 4 % гача қисмини ўзлаштиради. Фатосинтез жараёнини тезлаштириб ўсимлик маҳсулдорлигини ошириш мумкин. Маълумки, икки гуруҳ ўсимликлар бор. Улар CO_2 углеводлар (C_3) бирикма ва тур углерод (C_4) бирикма ҳосил қилади. C_4 гуруҳига оид ўсимликлар (маккажўхори, жўхори, лавлаги ва тропик ўсимликлар) да C_3 гуруҳига оид ўсимликларга (ғалла екинлари) нисбатан бир баробар фотосинтез фаоллиги юқоридир.

Фотосинтез жараёнининг оширишнинг асосий ё‘ли РБК фотосинтез ферментини фаоллигини оширишдир. РБК ферменти фаоллиги C_4 гуруҳда C_3 гуруҳидаги ўсимликларга нисбатан 60 марта юқоридир. Лекин C_3 гуруҳидаги баъзи екинларда (кунгабоқар) фотосинтез РБК ферменти фаоллиги маккажўхоридан қолишмайди. Шу сабабли кунгабоқарда РБК ферментини бошқарадиган генларни C_3 гуруҳидаги бошқа ўсимликларга ўтказиш лозимлиги еҳтимолдан йироқ емас.

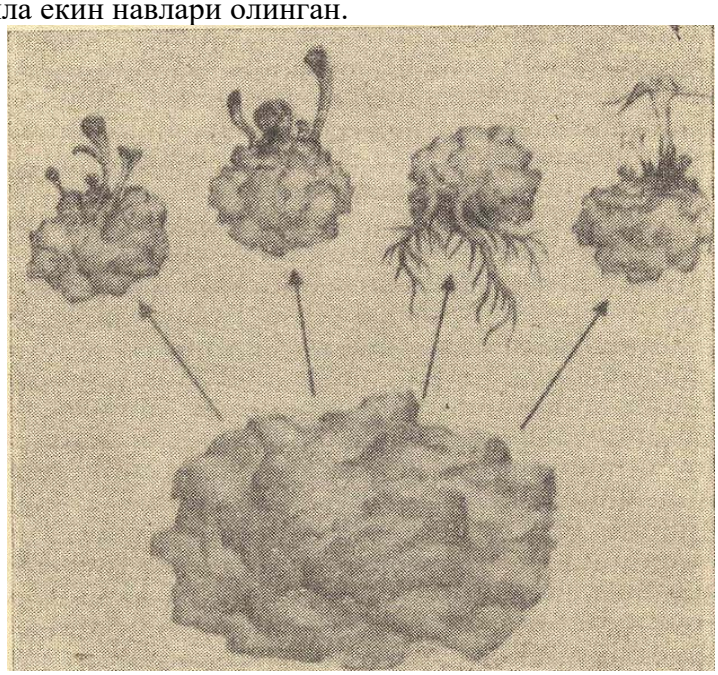
Ўсимлик қисмларини сувда узоқ вақтда сақлаш, ёки кўпайтириш мумкинлиги маълум. Ўсимлик ҳужайраларидан бир бутун ўсимлик олиш, бир неча бор кўпайтириш ҳозирги кунда олиб борилмоқда.

Ўсимлик ҳужайралари технологияси қуйидаги ё‘налишларда олиб борилади:

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

Ўсимлик тўқималарини ўстириш дастлаб XX асрнинг бошларида помидор ва маккажўхори илдиз учки қисмларидан олиб етиштирилган. 1960-1970 йилларда англялик олим Кокинг изоляцияланган протопластлар қобиғи олинган ҳужайрани ўстириб нормал ҳужайра хосил қилган. 1960 йил сунъий муҳитда ўсимлик ҳужайраларини кенг қамровли ишлаб чиқариш технологияси ишлаб чиқилган.

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



22-расм. Ҳужайра културасида морфогенез типлари

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

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

Россияда биринчи бўлиб микроклонлаштириш ва микротуганаклар етиштириш технологияси Россия қишлоқ хўжалиги биотехнологияси институтида О.С.Мелик–Саркисов ва шогирдлари томонидан ишлаб чиқилган. Пробиркада микротуганак етиштиришдан самарали усул коллус тўқималарни регенерация қилиб озиқа муҳитида 1м^2 да 1500- 7000 донага микротуганак етиштириш технологияси ишлаб чиқилган. Ушбу усул сифатли уруғлик олиш, ўсимлик генофондини сақлаш, трансгенли ўсимликларни жадал кўпайтириш имконини беради.

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

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

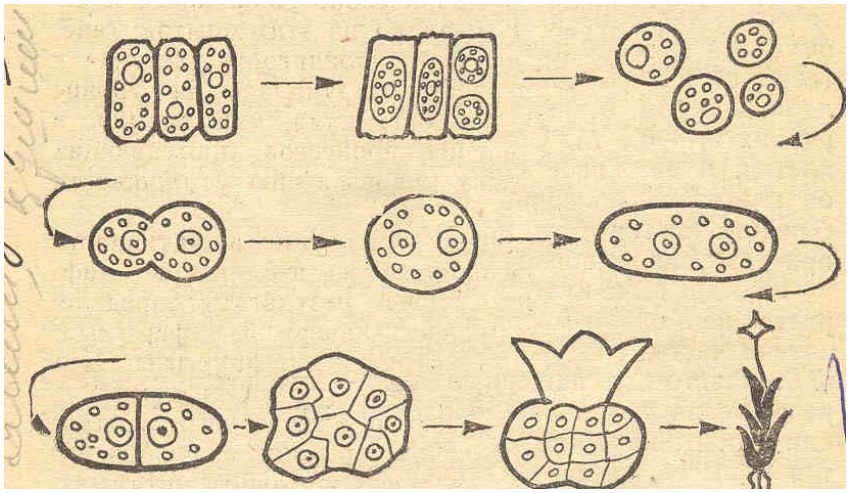
Гаплоид хромосомали тўқималарни хромосомасини ошириб фертилли (диплоид) қилиш гомозиготали қимматли формалар олинади. Протопластларни қўшиш ёʻли билан гаплоидлар биргаликда (иккита) регенарация қилиш селексия учун диплоидлар қимматли дастлабки материал бўлади.

9-жадвал

Ўсимлик ва ҳайвон ҳужайраларини ўстириш учун озуқа муҳитлар таркиби

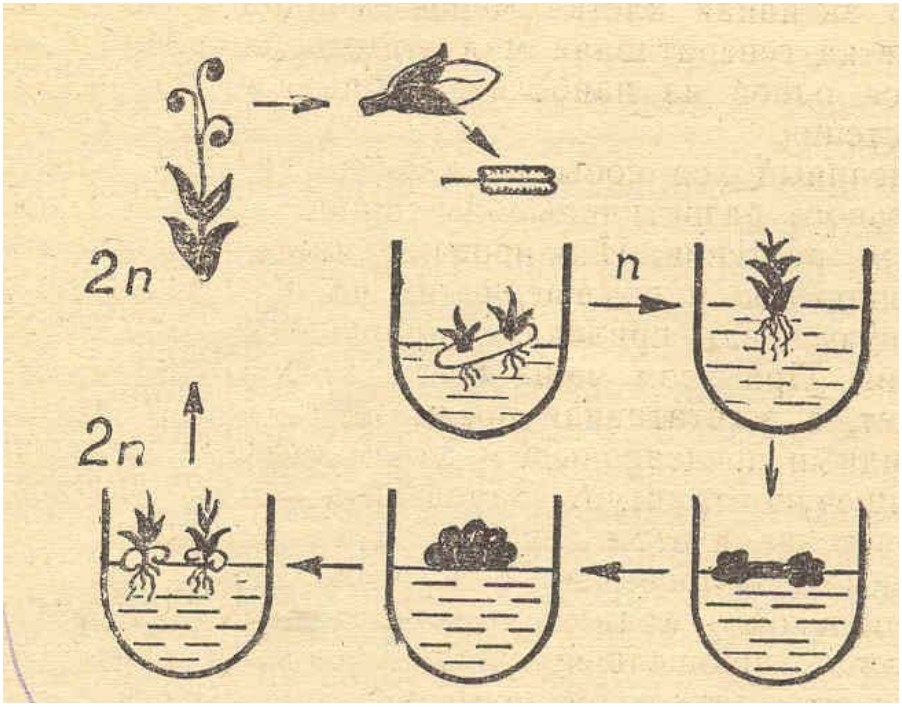
Гамборга озуқа муҳити, ўсимликлар учун		**Ваймура озуқа муҳити ҳайвон ҳужайралари учун**	
Компонентлар	**мг/л**	**Компонентлар**	**мг/л**
Минерал тузлар			
KHO_3	2500	НаСл	6000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	КСл	150
$(NH_4)_2CO_4$	134	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	120
$MgCO_4 \cdot 7H_2O$	250	$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	240
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	$MgCO_4 \cdot 7H_2O$	200
Фе-ситрат	3,5	Na_2HPO_4	300
$MnCO_4 \cdot H_2O$	10	KH_2PO_4	80
H_3BO_3	3	$NaHCO_3$	2240
$ZnCO_4 \cdot 7H_2O$	3	$FeCO_4 \cdot 5H_2O$	0,26
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	$CuCO_4 \cdot 5H_2O$	0,25
$CuCO_4 \cdot 5H_2O$	0,25	$MnCO_4 \cdot H_2O$	0,08
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,25	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,12
KH_2PO_4	0,75	$ZnCO_4$	0,15

Органик моддалар			
Сахароза	30000	Глюкоза	5000
а-нафтилуксус кислота	0,1-1	Аскорбин кислота	17,5
Кинетин	0,01-0,5	Систеин- ҲСл	90
		Глютатион	15
		Гипоксантин	25
		Холин- ҲСл	250
		Инсулин	8
		Тиамин- ҲСл	10
		Са-пантотенат	10
		Рибофлавин	10
		Пиродиксин ҲСл	10
		Мезо-инозит · $2Ҳ_2O$	10
		Никотинамид	10
		Витамин B_{12}	0,2
		Фолиевая кислота	0,4
		Биотин	0,02
		20 та аминокислота аралашмаси	



23-расм. Изоляцияланган протопластларни олиш, қўшиш ва ўзгартириш

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



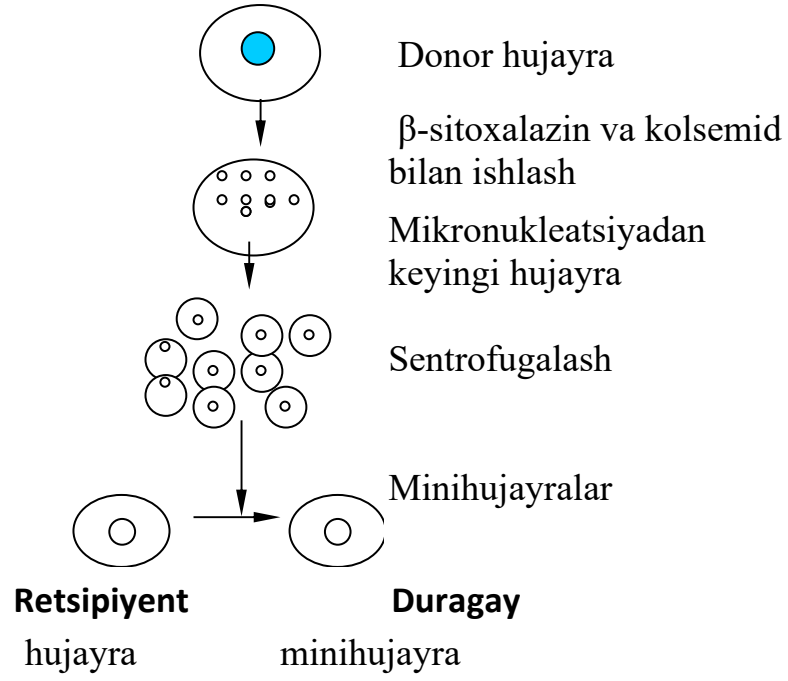
24-расм. Ёш чангдон тўқимасидаги ембриогенез

Соматик тўқималарни дурагайлаш. Ҳужайра инженерлиги билан соматик тўқималарни дурагайлаш – турли турларга, навларга хос ўсимлик ҳужайраларни протопластларни қўшилиши тушунилади. Ушбу ёʻл билан икки ёки ундан ортиқ организм геноми (генлари) бирикиши тўлиқ комбинацияси кузатилади.

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

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

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



25-расм. Генларни миниҳужайра орқали кўчириш

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

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

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

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

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

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

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

Ўсимлик, ҳайвонларда гармонлар одатда 2 гуруҳга ажратилади:

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

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

Ситокинин – ҳужайраларни ўсишини тезлатади, каришни олдини олади, генератив органларни шаклланишини таъминлайди.

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

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

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

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

Ҳужайра биотехнологияси - ҳужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Ҳужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир узгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмидан ташкдрида яшаши ва кўпайиши учун шароит тугдириб бериш лозим. Ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни сунъий озуқа муҳитида, стерил шароитда ***(ин витро)*** ўстириш, усули ажратилган тўқималар культураси деб ном олди ва уларни биотехнологияда ишлатиш мумкинлиги сабабли, катта ахамият касб етди.

Биотехнология узоқ - узоқлардан маълум бўлсада, алохида амалий фан сифатида утган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният енг аввало узи учун ута зарур бўлган яъни озик-овкдт, енергетика, захира (ресурс), атроф - муҳитни муҳохазаси ва х.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди. Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва хайвон тўқимали, ҳужайралари ва оргаларидан фойдаланишга асосланади. Хозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида еътибор берилмокда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошкд технологияларга нисбатан бир қатор устунликка егалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам енергия талаб киладилар, деярли чикиндисиз, екологик тоза ва х.к Шунинг билан бир кдторда, биотехнология стандарт жихрзлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иклим шароитига карамасдан хамда кўп майдон егалламаган ҳолда жараёнларни йил буйи утказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва хайвонларни ҳужайралари, тўқимали ва органларига хам тегишлидир.

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

Биринчи йўналиш *ажратиб олинган ўсимлик ҳужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва боища соуалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, ефир мойлари ва боища биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боглиц. Маълумки, иккиламчи метаболитлар каттщ (агарли) ёки суюц озуца муҳитида ўстирилган каллус туцималардан олинади. Ҳужайра технологияси асосида диосгенин - диоскоре уужайрасидан; аймолин - илон рацволъфи уужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар - женъшен х;ужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт уамда парфюмерияда ишлатилади. Шуни еътиборга олиш керакки, ўстириладиган ҳужайраларни хосилдорлиги, бутун ўсимликни хосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириш имконияти булмаган шароитда (совуц ёки иссиц иклимли минтакаларда), уларни ҳужайраларини бутун йил мабойинида устриш мумкин.*

Иккинчи йўналиш *- ажаратиб олинган ҳужайраларни, ўсимликлар селексиясида ишлатиш ва ту орсали тез ривожланувчи, хор хил ташси муҳит таъсирига чидамли (иссицса, совуцса, шурланишга, огир металларга, кургоцчиликка, касалликка ва х.к.) ўсимликлар яратиш. Шунинг билан бирга бу юналиш, ажратилган протопластларни қўшилиши орсали янги ўсимликлар яратиш хамда ножинсий (сомотик) гибридлар олишни хам уз ичига олади. Ажратиб олинган протопластларга ген мухандислиги методлари ёрдамида бегона генларни киритлиши, кейинчалик янги, мерос соладиган хоссаларга ега бўлган ўсимлик яратишга хам олиб келади. Ажратиб олинган чангдон ва уруг куртакни сунъий Озиқа муҳитида ўстириш, гаплоидлар, олиш имконини берса, муртакларни ўстириш - усаолмайдиган (ендоспермаси ёмон ривожланган) ўсимликлардан гибрид уругларетиштириш имконини беради.*

Учинчи йўналиш *- ажратиб олинган туқималарни кўпайтириш ва екув материалларини вируслар ва бошка патогенлардан соғломлаштириш мақсадида ишлатиш. Бу усул, ўсимликларни клонал микрокўпайтириш дейилади ва битта медистемадан йилига юз минглабўсимлик олиш имконини беради.*

Ҳужайра ва тўқималар культураларини ишлатишдаги натижалар биринчи навбатда ҳужайраларни бўлиниши, уларни табакдланиши ва улардан ўсимлик ўсиб чиқишини белгиловчи, физиологик жараёнларни оптимизациясига боглиқ. Энг мураккаб томон бу алохида ҳужайрадан ўсимлик регенерация қилиш. Биринчи навбатда бу бошокли ўсимликларга тегишли. Шунинг учун ҳам ин витро шароитда морфогенез регенерация ва уларни асосида ётган жараёнларни механизмларини аниқлаш, енг мухим ахдмиятга егадир.

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

- ***1-боссич (1892 — 1902 йиллар)*** *— Хаберландт, Фехтинг, Рехтигер каби немис олимларини номлари билан боглиц. Улар саҳароза еритмасида хор хил ўсимликлар тўқималарини ўстиришга уриниб куришган, аммо ўсимликларни ўсиши кузатилмаган. Фацатгина соци утини ва тол дарахтини пояларини сигментлари учун бирламчи каллус олинган ва каллусгенезга айланиши мумкин бўлган сегментин енг кичик размери аниқланган. Экспериментал муваффациятларга етаолмасдан бу олимлар катор гоя ва гипотезалар яратганлар. Бу гоя ва гипотезалар анча кечироц уз тасдщини топган. Масалан, Харерландт хор кандай тирик ўсимлик ҳужайрасини тотипотентлиги яъни ҳужайраларни маълум шароитда ўстирилганда ўзини ривожланиш потенсиалини намоён силиши ва бутун ўсимлик хосил булишига бошлаши ҳақида гипотеза еълон қилган еди.*
- ***П-боссич (1902-1922 йиллар)*** *- хайвон тўқималарини ўстириш учун биринчи Озиқа муҳити яратилганлиги билан нишонланади. Бу Озиқа муҳитлари табиий бўлиб, таркибида кон плазмаси (сонни суюц сисми) ва куртак суюклиги саклаган. Ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ўсимлик екстрактлари саклаган сунъий Озиқа муҳитида ўстириб куриш мувоффацияциз чицкан, чунки експериментларда юксак ўсимликларни ўсиш фаоллигини намоён қилишга тугри келмайдиган ҳужайра ва тўқималаридан фойдаланилган.*
- ***Ш-боссич (1922 — 1932 йиллар).*** *Бу даврда бир-бирлари билан боглиц булмаган холда Америкалик олим В.Робине ва немис олими Котте саттиц Озиқа муҳитида помидори ва маккажухори илдизи учидаги меристемаларни ўстириш мумкин еканлигини намойиш қилганлар. Аммо, маълум вақт утгач, ўсимлик тўқималари кунгир рангга кириб, халок бўлганлар. Ўсимликларни тўқималарини ўстириш методии ривожланиши - 1932 йилдан бошланган.*
- ***ИВ-боссич (1932 — 1940 йиллар), француз олими Р.Готре номи билан боглиц.*** *У, ин витро шароитида ўсимлик туцималарини вацти- вацти билан тоза озуца муҳитига кучириб туриш оркали узоц вацт ўстириш мумкинлигини намойиш силган. Бу янгилиқ тўқималар технологиясини ривожланишига катта хисса кушди ва ўстиришга куйиладиган ўсимликлар сони жуда хам кпайди.*
- ***В-боссич (1940 — 1960 йиллар).*** *1955 йилда янги синфга мансуб фитогормон - ситокининларни ихтиро қилиниши, (хусусан кинетинни) ҳужайраларни бўлинишини кучайтириш имконини яратади. Ўсишни кучайтирувчи моддаларни миқдори ва уларни нисбатига қараб, експлант ҳужайрасини бўлинишини кучайтириш, каллус тўқималарни ўсишини мухохаза қилиш, морфогенезни мндуцироват қилиш мумкин еканлиги намойиш етилди.Шу даврда какое ёнгогини, каштан, маккажухори ва бошка ўсимликлар ендоспермаларини ҳужайрани ўсиши, моргенез жараёнлари (каллус туцима ва ҳужайра суспензиясида)га ижобий таъсир курсатиши аниқлашган.*
- ***ВИ-боссич (1960 — 1975 йиллар).*** *Бу даврни енг мухим воцеаси Ноттинген*

университети профессорш Э.К.Коккинг томонидан ферментатив йўл билан помидорини илдизи ва мевасидан протопластлар олиниши ва уларни назорат қилиниб турилган шароитда ўстирилганлиги бўлган. Кейинроқ шу лабораторияда Пауер ўзини шогирдлари билан протопластларни сунъий қўшилиш шароитларини яратишган. Бу еса, сомотик гибридлар яратишда янги йўл бўлиб хизмат қилган. Уша даврда яратилган яна бир усул - бу ўсимликларни ин витро шароитида меристин кулътуралар ишлатиб микро кўпайтиришдир. Дастлаб бу усул француз олими Ж.Морел томонидан орхидей усимлигини соғлом кучатини олиш мацеадида яратилган.

> ***ВИИ-боссич — (1975 йилдан ҳозирги вацтгача).*** *Ин витро техникасини жадаллик билан ривожланиши ўстириладиган манбаларни биологиясини ўрганиш давом етмоцда ажратилган протопластларни електро совуштириш усуллари ишлаб чиқилди, мутагенез ва ҳужайра селексияси усуллари, гаплогидли ўсимликлар яратиш усуллари, ҳужайраларни ажратилган протопластлар ва Ти ва Ри Агробацтериум тумефациенс ва Агробацтериум рҳизогенес асосида тайёрланган Ти ва Ри плазмид векторларни ишлатиб суюкликда ўстириш усуллари мукаммаллаштирилмокда. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликларни генларини кучириб утказишни самарали усуллари ишлаб чщилди.*

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

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

Эксплантни стерилизацияси, шунингдек уруглар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация килувчи еритмада ушлаб туриш, кейин еса стерил сув билан ювиб ташлаш оркали амалга оширилади. Стерилизация даври експлантни ҳарактерига хамда еритмани стерилизация қилиш хусусиятига боглиқ Одатда уруг 10-20 мин, вегетатив қисмлар еса 5-10 мин. давомида стерилизация килинади. Стерилизация килувчи еритмаларга мисоллар 3.1- жадвалда курсатилган.

Эксплант олинмокчи бўлган ўсимлик органи, дастлаб совунли сув билан шеткалар ёрдамида яхшилаб ювилади ва дистилланган сув билан чайиб ташланади, кейин еса бир неча секунд давомида 70 % ли етанолга ботириб олинади. Уруглар спиртда 1-2 мин. ушлаб турилади. ТЎҚИМАларга спирт билан ишлов бериш, уни стерилизация қилиш хоссасидан ташкдри, асосий стерилизация килувчи еритмани таъсирини кучайтириши билан хам боглиқ.

Стерилизация кейин ўсимлик объектлари стерилланган сув билан тозалаб ювиб ташланиши керак. Сиртки стерилизация експлантни фақат ташки инфексиядан озод килади. Агар експлант тўқималари ички инфексияга ега булсалар, уларга антибиотиклар билан ишлов беришга тугри келади. Айниқса ички инфексияга йирик томирли тропик ва субстропик ўсимликлар бой булишади. Культураларни замбуруглар ёки бактериялар билан

ифлосланиши еқилгандан 1-14 кун утганда кузга ташланади. Ёруглик хонасидаги хавони ифлосланишдан саклаш учун, ифлосланган культурани дархрл юкртиш керак.

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

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни ўстириш учун мўлжалланган Озиқа муҳитлари, ўсимликларни яхши ўсиши учун керак бўлган барча макроелементлар (азот, фосфор, калий, калсий, магний, олтингугурт ва бошқалар) ва микроелементлар (бор, марганец, руҳ мис, молибден ва бошқалар) хамда витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларни синтетик аналогларини саклаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казеин гидролизоти, ЭДТА (етилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни ҳужайра киришига ёрдам беради) ва бошкд керакли моддалар саклайди.

Каллус тўқима олиш учун, алохида холларда озикд муҳитига кокос ёнгогини (какое сути), каштан дарахтини ендоспермасини кушилади. Карбон сувлар озуқа учун енг керакли компопенентлар хисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни автотроф озикланишга курблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпрок 2-3 % ли саҳароза ёки глюкоза еритмасидан фойдаланилади.

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

Гормон сакламайдиган озуқа муҳитида шиш ва «урганган» тўқималар усади. Хдр икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлиқ бу ҳужайраларниузларини гормон синтезқилиш хусусияти билан боглиқ

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

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

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

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

Ўстириш шароити

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

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

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

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

Ажратилган тўқималар культураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима булиши мумкин. Каллусли культура табакдлашмаган (дедифференсированнуй) ҳужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни узига хос равишда табакалашади. Каллус дегани кадоқ (котиб колган) деган маънони англатиб, ин витро шароитида алохида олинган тўқималарни (експлантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо булиши мумкин.

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

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

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

Ҳар бир ҳужайра ўсишни уч босқичда утади:

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

Охирги босқични (фазани) ҳарактерли томони ҳужайрани иккиламчи кобигини калинлашуви ва ҳужайрани булинишга бўлган кобилиятини юкотишидир. Дифференсиацияга учраган ҳужайралар яна кайтадан булиниш кобилиятига ега булиши

учун, уларни дедифференсировка булиши шарт, яъни ҳужайра худди меристема ҳолатига кдйтиши керак. Табакдланган ҳужайраларни кўпайтириш тартибсиз, анархия шаклида ўсишга олиб келади ва окибатда каллус тўқима ҳосил бўлади. Шундай килиб, ихтисослашган ҳужайраларни каллус тўқималарга айланиши ҳужайра бўлинишини кучайтириш билан боглик бўлиб, табакалаш жараёнида, ҳужайра булиниш кобилиятини юкотади.

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

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

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

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

Апексни асосий қисмида каллусли ўсишга утиш жараёни ҳужайра бўлинишини тухташи билан бошланади. Лаг - фаза 24-28 соат давом етади. Бу давр мобайнида ҳужайра катталашиб, тўқималар шишади. Лаг фаза тугагандан кейин ҳужайра тез булиниб, каллус тўқима ҳосил килади. Шундай килиб, агар ихтисослашган ҳужайраларни дедифференсиацияси фитогармонлр таъсирида булинишни кучайиши (индуксияси) билан боглиқ булса, булинадиган меристемали ҳужайраларни дедифференсиацияси бўлинишини тухташ билан хужйрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил булишига олиб келувчи булинишни кучайиши билан боглиқ.

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

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

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

Ўстиришга куйишдан олдин, експлантлар ҳужайрасининг метаболизмида узгаришлар содир булишини, у еса дедифференсия ёки травматик синтез билан боглиқ булишини хисобга олиб куйиш зарур. Бундай жараёнларни ажратиш мақсадида експлантларни гормонлар сакламайдиган муҳитда 3-6 сутка давомида преинкубация қилиш тавсия етилади.

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

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

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

- ***1—латент ёки лаг-фаза*** *даврида ҳужайра сони ёки оғирлиги узгармайди. Ҳужайралар бу даврда булинишга тайёргарлик курадилар.*
- ***2-фаза логарифлик ёки експоненсиал ўсиш фазаси е****нг кўп митодик фаоллик билан ва каллус културани массасини ошиши билан щмда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан ҳарактерланади.*
- ***3-фаза тугри чизикли (линейка),*** *бунда ҳужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.*
- ***4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади,*** *бу босқичда ҳужайрани миотетик фаоллиги кескин пасаяди.*
- ***5-фаза ўсиш чизиги (стационар) бир текис холатга келади****. Бу даврда ҳужайралар парчаланади, аммо ҳужайра сонини ошиши билан баробарланишади; умуман олганда бу босқичда, ҳужайра массасини кутарилиши нолга тенг бўлади. Стенсионар фазадан кейин ҳужайраларни деградацияси бошланади ва бу даврда тирик ҳужайраларни сони ва массаси тобора камайиб бораверади.*

Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги

Ин витро шароитида каллусли ҳужайралар ўсимликлаР организмидаги оддий ҳужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва бикимёвий хусусиятларни сакдаб колади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш кобилиятини юкотмайдилар. Совуқда чидамлилик хусуситяти каллусли ҳужайраларда, ўсимликлардагидек кдйтарилади. Бундай хусусият, тропик ёки субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималарда булмайди. Каллусли тўқималарга фотодаврийлик реаксияси хам хос, бу фитохрон фаоллигини сакдаб колинганлиги билан богликдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқималари учун умумийлик яна кдтор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юкори ҳароратга чидамлилиқ осмотик фаол моддаларга, шурланишга чидамлилик ва х.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал

тўқималардан фаркли томонлари хам бор. Уларда специфик сщсиллар пайдо бўлади ва умумий оқсил микдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида кдтнашадиган оқсиллар камаяди ёки бутунлай юкрлади. Каллусли ҳужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронликни бузулганлиги билан фарк килади.

Организм назоратидан чикданлиги сабабли. Каллусли ҳужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда утади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готре томонидан олинган сабзининг каллусли ҳужайраси, янги озуқа муҳитига утказиб туриш хисобидан хрзиргача яшаб келмокда.

Очиқ тупрокда усувчи ўсимликга нисбатан, каллусли ҳужайраларни ҳужайра сикли узунрокдир.

Каллусли ҳужайра узига хос томонларидан яна бири-уларни ёшини ҳар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни узида ёш ҳужайралар (Г- фазадаги), кдри (Г2) ва С - фазалар иштирок етадилар.

Каллусли ҳужайраларни енергия алмашинувида хам анча фарқ кузатилади. Улар, нормал ҳужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол киладилар. 1938 йилда Ромсторн бундай хусусият меристематик ҳужайраларда хам борлигини кузатган еди, демак бу хусусият фаол булинадиган ҳужайралар учун хосдир. Каллус ҳужайраларни нафас олиш коеффиценти бирдан катта. Масалан нухат каллус ҳужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

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

Пастер еффекта деганда, бижғишни кислород иштирокида нафас олиш билан босишни тушунилади.

Нафас олиш субстратлари узгармаган шароитда, нафас олиш коеффицентини кўпайиши, нафас олиш бижгишни тухтатаолмаётганлигини ва хатто кислородли шароитида хам каллусли ҳужайраларда нафас олиш билан бир кдторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижгиш жараёни содир булаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол килиб, булинадиган ҳужайраларда етил спритини тупланишини курсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

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

Каллусли ҳужайраларни нафас олиш ҳарактерини узгариши билан бир кдторда углеводларни кислородсиз прчаланишини кучайиши юналишида, булинадиган ҳужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон силжиш намоён бўлади.

Каллус ҳужайралари генетикаси

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

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

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

Плоидликни узгаришидан ташкдри ўсимлик ҳужайра ва туқималарини ин витро ўстирилиши, ҳужайрада хромосомали абберациялар ҳосил булишини чақиради. Бу еса

ўстирилаётган туқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (туқималарни) таищи куриниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги узгаради.

Ўстирилаётган ҳужайраларда микроскоп остида куринадиган хромосомали мутациялардан ташқари куринмайдиган узгаришлар ҳам содир булиши мумкин. Бундай узгаришлар хромосомаларни бир қисмида ҳамда генларни тузилишида ҳам булиши мумкин. Генли мутациялар ҳужайраларни морфологияси ва физиологик-биокимёвий хоссаларини узгаришида намоён бўлади.

Ўстирилаётган ҳужайраларни генетик муътадил емаслиги сабаблари нималардан иборат? Бундай сабаблар бир нечта. Энг аввало - дастлабки материални генетик бир хил булмаганлиги (експлантларни гетерогенлиги). Кўпчилик ўсимликларда табакдлашган туқималар, ҳар хил плоидли ҳужайраларга ега бўладилар ва фақатгина туқимани онтогенези даврида фаол кўпаядилар, юқори меристемалар, камбийлар ва бошқалар еса доимодиплоид ҳолатда қолади. Бошқа бир сабаб - бу тукдша ва ҳужайраларни узоқ муддат еқилиши, уз навбатида бундай шароитда улардаги генетик узгаришлар, жумладан плоидликни бир хил булмаган узгариши содир бўлади.

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

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

Ситокининлар хусусан кинетик ҳужайраларда полиплоидия содир булишига ёрдам берадилар.

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

Каллусли ҳужайралар фақат озуқа муҳити таркибида гормонлар бўлгандагина булинадилар. Аммо узоқ муддатда ўстирилганда, баъзан улар гормонсиз муҳитда хам ўсиш хусусиятига ега бўладилар, яъни ауксин ва ситиокининларга нисбатан автоном бўлиб крладилар. Баъзан «мослашган» ҳужайралар томонидан яратиган туқималарни кимёвий шишлар хам деб юритилади. «Мослашган» тукдшалар, шиш тукдшаларига ухшаб, кўп ҳолатларда нормал регенерация була олмайдилар ва фақат тератомлар хосил киладилар. Илмий адабиётларда жуда кам бўлсада, улар дан нормал регенерантлар ҳосил бўлганлиги хакдса ахборотлар бор.

Шуни хам еслаб қолиш зарурки, барча каллусли туқималарда, ўстириш жараёнида, баъзи бир культураларда 4-екишдан кейинроқ регенерация бўлган хусусият пасайиб боради, баъзи вақтларда еса умуман юқолади. қари кучатларда регенерант -ўсимлик яратиш мумкин емас.

Ҳозрча «мослашув» сабабларини аниқ жавоби юқ. Балки, у ҳужайраларни табакдсизланмайдиган ёки фаол пролиферация (ҳужайра ва туқимларни кўпайиши йўли билан янгидан ҳосил булиши) ҳолатида ушлаб турувчи гормонларни ҳужайрага узоқ муддатда таъсир етиши билан боглиқ булса керақ деген тахминлар бор.

«Мослашган» туқимлардан ташкдри (кимёвий шишлар), бактериялар ва вируслар чақирадиган ўсимлик шишлари хамда ҳар хил ўсимликларда турлараро гибридларда пайдо бўладиган генетик шишлар хам маълум. Табиатда кенг таркдлган ва илмий изланувчиларда катта ктгзикдпп уйготадиган шишлар - икки паллали ўсимликларда агробактериялар (Агробактериум тумефациенс) томонидан чақириладиган шишлар хисобланади. Бундан ташкдри ўсимликларда яна иккита хактщий шишлар:- попук илдиз

(Агробактериум рҳизогенес чақирадиган касаллик) ва пояли галл (А.руби чақиради) учрайди.

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

«Мослашган» туқималарда худди шиш туқималарга ухшаб, уз гормонлари синтез бўлади, шунинг учун хам улар гормонга мухтожлик сезмайдилар. Гормонга тобе булмаган туқимлар ташқи куринишидан каллусли туқималардан фарқ қилмайдилар, уларни ягона фарқи гормон синтез ктглиши билан намоён бўлади. Бу хусусияти»мослашган» шиш хусусияти учун умумий бўлсада, уларда бу вазифани ечиш йўли ҳар хилдир. «Мослашган» туқималарда гормонга тобе булмаслиқ гормонларни синтез қилишда иштирок етувчи ферментлар молекуласи синтезига жавобгар бўлган генларни фаоллигини узгариши натижасида содир бўлади. Шундай қилиб, ушбу ҳолатда узгариш епигеномли ҳарактерга ега бўлсада, мутация имкониятларини хам еътибордан ташкдрида колдирмаслик керак.

«Мослашган» ҳужайраларда узгаРиш епигеномли ёки генотипик асосга ега еканлигини аниқлаш учун ҳужайра-ўсимлик-ҳужайра каторида гормонга мухқтож булмаслик хусусияти сакданиб қолиши ёки қолмаслигини назоат қилиш керак бунинг учун «мослашган» туктгмада регенерант олиниб, кейин регенерация қилинган ўсимликдан олинган експлант бутунлай гормонсиз ёки гормонларни бирортаси булмаган муҳитда ҳужайра булинса, яъни гормондан автоном булса, гормонга мухтожсизлик хусусияти авлоддан-авлодга утади, демак у генетик асосга ега деб айтиш мумкин.

Агар гормонсиз муҳитда ҳужайра булинмаса ва каллусли туқима пайдо булмаса, яъни гормонга мухтожсизлик наслдан-наслга утмаса, узгаришни епигеномли ҳарактерга егалиги хақида хулоса чиқариш мумкин. Аммо, бу йўл билан фақатгина регенерация хусусиятини юқотган «мослашган» ҳужайраларни текшириш мумкин халос. Маълумки, кўпчилик «мослашган» ҳужайралар регенерацияга бўлган имкониятларини юқотадилар, бу еса юқоридаги усулни гормонга мухтожсизликни табиатини аниқдашни қийинлаштиради.

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

Гормон сакдамаган сунъий озуқа муҳитида, бактерия сакдамаган корнчатли галл туқимаси фаол пролиферацияни давом еттираолган. Бу туқималар, оддий туқимага қараганда юкори микдорда ауксинлар ва бирнеча ситокининлар саклайдилар. Узи утказган тажрибалар асосида Баун, ўсимлик ҳужайралари Агробацтериум тумефацциенс таъсиридан кейин кандайдир йўл билан шиш ҳужайраларга айланадилар деган фикрга келган еди.

Агробактериялар ўсимлик ҳужайрасига Тип (Тумор индуцинг принципле) киритади, у еса Збсоатда оддий ҳужайрани шиш ҳужайрага айлантиради деб тахмин қилинган еди. Кейинчалик Тип ДНК еканлиги ва агробактерияларни катта плазмидасида сакланиши аниқланди ва Ти плазмида деб аталди. Онкоген фаоллик бактерия ҳужайрасидан Ти плазмидани бутунлай ёки уни маълум бир қисмини ажратиб олинганда юколиши исботланган.

1977 йилда Чилтон ўзини шогирдлари билан корончатуй галлни шишлари агробактерияларни Ти плазмидасини маълум қисмини ўсимликни ядро ДНК сига киритиш натижасида пайдо бул шпини исботладилар.

Шундай килиб, Ти плазмидани сигменти (Т-ДНК) хромосомага интеграция килинади ва ўсимликни транформацияланган (шиш) ҳужайрасини ирсий аппаратини бир қисми

бўлиб хизмат килади. Агробактерияларни Ти плазмидани Т-ДНК сини ўсимликлар хромосомасига интерграцияси шиш пайдо булишига ва шиш ҳужайрасини сунъий озикд муҳитида гормонга мухтожиз равишда ўсишга олиб келади. Бу хдр икки ҳодиса бир бири билан узаро узвий боглиқ чунки ауксин ва ситокининларни синтезини назорат килиб турувчи генларни експрессияси окибатида гормонга мухтожсизлик келиб чиқади ва у ҳужайраларни табакдсизланишига ва пролиферациясига олиб келади.

Ти плазмида ўсимликлардаги янги генларни табиий вектори (ташувчиси) бўлиб хизмат килади. Агробактериялар томонидан индуксироват қилинган шиш ҳужайралар томонидан ауксин ва ситокининларни синтез булиш йўли, нормал ва «мослашган» ҳужайраларникига Караганда боищачарок. У оддийрок ва киска. Мутагенлар ёрдамида Т-ДНК молекуласида гормонал фаолликни узгаришини назорат килиб турувчи ксимни (участкани) аниқлаш мумкин булди. Шишни ўсиши учун бирта локус емас, балки бир катор генлар жавобгар еканлиги аниқланди.

Т-ДНК ауксин ва ситокининлардан таищари табиатда учрамайдиган янги синф аминокислоталар галли (опинлар) синтезини детерминация қилиши аниқланди. Бу моддалар шиш пайдо булишига сабаб булаолмайдилар; балки улар ҳосил бўлган шиш тўқималарида синтез бўладилар. Шиш тўқималар бир неча кунлик бўлганларидан кейингина опинлар синтезини бошлайдилар, масалан, коланхоеда опинлар синтези, шиш индуксияси бошланган кундан 7-кунда бошланади.

Каллусни суюқ озуқа муҳитига утказиб, автоматик равишда аралаштириш оркдли ҳужайра суспензияси олиш мумкин. Ферментлар ёрдамида. Масалан пектиназа ферменти ёрдамида тугридан-тугри експлант тўқималардан (барг, поя, илдиз ва х.к) хам ҳужайра суспензияси тайёрлаш мумкин. Дастлаб, експлант юзасида каллусли тўқима пайдо бўлади, кейин ундан ҳужайра ва ҳужайра агрегатлари ажралади ва окибатда ҳужайра суспензияси олинади.

100 мл ҳужайра суспензияси олиш учун 2-3 г каллусли тўқима керак бўлади.

Ҳужайра суспензиясини тайёрлаш учун енг зарур шароит - бу домий равишда аралаштириб ёки чайкдтиб туришдир. Агар ҳужайра суспензияси кимирламай турса, ундан булиниш натижасида каллусли тўқималар ҳосил бўлади.

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

Суспензия 2,4-Д сакдаган муҳитда ҳосил бўладиган пукак ҳужайрадан яхшироқ ҳосил бўлади. Мухит таркибидан калсий олиб ташланса, суспензия ҳосил булиши енгиллашади. Озиқага пектиназа ферменти аралаштирилса (бу фермент озуқа таркибидаги алоҳида ҳужайраларни бир-бирига боглаб трувчи пекрат калсийни парчалайди) суспензия янада енгилроқ ҳосил бўлади.

Биотехнологияда ҳужайра суспензиясидан иккиламчи метиболитлар олиш мақсадида фойдланилади. Иккиламчи метаболитларни кўпчилиги доривор моддалар хисобланадилар ва ҳужайра биомассасини саноат микиёсида кўпайтириш ва ҳужайра селексиясида кенг ишлатиладилар. Бундан ташкдри ҳужайра суспензиясидан алохида протопластлар олиш учун ҳам фойдаланилади.

Суспензион култур алардан иккиламчи метаболитлар продуценти сифатида фойдаланилганда, даврий ёки окдва усулида очиқ ёки ёпиқ тизимда ҳужайраларни кўпайтириш усуллари ишлатилади. Ёпиқ тизимда ҳужайра суспензиясига тоза озуқа муҳити киритилмайди, тизимда домий режимда ўстирилганда еса озуқа муҳити тозасига алмаштириб турилади.

Суспензион ҳужайралар билан ишлаганда уларни ҳарактеристикасини билиш шарт: тириклиги, ҳужайраларни суспензион културада кўп ёки камлиги, агрегация даражаси, ўсиш тезлиги ва х.к.

Ҳужайраларни тирик ёки тирик емаслиги уларни буяш (кук метилен ёки Эванс куки) оркдли аниқланади. Тирик хужайрлар, ҳужайра мембранаси буёкни утказмаслиги сабабли буялмайди. Улик ҳужайра кобигидан буёқ тез утади ва шунинг учун ҳам кук рангга буялади. Ҳужайра суспензиясини асосий курсатгичларидан бири, ҳужайра популяциясини кдлинлигидир. Ҳужайра сони Фукс-Розентал хисоб камерасида микроскоп остида мацерансиядан кейин (ҳужайраларни ажратилгандан кейин) аниқланади. Мацерация килувчи модда сифатида хром кислотасини 10-20% ли еритмасидан фойдаланилади. Бу кислота, ҳужайраларни бириктириб турувчи уртадаги пластинкани еритиб (гидролиз килиб) юборади.

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

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

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

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

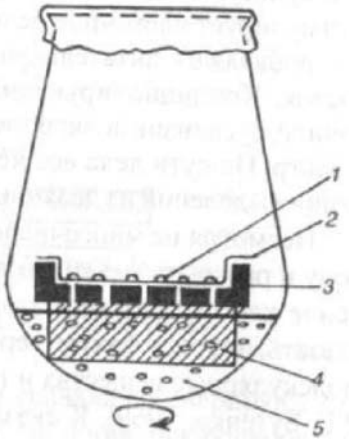
Генетик ва физиологик изланишлар хдмда хужайроа селексияси амалиётида ишлатиш учун алоҳида ҳужайралар жуда катта аҳамият касб етади. Клонни олиниши ягона ҳужайра авлодини олиниши каллусли ҳужайраларни генетик бир хил емаслигини сабабларини аниқлашга ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатишлар гетероген експлат олинган тўқималарда емас, балки алоҳида олинган ҳужайраларда олиб борилади.

Пропластлардан ажратилган алоҳида (ягона) гибрид ҳужайра кейинги булинишларида гибрид ҳужайрадан ташкил топган клон яратиш имконини беради. Бу еса изланувчиларни ишларини енгиллаштиради, чунки ажратилган пропласт культураларда гибрид булмаган ҳужайралардан пайдо бўладиган янги ҳужайраларни алоҳида ажратиш каби машакдатли ишдан озод килади. Бундан ташкдри алоҳида ажратиб олинган ҳужайраларни протопластларини урганилганда соматик гибридизация жараёнини ўзини кузатиш ҳам яхшироқ бўлади. Алоҳида (ягона) ҳужайралар ҳужайра суспензияларидан, ўсимлик тўқималаридан, масалан барг мезофиллидан уни ферментлар ёрдамида мацерация қилингандан кейин, алоҳида ажратиб олинган пропластлардан уларда ҳужайра қобиги пайдо бўлганидан кейин ажратиб олинади.

Бир ҳужайрали фракция олиш учун баъзида суспензион культурани колбада 15-30 мин тиндириб куйиш кифоя бўлади. Бунда йирик агрегатлар чукмага тушадилар. қолдиқ устки суюкликда еса фақат бир ҳужайрали культура ёки кичик агрегатлар бўладилар. Агар бу йўл билан бир ҳужайрали фракция олиш имконияти булмаса, фёрдамида мацерация қилиш, саҳароза градиетида сентрифуга қилиш ёки хдр хил елаклардан утказиш усулларидан фойдаланилади.

Ягона ҳужайраларни ўстиришда бироз кийинчиликлар сезилади, чунки алохида ҳужайра каллусли тўқима усган шароитда яхши булинмайди. Ягона ҳужайраларни бўлинишига мажбур киладиган махсус усуллар яратилган. 1960 йилда Джонсон «енага» усулини тадбиқ қилган еди. Бу усулда «енага» функсиясини бир кием каллусли тўқима

бажаради ва уалохида ҳужайрани бўлинишига мажбур килади ва уни алохида ҳужайрадан филтр қогози ёрдамида ажратиб олинади. Бундай шароитда («енага» хузурида) алохида ҳужайра булиниб, ҳужайрани индивидуал колонияси - клон хосил килади.



26-расм.Маккажўхорининг ягона щужайралари ва ажратилган протопластларини ўстиришда «енага» сифатида суспензион ҳужайралар культурасини ишлатилиши:

1-ҳужайра колониялари;
2-филтр =ОФЦО;
3-алюмин елак
4-пенополиуретан;
5-ҳужайра суспензияси
(З.Б. Шамина,1985).

Ҳужайрани бўлинишии муҳитни кондицирлаш хам тезлатади, бунинг учун унга (муҳитга) тез булинадиган ҳужайра культурасини Озиқа муҳити қушилаДи- Кондиция қилувчи фактор ҳужайра суспензиясини ўсишни експоненсиал фазасида бактериал филтрдан утказиш даврида пайдо бўлади (олинади). Мохияти бўйича юкорида зикр етилган барча усуллар хам булинадиган ҳужайралардан чиқадиган кондиция килувчи фактордан фойдаланишга асосланган.

Хрзирча бу факторни таъсир механизми ва уни кимёвий табиати аниқ емас. Аммо, бу фактор иссикда чидамли, сувда ерувчан, паст молекулали модда хамда фитогормонлар билан алмашиб булмаслигини айтиш мумкин. Шунингдеқ бу модда тахминан 700 Далтон молекуляр оғирлигига ега бўлган пҲ 4-11 да мутадил модда еканлиги хам аниқданган. Шундай килиб, бу модда тоза кимёвий модда булмасдан, ҳужайрадан ажраладиган факторлар йигиндиси булса хам ажаб емас.

Назорат саволлари

1. Ти-плазмиданинг ахамияти?

2.Ўсимлик ген муҳандислигида қўлланиладиган маркерлар генлар хақида маълумот беринг?

3.Трансген хужайраларини саралаб олиш қандай амалига оширилади?

4.Трансген ўсимликларининг истиқболларини қайси сохаларда кўриш мумкин?

7- МАЪРУЗА

ҲАЙВОН ГЕН МУХАНДИСЛИГИ (4 С)

7.1 Ҳайвон ген мухандислиги, Ҳайвон ҳужайраларининг ўзига хос маркерлари ва генларни киритиш. (2с)

7.2 Трансген ҳайвонлар яратиш. Одам геноми.Ген хариталари. (2с)

Режа:

1 Хайвон ген мухандислиги.
2 Хайвон хужайраларнинг ўзига хос маркерлари
3 Вирусларни вектор сифатида қўллаш
4 Трансген хайвон хужайраларини яратиш.

5 Одам геноми
6 Ген хариталари
7 Хайвон организмига янги генлар киритиш
8 Ирсий касалликларни даволаш

Таянч сўзлар: микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, регенерация, ретровируслар, ҳайвон ҳужайралари. Трансген хайвон хужайралари, одам геноми, ген хариталари, микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, регенерация, ретровируслар, ҳайвон ҳужайралари.

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

Вируслар билан прокариот ҳужайралар орасидаги материалларнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактериаларда ўтадиган рекомбинация механизимларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имконини беради. Олимлар қўлида ДНК нинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтқазадиган система-плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмессив кўчириб ўтказувчи ҳалқли молекулалар-плазмидалар ва мўътадил вируслар вектор деб аталади. Уларни табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлди. Шундай екан, енди бактерияларни кулътурада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оқсилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан?

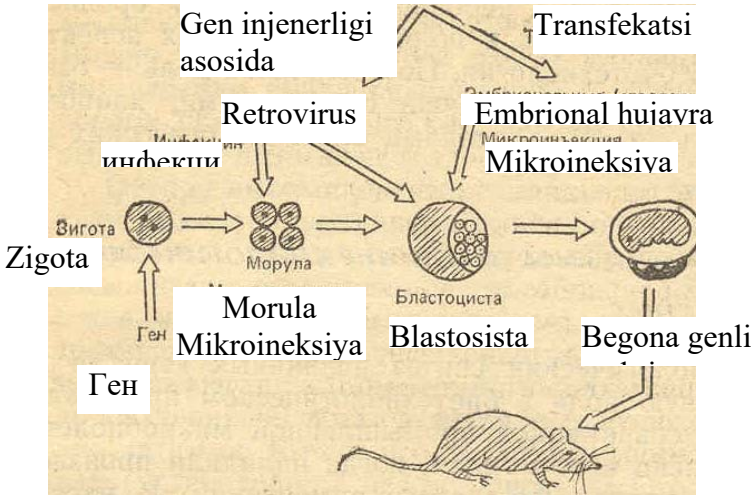
Бу ғояларни амалда юзага чиқиши ген инженерлиги ёки генетик инженерлик деб аталган ва катта истиқболга ега бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

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

Ҳайвонларда ген инженерлигини қўллаш инсон учун керакли (фойдали) генларни геномга жойлашнинг бажарилишига боғлиқ. Мана шундай клонлаштирилган генни ҳужайра ядросига жойлаб қўйишнинг икки усули: пронуклеусга генни пуркаш ва вирус траснфексияси усуллари мавжуд.

Биринчи усул билан керакли ген олдин ДНК молекуласига уланиб сўнгра пронуклеусга жойлаб қўйилади. Шундай ё‘л билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан (НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон ҳужайрасига киритишди. Сичқон ҳужайрасида ушбу фермент бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон ҳужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфексияси (трансфексияси) ҳайвонлар ҳужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар ҳужайра трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам ҳизмат қилади.



27-расм. Генларни ҳайвонларнинг генетик аппаратига кўчириш усуллари

Ҳозирги вақтда ҳар хил ретровируслар (тескари транскрипсия қилувчи РНК сақловчи вируслар оиласи) системаси векторлари яратилган бўлиб, улар қушлар ва сутемизувчилар организмига ташқаридан ген киритиш хусусиятига ега.

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

Зооинженерлар учун генларни ҳайвон ҳужайрасига киритиш ва геномига тартиб билан жойлаштириш усуллари муҳим ҳисобланади. Ҳозирги вақтда шу соҳада бир неча хил методлар ишлатилади. Жумладан вирус билан киритиш, химиявий, физиковий ё‘л билан, ҳужайраларни қўшиш ва янги усул-ретровирусни ишлатиш.

Биринчи усулда ДНК сақлайдиган вируслар генларни кўчириб ўтказишда вектор сифатида фойдаланилади. Лекин кўпчилик ҳозиргача ўрганилган вируслар киритилган ҳужайрани емирилиши ва ё‘қ қилиниши (литик вектор) мумкин. Бундан ташқари улар трасформация қилишда ретровирусларга нисбатан кам самара беради. Шунинг учун ҳам уларни ҳайвонларда кенг миқёсда ишлатиш мумкин емас. Лекин бундай векторлар вакциналарни ишлаб чиқаришда самара бериши мумкин.

Иккинчи усул генларни тартиб билан жойлаштиришда кенг қўлланилади ва бунда ДНК фосфот калсий билан қўшиб ҳужайрага киритилади. Бу усулнинг ва бошқа химик усулларнинг ижобий томони шундаки улар нисбатан оддий ва алоҳида асбоб-ускуна талаб қилмайди, ҳамда инфексия чақирмайди. Шунинг учун ҳам бу усул мутлоқ ҳавфли емас. Лекин бу усулнинг камчилиги ташқаридан киритилган ДНК нинг жуда кам ўзлаштирилишида.

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

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

Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг кўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар кўпайишда айрим гармонларнинг таъсир кучи аниқланган. Масалан, ФСГ (фолликулаларнинг

етилиши назорат қилади) ва ЛГ (лютинлаштирувчи гармон). Ген инженерияси олдида мана шу гармонларни биотехнологик усул билан ишлаб чиқиш ва шу билан уларнинг кўпайишига таъсир қилиш мумкин.

Шу нуқтаи назардан, серпуштлилиги юқори бўлган ҳайвонларнинг селексия қилиш ёʻли билан уларнинг сонини ошириш мумкин. Масалан. Бурула зотли қўйларда серпуштлик гени ўрганилиб, унинг тухумдонга таъсири аниқланган. Шу зотни бошқа меринос қўйлар билан чатиштириш натижасида ва уларни танлаш, саралаш ишлари олиб борилганда қўйларнинг серпушлилигини 40-60%га ошириш мумкин. Лекин шу даражага етказиш учун камида 30 йил керак бўлади. Серпуштлик хусусияти генларнинг полиген таъсирига боғлиқ. Мана шу жиҳатлардан фойдаланиб, ген инженерлик усули билан бурула-ген деб аталмиш генни бошқа қўйлар геномига жойлаб қўйиш туфайли уларнинг пуштдорлигини ошириш мумкин.

Тиббиёт соҳасида ембрионларни кўчириб ўтказиш бефарзандлик муаммосини ҳал қилишда муҳим аҳамиятга ега. Аммо бу усулнинг уй ҳайвонларини урчитишда қўлланилиши кўпчиликка коронги бўлса керак. Шунинг учун ембрионларни кўчириб ўтказишинг ўзи нима ва бу усулда қандай муаммолар мавжудлиги шу мақсадда кўрсатиб ўтишни ўз олдимизга мақсад қилиб куйдик.

Эмбрионларни кўчириб ўтказиш - оталанган қиз ҳужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қуйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ёʻллар билан бажарилмокда. Масалан: қуй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида ембрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ёʻли билан амалга оширилса, қорамолларда ҳамда йилқиларда бу усул махсус асбоблар ёрдамида танага зиён етказмасдан бажарилади. Албатта бу ишларни амалга оширишда мутахассисдан юқори даражада билим ва уқув талаб етилади. Бунда ҳар бир ҳайвон туринг тана тузилиши ва физиологиясининг ўзига хослигини унитмаслик керак. Негаки, ембрионни бир турдаги ҳайвондан олиб иккинчисига қўйиб бўлмайди.

Уй ҳайвонлари ичида ембрионларни кўчириб ўтказиш қорамолларда яхши ўрганилган бўлиб, бунинг учун ембрион олинадиган сигир (донор) танасига махсус гормонлар юборилади, натижада улар тухумдонида кўплаб киз ҳужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ёʻли билан ана шу киз ҳужайралар оталантирилади ва 6-12 кун ўтгандан кейин ҳали микроскопик ҳажмда (0,5-2 мм) бўлган ембрионлар махсус суюқлик ёрдамида бачадон ювиш ёʻли билан идишларга тушириб олинади. Суюқлик ичидаги ебрионлар махсус микроблар ёрдамида топилиб сифати аниқланади. Шундан кейин кўчириб ўтказишга ярайдиган ембрионлар бошқа сигирлар (реципиентлар) бачадонига махсус катетерлар ёрдамида жойлаб қўйилади. Кўчириб ўтказилган ембрион "Янги" она қорнида ривожланиб кетиши учун, реципиент сигир куйга келгандан кейинги вақт ембрион ёшига тўғри келиши керак. Сабаби, донор ва реципиент сигирлар бачадонидаги суюқлик таркиби ана шундагина бир-бирига мос бўлади. Одатда ҳар бир донор учун 5 тадан рециепиент тайёрланади.

Мана шу барча техник жараёнлар хатосиз амалга оширилган тақдирда кўчириб ўтказилган ембрион "янги" она қорнида ўсиш ва ривожланишни давом еттириб 285 кундан кейин тўлақонли бузоқ бўлиб туғилади.

Агар биз шу соҳада қилинган ишлар тарихига назар ташлайдиган бўлсак, ембрион шаклини тасвирлаш ХВИИИ асрга бориб тақалади. ХИХ асрнинг охирларида биринчи маротаба Валтер Хип томонидан ембрионни кўчириб ўтказишга уриниб кўрилган. Виксонсия Университетида Виетт томонидан 1950 йили биринчи маротаба ембрионни кўчириб ўтказишдан бузоқ олинган. 1974 йили ембрионни кўчириб ўтказиш бўйича умумжаҳон жамияти (МОПЭ) тузилиб бунга 26 мамлакат кирган. Шу жамият маълумотига қараганда жаҳонда ембрионни кўчириб ўтказиш усули билан 1981 йили 35 минг бузоқ олинган бўлса, 1995 йилга келиб 1 миллиондан зиёдроқ бузоқ олинди. Бу усул айниқса АҚШ, Франсия, Англия, Олмония, Голландия, Исроил каби чорвачилиги юқори

даражада ривожланган мамлакатларда кенг ёʻлга қўйилган. Хуш, бу соҳага шунчалик қизиқишнинг сабаби нимада? Биринчидан ушбу усул билан ҳайвонлар урчишидаги табиий тўсиқ бузилиб улар кўпайишдаги имкониятлар кенгайтирилади. Маълумки, урғочи уй ҳайвонлари бутун умри давомида 5-10 тадан зиёд насл колдирмайди. Ваҳоланки уларнинг тухумдонида юз минглаб пишиб етилмаган қиз хужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ёʻл билан 50 минг сигирни қочириш мумкин, лекин табиий шароитда улар фақат ўнлаб насл қолдириш имкониятига ега. Ҳайвонлар кўпайишидаги мана шу жуда катта имкониятлар фойдаланилмайди. Бу имкониятлардан тўлақонли фойдаланишда ембрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Айниқса бу усул юқори маҳсулдор ҳайвонлар сонини тез кўпайтиришда катта аҳамиятга ега. Масалан, битта юқори маҳсулдор сигирдан ембрионни кўчириб ўтказиш ёʻли билан йилига 10 ва ундан ортиқ бузоқ олиш мумкин. Бундай бузоқлар ирсий жихатдан бир-бирига яқинлиги билан табиий шароитда олинган бузоқлардан фарқ қилади. Бу еса уларни парваришлашда ва кейинчалик сут маҳсулоти ишлаб чикишда қўл келади. Бу усулнинг яна бир устунлик томони шундаки, қарилиги туфайли табиий шароитда насл қолдириш имкониятига ега бўлмаган юқори маҳсулдор сигирлардан ҳам кўплаб ембрионлар олиб реципиент-сигирларга ўтказиш мумкин. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини танлаш ва саралаш туфайли ҳозирги пайтда янги технологияга ҳамда жўғрофий иқлимга мос янги зотлар яратилган. Бундан 100 йил олдин сигирларнинг ўрта сут маҳсулдорлиги йилига 100-200 литрни ташкил қилган бўлса, ҳозирги пайтда бу кўрсаткич айрим мамлакатларда 5 минг литрдан ошиб кетади. Лекин Ўзбекистон шароитида бу кўрсатгич хали ҳам паст бўлиб ўртача 2300 литрни ташкил етди.

Эмбрионлар кўчириб ўтказишда донор сигирлар сут маҳсулдорлиги поданикидан 3 минг кг юқори бўлганда яхши самара бериб 5 минг кг дан кам бўлмаслиги керак. Сигирларнинг сут маҳсулдорлигини ошириш учун юқорида айтилган усулни қўллаш яхши натижа беради.

Айниқса ҳозирги пайтда муаммо бўлиб турган масала ҳайвонларни ҳар хил касалликларга чидамлилигини ошириш борасида бунда ҳам ембрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Бунинг учун юқори маҳсулдор ҳайвонлардан олинган ембрионлар, шароитга мослашган, касалликка чидамли реципиентларга қўйилади. Ҳозирги пайтда ембрионларни музлатиш ва ҳоҳлаган пайта еритиб реципиент ҳайвонларга қўйиш амалиётида - кенг қўлланилмокда. Махсус музлатгичларда музлатилган ембрионлар дунёнинг ҳоҳлаган бурчагига олиб борилиш ва шартнома асосида юқори маҳсулдор подалар яратилиши мумкин. Энг муҳими шу пул билан ембрионларни бир мамлакатдан иккинчисига олиб ўтилганда касаллик тарқалиши ехтимоли ёʻқолади.

Бу усулнинг қимматли томони яна шундаки ёʻқолиб бораётган ҳайвонлар ембрионлари узоқ, муддатга музлатилиб улар генофонди яратилади. Эмбрионларнинг кўчириб ўтказишнинг яна бир муҳим томони шундаки, уларни бўлакларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун ембрионлар 60 та ҳужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлакларга бўлинади ва ҳар қайсиси биттадан реципиентга ўтказилади. Натижада бир хил ирсиятга ега бўлган ҳайвонлар олинади.

Ҳозирги пайтда чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда ҳайвонларнинг кунлик ўсишдаги биологик потенсиали егалланди. Аммо сигирлар орасида йилига 25 минг ва ундан ортиқ сут берадиган ҳайвонлар мавжуд. Ўртача сут маҳсулотини юқори даражага етказиш учун олимлар томонидан ембрионлар пронеуклеусига юқори даражада сут беришни назорат қиладиган генларни ўрнатиш устида иш олиб борилмокда.

Юқорида биз урғочи ҳайвонлар тухумдонида юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчилик лабораторияларида ана шу қиз ҳужайралар олиниб, махсус суюқликларда

парвариш қилиниб оталаниш даражасига етказиш на танадан ташқари (ин витро) оталантирилиб реципиентларга қуйиш муаммоси устида ишлаяпти. Бу соҳадаги жиддий муаммолардан бири ембрионларнинг қайси жинсга мансублигини аниқлаш. Ҳозирда мавжуд бўлган усуллардан фойдаланилганда 70 % ембрионларни жинси тўғри аниқланяпти. Ана шу муаммолар босқичма-босқич амалга оширилса ембрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳайвонларни урчитишда асосий усул бўлиб қолади.

Маълумки амалий селексия иккита муҳим ёндошишга боғлиқ, биринчидан ирсий хилма-хиллик ва иккинчидан генотиплар селексиясига. Ҳужайра технологияси ирсий хилма-хилликни яратишда мутлоқ бошқача ёʻл тутади. Бунга ўзини клонлаш натижасида ҳужайрада индуциялашган мутант олиш, ҳужайра селексияси, соматик ҳужайраларни гибридлаш, ситоплазматик генларни кўчириб ўтказиш ва бошқалар киради: сигирлар, айниқса юқори маҳсулдор сигирдан насл олиш паст даражада бўлганлиги учун генетик прогресс чекланган бўлади. Мана шу табиий тўсиқни олиб ташлаш усули ембрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳисобланади. Эмбрионларни кўчириб ўтказиш еса ўз навбатида қуйидаги 4 омилга боғлиқ: 1) кўплаб тухум ҳужайраларни чиқариш ва уларни оталантириш: 2) ембрионни йиғиш: 3) ембрионни кўчириб ўтказиш: 4) ембрионни музлатиш ва сақлаш. Мана шу омиллар ичида биринчиси, яъни кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун, донор сигирлар суперовуляция қилинади. Шуни айтиш керакки, жаҳон миқёсида ҳам ҳозирги пайтга келиб, гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонлар қанча ва қандай сифатда ембрион беришни олдиндан таваккал қила олмайди. Кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун донорларга, гонадотропин гармони юборишдан олдин улар тухумдонидаги сарик таначанинг хажми 1,5 см дан ошган бўлмаслиги яхши натижалар бериши еътироф етилган. Агар тухумдонлардан бирида ҳажми 10 мм ва ундан каттароқ фолликула борлиги аниқланса, унда ҳайвонларни гармонлар билан ишлов бергандан қатъий назар яхши натижалар бермаслиги олимлар томонидан исботланган. Бундан хулоса шуки, урғочи ҳайвонларни гармонлар билан ишлов беришдан олдин, уларни тухумдонларининг физиологик ҳолати яхшилаб текширилиши керак. Тажрибалар шуни кўрсатдики ҳайвонларнинг ҳаммаси ҳам гонадотропин гармонига бир хил реаксия беравермайди.

Гонадотропин гармонларини ҳайвон танасига юбориш улар жинсий даврнинг 10-12 кунларни яхши натижалар беради. Бундан ташқари сифатли ембрионлар олиш йил фаслларига ва озиқа тўйим-лилигига боғлиқлиги тажрибаларда исботланди. Сунъий ёʻл билан овуляция чақириш қўй ва ечкиларда ҳам қорамолларникидек бўлиб, фақат танага гармон юборишни жинсий даврининг 11-13 кунлари ташкил қилинади ва уларнинг куйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчқалар кўп насл берадиган ҳайвонлар гуруҳига кириб, улардан ембрион олиш гармонлар билан ишлов бермасдан ҳам бажариш мумкин. Шунга қарамасдан гармонлар билан ишлов берилганда 33-38 % кўпроқ ембрионлар олиш мумкин. Отларда гармонлар билан ишлов берилиб, ембрионлар олиш тўлиғича ишлаб чиқилмаган. Шундай қилиб, юқоридаги маълумотлардан аён бўладики, ҳайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, ембрионлар олиш кўп таъсирга боғлиқ. Шунинг учун ҳам ҳайвонлардан сунъий ёʻл билан ембрион олишни олдиндан айтиш қийин.

Гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонларни ўз вақтида қочириш сифатли ва керакли миқдорда ембрион олишда муҳим аҳамият касб етади. Гармонлар билан ишлов берилгандан кейин куйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сариқ таначалар сони билан ўлчанади. Овуляция натижасида чиққан тухум ҳужайралар ва улар оталанишдан кейин ривожланаётган ембрионларни, ҳозирги пайтда мавжуд бўлган зондлар билан, 60-70 % ини ювиб олиш мумкин. Шундан 20 % оталанмаган тухум ҳужайраларни ташкил қилади.

Ҳозирги пайтда ембрионларнинг сифатини аниқлаш уч ёʻналишда олиб борилмоқда; 1) ембрионларнинг ташқи кўринишидаги бир-бирига боғлиқлик, уларнинг ёшига муво-

фиқлиги ва улар кўчириб ўтказилгандан кейин яшаб кетиши; 2) ембрионлари модда алмашинувини ўрганиб, улар ҳаётчанлигини аниқлаш; 3) ембрионлар қобиғи ва бластомерлар ситоплазмасининг ҳар хил бўёқларга нисбатан адсорбсион қобилиятини ўрганиш. Бу усулларни барчаси ҳам камчиликлардан ҳоли емас. Шунга қарамасдан ҳозир амалиётда ембрионлар фақат уларнинг морфологик кўриниши билан баҳоланиб, сифати аниқланмоқда.

Маълумки, ембрионларни кўчириб ўтказишда баҳоси юқори бўлган оталанган тухум ҳужайралардан фойдаланиш яхши самара беради.

Реципиент сигирларга ембрионларни кўчириб ўтказиш жараёни донор-сигирлардан ембрионларни ювиб жойлаштирилган асбоб (катетер) тухумдонида сариқ таначаси бор бачадон шохининг юқори қисмига усталик билан олиб борилиб ташланади.

Отларда ембрионларни кўчириб ўтказиш қорамоллардагидек ва жарроҳлик ё‘ли билан амалга оширилиши мумкин. Куй ва чучкаларда бу жараён факат жаррохлик усули билан амалга оширилади. кўчириб ўтказиладиган ембрионлар сони чучкаларда 4 тадан кам бўлмаслиги керак. Бундан кам бўлган ҳолда ембрионлар бачадон деворига ёпишмайди (инплантация) ва уларда кейинги ривожланиш бўлмайди.

Эмбрионларни кўчириб ўтказишда уларни донор-сигирдан ювиб олингандан кейин реципиент-сигирга жойланганига кадар бўлган вактда қандай сақлаш муҳим аҳамиятга ега. Бу давр 37 градусли ҳароратда, кўпчилик олимларнинг фикрича, 2 соатдан ошмаслиги керак. Лекин бу даврни узайтириш учун ембрионларни махсус асбобларда музлатиш ва керак бўлганда еритиб фойдаланиш мумкин.

Эмбрионларни музлатиш махсус автомат асбобларда амалга оширилиб, белгиланган дастурда ишлайди, у 3 қисмидан иборат бўлиб: електрон блоки, музлатиш камераси ва суюқ азот сақланадиган идишдан иборат. Музлатгич вазифасини азот пар бажаради. Ҳозирги пайтда ембрионларни музлатиш ва еритиб реципиент ҳайвонларга кўчириб ўтказиш натижасида кўплаб бузоқ, қўзи ва чўчқа болалари олинмоқда.

Эмбрионлар донор ҳайвонлардан ювиб олингандан кейин, ёки сунъий шароитда тухум ҳужайралар ўстирилиб, ин витро шароитида оталантирилгандан сўнг ҳар хил микроманитуляция ишлари олиб борилиши мумкин, Масалан, ембрионлар ядросини бошқа ядросизлаштирилган тухум ҳужайрага кўчириш кўплаб бир хил насл олишни клонлашни беради. Бу усул айниқса сигирларни хирургиясиз ё‘л билан ювиш ишлатила бошлангандан кейин кенг қулоч ёйди. Агар юқори маҳсулдор донор-сигиридан бешта 32 ҳужайрали ембрион ювиб олинса ва ҳар бир ҳужайра ядроси алоҳида тухум ҳужайрага кўчирилса, бир донордан 160 ембрион олинган бўлади. Бригц ва Кинг (1952) аниқлашича ембрионлар ёш пайтида улар ядроси кўчирилса ҳужайранинг ривожланиши яхши бўлади. Ядроси кўчириб ўтказиладиган ембрион кечки стадияда бўлса, ҳужайра ривожланиши бўлмайди. Чунки ембрионлар бу даврда узларини РНК синтезини амалга ошира бошлайди. Олдинги даврда еса она транскрипсияси амалга оширилади. Шундай қилиб қўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш ембрионлар ядросини қайтадан программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум ҳужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир ембриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

Ген муҳандислиги методларининг яратилишига қадар, 2 та соматик ҳужайраларни қўшиш йўли билан генлар кўчирилган. Агар ҳужайраларнинг 2 та линиясини биргаликда полиэтиленгиликол ёки инактивланган Сендай вируси иштирокида инкубация қилинса, бу 2 та ҳужайра линияларининг ядролари қўшилади. Ҳосил бўлган гибрид ҳужайраларни селектив муҳитда ажратиб олиш мумкин. Бунда маълум бир белгилар ва маълум бир хромосомалар ўртасидаги мувофиқликни аниқлаб янгидан-янги генлар харитасини тузиш мумкин бўлади. Гибрид ҳужайра кўпайиши давомида битта ёки иккала она ҳужайраларни хромосомаларини йўқотиши, ҳамда йиллар давомида репрессияланган генлар экспрессияланиши мумкин. Баъзи ҳолларда она ҳужайра линиясида «ишламаган» ген, гибрид ҳужайраларда «ишлаши» мумкин.

Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш

1976 йили Ениш сичқон ҳужайраларига бегона генларни киритиш ва бу белгиларни наслдан-наслга ўтишини амалга оширган. Лекин рекомбинация ва клонлаш методи ўша вақтда унчалик ривожланмаганлиги сабабли генларни киритишда вируслардан вектор сифатидагина фойдаланилган.

Сичқон лейкози вируси кирадиган синф вирусларига олимлар томонидан генларни кўчириш учун самарали вектор сифатида қараганлар. Ушбу ретровирусларнинг генлари якка ипли РНКнинг 2 та молекуласидан тузилган: ҳужайра бу вирус билан зарарланганда қайтар транскриптаза ДНК молекуласини, комплементар РНКни синтезлайди. Ҳосил бўлган ДНК-нусха ҳужайра ДНКсига «провирус" кўринишида жойлашади. Провирус барқарор ҳолда қолиши ёки хужайра ДНКсидан ажралиб янги вирус заррачалари ўсишига манба бўлади.

Биотехнология саноатида продусент сифатида прокариотлар – (бир ҳужайрали, ядроси мукаммал бўлмаган организмлар) – бактериялар, актиномисетлар, риккецийлар ва тубан еукариотлар (бир ва кўп ҳужайрали, ядроси мукаммал, хромосомалари махсус липопротеид табиатли мембраналар билан ўралган) – ачитқи ва миселиал замбуруғлар, енг содда жониворлар ва сув ўтлари ҳамда уларни ҳар хил усуллар (селексия, мутагенез, ҳужайра ва ген мухандислиги) орқали олинган мутантларидан фойдаланилади.

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

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

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

Вируслар билан прокариот ҳужайралар орасидаги материалларнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактериаларда ўтадиган рекомбинация механизимларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имконини беради. Олимлар қўлида ДНК нинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтқазадиган система-плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмессив кўчириб ўтказувчи ҳалқли молекулалар-плазмидалар ва мўътадил вируслар вектор деб аталади. Уларни табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлди. Шундай екан, енди бактерияларни кулътурада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оқсилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан?

Бу ғояларни амалда юзага чиқиши ген инженерлиги ёки генетик инженерлик деб аталган ва катта истиқболга ега бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

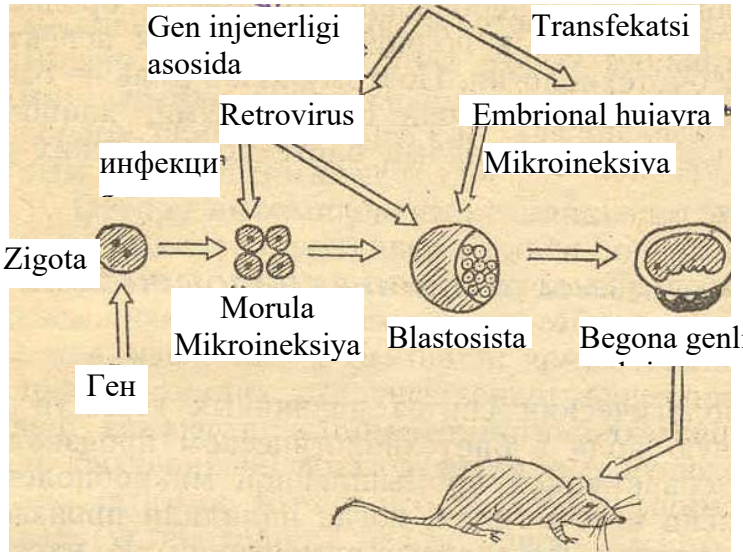
Ген инженерлиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функсионал қисимларига ега бўлиш, керакли жойидан кесиш, керакмас қисмини олиб ташлаб, керак бўлган қисимларини бошқа генлардан ёки синтез ё'ли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки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

Ҳайвонларда ген инженерлигини қўллаш инсон учун керакли (фойдали) генларни геномга жойлашнинг бажарилишига боғлиқ. Мана шундай клонлаштирилган генни ҳужайра ядросига жойлаб қўйишнинг икки усули: пронуклеусга генни пуркаш ва вирус траснфексияси усуллари мавжуд.

Биринчи усул билан керакли ген олдин ДНК молекуласига уланиб сўнгра пронуклеусга жойлаб қўйилади. Шундай ё'л билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан (НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон ҳужайрасига киритишди. Сичқон ҳужайрасида ушбу фермент

бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон ҳужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфексияси (трансфексияси) ҳайвонлар ҳужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар ҳужайра трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам ҳизмат қилади.



27-расм. Генларни ҳайвонларнинг генетик аппаратига кўчириш усуллари

Ҳозирги вақтда ҳар хил ретровируслар (тескари транскрипсия қилувчи РНК сақловчи вируслар оиласи) системаси векторлари яратилган бўлиб, улар қушлар ва сутемизувчилар организмига ташқаридан ген киритиш хусусиятига ега.

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

Зооинженерлар учун генларни ҳайвон ҳужайрасига киритиш ва геномига тартиб билан жойлаштириш усуллари муҳим ҳисобланади. Ҳозирги вақтда шу соҳада бир неча хил методлар ишлатилади. Жумладан вирус билан киритиш, химиявий, физиковий ё‘л билан, ҳужайраларни қўшиш ва янги усул-ретровирусни ишлатиш.

Биринчи усулда ДНК сақлайдиган вируслар генларни кўчириб ўтказишда вектор сифатида фойдаланилади. Лекин кўпчилик ҳозиргача ўрганилган вируслар киритилган ҳужайрани емирилиши ва ё‘қ қилиниши (литик вектор) мумкин. Бундан ташқари улар трасформация қилишда ретровирусларга нисбатан кам самара беради. Шунинг учун ҳам уларни ҳайвонларда кенг миқёсда ишлатиш мумкин емас. Лекин бундай векторлар ваксиналарни ишлаб чиқаришда самара бериши мумкин.

Иккинчи усул генларни тартиб билан жойлаштиришда кенг қўлланилади ва бунда ДНК фосфот калсий билан қўшиб ҳужайрага киритилади. Бу усулнинг ва бошқа химик усулларнинг ижобий томони шундаки улар нисбатан оддий ва алоҳида асбоб-ускуна талаб қилмайди, ҳамда инфексия чақирмайди. Шунинг учун ҳам бу усул мутлоқ ҳавфли емас. Лекин бу усулнинг камчилиги ташқаридан киритилган ДНК нинг жуда кам ўзлаштирилишида.

Физикавий усул икки асосий классда-микроинъексия ва електропорация ё‘ли билан

олиб борилади. Электропорация нисбатан янги усул бўлиб, ДНК молекуласини електр токи ёрдамида ҳужайра мембранасидан олиб ўтишга ёрдам беради. Лекин бу усул ёʻли билан генларнинг геномга ўтказилиши хусусияти номаълум.

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

Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг кўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар кўпайишда айрим гармонларнинг таъсир кучи аниқланган. Масалан, ФСГ (фолликулаларнинг етилиши назорат қилади) ва ЛГ (лютинлаштирувчи гармон). Ген инженерияси олдида мана шу гармонларни биотехнологик усул билан ишлаб чиқиш ва шу билан уларнинг кўпайишига таъсир қилиш мумкин.

Шу нуқтаи назардан, серпуштлилиги юқори бўлган ҳайвонларнинг селексия қилиш ёʻли билан уларнинг сонини ошириш мумкин. Масалан. Бурула зотли қўйларда серпуштлик гени ўрганилиб, унинг тухумдонга таъсири аниқланган. Шу зотни бошқа меринос қўйлар билан чатиштириш натижасида ва уларни танлаш, саралаш ишлари олиб борилганда қўйларнинг серпушлилигини 40-60%га ошириш мумкин. Лекин шу даражага етказиш учун камида 30 йил керак бўлади. Серпуштлик хусусияти генларнинг полиген таъсирига боғлиқ. Мана шу жиҳатлардан фойдаланиб, ген инженерлик усули билан бурула-ген деб аталмиш генни бошқа қўйлар геномига жойлаб қўйиш туфайли уларнинг пуштдорлигини ошириш мумкин.

Тиббиёт соҳасида ембрионларни кўчириб ўтказиш бефарзандлик муаммосини ҳал қилишда муҳим аҳамиятга ега. Аммо бу усулнинг уй ҳайвонларини урчитишда қўлланилиши кўпчиликка коронги бўлса керак. Шунинг учун ембрионларни кўчириб ўтказишинг ўзи нима ва бу усулда қандай муаммолар мавжудлиги шу мақсадда кўрсатиб ўтишни ўз олдимизга мақсад қилиб куйдик.

Эмбрионларни кўчириб ўтказиш - оталанган қиз ҳужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қуйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ёʻллар билан бажарилмокда. Масалан: куй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида ембрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ёʻли билан амалга оширилса, қорамолларда ҳамда йилқиларда бу усул махсус асбоблар ёрдамида танага зиён етказмасдан бажарилади. Албатта бу ишларни амалга оширишда мутахассисдан юқори даражада билим ва уқув талаб етилади. Бунда ҳар бир ҳайвон турининг тана тузилиши ва физиологиясининг ўзига хослигини унитмаслик керак. Негаки, ембрионни бир турдаги ҳайвондан олиб иккинчисига қўйиб бўлмайди.

Уй ҳайвонлари ичида ембрионларни кўчириб ўтказиш қорамолларда яхши ўрганилган бўлиб, бунинг учун ембрион олинадиган сигир (донор) танасига махсус гормонлар юборилади, натижада улар тухумдонида кўплаб киз ҳужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ёʻли билан ана шу киз ҳужайралар оталантирилади ва 6-12 кун ўтгандан кейин ҳали микроскопик ҳажмда (0,5-2 мм) бўлган ембрионлар махсус суюқлик ёрдамида бачадон ювиш ёʻли билан идишларга тушириб олинади. Суюқлик ичидаги ебрионлар махсус микроблар ёрдамида топилиб сифати аниқланади. Шундан кейин кўчириб ўтказишга ярайдиган ембрионлар бошқа сигирлар (реципиентлар) бачадонига махсус катетерлар ёрдамида жойлаб қўйилади. Кўчириб ўтказилган ембрион "Янги" она қорнида ривожланиб кетиши учун, реципиент сигир куйга келгандан кейинги вақт ембрион ёшига тўғри келиши керак. Сабаби, донор ва реципиент сигирлар бачадонидаги суюқлик таркиби ана шундагина бир-бирига мос бўлади. Одатда ҳар бир донор учун 5 тадан рециепиент тайёрланади.

Мана шу барча техник жараёнлар хатосиз амалга оширилган тақдирда кўчириб ўтказилган ембрион "янги" она қорнида ўсиш ва ривожланишни давом еттириб 285 кундан кейин тўлақонли бузоқ бўлиб туғилади.

Агар биз шу соҳада қилинган ишлар тарихига назар ташлайдиган бўлсак, ембрион шаклини тасвирлаш ХВИИИ асрга бориб тақалади. ХИХ асрнинг охирларида биринчи маротаба Валтер Хип томонидан ембрионни кўчириб ўтказишга уриниб кўрилган. Виксонсия Университетида Виетт томонидан 1950 йили биринчи маротаба ембрионни кўчириб ўтказишдан бузоқ олинган. 1974 йили ембрионни кўчириб ўтказиш бўйича умумжаҳон жамияти (МОПЭ) тузилиб бунга 26 мамлакат кирган. Шу жамият маълумотига қараганда жаҳонда ембрионни кўчириб ўтказиш усули билан 1981 йили 35 минг бузоқ олинган бўлса, 1995 йилга келиб 1 миллиондан зиёдроқ бузоқ олинди. Бу усул айниқса АҚШ, Франсия, Англия, Олмония, Голландия, Исроил каби чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда кенг ёʻлга қўйилган. Хуш, бу соҳага шунчалик қизиқишнинг сабаби нимада? Биринчидан ушбу усул билан ҳайвонлар урчишидаги табиий тўсиқ бузилиб улар кўпайишдаги имкониятлар кенгайтирилади. Маълумки, урғочи уй ҳайвонлари бутун умри давомида 5-10 тадан зиёд насл колдирмайди. Ваҳоланки уларнинг тухумдонида юз минглаб пишиб етилмаган қиз хужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ёʻл билан 50 минг сигирни қочириш мумкин, лекин табиий шароитда улар фақат ўнлаб насл қолдириш имкониятига ега. Ҳайвонлар кўпайишидаги мана шу жуда катта имкониятлар фойдаланилмайди. Бу имкониятлардан тўлақонли фойдаланишда ембрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Айниқса бу усул юқори маҳсулдор ҳайвонлар сонини тез кўпайтиришда катта аҳамиятга ега. Масалан, битта юқори маҳсулдор сигирдан ембрионни кўчириб ўтказиш ёʻли билан йилига 10 ва ундан ортиқ бузоқ олиш мумкин. Бундай бузоқлар ирсий жихатдан бир-бирига яқинлиги билан табиий шароитда олинган бузоқлардан фарқ қилади. Бу еса уларни парваришлашда ва кейинчалик сут маҳсулоти ишлаб чикишда қўл келади. Бу усулнинг яна бир устунлик томони шундаки, қарилиги туфайли табиий шароитда насл қолдириш имкониятига ега бўлмаган юқори маҳсулдор сигирлардан ҳам кўплаб ембрионлар олиб реципиент-сигирларга ўтказиш мумкин. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини танлаш ва саралаш туфайли ҳозирги пайтда янги технологияга ҳамда жўғрофий иқлимга мос янги зотлар яратилган. Бундан 100 йил олдин сигирларнинг ўрта сут маҳсулдорлиги йилига 100-200 литрни ташкил қилган бўлса, ҳозирги пайтда бу кўрсаткич айрим мамлакатларда 5 минг литрдан ошиб кетади. Лекин Ўзбекистон шароитида бу кўрсатгич хали ҳам паст бўлиб ўртача 2300 литрни ташкил етди.

Эмбрионлар кўчириб ўтказишда донор сигирлар сут маҳсулдорлиги поданикидан 3 минг кг юқори бўлганда яхши самара бериб 5 минг кг дан кам бўлмаслиги керак. Сигирларнинг сут маҳсулдорлигини ошириш учун юқорида айтилган усулни қўллаш яхши натижа беради.

Айниқса ҳозирги пайтда муаммо бўлиб турган масала ҳайвонларни ҳар хил касалликларга чидамлилигини ошириш борасида бунда ҳам ембрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Бунинг учун юқори маҳсулдор ҳайвонлардан олинган ембрионлар, шароитга мослашган, касалликка чидамли реципиентларга қўйилади. Ҳозирги пайтда ембрионларни музлатиш ва ҳоҳлаган пайта еритиб реципиент ҳайвонларга қўйиш амалиётида - кенг қўлланилмоқда. Махсус музлатгичларда музлатилган ембрионлар дунёнинг ҳоҳлаган бурчагига олиб борилиш ва шартнома асосида юқори маҳсулдор подалар яратилиши мумкин. Энг муҳими шу пул билан ембрионларни бир мамлакатдан иккинчисига олиб ўтилганда касаллик тарқалиши ехтимоли ёʻқолади.

Бу усулнинг қимматли томони яна шундаки ёʻқолиб бораётган ҳайвонлар ембрионлари узоқ, муддатга музлатилиб улар генофонди яратилади. Эмбрионларнинг кўчириб ўтказишнинг яна бир муҳим томони шундаки, уларни бўлакларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун ембрионлар 60 та ҳужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлакларга бўлинади ва ҳар қайсиси биттадан реципиентга ўтказилади.

Натижада бир хил ирсиятга ега бўлган ҳайвонлар олинади.

Ҳозирги пайтда чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда ҳайвонларнинг кунлик ўсишдаги биологик потенсиали егалланди. Аммо сигирлар орасида йилига 25 минг ва ундан ортиқ сут берадиган ҳайвонлар мавжуд. Ўртача сут маҳсулотини юқори даражага етказиш учун олимлар томонидан ембрионлар пронеуклеусига юқори даражада сут беришни назорат қиладиган генларни ўрнатиш устида иш олиб борилмокда.

Юқорида биз урғочи ҳайвонлар тухумдонида юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчилик лабораторияларида ана шу қиз ҳужайралар олиниб, махсус суюқликларда парвариш қилиниб оталаниш даражасига етказиш на танадан ташқари (ин витро) оталантирилиб реципиентларга қуйиш муаммоси устида ишлаяпти. Бу соҳадаги жиддий муаммолардан бири ембрионларнинг қайси жинсга мансублигини аниқлаш. Ҳозирда мавжуд бўлган усуллардан фойдаланилганда 70 % ембрионларни жинси тўғри аниқланяпти. Ана шу муаммолар босқичма-босқич амалга оширилса ембрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳайвонларни урчитишда асосий усул бўлиб қолади.

Маълумки амалий селексия иккита муҳим ёндошишга боғлиқ, биринчидан ирсий хилма-хиллик ва иккинчидан генотиплар селексиясига. Ҳужайра технологияси ирсий хилма-хилликни яратишда мутлоқ бошқача ёʻл тутади. Бунга ўзини клонлаш натижасида ҳужайрада индуциялашган мутант олиш, ҳужайра селексияси, соматик ҳужайраларни гибридлаш, ситоплазматик генларни кўчириб ўтказиш ва бошқалар киради: сигирлар, айниқса юқори маҳсулдор сигирдан насл олиш паст даражада бўлганлиги учун генетик прогресс чекланган бўлади. Мана шу табиий тўсиқни олиб ташлаш усули ембрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳисобланади. Эмбрионларни кўчириб ўтказиш еса ўз навбатида қуйидаги 4 омилга боғлиқ: 1) кўплаб тухум ҳужайраларни чиқариш ва уларни оталантириш: 2) ембрионни йиғиш: 3) ембрионни кўчириб ўтказиш: 4) ембрионни музлатиш ва сақлаш. Мана шу омиллар ичида биринчиси, яъни кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун, донор сигирлар суперовуляция қилинади. Шуни айтиш керакки, жаҳон миқёсида ҳам ҳозирги пайтга келиб, гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонлар қанча ва қандай сифатда ембрион беришни олдиндан таваккал қила олмайди. Кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун донорларга, гонадотропин гармони юборишдан олдин улар тухумдонидаги сарик таначанинг хажми 1,5 см дан ошган бўлмаслиги яхши натижалар бериши еътироф етилган. Агар тухумдонлардан бирида ҳажми 10 мм ва ундан каттароқ фолликула борлиги аниқланса, унда ҳайвонларни гармонлар билан ишлов бергандан қатъий назар яхши натижалар бермаслиги олимлар томонидан исботланган. Бундан хулоса шуки, урғочи ҳайвонларни гармонлар билан ишлов беришдан олдин, уларни тухумдонларининг физиологик ҳолати яхшилаб текширилиши керак. Тажрибалар шуни кўрсатдики ҳайвонларнинг ҳаммаси ҳам гонадотропин гармонига бир хил реаксия беравермайди.

Гонадотропин гармонларини ҳайвон танасига юбориш улар жинсий даврнинг 10-12 кунларни яхши натижалар беради. Бундан ташқари сифатли ембрионлар олиш йил фаслларига ва озиқа тўйим-лилигига боғлиқлиги тажрибаларда исботланди. Сунъий ёʻл билан овуляция чақириш қўй ва ечкиларда ҳам қорамолларникидек бўлиб, фақат танага гармон юборишни жинсий даврининг 11-13 кунлари ташкил қилинади ва уларнинг куйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчқалар кўп насл берадиган ҳайвонлар гуруҳига кириб, улардан ембрион олиш гармонлар билан ишлов бермасдан ҳам бажариш мумкин. Шунга қарамасдан гармонлар билан ишлов берилганда 33-38 % кўпроқ ембрионлар олиш мумкин. Отларда гармонлар билан ишлов берилиб, ембрионлар олиш тўлиғича ишлаб чиқилмаган. Шундай қилиб, юқоридаги маълумотлардан аён бўладики, ҳайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, ембрионлар олиш кўп таъсирга боғлиқ. Шунинг учун ҳам ҳайвонлардан сунъий ёʻл билан ембрион олишни олдиндан айтиш қийин.

Гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонларни ўз вақтида қочириш сифатли ва керакли миқдорда ембрион олишда муҳим аҳамият касб етади. Гармонлар билан ишлов

берилгандан кейин куйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сариқ таначалар сони билан ўлчанади. Овуляция натижасида чиққан тухум ҳужайралар ва улар оталанишдан кейин ривожланаётган ембрионларни, ҳозирги пайтда мавжуд бўлган зондлар билан, 60-70 % ини ювиб олиш мумкин. Шундан 20 % оталанмаган тухум ҳужайраларни ташкил қилади.

Ҳозирги пайтда ембрионларнинг сифатини аниқлаш уч ё‘налишда олиб борилмоқда; 1) ембрионларнинг ташқи кўринишидаги бир-бирига боғлиқлик, уларнинг ёшига мувофиқлиги ва улар кўчириб ўтказилгандан кейин яшаб кетиши; 2) ембрионлари модда алмашинувини ўрганиб, улар ҳаётчанлигини аниқлаш; 3) ембрионлар қобиғи ва бластомерлар ситоплазмасининг ҳар хил бўёқларга нисбатан адсорбсион қобилиятини ўрганиш. Бу усулларни барчаси ҳам камчиликлардан ҳоли емас. Шунга қарамасдан ҳозир амалиётда ембрионлар фақат уларнинг морфологик кўриниши билан баҳоланиб, сифати аниқланмоқда.

Маълумки, ембрионларни кўчириб ўтказишда баҳоси юқори бўлган оталанган тухум ҳужайралардан фойдаланиш яхши самара беради.

Реципиент сигирларга ембрионларни кўчириб ўтказиш жараёни донор-сигирлардан ембрионларни ювиб жойлаштирилган асбоб (катетер) тухумдонида сариқ таначаси бор бачадон шохининг юқори қисмига усталик билан олиб борилиб ташланади.

Отларда ембрионларни кўчириб ўтказиш қорамоллардагидек ва жарроҳлик ё‘ли билан амалга оширилиши мумкин. Куй ва чучкаларда бу жараён факат жаррохлик усули билан амалга оширилади. кўчириб ўтказиладиган ембрионлар сони чучкаларда 4 тадан кам бўлмаслиги керак. Бундан кам бўлган ҳолда ембрионлар бачадон деворига ёпишмайди (инплантация) ва уларда кейинги ривожланиш бўлмайди.

Эмбрионларни кўчириб ўтказишда уларни донор-сигирдан ювиб олингандан кейин реципиент-сигирга жойланганига кадар бўлган вактда қандай сақлаш муҳим аҳамиятга ега. Бу давр 37 градусли ҳароратда, кўпчилик олимларнинг фикрича, 2 соатдан ошмаслиги керак. Лекин бу даврни узайтириш учун ембрионларни махсус асбобларда музлатиш ва керак бўлганда еритиб фойдаланиш мумкин.

Эмбрионларни музлатиш махсус автомат асбобларда амалга оширилиб, белгиланган дастурда ишлайди, у 3 қисмидан иборат бўлиб: електрон блоки, музлатиш камераси ва суюқ азот сақланадиган идишдан иборат. Музлатгич вазифасини азот пар бажаради. Ҳозирги пайтда ембрионларни музлатиш ва еритиб реципиент ҳайвонларга кўчириб ўтказиш натижасида кўплаб бузоқ, қўзи ва чўчқа болалари олинмоқда.

Эмбрионлар донор ҳайвонлардан ювиб олингандан кейин, ёки сунъий шароитда тухум ҳужайралар ўстирилиб, ин витро шароитида оталантирилгандан сўнг ҳар хил микроманитуляция ишлари олиб борилиши мумкин, Масалан, ембрионлар ядросини бошқа ядросизлаштирилган тухум ҳужайрага кўчириш кўплаб бир хил насл олишни клонлашни беради. Бу усул айниқса сигирларни хирургиясиз ё‘л билан ювиш ишлатила бошлангандан кейин кенг қулоч ёйди. Агар юқори маҳсулдор донор-сигиридан бешта 32 ҳужайрали ембрион ювиб олинса ва ҳар бир ҳужайра ядроси алоҳида тухум ҳужайрага кўчирилса, бир донордан 160 ембрион олинган бўлади. Бригц ва Кинг (1952) аниқлашича ембрионлар ёш пайтида улар ядроси кўчирилса ҳужайранинг ривожланиши яхши бўлади. Ядроси кўчириб ўтказиладиган ембрион кечки стадияда бўлса, ҳужайра ривожланиши бўлмайди. Чунки ембрионлар бу даврда узларини РНК синтезини амалга ошира бошлайди. Олдинги даврда еса она транскрипсияси амалга оширилади. Шундай қилиб қўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш ембрионлар ядросини қайтадан программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум ҳужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир ембриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

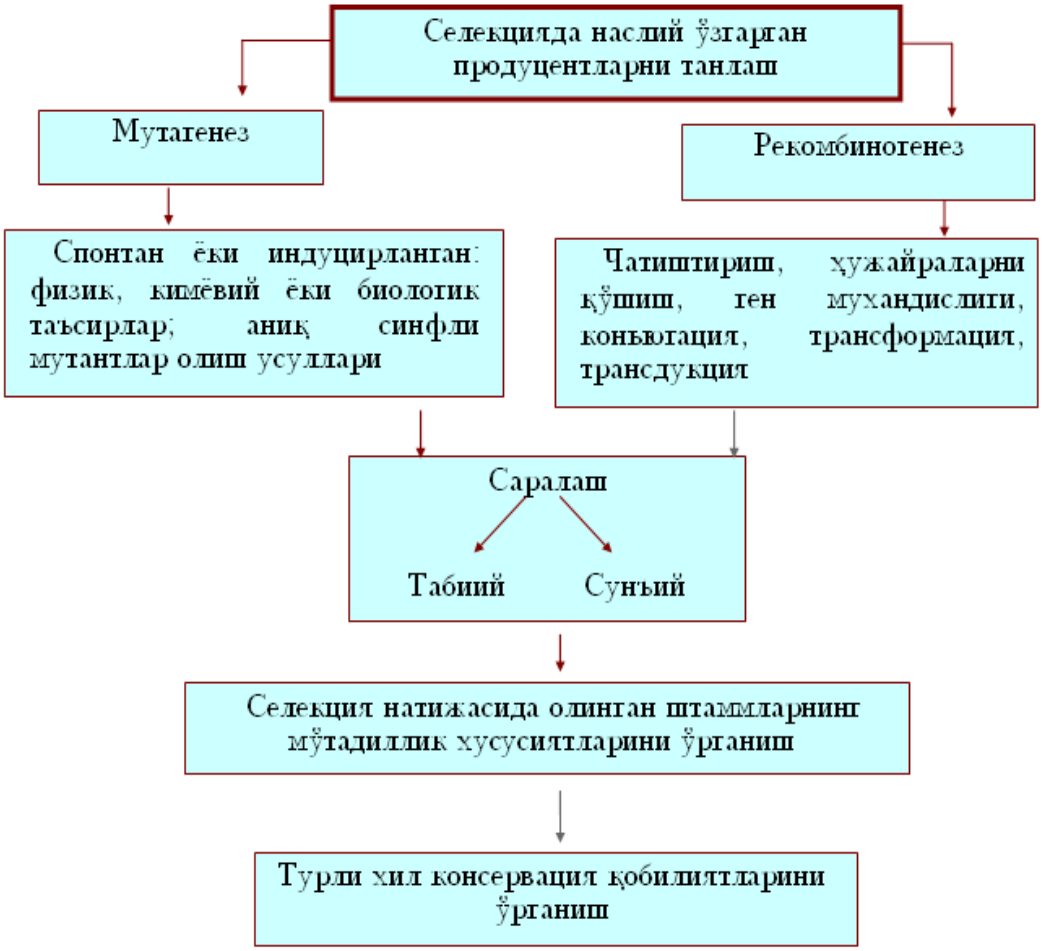
Продусентларни яратиш усуллари

Микроорганизмларнинг табиий штаммларини ҳосилдорлиги кўпинча талаб даражасидан паст бўлади.

Ҳосилдор штаммлар яратиш учун йўналтирилган селексия - усулидан фойдаланилади (1-чизма).

Бунинг учун кимёвий мутагенлар ёки радиасион нурлардан фойдаланилади. Селексия ва танлов ишлари баъзида йиллаб вақт егаллайди ва натижада микроб ҳосилдорлигини 100 ва ундан ҳам кўпроқ маротабалаб ошириш мумкин бўлади. Масалан, ҳозирги даврда саноат усулида ишлатиб келинаётган пенисиллин антибиотиги синтез қиладиган продусентнинг фаоллиги дастлабки штаммларга қараганда 10 минг маротабадан ошиб кетган.

Юқори фаолликга ёки ҳосилдорликга ега бўлган штамм яратиш учун селексионер, табиий штаммни генетик материалларини ўрганиш борасида ўта мураккаб, ўта нафис ишларни амалга ошириши лозим бўлади. Бунда, генларни рекомбинасияси билан боғлиқ бўлган барча усуллардан, хусусан: конъюгасия, трансдуксия, трансформасия ва бошқа генетик жараёнлардан фойдаланишга тўғри келади (28-расм).



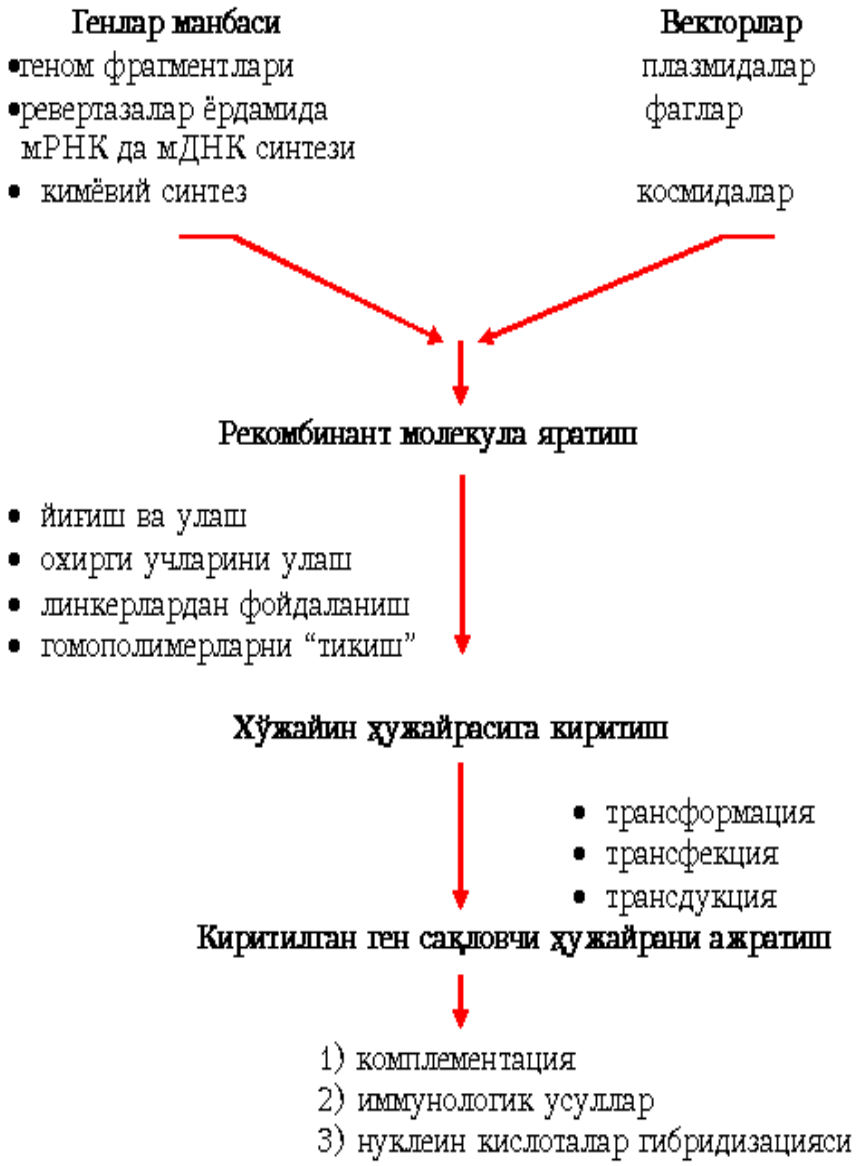
28-расм. Микроорганизмлар селексияси

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

Кўпинча трансдуксия (бактерия вируслари-бактериофаглар ёрдамида бир бактериядан бошқа бактерияга генлар ўтказиш) ва амплификасия (керакли генларни нусха

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

Селексия ишларини яна бир йўли бу ҳар-хил бактериялар протопластларини бир-бирига бирлаштириш натижасида генетик рекомбинантлар олиш йўлидир (29-расм).



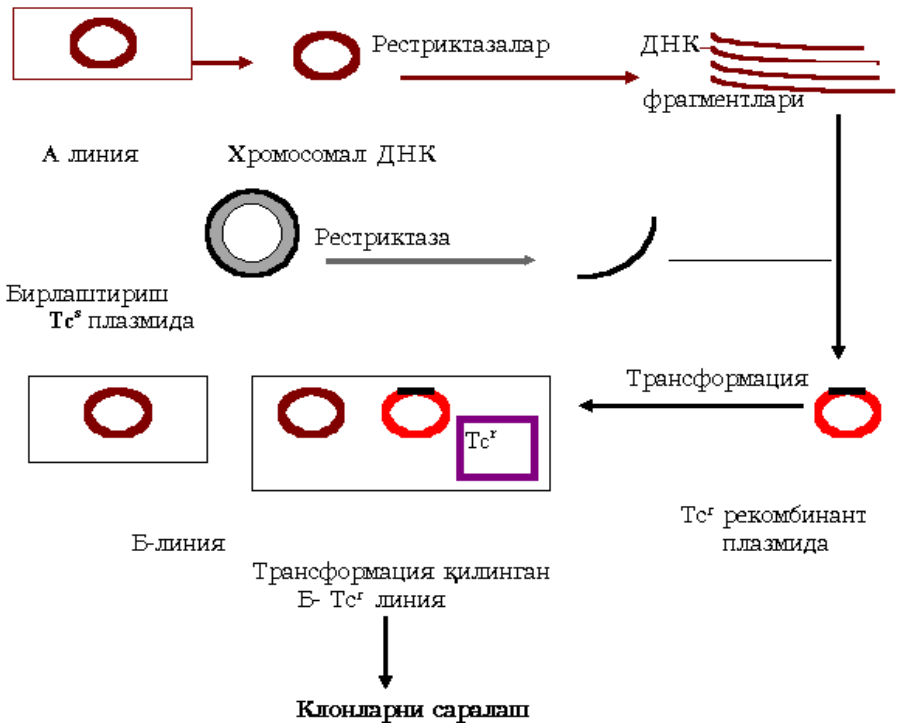
29-расм. Генларни клонлаш стратегияси

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

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

Микроорганизм – продусентларни ген мухандислиги усуллари ёрдамида яратиш Ўтган асрнинг 70 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) мухандислик яратилди. Бу усулнинг асосида ҳужайрадан ташқарида рекомбинант ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оқибатида генларни соф ҳолда ажратиш, уларни модификасия қилиш, бирини иккинчисига улаш, “генлар мажмуаси” яратиш, оқибатида бутунлай янги хусусиятига ега бўлган оқсил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оқсиллар муҳандислиги деб аталади (4–чизма).

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



31-расм. Плазмида ДНК си ва бактерия ҳужайрасидан фойдаланиб, генни клонлаш чизмаси

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

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

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

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

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

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

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

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

Ген мухандислиги муаммолари билан шуғиланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараённи асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ емас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оқсил моддаларини керакли меъёрда ушлаб туриш, уларни модификасияга учраб,

микроорганизм ҳужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғлиқдир.

Ҳужайра биотехнологияси - ҳужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Ҳужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир узгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмидан ташқдрида яшаши ва кўпайиши учун шароит тугдириб бериш лозим. Ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни сунъий озуқа муҳитида, стерил шароитда ***(ин витро)*** ўстириш, усули ажратилган тўқималар культураси деб ном олди ва уларни биотехнологияда ишлатиш мумкинлиги сабабли, катта ахамият касб етди.

Биотехнология узоқ - узоқлардан маълум бўлсада, алохида амалий фан сифатида утган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният енг аввало узи учун ута зарур бўлган яъни озик-овкдт, енергетика, захира (ресурс), атроф - муҳитни муҳохазаси ва х.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди. Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва хайвон тўқималари, ҳужайралари ва оргаларидан фойдаланишга асосланади. Хозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида еътибор берилмокда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошкд технологияларга нисбатан бир қатор устунликка егалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам енергия талаб киладилар, деярли чикиндисиз, екологик тоза ва х.к Шунинг билан бир кдторда, биотехнология стандарт жихрзлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иклим шароитига карамасдан хамда кўп майдон егалламаган ҳолда жараёнларни йил буйи утказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва хайвонларни ҳужайралари, тўқималари ва органларига хам тегишлидир.

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

Биринчи йўналиш *ажратиб олинган ўсимлик ҳужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва боища соуалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, ефир мойлари ва боища биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боглиц. Маълумки, иккиламчи метаболитлар каттщ (агарли) ёки суюц озуца муҳитида ўстирилган каллус туцималардан олинади. Ҳужайра технологияси асосида диосгенин - диоскоре уужайрасидан; аймолин - илон рацволъфи уужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар - женъшен х;ужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт уамда парфюмерияда ишлатилади. Шуни еътиборга олиш керакки, ўстириладиган ҳужайраларни хосилдорлиги, бутун ўсимликни хосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириш имконияти булмаган шароитда (совуц ёки иссиц иклимли минтакаларда), уларни ҳужайраларини бутун йил мабойинида устриш мумкин.*

Иккинчи йўналиш *- ажаратиб олинган ҳужайраларни, ўсимликлар селексиясида ишлатиш ва ту орсали тез ривожланувчи, хор хил ташси муҳит таъсирига*

Назорат учун саволлар

1 *Хайвон ген мухандислиги ўзига хос томонларини сананг?*
2 *Хайвон хужайраларнинг ўзига хос маркерлари қандай тузилган?*
3 *Вирусларни вектор сифатида қўллашнинг ахамиятли томонлари?*
4 *Ўсимлик ҳужайраларига генларни киритиш ҳақида тушунча беринг?*
5 *Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси ҳақида тушунча беринг?*

6 Трансген ўсимликларнинг яратилиши ва аҳамияти?
7 Ҳайвонлар ген муҳандислиги ҳақида тушунча беринг?
8 Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш ҳақида тушунча беринг?

8-МАЪРУЗА.
ҲУЖАЙРА МУҲАНДИСЛИГИ.(6 с)

8.1 микроорганизм биокимёвий фаолликларини бошқариш жарёнлари. (2с)
8.2 ҳужайраларни ўстириш ва сақлаш. Ҳужайра културалари. (2с)
8.3 биотехнологияда одам ва ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш.(2с)

Режа:

1. Хужайраларни ўстириш ва сақлаш
2.Ҳужайралари культуралари
3.Ўсимлик хужайрасини ўстиришдаги фарқлар
4.Биотехнологияда одам ва хайвон хужайра культураларини қўллаш
4.Протопластларни қўшилиши
5.Соматик ҳужайралар гибридизацияси
6.Хужайра культураларини хосил қилиш.
7.Ўсимлик хужайраларини ўстириш
8.Хайвон хужайраларини ўстириш

***Таянч сўзлар*:** Хужайра, ўстириш, сақлаш, каллус, каллусогенез, ҳужайра ва тўқима культуралари, протопластлар, гибридомалар, озуқа муҳити,хужайра, ўстириш, сақлаш, каллус, каллусогенез, ҳужайра ва тўқима культуралари, протопластлар, гибридомалар, озуқа муҳити

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

Биотехнологиянинг янги босқичи ноанъанавий объектлар – кўп ҳужайрали юқори организмларнинг тўқима ва ҳужайралари культураси, ҳамда микроорганизмларнинг культурасини олиш имконини берди. Микроорганизмлар культурасига нисбатан юқори организмлар культуралари биотехнологиянинг **янги объекти** ҳисобланади. Ўсимликлар культурасини олиш методи XX асрнинг 70-йилларида яратилган.

Ўсимлик ҳужайраларини культурасини олишнинг асосий типи каллус тўқимасини, баъзида эса ўсимликларнинг ўсма ҳужайралари культураси олишдир. Ўсма ҳужайралари культураси чуқур ва юзаки экилганда кўринишидан ва морфологик жиҳатдан деярли фарқ қилмайди. Уларнинг асосий фарқи шундаки, ўсма ҳужайралари гормонга боғлиқ эмас, шунинг учун уларнинг озуқа муҳитига фитогормонлар қўшиш керак эмас. Ундан ташқари ўсма ҳужайралардан органогенез жараёнида илдиз ёки куртаклар унмайди. Каллус ҳужайралари культураси эса тўсатдан гормонга боғлиқ бўлмай қолиш хусусиятига эга. Каллус ҳужайралари бўлиниши натижасида (юқори ўсимликларга хос бўлган ҳужайра дифференциациясининг бир типи) **каллус тўқималари** ёки каллус ҳосил бўлади.

Каллус ҳужайралари культурасини олиш учун юқори ўсимликларнинг турли органлари (эксплантлар)дан бир қисм (фрагмент) олиб стериллик қоидаларини сақлаган ҳолда уни пробирка, колба ёки Петри чашкасидаги сунъий озуқа муҳитига эқилади.

Эксплант ҳужайраларининг дедифференцияланиши ва **каллусогенез** жараёнининг хусусиятлари олинган тўқиманинг хусусиятларига боғлиқдир. Ўсимликларнинг махсус тўқималари (паренхима, илдиз ва поя, барг мезофили ва б.) нинг ҳужайралари озуқа муҳитида ўзига хос функцияларининг йўқотиб дедифференциялашиши ва фаол бўлинадиган ҳужайра ҳолатига келиши керак.

Ўсимлик ҳужайра ва тўқималари культуралари ўстириладиган **озуқа муҳит таркибида** минерал тузлар (макро ва микроэлементлар), углерод манбаи (саҳароза ёки глюкоза), витаминлар ва ўсиш регуляторлари бўлиши керак. Зарур ҳолларда озуқа муҳитига турли комплекс бирикмалар (казеин гидролизати, аминокислоталар аралашмаси, ачитқи экстракти, турли ўсимлик экстрактлари) қўшилади. Янги объект билан ишлаётганда озуқа муҳитларининг оптимал таркибини танлай билиш керак.

Юза усулда экилган каллус тўқималари ранги оқ, сарғиш, яшил, қизил, аниқ бир анатомик структурага эга бўлмаган аморф массага эга бўлиб, консистенцияси жиҳатидан ҳам фарқланади.

Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик ҳужайралари культуралари **суспензион культуралар** дейилади. Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик ҳужайралари культуралари каллус культураларининг юза экиш усулидан афзалликка эга. Суюқ муҳитда метаболизм ва ҳужайра популяцияси ўсишига турли экзоген омиллар билан таъсир этиш мумкин. Суспензион культуралар биокимёвий ва молекуляр-биологик тажрибалар – ферментлар индукцияси, генларни экспрессияси, мутантларни яратиш ва уларни тавсифлаш учун қулай.

Суспензион культуралар учун ҳужайралар каллус тўқималаридан олинади. Сўнг улар доим аралаштириб турган ҳолда суюқ озуқа муҳитига ўтказилади. Суспензион культураларни ўсимлик тўқималаридан ҳам олиш мумкин, фақат бу усул кўп вақт талаб қилади. Бунинг учун эксплант ҳужайраси аввал бирламчи ҳосил қилиши керак, сўнгра эса озуқа муҳитида кўпайиб, суспензия кўринишида ўсадиган ҳужайра линиялари учун манба бўлиб ҳисобланади.

Ҳужайра культураларида ўсимликлар учун хос бўлган бирикмалар: алкалоидлар, гликозидлар, полисахаридлар, эфир мойлари, пигментлар ва б. мавжуддир. Ўсимлик ҳужайраларидан фермент препаратларини ишлаб чиқариш мақсадида фойдаланиш табиий ёки сунъий манбардан қимматли маҳсулотларни олиш имконини беради.

Мутант, гибрид ёки трансформацияланган ҳужайраларни клонал селекциясида изолирланган ҳужайралар ва регенерацияланган протопластларни ўстириш методи орқали амалга оширилади.

Ўсимлик протопластлари – мембрана билан чегараланган, ички ҳужайравий органеллалари таркиби сақланган структуравий тузилмадир.

Протопластлар 2 усулда ажратиб олинади:

1. **Механик усул**. Биринчи бор ўсимлик ҳужайраси протопластлари 1892 йили телорез сув ўсимлиги ҳужайрасида плазмолиз ҳодисасини ўрганиш жараёнида ажратиб олинган. Бунинг учун ўсимлик тўқимасидан кесма олинади ва 0,1 М ли сахароза эритмасига солинади. Протопластлар “бужмайиб” ҳужайра деворидан ажралади, сўнг скалпель ёрдамида кесма кесилади ва протопластлар муҳитга ажралади.

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

Протопластлар культурасини олиш учун 2 хил ёндошилади: суюқ муҳит томчиларида инкубация қилинади ва агарли қатламга ўтказилади.

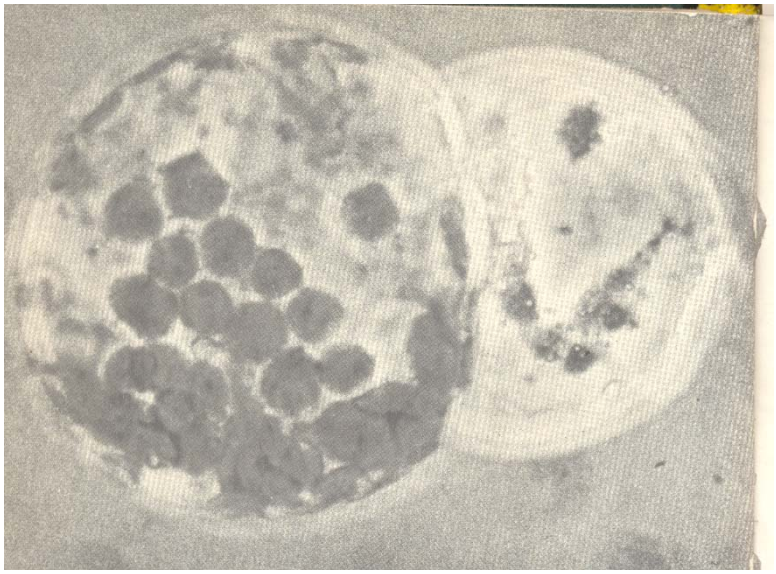
Изолирланган протопластлар ҳужайра деворини тиклагунга қадар қисқа вақт ичида бир-бири билан қўшилиши мумкин. Бу жараён нафақат бир типдаги ўсимлик протопластлариаро, балки гетеролик протопластлараро бўлиши ҳам мумкин. Шу усул билан 2 турдаги тамаки ўсимлигини протопластларини қўшиб регенерацияланган ўсимлик олинган. 1978 йили эса картофель ва томат ўсимликларининг протопластлари қўшилган.

Бунинг натижасида томатнинг касалликларга чидамли факторлари картофелга кўчирилган.

Соматик гибридизация – ўсимликларни гибридини яратишнинг янги методи бўлиб, бунда гибридланаётган ҳужайралар сифатида гаметалар (репродуктив ҳужайралар) эмас, балки протопластлар олинадиган ўсимлик танасининг ҳужайралари (соматик) қатнашади. Протопластларни қўшиш билан ҳужайра геномидан ташқари 2 та турли цитоплазмалар ҳам қўшилади. Кўпгина ҳолларда юқори ўсимликларни протопластларини қўшиш

32-Расм.

ин витро тажрибаларида пальмани (Элаеис гуинеенсис) клонлаш. *Пальманинг ёш барглари бўлакларидан каллуслар олиниб экмага эқилади. Иккинчи муҳитда улар кўпаяди ва учинчи муҳитда каллуслар эмбриоидлар ҳосил қилади. Бундай соматик эмбрионегенездан сўнг эмбриодлар ривожланиб, улардан аввал кластер, кейинроқ ёш ниҳоллар унади.*



33-расм

Протопластларни қўшилиши.

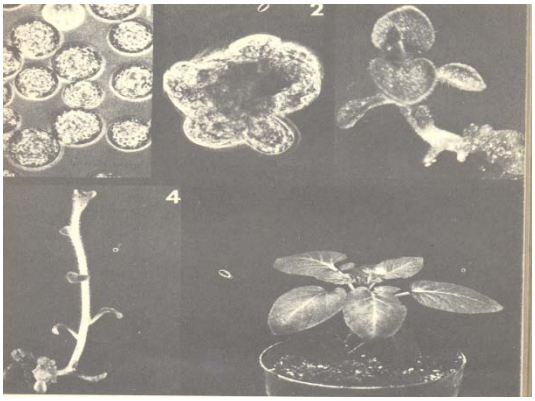
Картофель баргидан олинган альюбинос протопласт ва томат баргининг соғлом протопласти қўшилган. Бундан мақсад томат генларининг касалликларга чидамли геномларини картофел геномига киритишдир.

натижасида ёки гибрид ёки цибрид ҳосил бўлади. Цибрид ўсимликда иккала ўсимликнинг цитоплазмаси, ядро эса фақат биттасиники бўлади.

Гетерологик протопластларни қўшаётганда мос келадиган маркерни танлаш керак. Бундай маркер сифатида пластидалар ёки хлоропластлар бўлиши мумкин. Пластидалардан ташқари биокимёвий ёки генетик маркерлар: масалан, изоэнзимли

таркиб, нуклеин кислоталарнинг хусусиятлари, маълум бир моддаларга чидамлилик ва хромосомалар ёки ҳужайра кариотиплари сони ҳам бўлиши мумкин.

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



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

Ўсимлик ва ҳайвон ҳужайраси культураларини ўстириш технологиялари. Биотехнологик мақсадлар учун организмларнинг ёппасига культурасини олиш технологиялари бактериялар, ачитқилар ва мицелиал замбуруғлар учун ишлаб чиқилгандир. Яқин вақтларга келиб ўсимлик ва ҳайвон ҳужайрлари культурасини яратиш бўйича ишлар бошланди. Ўсимлик ҳужайраларини культураси олиш техникаси ёрдамида кўплаб мамлакатларда маълум бир ўсимликларни учун экиш материали бўлиб келмоқда. Ушбу методлар органогенез ва ниҳолларни амплификациялаш, сўнгра уларни тупроққа экиш бўйича қилинган ишлар натижасида такомиллаштирилмоқда. Лекин, кўплаб ўсимликлар ҳужайраларининг суспензион культураларини яхлит ўсимликка хос бўлган маҳсулотларни олиш (никотин, алкалоид, женьшень) мақсадида экиш кенг миқёсда ишлаб чиқилган ва у қўлланиб келинмоқда. Дигиталис, ясмин, ялпиз, кодеин каби қимматбаҳо препаратларни ишлаб чиқариш самарали ҳисобланади. Ўсимлик ҳужайралари суюқ доимо аралаштирилган муҳитда культурасини олишда ишлатиладиган ферментацион методлар микробиология технологиясига хосдир. Ўсимлик ҳужайралари бактерияларга нисбатан секин ўсишига қарамай, уларнинг ҳарактеристикаси бир-бирига яқиндир.

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

Ҳайвон ҳужайралари ё суспензия кўринишида ёки қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўстирилади. Бундай ҳужайралар, масалан, ҲеЛа (инсон ўсмаси ҳужайраси) иккала ҳолатда ҳам ўсиши мумкин; лимфобластом ҳужайралар суспензион культурада, нормал диплоид ҳужайралар эса қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўсади.

Охирги пайтларда ҳужайра ўсишини назорат қилувчи системалар «бухта» кўринишида ўралган, газни ўтказувчан тефлон трубкаларга асосланган. Бундай шароитларда кўплаб ҳужайраларни культурасини олиш мумкин. Яна бир самарали метод, бу ҳужайраларнинг унча катта бўлмаган маржонлар (шарчалар, микроташувчилар)га бириктирилишига асосланган усулдир. Шарчалар сефадексдан ясалиб, юзаси 7 $см^2$/мг бўлиши мумкин. Шарчалар суспензион ҳолатда суза олади ва уларда турли типдаги ҳужайралар ўсиши мумкин. Бу усул ёрдамида инсон интерферони олинмоқда.

Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллаш

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

Иммобилланган ҳужайралар иммобилланган ферментлар, ҳамда эркин ҳужайралардан ҳам бир қатор афзалликларга эгадир. Булар қуйидагилардир:

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

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

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

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

Физикавий методлардан адсорбция ва агрегациядир.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иммобилланган ҳужайралар бир қанча афзалликка эга:

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

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

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

4. Каллус ва суспензион культуралар ўстирилаётган муҳитни ўзгартиришда уларни зарарлаш ёки культурани ифлослантириш мумкин. Бу қийинчиликларни физик жиҳатдан ҳаракатсиз ҳужайралар атрофидаги катта ҳажмдаги озуқа муҳитини циркуляция қилиш билан бартараф этилади.

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

Иммобилланган ҳужайралардан фойдаланганда керакли маҳсулотларни ажратувчи кимёвий моддалар билан ишлаш мумкин. Айрим ўсимликларнинг, масалан *Сапсицум фрутесценс* ўсимлиги ҳужайрасининг культураси иккиламчи метаболитларни атроф-муҳитга ажратади. Иммобилланган ҳужайралар системаси эса культурани зарарламасдан

маҳсулотни олиш имконини беради. Демак, ҳужайраларни иммобиллаш идиолитларни осон изоляциялаш имконини беради.

Иммобилланган ҳужайралар культурасини олиш 2 хил системада амалга оширилади:

3. Ясси асосли культура системасида ҳужайралар идишга горизонтал идишда ўстирилади.
4. Колонкали культура системасида ҳужайралар вертикал идишда ўстирилади.

Иккала системада ҳам суюқ муҳит ҳаракатсиз ҳужайралар атрофини циркуляциялайди.

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

Эксплантни стерилизацияси, шунингдек уруғлар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация қилувчи эритмада ушлаб туриш, кейин эса стерил сув билан ювиб ташлаш орқали амалга оширилади. Стерилизация даври эксплантни характерига ҳамда эритмани стерилизация қилиш хусусиятига боғлиқ. Одатда уруғ 10-20 мин, вегетатив қисмлар эса 5-10 мин. давомида стерилизация қилинади. Стерилизация қилувчи эритмаларга мисоллар 3.1- жадвалда кўрсатилган.

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

10-жадвал.

Дастлабки ўсимлик материалларини стерилизация қилиш (Р.Г.Бутенка, 1990 йил)

Манба	**Стерилизация вақти, мин**			
	0,1% ли диацид	**0,1% ли кумуш хлорид ($АгСл_2$)**	**5-9 % ли гипохлоритлар (Na, Ca)**	**10-12% ли водород пероксиди ($Х_2О_2$)**
Уруғлар				
қуруқ	15-2	10-15	15-20	12-15
намланган	6-10	6-8	10-15	6-8
Тўқималар				
сутли илдиз, илдизмева	20-3	15-25	15-20	-
дарахтланган поя	20-4	20-25	20-25	-
барглар	1-3	1-3	3-6	3-5
апекслар	1-10	1-7	3-15	2-7

Стерилизация кейин ўсимлик объектлари стерилланган сув билан тозалаб ювиб ташланиши керак. Сиртқи стерилизация эксплантни фақат ташқи инфекциядан озод қилади. Агар эксплант тўқималари ички инфекцияга эга бўлсалар, уларга антибиотиклар билан ишлов беришга тўғри келади. Айниқса ички инфекцияга йирик томирли тропик ва субстропик ўсимликлар бой бўлишади. Культураларни замбуруғлар ёки бактериялар билан ифлосланиши экилгандан 1-14 кун ўтганда кўзга ташланади. Ёруғлик хонасидаги ҳавони ифлосланишдан сақлаш учун, ифлосланган культурани дарҳол йўқотиш керак.

Озуқа мҳитларини автоклвда, 120^0С да 0.75 – 1,0 атм. босимда 20 минут давомида стерилизация қилинади. Агар озуқа муҳити таркибига юқори хароратда парчаланадиган моддалар кирса, уларни алоҳида совуқ стерилизация қилинди. Уларни тешиклар диаметри 0,22 – 0,45 мкм, бўлган бактериал фильтрлардан ўтказилади ва автоклавдан чиққан озуқа муҳитини 40^0 С гача совутиб, кейин уларни аралаштирилади. Олдиндан фольгача ёки ўрайдиган қоғозга ўралган идишларни қуруқ иссиқ билан, қуритгич шкафларида 160^0С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Озуқа муҳити

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни ўстириш учун мўлжалланган озуқа муҳитлари, ўсимликларни яхши ўсиши учун керак бўлган барча макроэлементлар (азот, фосфор, калий, кальций, магний, олтингугурт ва бошқалар) ва микроэлементлар (бор, марганец, рух, мис, молибден ва бошқалар) ҳамда витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларни синтетик аналогларини сақлаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казсин гидролизоти, ЭДТА (этилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни ҳужайра киришига ёрдам беради) ва бошқа керакли моддалар сақлайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озиқа муҳитига кокос ёнғоғини (какос сути), каштан дарахтини эндоспермасини қўшилади. Карбон сувлар озуқа учун энг керакли компопенентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни автотроф озиқланишга қурблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпроқ 2-3 % ли сахароза ёки глюкоза эритмасидан фойдаланилади.

Фитогормонлар ҳужайраларни табақаланиши (дедифференцировки) ва ҳужайра бўлинишини кучайтириш (индукция) учун керак. Шунинг учун ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озуқа муҳити таркибида албатта ауксинлар (ҳужайра бўлинишини кучайтирувчи) бўлиши шарт. Поя морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар миқдорини камайтириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

Гормон сақламайдиган озуқа муҳитида шиш ва «ўрганган» тўқималар ўсади. Ҳар икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлик, бу ҳужайраларниўзларини гормон синтезқилиш хусусияти билан боғлиқ.

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

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

Ҳозирги пайтда жуда кўп сонли озуқа муҳитларни таркиби аниқ бўлсада, ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ***ин витро*** шароитида ўстириш учун Т.Мурасига ва Ф.Скуга муҳитлари ишлатилади. Бу муҳитни таркиби биринчи марорта 1962 йилда эълон қилинган ва у жуда яхши балансланган озуқа моддалари таркибига эга ва бошқалардан аммонийли ва нитратли азотни нисбати билан фарқ қилади (3.2-жадвал).

11-жадвал.

Ўсимликларни ажратиб олингн тўқималарини ўстириш учун ишлатиладиган озуқа муҳитларини таркиби

Озуқа муҳити компонентлари	***миқдори, мг/л***			
	Мурасига-Скуга	**Гамборга**	**Шенка - Хильдебрандта**	**Грессхофф-Доу**
$НХ_4НО_3$	1650	2500	2500	-
$НХ_4Х_2ПО_4$	-	-	300	-
$КНО_3$	1900	-	-	1000
$СаСл_2+2Х_2О$	440	150	200	150
$Мг\ СО_4\times7Х_2О$	370	250	400	250
$(НХ_4)_2СО_4$	-	130	-	-
$КХ_2ПО_4$	170	-	-	-
$На_2$ЭДТА	37,3	37,3	20,0	37,3
$ФеСО_4\times7Х_2О$	27,95	27,85	15.0	27,8
$НаХ_2ПО_4\times Х_2О$	-	150	-	90,0
$Н_3ВО_3$	6,2	3,0	5.0	3,0
$МнСО_4\times4Х_2О$	22,3	10,0	10,0	10,0
$ЗнСО_4\times7Х_2О$	8,6	2,0	1,0	3,0

Кл	0,83	0,75	1,0	0,75
$Na_2MoO_4 \times 2Х_2O$	0,25	0,25	0,1	0,25
$CuCO_4 \times 5Х_2O$	0,025	0,025	0,2	0,25
$CoУ_2 \times 6Х_2O$	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотин кислотаси	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-ҲСл	0.5	1,0	0,5	0,1
Тиамин ҲСл	1,0	10,0	5,0	-
2,4–	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Глутамин	-	-	-	2,0
Сахароза	30000	30000	30000	20000

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

Ўстириш шароити

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

Морфогенезга аниқланган (детерминированўе) тўқималар ёруғликга ўтказилиб, кейин 1000-4000 лк ёруғликда ўстирилади. Ажратиб олинган меристемлар ва уларни микрокўпайтириш ҳам ёруғликда ўтади. Ёруғ уйчани ёруғлиги 1000 – 10000 лк бўлиши керак ва ёруғликни кучи ўсимликни хусусиятларига боғлиқ. Ўстриладиган объектни фото даврини ҳам ҳисобга олиш керак.

Ўстириладиган хонада намлик 60-70 % бўлиши керак. Ундан қуруқроқ хаво озиқа муҳитини қуритиб юборади, агар пробирка пахтали тиқин билан бектилган бўлса, озуқа моддаларни концентрацияси ўзгариб, ўстириш шароити бузилади.

Кўпчилик тўқималарни ўстириш учун оптимал харорат 25-26^{0}С. Агар тропик ўсимликларни тўқималари бўлса 29-30^{0}С да ўстирилади. Морфогенез индукция қилинганда харорат 18-20^{0}С гача туширилади. Одатда климатик камералардан фойдаланилади.

3. КАЛЛУС ТЎҚИМАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Умумий ҳолати

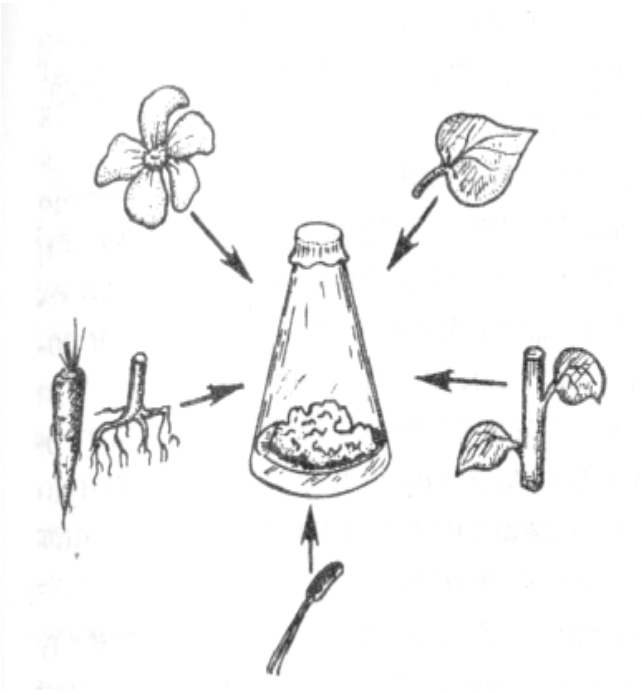
Ажратилган тўқималар культураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима бўлиши мумкин. Каллусли культура табақалашмаган (дедифференцированнўй) ҳужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни ўзига хос равишда табақалашади. Каллус дегани қадоқ (қотиб қолган) деган маънони англатиб, ин витро шароитида алоҳида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо бўлиши мумкин.

Ин витро шароитида каллус тўқима, асосан оқ ёки сариқроғ жуда ҳм кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус ҳужайралар қариганда, тўқ қўнғир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тўпланиши билан боғлиқ. Вақт ўтиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан қутулиш мақсдида озуқа муҳитига антиоксидантлар қўшилади.

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

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

Ўсимлик ҳужайрасини табасизланиши ва уни каллусга айланиши учун шарт бўлган шароит-бу озуқа муҳити таркибида икки фитогормонларни яъни ауксинлар ва цитокининларни бўлишидир. Ауксинлар ҳужайраларни табақасизланишини (дедифференцировка) чақирса уларни бўлинишига тайёрлайди, цитокининлар табақасизланган ҳужайраларни бўлинишига (тролифорция) олиб келади. Агар таркибида гормон сақламаган озуқа муҳитига поя, барг ёки илдизни бир қисмини тиқиб қўйилса, ҳужайраларни бўлиниши амалга ошмайди ва каллус тўқима ҳосил бўлмайди. Бу табақалашган ҳужайраларни бўлинаолмаслиги билан боғлиқдир (3.1-расм).



35-расм. Турли хил эксплантлардан каллус тўқимаси культураларини олиш:

Ҳар бир ҳужайра ўсишни уч босқичда ўтади:

- ***бўлиниш;***
- ***чўзилиш;***
- ***табақаланиши (дифференцировка).***

Охирги босқични (фазани) характерли томони ҳужайрани иккиламчи қобиғини қалинлашуви ва ҳужайрани бўлинишга бўлган қобилиятини йўқотишидир. Дифференциацияга учраган ҳужайралар яна қайтадан бўлиниш қобилиятига эга бўлиши учун, уларни дедифференцировка бўлиши шарт, яъни ҳужайра худди меристема ҳолатига қайтиши керак. Табақаланган ҳужайраларни кўпайтириш тартибсиз, анархия шаклида ўсишга олиб келади ва оқибатда каллус тўқима ҳосил бўлади. Шундай қилиб, ихтисослашган ҳужайраларни каллус тўқималарга айланиши ҳужайра бўлинишини кучайтириш билан боғлиқ бўлиб, табақалаш жараёнида, ҳужайра бўлиниш қобилиятини йўқотади.

Озуқа муҳити таркибида цитокининларни бўлмаслиги тамаки ўсимлигини ўзак қатлами паренхимасида ҳужайра циклини тўсиб қўяди. Шунинг учун ҳам агар озуқа муҳити таркибида фақатгина ауксин бўлса, ҳужайра бўлинмайди ва тўрт кунлик даврдан кейин чўзилиб, ўсишга ўтади.

Ауксинларсиз, фақат цитокининларни ўзлари ҳам гормон сақламаган озуқа муҳитига ўхшаб, ўсимликни қаришига олиб келади. Тамаки ўсимлиги мисолида келтирилган далиллар бирта гормон сақлаган озуқа муҳитида каллусли тўқима ҳосил бўлишини барчасини тушунтира олмайди. Бунга зид бўлган мисоллар ҳам бор.

Масалан, буғдойни етилмаган куртакларида цитокининсиз 2,4-Д сақлаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ёки кунгабоқарни уруғ палласида цитокинин сақлаган ауксин сақламаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ва х.к. Кузатиладигн натижалар кўпроқ эндоген гормонларга, аниқроғи у ёки бу эксплантни ҳужайрасида сақланадиган гормонлар билан яъни ҳужайрани гормонал статуси билан боғлиқ эканлиги исботланган.

Баъзи бир олимларни фикрларича, ҳужайрани бўлинишини ауксин ёки цитокинин эмас, балки полисахаридлар ва бошқа қандайдир индукторлар чақириши ва каллус ҳосил бўлишига олиб келиши мумкин.

Апексни асосий қисмида каллусли ўсишга ўтиш жараёни ҳужайра бўлинишини тўхташи билан бошланади. Лаг – фаза 24-28 соат давом этади. Бу давр мобайнида ҳужайра катталашиб, тўқималар шишади. Лаг фаза тугагандан кейин ҳужайра тез бўлиниб, каллус тўқима ҳосил қилади. Шундай қилиб, агар ихтисослашган ҳужайраларни дедифференциацияси фитогармонлр таъсирида бўлинишни кучайиши (индукцияси) билан боғлиқ бўлса, бўлинадиган меристемали ҳужайраларни дедифференциацияси бўлинишини тўхташ билан хужйрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил бўлишига олиб келувчи бўлинишни кучайиши билан боғлиқ.

Бир фитогормоннни таъсир самараси, нишон тўқимани физиологик тавсифига қараб ҳар хил бўлиши мумкин.

Ҳужайрани ***ин витро*** шароитида дифференциалланган ҳолатдан дидефференциалланган ҳолатга ва ҳужайрани фаол бўлинишга ўтиши, генларни фаоллигини ўзгариши билан бошланади. (Эпигеномли ўзгарувчанлик). Бир генни фаоллашуви ва иккинчисини репрессияга учраши ҳужайрадаги оқсил таркибини ўзгаришига олиб келади. Каллусли ҳужайраларда ўзига хос бўлган оқсиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг ўзида баргнинг фотосинтез қилувчи ҳужайраларида оқсиллар миқдори пасаяди. Икки паллали ўсимликларда дидефференциаллашган генларни репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон ўтади.

Дедифференциаллашган ҳужайрларни каллус тўқималар ҳосил бўлишига олиб келувчи тартибсиз кўпайишга ўтиши биланбиокимёвий ва цитологик ўзгаришлар содир бўлади. Заҳирадаги моддаларни ишлатилиши ва ихтисослашган ҳужайра органеллаларини парчаланиши билан дедифференциалланиш бошланади. Дедифференцияни индукциясидан 6-12 соат ўтгандан кейин ҳужайра қобиғи ғоваклашиб шишади, мустақил рибосомалар сони кўпайиб, Гольджи аппарати элементлари сони ҳам ошади. Бу ўзгаришлар бўлинишдан олдин бошланади.

Ўстиришга қўйишдан олдин, эксплантлар ҳужайрасининг метаболизмида ўзгаришлар содир бўлишини, у эса дедифференция ёки травматик синтез билан боғлиқ бўлишини ҳисобга олиб қўйиш зарур. Бундай жараёнларни ажратиш мақсадида эксплантларни гормонлар сақламайдиган муҳитда 3-6 сутка давомида преинкубация қилиш тавсия этилади.

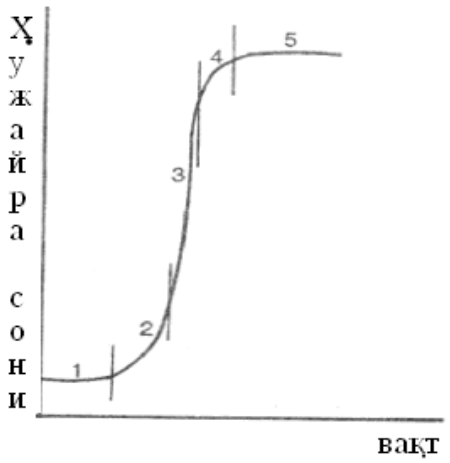
Каллусли ҳужайра ўзини ривожланиш циклига эга бўлиб, ҳар қандай ҳужайрани ривожланишини қайтаради: бўлиниш, чўзилиш ва дифференция ва ундан кейин қариш ва ҳужайрани ўлиш даври. Каллусли дифференцияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайраларни иккиламчи дифференцияси билан аралаштириб юбормаслик керак.

Каллус ҳужайралари нобуд бўлиб қолмаслиги учун уларнинг бўлинишга бўлган қобилиятларини йўқотмасликлари учун, эксплантларда пайдо бўлган бирламчи каллус, 4-6 ҳафтадан кейин янги тайёрланган озуқа муҳитига ўтказиб турилади. Бу операцияни – пассирлаш деб аталади. Ўз вақтида бу жараён ўтказиб турилса, каллус ҳужайралари ўн йиллаб ўз бўлини хусусиятини йўқотмаслиги мумкин.

Каллус ҳужайраларни ўсиш чизиғи 3.2-расмдан кўриниб турибдики, С- симон шаклга эга, ўсиши беш фаздан иборат:

- ***1–латент ёки лаг-фаза*** *даврида ҳужайра сони ёки оғирлиги ўзгармайди. Ҳужайралар бу даврда бўлинишга тайёргарлик кўрадилар.*
- ***2-фаза логарифлик ёки экспоненциал ўсиш фазаси*** *энг кўп митодик фаоллик билан ва каллус культурани массасини ошиши билан ҳамда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан характерланади.*
- ***3-фаза тўғри чизиқли (линейка),*** *бунда ҳужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.*

- ***4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади,*** *бу босқичда ҳужайрани миотетик фаоллиги кескин пасаяди.*
- ***5-фаза ўсиш чизиғи (стационар) бир текис холатга келади****. Бу даврда ҳужайралар парчаланади, аммо ҳужайра сонини ошиши билан баробарланишади; умуман олганда бу босқичда, ҳужайра массасини кўтарилиши нолга тенг бўлади. Стенционар фазадан кейин ҳужайраларни деградацияси бошланади ва бу даврда тирик ҳужайраларни сони ва массаси тобора камайиб бораверади.*



36-расм. Каллус ҳужайраларнинг ысиш чизи`и

Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги

Ин витро шароитида каллусли ҳужайралар ўсимликлар организмидаги оддий ҳужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва бикимёвий хусусиятларни сақлаб қолади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилиятини йўқотмайдилар. Совуққа чидамлилик хусуситяти каллусли ҳужайраларда, ўсимликлардагидек қайтарилади. Бундай хусусият, тропик ёки субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималарда бўлмайди. Каллусли тўқималарга фотодаврийлик реакцияси ҳам хос, бу фитохрон фаоллигини сақлаб қолинганлиги билан боғлиқдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқимлари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори хароратга чидамлилик, осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлилик ва х.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал тўқималардан фарқли томонлари ҳам бор. Уларда специфик оқсиллар пайдо бўлади ва умумий оқсил миқдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида қатнашадиган оқсиллар камаяди ёки бутунлай йўқолади. Каллусли ҳужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронликни бузулганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан чиққанлиги сабабли. Каллусли ҳужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда ўтади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готре томонидан олинган сабзининг каллусли ҳужайраси, янги озуқа муҳитига ўтказиб туриш ҳисобидан ҳозиргача яшаб келмоқда.

Очиқ тупроқда ўсувчи ўсимликга нисбатан, каллусли ҳужайраларни ҳужайра цикли узунроқдир.

Каллусли ҳужайра ўзига хос томонларидан яна бири-уларни ёшини хар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни ўзида ёш ҳужайралар (Г- фазадаги), қари ($Г_2$) ва С – фазалар иштирок этадилар.

Каллусли ҳужайраларни энергия алмашинувида ҳам анча фарқ кузатилади. Улар, нормал ҳужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол қиладилар. 1938 йилда Ромсторн бундай хусусият меристематик ҳужайраларда ҳам борлигини кузатган эди, демак бу хусусият фаол бўлинадиган ҳужайралар учун хосдир. Каллус ҳужайраларни

нафас олиш коэффиценти бирдан катта. Масалан нўхат каллус ҳужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

Бу нафас олиш билан бижғиш орпасидаги нисбат бижғишни кучайиш томонига, сурилганлигини яъни Пастер эффектини пасайишини кўрсатади.

Пастер эффекти деганда, бижғишни кислород иштирокида нафас олиш билан босишни тушунилади.

Нафас олиш субстратлари ўзгармаган шароитда, нафас олиш коэффицентини кўпайиши, нафас олиш бижғишни тўхтатаолмаётганлигини ва ҳатто кислородли шароитида ҳам каллусли ҳужайраларда нафас олиш билан бир қаторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижғиш жараёни содир бўлаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол қилиб, бўлинадиган ҳужайраларда этил спритини тўпланишини кўрсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

Каллус ҳужайраларни митохондриялари, меристем ҳужайраларга ўхшаб, жуда паст ривожланган уларда кристлар кам, бу эса аэроб нафас олишга таъсир кўрсатмасдан қолмайди. Пастер эффектини бузилиши кўпроқ хайвонларни шиш ҳужайраларида кузатилади. Бу ходиса Варбург томонидан аниқланган бўлсада ҳозиргача аниқ тушунтира олинганча эмас. Пастер эффектини бузилиши оқибатида келиб чиқадиган анаэроб гликолиз (углеводларни кислородсиз парчаланиши), кислород иштирокида шишли ҳужайраларни углеводлар истеъмол қилишини кескин (19 маротабага) ошириб юборади.

Каллусли ҳужайраларни нафас олиш характерини ўзгариши билан бир қаторда углеводларни кислородсиз прчаланишини кучайиши йўналишида, бўлинадиган ҳужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон силжиш намоён бўлади.

Каллус ҳужайралари генетикаси

Узоқ вақт каллусли ҳужайралар генетик бир хил деб ҳисоблаб келинар эди. Ўтган асрнинг 60-йилларида каллусли ҳужайралар генетик гетероген (кўпсонли) эканлиги аниқланди. Уларни бир хил эмаслиги энг аввало ҳар хил сонли хромосомалар сақлаши билан намоё бўлади. ***Ин витро*** шароитида меристематик тўқимлар генетик мўътадил бўлдаилар

Каллусли ва суспензион культураларда дастлабки ўсимликка хос бўлган қатор диплоид хромосомалар сақловчи ҳужайралар 3, 4, 5 ва ундан ҳам кўпроқ хромосомалар тўплами сақловчи полиплоидли ҳужайралар учрайдилар. Шулар қатори каллусли тўқималарда тез-тез ануеплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли тўқималарни қанчалитк узоқ вақт ўстирилса, ўшанчалик улар плодлиги билан фарқланадилар. Тамаки ўсимлигини каллусли тўқимларида тўрт йил ўстирилгандан кейин умуман, диплоидли ҳужайралар қолмайди: Барча ҳужайрлар полиплоидли ёки анеуплоидли бўлиб қоладилар. Бу эса плоидликни ўзгариши ўстириш шароити таъсирида, энг аввало озуқа муҳити таркибидаги моддалар таъсирида амалга ошишини кўрсатади. Аммо бу ҳолатни бошқача тушунтириш ҳам мумкин.

Плоид ҳужайралар қисқа лаг фазага эга бўлганлиги сабабли, диплоид ҳужайраларга нисбатан бўлиниши тезроқ ўтади. Бунинг оқибатида, улар кейинги кўчириб ўтказиш жараёнларда устунликка эга бўлиб қоладилар. Ҳар ҳолда икки сабаб ҳам ўринли деб ҳисоблаш мумкин.

Плоидликни ўзгаришидан ташқари ўсимлик ҳужайра ва тўқималарини ин витро ўстирилиши, ҳужайрада хромосомали абберациялар ҳосил бўлишини чақиради. Бу эса ўстирилаётган тўқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (тўқималарни) ташқи кўриниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги ўзгаради.

Ўстирилаётган ҳужайраларда микроскоп остида кўринадиган хромосомали мутациялардан ташқари кўринмайдиган ўзгаришлар ҳам содир бўлиши мумкин. Бундай ўзгаришлар хромосомаларни бир қисмида ҳамда генларни тузилишида ҳам бўлиши мумкин. Генли мутациялар ҳужайраларни морфологияси ва физиологик-биокимёвий хоссаларини ўзгаришида намоён бўлади.

Ўстирилаётган ҳужайраларни генетик мўътадил эмаслиги сабаблари нималардан иборат? Бундай сабаблар бир нечта. Энг аввало – дастлабки материални генетик бир хил бўлмаганлиги (эксплантларни гетерогенлиги). Кўпчилик ўсимликларда табақалашган тўқималар, ҳар хил плоидли ҳужайраларга эга бўладилар ва фақатгина тўқимани онтогенези даврида фаол кўпаядилар, юқори меристемалар, камбийлар ва бошқалар эса доимодиплоид ҳолатда қолади. Бошқа бир сабаб – бу тўқима ва ҳужайраларни узоқ муддат экилиши, ўз навбатида бундай шароитда улардаги генетик ўзгаришлар, жумладан плоидликни бир хил бўлмаган ўзгариши содир бўлади.

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

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

Цитокининлар хусусан кинетик ҳужайраларда полиплоидия содир бўлишига ёрдам берадилар.

Каллус ҳужайраларни генетик хилма-хиллиги, уларни ташқи муҳит таъсирига фитопатогенларга чидамли ҳамда серҳосил мутантлар олиш учун амалга ошириладиган селекцион ишларда фойдаланиш имкониятини яратади.

Назорат учун саволлар

1. Каллус ҳужайралар культураларини олиш ҳақида тушунча беринг?

2.Протопластларни ажратиб олиш ҳақида тушунча беринг?

3.Протопластлар культурасини олиш ҳақида тушунча беринг?

4.Протопластларни қўшилиши ҳақида тушунча беринг?

5.Соматик ҳужайралар гибридизацияси ҳақида тушунча беринг?

6.Ҳужайра культураларини қандай хосил қилинади?
7.Ўсимлик хужайраларини ўстиришда қўлланиладиган озиқ мухитлар?
8.Хайвон хужайраларини ўстиришда ўзига хос томонларини сананг?
9. Хужайраларни ўстиришда стериллаш ишлари қандай олиб борилади?

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ

ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ”

фанидан

ТАЖРИБА МАШҒУЛОТЛАРИ

Тузувчи: А.Сатторов

Термиз – 2022

1-лаборатория машғулоти

Мавзу: Амилолитик фермент фаоллигини аниқлаш.

1.2 Амилолитик фермент фаоллигини аниқлаш (2с)

1.2 амилолитик фермент фаоллигини аниқлашда қо`лланиладиган усуллар (2с) **(4 соат)**

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ишлаб чиқаришда чиқиндисиз технологияларини кенг жорий қилиш учун қишлоқ хўжалигида ҳосил бўлаётган чиқиндиларни микроорганизмлар ёрдамида қайта ишлаш усулларини ўргатиш

Мазкур лаборатория машғулотида чиқиндидиз технологиялар билан ишлаш қонун-қоидаларини ўрганишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ишлаб чиқаришда чиқиндисиз технологияларни кенг жорий қилиш ва ҳосил бўлаётган чиқиндиларни микроорганизмлар ёрдамида қайта ишлаш усуллари ўргатилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уалрга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага қишлоқ хўжалик чиқиндиларини аниқлаш, уларни ўзларининг билими доирасида қайта ишлаш усуллари ва иқтисодий кўрсаткичларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага саноат чиқиндиларини аниқлаш, уларни ўзларининг билими доирасида қайта ишлаш усуллари ва иқтисодий кўрсаткичларини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага хонадонлардан чиқадиган чиқиндиларни аниқлаш, уларни ўзларининг билими доирасида қайта ишлаш усуллари ва иқтисодий кўрсаткичларини аниқлаш топширилади.

Назарий қисм: Аероб ва анаероб микроорганизмлар оқова сувларда учрайдиган органик материаллардан тозалаш хусусиятига эга. Ачитқи, нефтни қайта ишлаш заводи, сут ва пишлоқ ишлаб чиқарувчи корхоналар, картофел ва крахмални қайта ишловчи заводлардан чиқадиган чиқиндиларни анаероб жараён ёрдамида тозалаш бўйича катта муваффақиятларга эришилган. Бу жараёнда фаол биологик компонентлар қайта ишлатилади, қолдиқ маҳсулотлар камаяди, сезиларли даражада нохуш ҳидлар тарқалиши камайтирилади. Энг муҳими метан ҳосил бўлади.

Булардан ташқари кимёвий зарарланиш (биотсидларнинг дечруксияланиши каби)нинг назорат қилиш учун микроб штаммларидан фойдаланилади.

Псеудомонас турига мансуб бактерияларда оксиредуктаза ёки гидроқсилазалар бўлиб, улар юқори токсиқ углеводородлар ва ароматик бирикмаларни парчалаш хусусиятига эгадир. Псеудомонас нинг айрим штаммлари таркибида ушбу ферментларни кодловчи генлар плазмида таркибида учрайди. Бундай плазмидаларнинг 4 хили мавжуд: ОСТ (октан ва

ва деканни парчаланиши), ХЙЛ (ксилол ва толуолни парчаланиши), САМ (камфорани парчаланиши) ва НАҲ (нафталинни парчаланиши). САМ ва НАҲ плазмидалари бактериал ҳужайраларни чатиштириб ўзининг ўтказувчанлигини таъминлайди, қолган плазмидалар эса бактерияга бошқа плазмидалар киритилгандагина ўтказилиши мумкин.

Кейинчалик бу штаммларнинг гибрид плазмидалари олинган бўлиб, улар тозаланмаган нефтда бошқа штаммларга нисбатан углеводородларни метаболитлаш хусусиятига эгадир. Улар ёрдамида ҳарорат ва бошқа омилларни назорат қилган ҳолда оқар сувларни тозалаш мумкин.

Айрим микроблар молекулаларни шундай ўзгартириш хоссасига эгаки, уларнинг ўзи бошқа микроблар таъсирида парчаланади. Бундай «кометаболизм”ни Дафтон ва Хси (Калифорния университети) кучли токсик паратион инсектитсидини Псеудомонаснинг 2 та штамми таъсирида парчаланишини кўрсатиб беришган.

Токсик молекуланинг кимёвий ўзгаришининг натижаси тўлиқ парчаланиш эмас, балки детоксификатсиядир: фосфорилланиш, метилланиш, атсетилланиш ва б.лардир. Детоксификатсияни катализловчи ферментлар плазмида таркибидаги генлар билан кодланади. Олимлар кучли ва кўп ишлатиладиган гербитсид – 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксисирка кислотаси)ни метаболитловчи микроб культурасини олишга эришганлар. Улар тозалаш чансияларидан бир нечта микроорганизмларни ажратиб олиб уларни органик бирикмаларни плазмидаси таркибида парчаловчи ферментларни кодлайдиган гени бўлган бошқа бактериал штаммлар билан аралаштирганлар. Сўнг аралашма фақатгина 2,4,4-Тда хемочатда ўчирилган. 10 ойдан сўнг бактерияларнинг ўсиш суръати 2,4,5-Тнинг бактерияларнинг ўсиши учун ишлатилиши ҳисобига тезлашган.

Ген инженерлиги методлари асосида бундай натижаларга эришиш кўзда тутилмоқда. Бу кўплаб бирикмаларни (кимёвий саноатда ажраладиган ва биопарчаланмайдиган) бузиш хусусияти ва ассимилятсия қилувчи микроб штаммларини кончруксиялаш муаммосини ечишга хизмат қилади.

қишлоқ хўжалиги, ўрмон ва озиқ-овқат саноати чиқиндиларидан турли мақсадларда, хусусан, биомассани ошириш, ҳамда ундан энергия олиш ва шу йўл билан атроф-муҳит ифлосланишини камайтиришда ишлатилади. Уларни микроорганизмлар ёрдамида бижғийдиган бирикмаларгача парчалаш ёки уларни оқсилларга айлантириш мумкин. Оқава сувларда сув ўтларини культурасини кўпайтириб, нафақат сувларни тозалаш, балки оқсил ва микроелементларга бой биомасса олиш мумкин.

Кўплаб чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни қайта ишлаш мумкин. Маълумотларга кўра турли бошоқли ўсимликлардан тахминан 1700 млн. т. сомон чиқади ва буларнинг кўп қисми ишлатилмайди. Ёки ананасни консерватсиялашда унинг 20% игина ишлатилади, асосий қисми эса чиқиндига чиқади. Унинг меваси, пўчи ва бошқа чиқиндилари шарбат олиш учун эзилади, қуритилган қолдиқлари эса молларга ем сифатида берилади.

Спиртли бижғитиш билан ушбу заводлардан оқизиладиган чиқиндиларни камайтириш мумкин.

Бижғиш давомида турли органик моддаларни алмашиниши билан боғлиқ бўлган биотехнологик жараёнлар атроф-муҳитни ҳам кимёвий ҳам биологик жиҳатдан ифлослантиради. 1970 йилларнинг бошларида ўтказилган тадқиқотларга кўра фарматсевтикада ишлатиладиган ферментатсия – бу ифлосланишнинг асосий манбаидир. Масалан, бу антибиотиклар олинадиган ишлаб чиқаришга хосдир. Ферментатсиянинг чиқиндилари маълум бир метаболитик маҳсулотларнинг микробли ҳужайралари ва озуқа муҳитининг ишлатилмаган компонентлари ҳисобланади.

Таркибида углевод бўлган чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни анъанавий микробли бижғиш ёки биотехнологик жараёнлар йўли билан қайта ишлаш мумкин. Масалан, сахарозани кричаллаш учун бошланғич сироп ҳисобланган ва технологик сиклдан чиқариб ташланадиган меласса – шакар олишдаги йўлдош маҳсулот ҳисобланади. Унинг таркибида шакардан ташқари сулфитлар, карбонатлар ва калсий, магний тузлари мавжуд. Мелассани бижғиш давомида қолган шакарнинг ҳаммаси ҳам ишлатилмайди.

Крахмал донларнинг, картофел ва маниокнинг қуруқ массасини 50%ини ташкил этади. Бу маҳсулот жўҳори ва маниокдан олинади. У кислотали ёки ферментатив гидролизга осон учрайди ва ундан декчрин ва глбкоза олинади. Ушбу гексозалардан спирт ва фруктозали сироп олишда фойдаланилади.

Селлюлоза ва гемитселлюлозани микробли деградатсия ва конверсияга учратиб этил спирти ёки кимёвий саноат учун хомашё олиш мумкин. Слочридиум тҳермоселлум таркибидаги селлюлаза ва гемитселлюлаза генларини лочридиум нинг бошқа турларига ўтказиб селлюлоза ва гемитселлюлозани этил спирти, атсетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб ҳужайралари ёрдамида ўзига яқин бўлган бирикмаларга айланишидир. Сҳу билан бирга микроорганизмлар кимёвий синтезнинг муҳим ва мураккаб жараёнларнинг маълум бир босқичига таъсир қилади.

Биоконверсиянинг қадимги тури – сирка олиш жараёнида этил спиртини сирка кислотага айланишидир.

Биоконверсия бир типдаги реаксия ва маълум бир чруктура (череоспетсификлик) билан боғлиқлиги сабабли ўзига хосдир. Биоконверсияда изопропанол атсетонга, глитсерин дигидроатсетонга, Л-тирозин Л-диоксифенилаланинга, глюкоза глюкон кислотага ва охирида 2-кетоглюкон ёки 5-кетоглюкон кислотага ва сорбит Л-сорбозага айланади. Сорбитнинг сорбозага биоконверсияси кимёвий саноатдаги ягона биологик реаксиядир.

Биоконверсияга асосланган методлар ёрдамида чероид гормонлар синтез қилинган. 1930 йилнинг бошларида Кендалл ва Райхштейн буйрак очи безидан ревматоид артритни даволашда ишлатиладиган кортизон ажратиб олишган. Кортизон синтезининг биринчи оралиқ маҳсулоти прогечорондир.

Биоконверсия 370С ҳароратда сувли муҳитда ва атмосфера босимида олиб борилади. Ҳозирги кунга келиб чероид ядросининг углерод атомини маълум бир микроорганизмлар ёрдамида гидроқсиллаш ва керакли чероидни олиш мумкин.

Микроорганизмлар чероидларни олиш учун хомашёни (масалан, черинлар) ишлаб чиқаришда ҳам ишлатилади.

Баъзи ҳолларда биоконверсияни амалга ошириш учун аралаш культуралар ёки микроб штаммларини кетма-кет қўшиш керак бўлади. Буларнинг ҳар бири биоконверсиянинг ўзига хос босқичини амалга оширади. Иммобилланган ҳужайралардан фойдаланиш ферментларга нисбатан биоконверсия самарадорлигини оширади ва унинг сарф-ҳаражатини камайтиради.

Микроорганизмларнинг саноатда ишлатиладиган штаммларини қўллаш учун 2 усулдан фойдаланилади: штаммларни скрининги ва ажратиб олишда юзага келадиган қийинчиликларни бартараф этиш учун ДНКнинг махсус учачкаларида мутатсияларни индуксиялаш; ген инженерияси ва табиий жинсий жараённи кенгайтириш учун протоплачларни қўшилиши; табиий генларни ўтказиш ва янги генларни рекончруксия қилиш учун рекомбинант ДНКни қўллаш.

Микроб ҳужайраларида маълум бир ген нусхаси сонини кўпайтириш генларни амплификатсиялаш орқали амалга оширилади ва натижада ушбу геном кодлайдиган маҳсулот ишлаб чиқариш кескин ортади. Бундай техник ёндашув ҳужайрада плазмидалар сонини кўпайтириш билан боғлиқдир. Одатда битта ҳужайрага 1-30 та нусха тўғри келади ва 2-250 ген мавжуд. Сҳу билан бирга ҳужайрада плазмида генлари 3000 нусхагача оширилган. Генларни амплификатсиялаш Э.цолининг учун кенг ишлатилган. Ҳозирга келиб ичалган хромосома гени ёки генлар гуруҳини плазмидага ўтказиш, сўнгра плазмидани амплификатсиялаш учун ичак таёқчасига ўтказишга эришилган. Ундан ташқари бир ҳужайрадан бошқасига полиетиленгликол иштирокида трансформатсиялаш йўли билан Басиллус плазмидаси ўтказилган. Псеудомонас плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Сҳу йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш саволлари.

1. Чиқиндисиз технологиялар деганда нимани тушунасиз?
2. қишлоқ хўжалиги чиқиндиларини қайта ишлашда қайси микроорганизмлар иштирок этади?
3. Саноат чиқиндиларини қайта ишлашда қайси микроорганизмлар иштирок этади?
4. Чиқиндиларни қайта ишлашнинг иқтисодий афзалликларини аниқланг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:мир. 2002

2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар мухандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш буйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
3. Давронов . Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б

2-лаборатория машғулоти

Мавзу: Чиқиндилар асосида сорбент олиш.

2.1 қишлоқ хо`жалиги чиқиндилари асосида сорбент олиш (2с)
2.2 саноат чиқиндилари асосида сорбент олиш (2с)
2.3 кунлик чиқиндилар асосида сорбент олиш (2с)

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

Мазкур лаборатория машғулоти чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усулларини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усулларини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш усулларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усулларини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага чиқиндисиз технологиялар яратишнинг замонавий усулларини аниқлаш топширилади.

Назарий қисм: Адсорбция қилиш йўли билан иммобилизация қилиш энг содда усуллардан бўлиб, фермент эритмасини "ташувчи" билан аралаштириш йўли билан амалга оширилади. Ёпишмасдан ферментни ювиб ташлагач, иммобилизация қилинган фермент ишлатилишга тайёр бўлади. Адсорбцион иммобилизация қилинган ферментларни олиш учун қуйидаги услубий кўрсатмалардан фойдаланади.

Статичик усул энг осон йўл бўлиб "ташувчи" фермент эритмасига ташланиб (солиниб) ҳосил бўлган аралашма, маълум вақтга ташлаб қўйилади. Иммобилизация ферментни ўз ўзидан диффузияси туфайли бошланиб, адсорбция билан тугалланади. Бу усулни камчилиги, фермент эритмаси билан "ташувчи" аралашмаси узоқ вақт (бир неча кунга) ташлаб қўйилиши лозим. Лаборатория шароитида кўпроқ аралаштириш усули ишлатилади. Бу усулда чатичик усулдан фарқли ўлароқ фермент эритмаси билан "ташувчи" доимий равишда аралаштириб турилади.

Аралаштириш учун магнит аралаштиргич, механик аралаштиргич ёки микробиологик тебратгичдан фойдаланиш мумкин. Бу усул олдингисидан анча учун туриб "ташувчи" сатхида ферментни бир текис жойланишини белгилаб беради. Баъзида адсорбцион иммобилизация қилиш учун электрочўктириш усулидан фойдаланилади. Бунинг учун фермент эритмасига иккита электрод туширилади, улардан биттасини сатхида бир қатлам "ташувчи" суртилган бўлади. Электродлар токка уланганда фермент сатхидаги фаол гуруҳлар (-НХ$_2$; -СООҲ ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган электрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатхида чўкади.

Технологияда фойдаланиш учун энг қулай усул - колонкалардан ўтказиш усулидир.

Бу усулни икки модификасияси бор, улардан биридан "ташувчи" тўлдирилган колонкадан тепадан пачга қараб, микронасослар ёрдамида фермент эритмаси ҳайдалади, икинчисида эса тескариси, фермент пачдан тепага қараб ёъналтиради. Бу усулни афзаллик томони, ферментни ҳайдаш, ювиш, ва кейинги ферментатив жараёнлар, ҳеч қандай манипулясиясиз бир колонкани ўзида олиб борилади.

Фермент ва "ташувчи" орасидаги адсорбцион ўзаро таъсирнинг табиати

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

Баъзи вақтларда ўзаро таъсир кучи оқибатида "ташувчи"нинг тузилиши бузилишигача бориш мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик ҳужайраларини ситодекс гранулаларига адсорбция қилинганда ҳужайра девори деформасияга учрагани кузатилган.

Ферментлар адсорбциясига таъсир этувчи омиллар

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

Фермент адсорбциясига таъсир этувчи омилларга қуйидагилар киради: ташувчини ғоваклиги ва сиртини фаоллигидир.

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

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

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

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

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

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга амилолотик фермент фаоллигини аниқлаш усуллари ўргатилади.

Мазкур лаборатория машғулоти амилолотик фермент фаоллигини аниқлаш усулларини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад амилолотик фермент фаоллигини аниқлаш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага амилолотик ферментлар қайси ферментлар гуруҳига киришини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага амилолотик ферментларнинг ишлаш механизмини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага амилолотик ферментлар фаоллигини аниқлашда қайси методлардан фойдаланишни аниқлаш топширилади

Назарий қисм: Ҳужайраларда биокимёвий реаксияларни каталитик ферментларни тезлигини ошириш йўли билан активлаштириш асосан 2 хил усулда олиб борилади:

Ферментлар молекуласига секунд ва минутлар мобайнида индивидуал таъсир этиши.

Жараёнларни синтези ва парчаланишини тезлигини идора этадиган бир қанча мухитларнинг минутлари ва соатлар мобайнида таъсир этиши.

Хар иккала механизмнинг мухим принсипи қайтма алоқа принсипини бошқаришдан иборат.

Хар бир метаболитик жараённи бошкаришни оддий усули мухитга кофакторларни таъсир эттиришга асосланган. Агар мухит консентратсияси камайтирилса мухит реаксияси тезлашади, акс холда метаболитик юл тезлашади.

Генетик монипулятсиядаги селексия ишлари консентратсияни оширишга асосланган. Метаболизм жараёнларини бошкаришнинг энг кулай усули ферментлар активлигини кайта богланиш принсипини бошкаришга асосланган. Бирок, биосинтез жараёнида консентратсиясини ва активлигини пасайтиради ва охирги махсулотни синтез булишини тухтатади. Сҳундай килиб, биосинтез жараёнининг тезлиги охирги махсулотнинг талаб килинишига боглик.

Агарда триптофанни биосинтез жараёнида мухитга кушилса жараён тухтайди.

Ферментларнинг актив ва пассив формаси, оқсиллар билан кимёвий группаларнинг ковалент боғланишига ҳам боғлиқ.

Ишни бажариш тартиби:

Спектрофотометрнинг кюветаси 0,4 мл субстрат аралашмаси (Д-глюкоза, МгСл2 ва АТФ) 0,1 мл НАДФ эритмаси, 0,01-0,04 мл глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа бўлган эритма, трис-ҲСл буферининг 50 мМ ли эритмасидан қўшиб, умумий ҳажми 3 мл га етказилади ва яхшилаб аралаштирилгандан кейин унга 0,01-0,02 мл амилолитик эритмасини қўшиш орқали реаксия бошлаб юборилади. Реаксиянинг бошланиши секундларда қайд қилинади ва 340 нм да, ҳар секунд оралиғида оптиц зичликнинг ошиб бориши кузатилади. Ажратиб олинган фермент препаратини солиштирма фаоллиги сарҳисоб қилинади.

Оқсил миқдорини спектрофотометрик йўл билан 280 нм да консентратсияси 1,0 мг/мл бўлганда кўрсаткичи 0,9 га тенглигига қараб аниқланади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Амилолитик ферментларнинг ўзига хос хусусиятларини аниқланг?
2. Фермент фаоллигига салбий таъсир этувчи омилларни сананг?
3. Фермент фаоллигини аниқлаш усуларини сананг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар мухандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш буйича услубийқўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
3. Давронов .Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

3-лаборатория машғулоти

Ферментларни ковалент иммобиллаш.

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.
Мазкур лаборатория машғулоти Ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятлари, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.
Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментлар фаоллигига ҳарорат аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага ферментлар фаоллигига пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини аниқлаш топширилади

Назарий қисм:

Ушбу машғулотда ферментларнинг қуйидаги меъёрий кўрсаткичларини аниқланади.

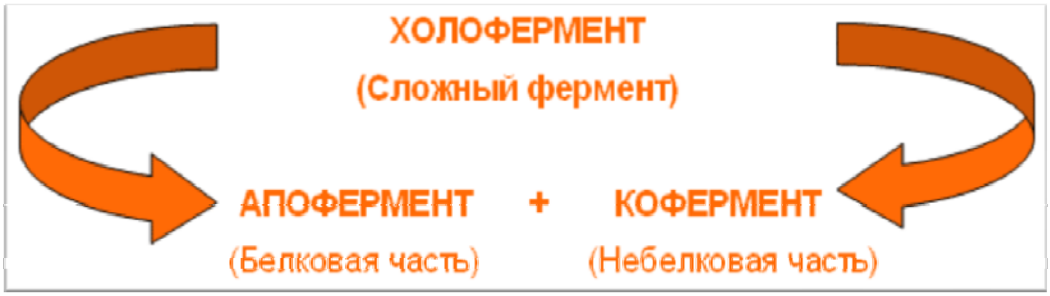
1.Табиатда *оддий* ва *мураккаб ферментлар* мавжуд.

Дастлабкиси полипептид занжиридан ташкил топган ҳолда гидролизланганда фақат аминокислоталар ҳосил бўлади.

Бундай ферментлар одатда гидролитик ферментлар ҳисобланиб, уларга *пепсин, трипсин, папаин, уреаза, лизоцим, рибонуклеаза* ва бошқалар киради.

Иккинчи холатда фермент таркибида *оқсил табиатли бўлмаган* қўшимча группа бўлади.

2. Мураккаб ферментлар *(холоферментлар)* таркибида аминокислотадан тузилган оқсил қисми – *апофермент*, ва оқсил бўлмаган қисми – *коферментдан (простктик группа) ташкил топган*.



Агар оқсил бўлмаган қисм апофермент билан *ковалент боғлар* иштирокида боғланса - *кофермент* дейилади, агар *ковалент бўлмаган (ион, водород)* боғлар ёрдамида боғланса – *кофактор* дейилади.

Простетик группанинг вазифалари қуйидагилар*: катализда қатнашиш, фермент ва субстрат орасида контакт ўрнатиш , муҳитда фермент молекуласини фазовий стабиллигини таъминлаш.*

Коферментларни ҳусусияти шундаки, оқсил қисми ҳам, қўшимча қисми ҳам алоҳида олганда *сезиларли каталитик активликни* бермайди. Фақат уларнинг комплекси ферментатив ҳусусиятга эга.

Апоферментда кофермент билан боғланишни таъминлайдиган, специфик структурали қисм мавжуд.

Бу қисм *кофермент боғловчи домен* дейилади, бир хил коферментни боғловчи қисм структураси турли апоферментларда жуда ўхшаш.

Иккикомпонентли ферментларда кофермент сифатида аксарият *витаминлар (Е, К, Қ, В1, В2, В6, В12, С, Н ва* б.) ёки витаминлар иштирокида тузилган бирикмалар *(коэнзим А, НАД+ ва б.*) иштирок этади.

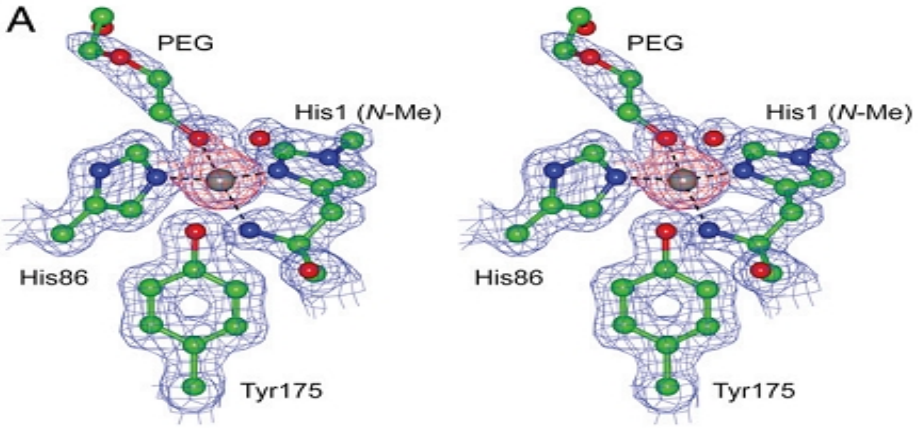
Бундан ташқари *коферментлар функциясини НС-глутатион* каби брикмалар*, турли нуклеотидлар ва уларни ҳосилалари, айрим моносахаридларни фосфорли эфирлар* ва бошқа моддалар гурухлари ҳам бажаради.

Таркибида субстрат билан бевосита контактга киришиши мумкин бўлган қўшимча группа тутмайдиган *биркомпонентли ферментларда* жараён бошқача кечади.

Бу функцияни фермент молекуласининг *актив марказ* деб номланувчи қисми бажаради.

Актив марказ — бу бевосита катализда иштирок этувчи фермент молекуласининг ичкарисида жойлашган *ингичка гидрофоб чуқурлик* қисмидир.

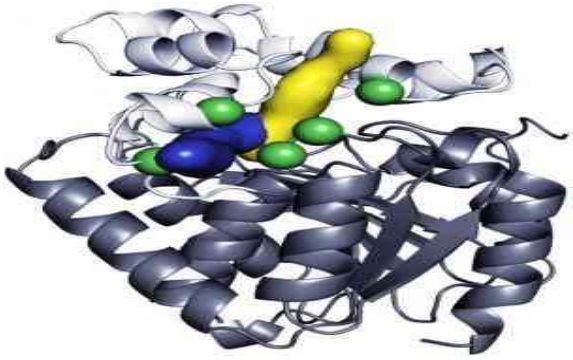
Ферментнинг актив марказида одатда 3-12 *аминокислота* қолдиғи жойлашган бўлиб, у молекуланинг катта бўлмаган қисмини ташкил этади.

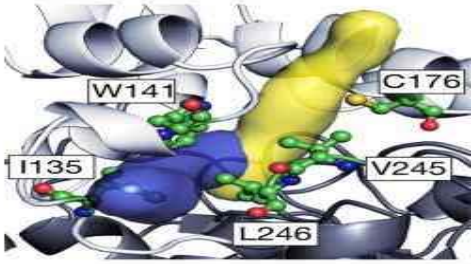


Фермент структурасини ташкил этувчи қолган аминокислоталарнинг роли *молекуланинг тўғри глобуляр шаклини* таъминлашдир. Бу эса фермент актив марказини эффектив ишлаши учун муҳим аҳамиятга эга.

Биркомпонентли ферментлар каталитик марказида одатда *Сер, Гис, Три ,Арг, Цис, Асп, Глу,Тир каби аминокислоталарни* радикаллари учрайди.

Биркомпонентли фермент *актив марказ*ини шакллантирувчи *аминокислота* қолдиқлари полипептид занжирнинг турли қисмларида жойлашган.



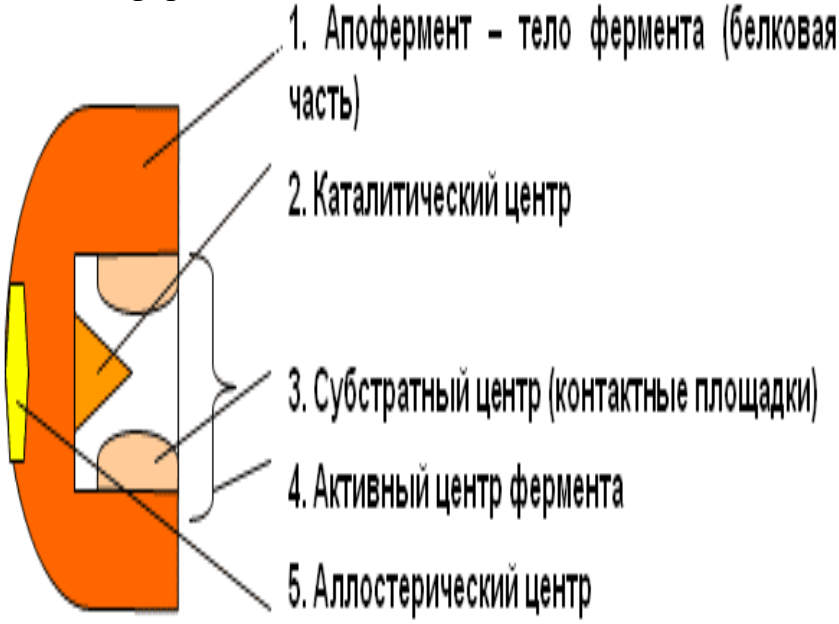


Шунинг учун актив марказ оқсил молекуласининг ўзига хос учламчи *структураси* шаклланаётган пайтда юзага келади.

Демак, у ёки бу факторлар таъсирида фермент учламчи *структурасининг* ўзгариши *каталитик марказ деформациясига* ва ф*ерментатив* активликнинг ўзгаришига олиб келади.

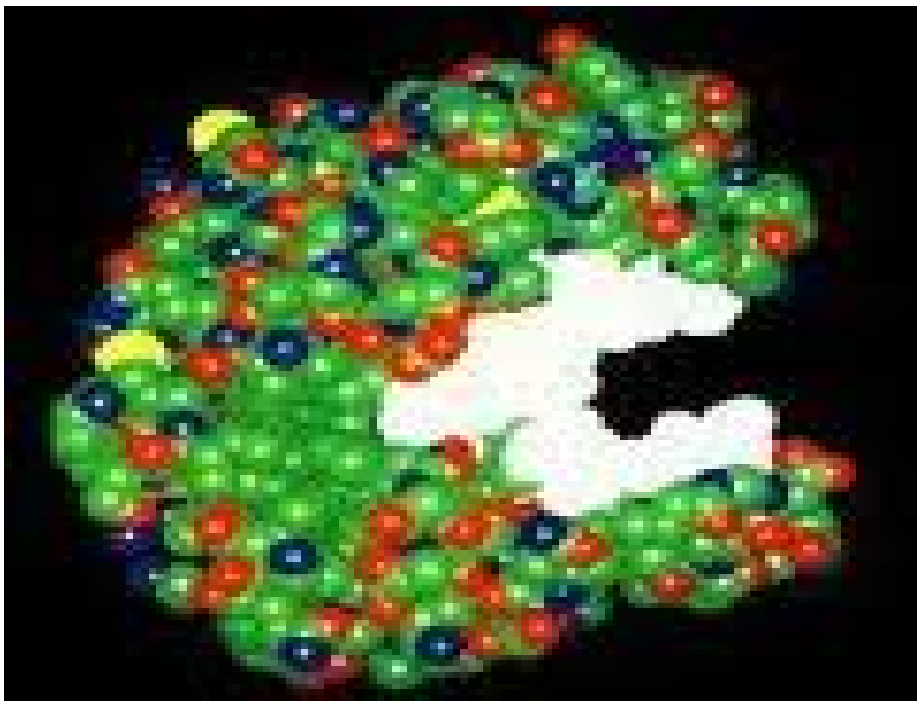
Актив марказда шартли равишда: субстратга бевосита кимёвий таъсир қилувчи к*аталитик марказ* ва

субстратга специфик мос келувчи ва уни фермент билан комплексни шаклланишини таъминловчи *субстрат маркази ёки контакт («лангар»)* майдончаси фарқланади.



Ўз навбатида субстрат молекуласида фермент билан танлаб боғланувчи бир ёки бир неча қисм ва катализга бевосита учрайдиган битта боғ (ёки атомлар гуруҳи) мавжуд бўлади.

Шунингдек фермент молекуласида аллостерик марказ (ёки марказлар) (грекчадан *аллос* -бошка, ва *стерос* -тузилишли)-мавжуд.



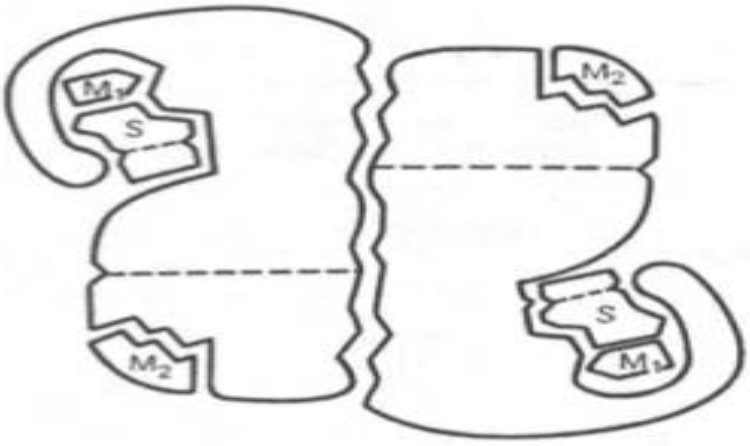
У тузилишига кўра субстратдан фарқ қилувчи паст молекуляр моддаларни *(эффекторлар, ёки модификаторларни)* боғлаш хусусиятига эга.

Эффекторни аллостерик марказга боғланиши фементнинг учламчи ва тўртламчи структурасини ўзгартиради ва *актив маркази конфигурацияни ўзгаришига* сабабчи бўлади.

Бу ўз навбатида энзиматик активликни ошиши ёки пасайишига олиб келади.

Аллостерик марказ билан эффекторлар боғланиши оқибатида каталитик марказ фаоллигини ўзгартиш ҳусусиятига эга ферментлар, *аллостерик ферментлар* дейилади.

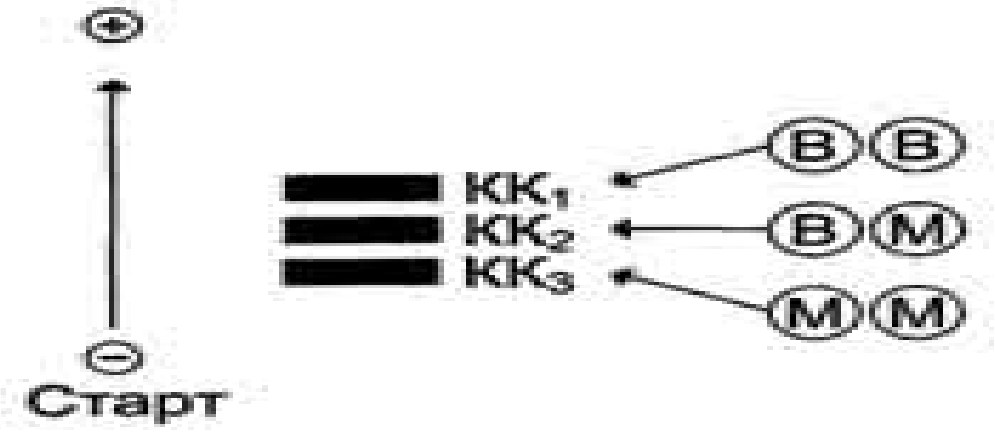
Аллостерик ферментларнинг ўзига ҳослиги *олигоферментлар молекуласида бир нечта актив марказ ва бир нечта аллостерик регулятор марказларнинг* бўлиши, ҳамда уларнинг бир-биридан узоқда жойлашувидадир.



ИЗОФЕРМЕНТЛАР

Изоферментлар ёки изоэнзимлар -бир хил реакцияларни катализловчи, бир биридан тузилиши, физик кимёвий хоссалари: субстратга мослиги,

реакцияни максимал катализлаш тезлиги, электрофоретик ҳаракатчанлиги, реакцияларни бошқарув ҳусусиятлари билан фарқланувчи *ферментларни турлича шакларидир.*

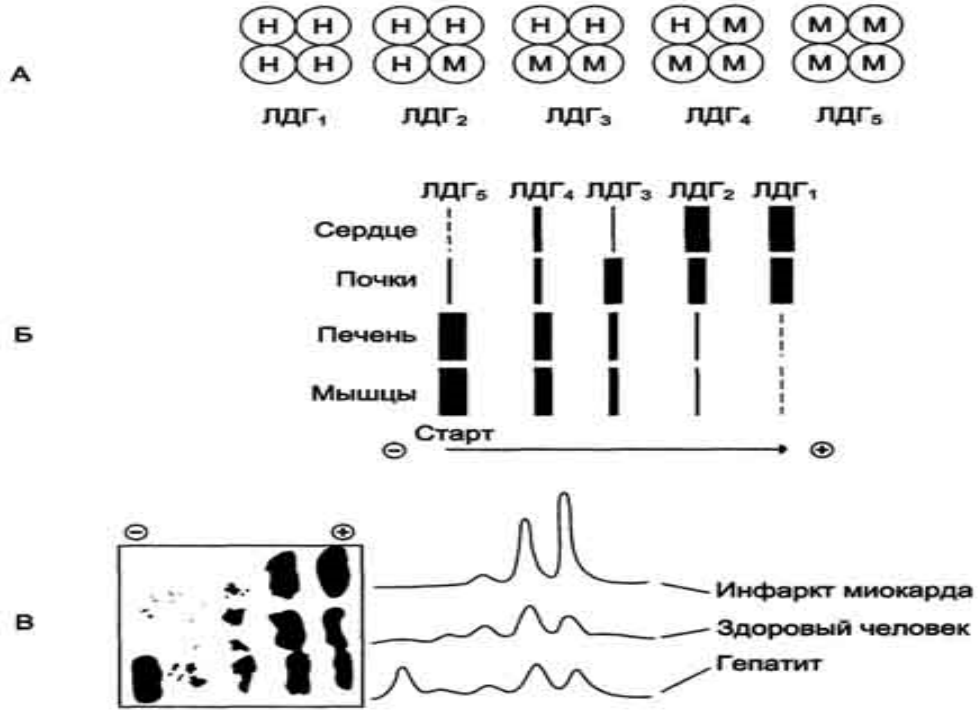


Тирик табиатда бир хил ёки турли бирламчи, иккиламчи ёки учламчи структурага эга, *икки ёки кўпроқ суббирликдан* тузилган ферментлар молекулалари учрайди.

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

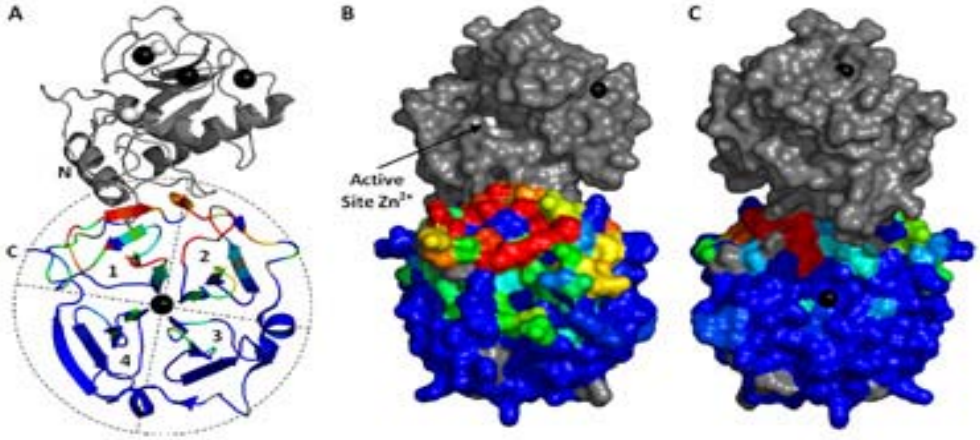
Уларда суббирликларни бириктирувчи *ковалент ва валентлик боғлари учрамайди*. Асосан *ноковалент* бўлган *боғлар* мавжуд, шунинг учун ҳам бундай ферментлар *протомерларга осон диссоцирланади*.

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



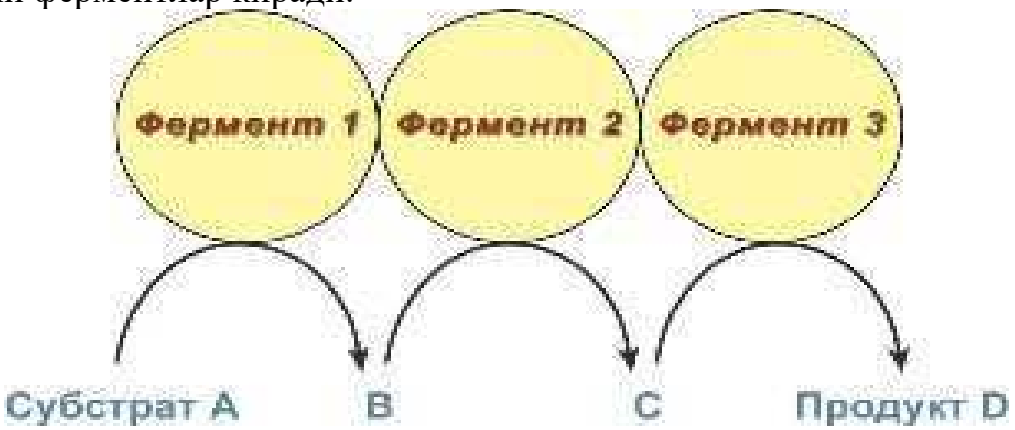
Гель-электрофорез методи ёрдамида яхши ўрганилган 4 ферментдан бири, бу ЛДГнинг изоферментлари бўлиб, улар пироузум кислотасидан сут кислотани ҳосил бўлиши қайтар реакциясини катализлайди.

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



МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯР ФЕРМЕНТ СИСТЕМАЛАРИ

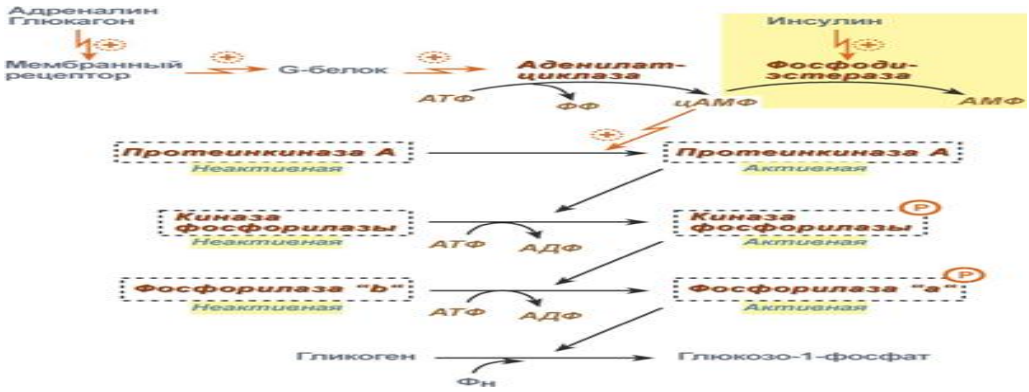
Ферментларнинг алоҳида гуруҳини *надмолекуляр (ёки мультимолекуляр)* фермент комплекслари ташкил этади. Уларни таркибига бир хил каталитик активликка эга протомерлар эмас, балки субстратни боскичли катализловчи турли ферментлар киради.



Бирор бир органелла (рибосома, митохондрия) ёки биомембрана билан боғланган *мультифермент комплексларни* баъзан *ферментлар ансамбли* дейилади.

Улар тўкималарни нафас олиши (нафас олиш ферментлари системаси ёрдамида электронларни субстратдан кислородга ўтказилиши) каби *муҳим ҳаётий зарур* функцияларни бажарувчи *юқори ташкиллаштирилган надмолекуляр системаларни* ҳосил қилади.

Агар *мультиэнзим комплекси* кўп боскичли биокимёвий ўзгаришлар жараёни амалга оширса улар *метаболон* (метаболизм -моддалар алмашинуви сўзидан) деб юритилади.



Бундай <u>метаболонлар гликолиз, аминокислоталар биосинтези, дикарбон ва трикарбон кислоталар цикли</u> каби жараёнларда қатнашади.

Назорат учун саволлар

1. Ферментларни кимёвий таркиби, тузилиши ва функциялари.
2. Коферментларни ҳусусияти
3. Актив марказ.
4. Каталитик, субстрат ва аллостерик марказлар.
5. Аллостерик ферментлар
6. Изоферментлар ёки изоэнзимлар
7. ЛДГнинг изоферментлари
8. Надмолекуляр (ёки мультимолекуляр) фермент комплекслари
9. мультифермент комплексларни

4-лаборатория машғулоти

Мавзу: Полимераза занжир реаксиялари.

4.1 пзр да қо`лланиладиган асбоб ускуналар. (2с)

4.2 пзр қо`лланиладиган анализлар, реактивлар (2с)

4.3 пзр ни о`тказиш технологияси (2с)

Машғулотнинг мақсади: Ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган ҳужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулотида Ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган ҳужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш усулларини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган ҳужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган ҳужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш усулларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментларни

ковалент иммобиллаш механизмини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага иммобилизацияланган ҳужайра ва ферментлар фаоллигини аниқлашда қайси методлардан фойдаланишни аниқлаш топширилади

Назарий қисм: Иммобилизачия усуллари ферментларни табиий ёки сунъий тутувчилар юзасига бириктириш, полимер генга ферментни мембранали капсулалари, тўлиқ толаларини киритиш, фермент молекулаларини кўндаланг тикиш кабилар киради. Иммобилизациялашган фермент иштирокидаги жараенлар иқтисодий самарадордир. Фруктоза ва глюкозани қўллаш билан глюкоизомеразани олиш жуда арзон бўлади чунки бу ерда иммобилизациялашган фермент препаратлари технологиясига ўтилган. (А.А.Клесов, 1982 й) Ферментлар жараенида гомоген катализаторлар гетероген катализаторларга ўтади. Фермент ва реагентлар ажратилади. Бу эса а) керак бўлганда реаксияни тўхтатиш; б) реаксия тугагандан сўнг ферментни регенерлаш ва биотехнологик жараён учун қўллаш; в) реаксия маҳсулотини фермент аралашмасисиз олиш бу эса озиқ-овқат ва фармасевтикада муҳим ўрин тутади. Жараёнининг бир ферментатив препаратни қўллаш билан тўхтўвсиз равишда давом эттириш мумкин. Тўхтўвсиз режимли яна бир асосий хусусияти ҳаракатчан ва ҳаракатсиз фазаларни таъмирлашувидир.

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

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

Олдин амалиётда кенг қўлланган этанол олиш учун ачитқилар бактерия ҳужайраларини иммобилизацияси, микронормали ионалмашинувчи смоладаги ион кучлари ҳисобига амалга ошади. (А. И Даугулис и др., 1985).

Аминосилазани саноатда Л- ва Д аминокислотаси аралашмасини ажратишда адсорбцияланади.

Керамика ва бошқа тутувчиларда адсорбцияланган ачитқи ҳужайралари, эркин ачитқи ҳужайраларидан кўп нафас олиш активлигига эга. (В. Вожтисеҳ, В.Йирҳу, 1984).

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

Химиёвий тикишсиз иммобилизацияда биокатолитик тизим хусусиятига тутувчининг кучсиз таъсири кузатилади. Ферментлар табий активлигини

сақлаб қолади ҳужайралар эса ҳаётнчанлигини. Шу вақтнинг ўзида тутувчи билан ферментнинг кучсиз боғи уларни десоросиега олиб келади бу усулни қулайлигини пасайтиради.

Нисбатан мучаҳкам бўлиб ионли таъсирлашувчи ҳисобланади. Ионли адсорбция учун турли тутувчи ишлатилади. Агар биокатализаторини регенерасия қилиш керак бўлса унда эритма алмаштирилади ва фермент десорбсияланади.

Аммо биокатализатор ва тутувчи орасидаги ўзаро таъсир, эритмани катта ион кучида мучаҳкамлик қолади. Бу шароитларда дисперсион ўзаро алоқа принсипида адсорбция қулайроқ. Аспарагин кислотасини олиш учун ишлатиладиган аспортиза ферментни хлобчатобумажнўй толада идсарбсияланади. (Ҳ. Уамосаҳи. эт. ал., 1986).

Биокатализаторни тутувчи билан мучаҳкам химиявий тикилишига келадиган бўлсак, бу усул назарий тадқиқотлар билан боғлиқ узун тарихга эга. У кўп сонли модифинансияларни имконини беради. Дярли барча оқсилларни функсионал гуруҳлари биокатализатор ва тутувчини топиши учун қўлланилиши мумкин. қисман кенг биокатализатор амино гуруҳи ва тутувчи корбанси гуруҳи орасида пепдид баъзилар ҳосил бўлишига олиб келадиган реаксиялар қўлланилади. Реаксия учун сувни тортиб олувчи агент керак. Уларга сулфихролид, гидрозин ва бошқалар киради. Улар биокатализатор ва тутувчи орасидаги турли боғлар ҳолсил қилади.

Мисол учун бироисиан ва Сл-С-О-Ч2-Ч3 гидрооксин ва аминогуруҳни тикади. Тутувчи ва биокатализатор орасида тикувчи агентларсиз реаксиялар ўтказилади. Бу хилдаги реаксиялардан бири тутувчининг химиявий чруктурасида ОқС-О-СқО гуруҳ борлигига боғлиқ. Бу хилдаги реаксияларни амалга ошириш учун сикинлашган материалларга малеин ангидрид тутувчи қўшимча чруктуралар қўшилади. Сҳу усул билан буқани сўвородка албумини глюнооксидаза ишқорли фазфатаза Бациллус черотҳермопҲилус ҳужайраси омадли иммобилизацияланади.

Полимерга у ёки бу ёнаки шохларни бириктириб уни реаксион хусусиятини ва имкониятларни бошқариш мумкин. микросомаларни политенда иммобилизация қилиш қизиқиш уйғотади. Бу шароитда микросомалар юқори чабил монооксигинизоли активлигини сақлаб қолади. Ферментатив активлигни қўшимча чабилизасиясига глисирин қўшиб эритиш мумкин.

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

иммобилазисиясидан тутувчи ва фермент орасида - Ч2НҲ (Ч2)5СО-кетма-кетлиги қўшади (Д. Г. Демеррс, С.С. Wонг, 1989).

Спайсерни аптимал узунлигини таъминлаш муаммо саналади. Химиявий тикишни салбий таъсири пайсайтириш мақсадида фермент актив марказида тикиш жойи олиб ташланади. Агар фермент дилигопродедли табиатли бўлса фермент молекуласини оқсил қисми эмас, балки углеводли қисмида ковалент тикиш ўтказилади. қандлар спирт гуруҳлари премондатни алдегид гуруҳигача оксидлайди. Бу эса тутувчини аминогуруҳи билан реаксияга киришадию (Ж. Кас эт ал., 1984).

Тикувчи агентсиз қўлланиладиган асосий ҳол сифатида ҳужайраларни полимер серканигидрооксиди титан, олова ва темир тутувчиларда иммибилизасияланади. (В. Вожтисеҳ, В. Йирҳу, 1984). Гидроогкид гуруҳлар ҳужайра деворини у ёки бу метал функсионал гуруҳлари кординасион сферасидан чиқарилади. Тутувчи ва биокатализатор орасида кординасион ёки ковалент боғ ўрнатилади.

Ферментлар ва ферментлар сичемаси амалий фаолиятнинг ҳар хил сохаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат сохаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органиқ синтез, кимиёвий тахлил ва. хзо. Сҳунга қарамасдан амалий энзимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жахон бозорида жуда қиммат эди. Микробиологиянинг ривожланиши натижасида ферментларни керакли миқдори ишлаб чиқариш мумкин бўлди. Ферментларнинг қўлланилишини яна 2та сабаб қийинлаштиради. Биринчидан - ферментларни сақлаш қийин ва ҳар хил таъсирлар, айниқса иссиқликка чидомсиз. Иккинчидан, ферментлардан кўп маротаба фойдаланиш, уларни реагентдан ва реаксия маҳсулотларидан ажратишнинг мураккаблиги натижасидадир. Лекин хозирги шунда бу муаммолар хал қилинган.

Иммобилизацияланагн ферментларнинг яратилиши натижасида амалий энзимология олдида янги принсипиал ичиқболлар очилди. Дж. Нелъсон ва Э. Гриффин 1916 йилдаёқ кумирда адсорбцияланган (яъни иммобилизацияланган) инвертаза каталитик фаоллигини сақлашини аниқладилар. 1936 йилда Дж. Пфанмйўллер ва Г.Сҳлейх ёгоилик кипигида адсорбцияланган протеолитик ферментлар (терини ошлашда ишлатилади) га патент олдилар. Ферментлар билан ташувчиларининг мучахкам конъюгатлари 1953 йилда Н.Грубхофер ва Д. Сҳлейт томонидан олинди.
Ферментларни ташувчиларга бириктириш натижасида гетероген катализаторлар яратилиб уларга 1971 йилда иммобилизацияланган ферментлар деб кам берилди. Унинг маъноси анча аниқ бўлиб, бу фермент препаратларининг эримайдиган ташувчиларга бириктиришдир. Лекин иммобилизация тушунчасини анча кенгтушуниш керак: бу оқсилл молекуласининг (ёки унинг франгментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. эримайдиган ташувчига бириктиришдан ташкари буни оқсил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки

молекулалар ўртасидаги боглар қуйи молекуляр бифунксионал реагентлар ёки ферментни эрувчи полимерга бириктириб эришиш мумкин.
Иммобилизацияланган ферментлар бир катор афзалликларга эга. Биринчидан, гетероген катализатор реаксия муҳитидан осон ажралади бу эса :а) реаксияни керакли вақтда тўхтатиш имконини беради ; б) катализатордан қайта фойдаланиш; в) фермент аралашмаган максулот олиш мумкин. Охиргиси айниқса озиқ-овқат ва фермесевтика ишлаб чиқаришда жуда муҳимдир. Иккинчидан: гетероген катализаторларнинг қўлланилиши ферментатив жараённи узлуксиз олиб бориш имконини беради. Масалан: оқиб ўтувчи колонкаларда реаксия тезлигини бошқариш , шу билан бирга маҳсулот ҳосил бўлишини оким тезлигини ўзгартириб эришиш мумкин.
Учинчидан: ферментнинг иммобилизация ва модификасияси катализатор хусусиятини мақсадга мувофик ўзгаришига олиб келади каталитик активлигининг пҲга, ион таркибига ва муҳитининг бошқа параметрларига богликлиги, унинг ҳар хил денатурасияловчи таъсирларга нисбатан баркаролигини таъминлайди.
Туртинчидан: ферментларнинг иммобилизацияси уларнинг каталитик активлигини ташувчи хусусиятларига ҳар хил физик омиллар таъсир эттириб (нур. товуш) бошқариш мумкин. Бу асосда механо ва товушга сезгир датчиқлар, пач товушларни кучайтиргичлар ва яратиш имконини беради.

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Ферментларни ковалент иммобиллаш ҳақида маълумот беринг?
2. Иммобилизацияланган ҳужайра ҳақида маълумот беринг?
3. Ферментларни саноатда қўллаш ҳақида маълумот беринг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар мухандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш буйича услубийқўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
3. Давронов .Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

5-лаборатория машғулоти

Фитовирусларни ажратиш ва тозалаш.

5.1 фитовирусларни ажратиш усуллари (2с)
5.2 фитовирусларни тозалаш усуллари (2с)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулоти Ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятлари, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.
Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментлар фаоллигига ҳарорат аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага ферментлар фаоллигига пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини аниқлаш топширилади

Назарий қисм:

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

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

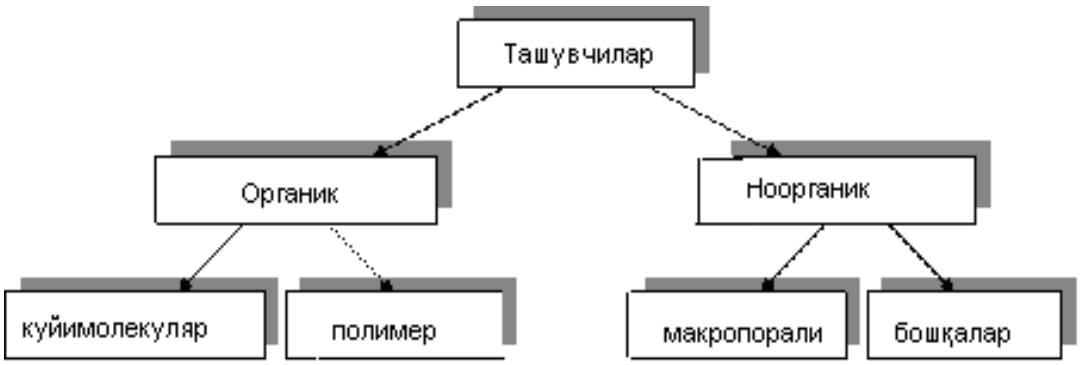
“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оқсил молекулари ҳаракатланиш еркинлигини исталган чекланишини англатади.

Ферментларни иммобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

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

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

Қуйидаги расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



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

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

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

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

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

Ферментларни иммобиллаш методлари.

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

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

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

Бу усуллар қуйидаги расмларда келтирилган.

Адсорбсион иммобилизация ферментларни иммобиллашнинг қадимги усули бўлиб, унга 1916 йили асос солинган. Бу усул жуда осон ва у ферментнинг сувли еритмаси билан ташувчи орасидаги контакт ҳисобига амалга ошади. Адсорбсияланмаган оқсил ювиб ташлангандан сўнг фермент ишлатишга тайёр бўлади. Ташувчининг юзасида ферментнинг адсорбсияланган молекуласи ташувчи ва оқсилнинг юзаки гуруҳларининг Ван-дер-ваалс ўзаро таъсирлашуви, водород боғлари, електростатик ва гидрофоб ўзаро таъсирлашувлар ҳисобига ушланиши мумкин. Ҳар бир боғланиш ташувчининг кимёвий табиати ва фермент молекуласининг юзасидаги функсионал гуруҳларга боғлиқдир.

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

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

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

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

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

6-лаборатория машғулоти

Усимликларни микроклонлаш учун озуқа мухити тайёрлаш ва экиш.
6.1 о`симликларни микроклонлаш усуллари (2с)
6.2 о`симликларни микроклонлаш учун озуқа мухити тайёрлаш усуллари (2с)
6.3 о`симликларни микроклонлаш учун экиш усуллари (2с)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.
Мазкур лаборатория машғулоти Ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятлари, ферментлар фаоллигига ҳарорат, пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принсипи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.
Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментлар фаоллигига ҳарорат аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага ферментлар фаоллигига пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсирини аниқлаш топширилади

Назарий қисм:
Ферментларнинг махсуслиги

Ферментларнинг махсуслиги ўзига хос ҳусусият бўлиб, бу нарса фермент таъсир этадиган субстратнинг кимёвий тузилиши билан боғлиқ бўлади. Ҳар бир фермент маълум бир субстратгагина таъсир эта олади.
Амилаза ва уреазаларнинг махсуслигига хос реаксиялар

Маълумки, крахмал йод билан кўк ранг ҳосил қилади. Унинг амилаза таъсирида парчаланиши дачлаб декчринлар (амило-, эритро-, ахро-, малтодекчринлар) ни, кейин малтоза ва ундан кейин глюкозани ҳосил бўлишига олиб келади. Крахмалнинг парчаланиши натижасида парчаланишнинг ахродекчрин босқичидан ўтгандан кейин унинг фрагментлари йод билан ҳеч қандай ранг ҳосил қилмайди. Йодли реактив кричалл йодни калий йод эритмасида эритиб тайёрланган эритма ҳисобланади. Уни тайёрлаш учун 100 мл дичилланган сувда 20 г калий йод

эритилади ва уни учига 10 г йод кричали солиниб аралаштирилади. Крахмални аниқлаш учун аралашма 5 марта суюлтирилади.

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

СО(НҲ2)2 қ ҲОҲ қ СО2 қ 2НҲ3

СО2 қ 2НҲ3 қ ҲОҲ қ (НҲ4)2СО3

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

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

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

Соя уруғидан уреаза ферменти экчрактини ажратиб олиш. қуруқ соя уруғини яхшилаб янчиб майдаланади ва кўп карра петролей эфири билан ишлов берилиб, ёғидан холис қилинади. Соянинг ёғсизлантирилган уни ҳаво ҳароратида филтр қоғози учида қуритилади ва унга 5 0С да беш ҳажм бирлигида дичилланган сув қўшилади. Аралашма сентрифугаланади ва ҳосил бўлган сентрифугатнинг таркиби айнан уреаза ферментли экчракт ҳисобланади.

Иш тартиби: Иккита пробиркага (1 ва 2) 5 мл дан 0,1 % ли крахмал эритмаси (крахмал эритмаси олдиндан И ва КИ эритмаси солганда ҳаворанг рангга бўялиши бу олдиндан синаб кўрилган бўлиши лозим) солинади. Сўнг бошқа иккита пробиркага (3 ва 4) олдиндан бир неча томчи фенолфталеин қўшиб қўйиллган сийдикчилнинг 1 % ли эритмасидан 5 мл дан солинади. Бундан кейин 1- ва 3-пробиркаларга 1 мл дан филтрланган ва суюлтирилган сўлак эритмаси ҳамда 2- ва 4- пробиркаларга эса 1 мл дан юқорида келтирилган тартибда тайёрланган уреаза ферменти экчракти солинади. Аралашмалар яхшилаб аралаштирилади ва 20 минутга 38-40 0С ли термостат ёки сув ҳаммомига қўйилади. қиздириш ниҳоясига етгандан сўнг 1- ва 2-пробиркаларга йод эритмасидан бир томчи томизизади. Бунда 1-пробиркадаги аралашманинг кўк рангги ёъқолади, чунки крахмалга сўлак амилазаси таъсир этиши туфайли у парчаланган бўлади, 2-пробиркага эса уреаза ферменти экчракти солинганлиги сабабли реаксия содир бўлмайди ва кўк ранг сақланади. 3-пробиркада амилаза ферменти сийдикчилга таъсир эта олмайди, реаксия муҳитида ўзгариш бўлмайди, 4-пробиркада уреаза

таъсиридаги реаксия туфайли фенолфталеин гулоби рангга бўялади, чунки сийдикчил гидролизланади.

Ферментларнинг термолабиллиги ва пҲ кўрсаткичларининг ферментататив реаксияга таъсири

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

Ферментатив реаксияларнинг термолабиллигини аниқлаш

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

Уччала пробирка ҳам 20-25 минутга 37 0С ли термостатга жойлаштирилади. Пробиркалар термостатдан сҳиқарилиб, муз солинган идишга ўтказилиб совитилади ва уларнинг ҳар бирига 1-2 томчи йоднинг калий йоддаги эритмасидан томизилади. Бунда биринчи пробиркадаги крахмалнинг парчаланиши юз бериши туфайли йод эритмаси билан кўк ранг ҳосил бўлмайди. Иккинчи пробиркада сўлак таркибидаги амилаза фаолсизланганлиги туфайли реаксия юз бермаганлиги, яъни ранг ўзгармаганлиги, учинчи пробиркада муҳит нордон бўлганлиги сабабли реаксия секинлашганлиги кузатилади. Демак, иккинчи ва учинчи пробиркалар йод ва калий йодли аралшма таъсирида кўк рангга бўялади.

Ферментатив реаксия тезлигига ҳароратнинг таъсирини аниқлаш

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига крахмалнинг 0,25 % ли эритмасидан 5 мл дан солинади. Бундан кейин биринчи пробиркани муз солинган идишга, иккинчи ва учинчи пробиркаларни 38 0С ли термостатга жойлаштирилади. Сўнг биринчи ва иккинчи пробиркаларга 0,5 мл дан суюлтирилган сўлак, учинчи пробиркага худди шу миқдорда қайнатиб совитилган сўлак қўшилади. Вақти-вақти билан иккинчи пробиркадаги аралашмадан бир томчи олиб, учига 1 мл йоднинг калий йодли эритмаси қўшиб, аралаштирилади. Сҳу ёъсинда крахмалнинг парчаланиш динамикаси кузатилади. Энг охирида, иккинчи пробиркадан олинган томчини солинганда солинган йодни калий йодли эритма билан ранг ҳосил қилмайдиган пайт келади. Бу нарса крахмалнинг сўлак таркибидаги амилаза иштирокида тўлиқ парчаланганлигини кўрсатади.

Кейин ҳамма пробиркалардаги аралашмаларга 3-4 мл дан 1 н Ҳ2СО4 қўшилади ва совитилади. Уччала пробиркаларга ҳам йоднинг калий йодли эритмасидан 2-3 томчи томизилади. Бунда иккинчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши ниҳоясига етади ва ранг ҳосил бўлмайди, биринчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши қисман юз бериб қизғиш ранг ҳосил бўлади,

учинчи пробиркада крахмал умуман парчаланмайди ва кўк ранг ҳосил бўлади.

Ферментатив реаксиялар тезлигининг фермент консентрациясига боғлиқлигини аниқлаш

Иш тартиби: Тўртта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 3 мл дан пҲ кўрсаткичи 6,8 бўлган фосфат-ситрат буфер эритмаси ҳамда 4 мл дан 0,25 % ли крахмал эритмаси қўшиб аралаштирилади. Сўнг биринчи пробиркага 20 марта, иккинчи пробиркага 40 марта, учинчи пробиркага 80 марта ва тўртинчи пробиркага 160 марта суюлтирилган сўлак эритмаларидан 1 мл дан қўшилади ва бу аралашмалар 38-40 0С ли термостатга ўтказилади. Бундан кейин вақти-вақти билан намуналардан бир неча томчи олиб, жуда кучли равишда суюлтирлган йоднинг калий йодли эритмаси билан аралштирилади. Намуналар дачаввал кўк, сўнг қизғиш-бинафша рангга бўялади. Тўрттала пробирка учун ҳам йод билан кўк рангга бўялишининг ёъқолиши 0,5 минут аниқликда қайд қилинади. Бу фурсат оралиғи амилолитик парчаланишнинг ниҳояси ҳисобланади. Тажриба натижалари эгри чизиқ орқали ифодаланиб, бунда абситсса ўқига амилазанинг нисбий консентратсияси, ордината ўқига эса унга тегишли бўлган вақт бирлиги жойлаштирилади. Амилолитик реаксия туфайли крахмалнинг парчаланиши учун сарфланган вақт реаксия тезлигига тескари пропорсионал бўлади.

Сўлак амилазаси фаоллигига фаолловчилар ва ингибирловчиларнинг таъсирини ўрганиш

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

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларга 5 томчидан 0,5 % ли крахмал эритмасидан томизилади, биринчи пробиркага 10 томчи дичилланган сув, иккинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли НаСл эритмаси, учинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли СуСО4 эритмаси томизилади, ҳаммасига 5 марта суюлтирилган сўлакдан 10 томчидан қўшиб, яхшилаб аралаштирилиб, хона ҳароратида қолдирилади. 5 минутдан кейин уччала пробиркага ҳам 10 томчидан дичилланган сув, 1-2 томчидан 0,1 % ли йод эритмасидан солиб аралаштирилади, уларнинг учига тажрибадаги уччала пробиркадаги аралашманинг ҳар биридан 2-3 томчидан алоҳида пробиркаларга томизилади. Йод билан қилинадиган реакция 10-15 минутда яна такрорланади. Биринчи пробиркадаги суюқлик бинафша ёки қизил рангга, иккинчиси қизил ёки сариқ, учинчиси эса кўк рангга киради. Демак, иккинчи пробиркада крахмал яхшироқ гидролизланган, учинчисида умуман гидролиз кетмаган. Иш натижаси жадвалда (4-Жадвал) қайд қилинади.

4-Жадвал

Амилаза фаоллигига фаолловчи ва ингибирловчиларнинг таъсири

№	Фермент	Субстрат	Ферментинг таъсир этиш вақти, мин	Реакчион аралашманинг йод билан берган ранги		
1	Сўлак амилазаси	Крахмал	5			
2	Сўлак амилазаси	Крахмал	10			
3	Сўлак амилазаси	Крахмал	15			
Хулоса:						

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Ферментларнинг физик-кимёвий ҳусусиятлари ҳақида маълумот беринг?
2. Ферментлар фаоллигига ҳароратнинг таъсири ҳақида маълумот беринг?
3. Ферментлар фаоллигига пҲ ва фермент консентратсиясининг таъсири ҳақида маълумот беринг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:Мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар мухандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш буйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
3. Давронов .Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

Машғулотдан мақсад: Микроорганизмларни екиш учун озуқа муҳити тайёрлаш ва стерилизация қилиш ҳамда продуцент суюқ ва қаттиқ озуқа муҳитида ўстириш

Керакли асбоб ва жиҳозлар:Микроскоп,аналитик тарози,мензурка,петри ликопчаси ,сентрифуга,спирт лампаси, натрий гидрооксид ,натрий сулфат ,сулфат кислота,термостат,микробиологик кесгич,озуқа муҳитлар,биотехнологик обект

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

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

Биринчи гуруҳ талабалари: суюқ озуқа муҳити таркибини тузади, стериллизация қилишади ва продуцентни екиб, зарур кўрсаткичларни таъминлаган ҳолда микробиологик качалкага идишларни жойлаштиришади. Гуруҳчадаги талабаларнинг ҳар иккитаси турли хил ҳажмдаги суюқликка озуқа таркиби тузишлари лозим;

Иккинчи гуруҳ талабалари: қаттиқ озуқа муҳити тайёрлашади, стериллизация қилиб, продуцентларни екишади (Петри ликопчаларига) ва термостатга жойлаштиришади.

Гуруҳчадаги талабаларнинг ҳар иккитаси турли хил ҳажмдаги суюқликка озуқа таркиби тузишлари лозим;

Жараёнлар давомида мураббий талабаларнинг берган саволларига жавоб бериб бориши ва туғилган муаммоларни ҳал етишда амалий ёрдам бериши лозим.

Дарс (иккинчи жуфтлик) охирида талабалар лаборатория дафтарларига қайд етилган маълумотлар асосида коллоквиум топширади ва машғулотга ажратилган рейтинг балини олади. Рейтинг балини тўплай олмаган талаба кейинги машғулотгача ушбу лаборатория ишини қайта топшириши мумкин.

Лаборатория ишигача техник ходим ёки лоборант талабалар учун 2 сутка давомида колбаларда ва косякларда ўстирилган (Петри ликопчасида ўстириш ҳам мумкин) продуцент микроорганизм культураси ва стерил идишлар билан таъминлаши лозим. Шунингдек, автоклавни зарур вақтда қўшиб, стреиллаш жараёнига тайёрлаб беради. Бундан ташқари микробиологик качалкада қолдириладиган культурал суюқликни назорат қилиш ва кейинги машғулотгача сақлашни таъминлаши зарур.

Мураббий томонидан ҳар иккала гуруҳнинг бир вақтда стериллаш жараёнини амалга оширилиши назорат қилиниди. Стерилизация вақтида еса зарур бўлган маълумотларни талабалар дафтарларига қайд етиб қўядилар.

3) **Тушинтириш:**

Айни вақтда жаҳон аграр саноати амалиётида микроб инсектицид биопрепаратлардан қишлоқ хўжалиги екинларини зараркунанда хашаротлардан ҳимоя қилишда унумли фойдаланиб келинмоқда.

Бу борада Бац.тҳурингиенсис турига мансуб ентомопатоген бактериялар асосида тайёрланаётган инсектицидлар асосий ўрин тутади. Шу боисдан Бац.тҳурингиенсис бактерияси асосида биопрепарат тайёрлаш учун мўтадил ва арзон озиқа муҳити танлаш катта амалий аҳамият касб етади.

Адабиётлардан маълумки Бац.тҳурингиенсис бактерияси штаммларини ўстириш учун асосан глюкоза қўшилган маккажўхори, ачитқи ва қуруқ ачитқи екстрактлари асосида тайёрланган озиқа муҳитларидан фойдаланилади.

Маълумки, Бац.тҳурингиенсис бактерияларини биотехнология саноати миқёсида ўстириш учун таклиф етилган маккажўхори екстракти ва глюкоза сақловчи озиқа муҳити ехтиёжга етарлича жавоб бермайди, шунингдек, маккажўхори екстрактининг беқарорлиги ва глюкозанинг танқислиги бу озиқа муҳити ўрнини босадиган арзон ва мўтадил озиқа муҳити манбаларини топишни тақазо етади.

Шу боисдан мазкур ишда биз Бац.тҳурингиенсис ентомопатоген бактерияси штаммлари учун қуйидаги озуқа муҳитида ўстиришни тавсия етамиз: стандарт озиқа муҳити: Пептон-1,0; НаСл-0,05; $К_2ҲПО_4$-0,05; $МгСО_4$ -0,02; (пҲ 7,0) (1л. суюқлик учун). Бунда культуралар юқори даражада маҳсулдорлик кўрсатади. Ушбу озуқа муҳити асосида асосан лаборатория ишлари бажарилади.

Унинг асосида ишлаб чиқаришни ташкиллаштириш еса иқтисодий самарадорликка олиб келиши мумкинлиги исботлаб берилган. Шунинг учун лаборатория шароитида биз мақсадимиз фақатгина ушбу бактериялар синтез қиладиган кристалл оқсилларни ўрганиш бўлганлиги учун ҳоҳлаган озуқа муҳитидан фойдаланишимиз мумкин.

Қуйидаги расмда ўрганилаётган бактериянинг спора ва кристал ҳосил қилиши акс еттирилган бўлиб, талабалар микроскоп остида шу шаклни аниқ кўришлари талаб етилади.

бактерияларнинг спора-кристалл ҳосил қилиши

4) **Асбоб-усуналар ва материаллар:**

- ✓ 500-700 мл-ли кимёвий стаканлар (2 та);
- ✓ дистилланган сув учун колбалар;
- ✓ Петри ликобчалари (зарур миқдорда);
- ✓ картошка доналари (зарур миқдорда мураббий томонидан таъминланади);
- ✓ Бациллус тҳурингиенсис бактериясининг тайёр култураси (зарур миқдорда мураббий томонидан таъминланади);
- ✓ Автоклав;
- ✓ Қуритиш шкафи;
- ✓ Суюқ озуқа муҳитида ўстириш учун (1ёки 2 литрли колбалар);
- ✓ Термостат;
- ✓ Микробиологик качалка;
- ✓ Сентрифуга;
- ✓ Микроскоп ва зарур бўёқлар;
- ✓ pH-метр.
- ✓ Тарозилар.

5) **Ишнинг бориши:**

Микроорганизмлар учун озуқа муҳити тайёрлаш, уни стерилизациялаш ва унга продуцентларни екиш усуллари билан микробиология фанининг лаборатория машғулотларида етарли даражада танишганлиги сабабли талабалар ушбу лаборатория ишини қуйидаги тавсиялар асосида бажаришади:

Стерилизациялаш шароити. Озиқа муҳити 105-110^{0}С ҳароратда 1 атмосфера босимда 20 мин. давомида стерилланади. Озиқа муҳитининг пҲ кўрсаткичи: стерилизициягача 7,0-7,2 ва стерилизациядан кейин 6,8-7,0 га тенг бўлиши лозим (зарур бўлганда pH кўрсаткичи мўътадиллаштирилиши керак, культуранинг мўтадил ўсиб ривожланиши учун озиқа муҳити пҲ кўрсаткичини 7,4 да ушлаб туриш мақсадга мувофиқдир).

пҲ кўрсаткичи (суюқ озуқа муҳити учун). пҲ кўрсаткичи ферментация жараёнигача 6,8-7,0 бўлиши керак; ферментация жараёни охирида пҲ кўрсаткичи кўтарилиб кетади (8,0). Табиийки озиқа муҳитининг ишқорий ҳолатга ўтиши кристалларни кичик бўлакларга бўлиниб кетишига олиб келади ва бу кейинги кристалл оқсилларни ажратиб олишда қийинчилик туғдиради. Øó áîèñàí ôåðìåíòàöèÿ æàðà¸íè òóãàãàíäàí ñûíã, áèîìàññàíè àæðàòèá îëèøäà êóëüòóðàë ñóþқëèêëèíèã пҲ кўрсаткичини 6,2-6,4 даражасигача келтириб оламиз. Бунда мақсадга мувофиқ бўлган барча кристалл оқсилларни сентрифугалаш (5000 тез/мин. 20 мин) орқали ажратиб олишга еришилади. Бунинг учун ҲСл нинг кучсиз еритмаларидан фойдаланиш мумкин.

2-иш. Бактериялардан спора ва кристалларни ажратиб олиш ва микроскопда текшириш

1) **Ишдан мақсад:** ўрганилаётган бактерияларнинг биомассасини ажратиб олиш, биомассадаги споралар ва кристалларни алоҳида ажратиш ва уларнинг миқдорини микроскопик таҳлил қилишни ўрганишдан иборат.

2) **Ишнинг ташкил етилиши:** мураббий гуруҳ талабалрини икки гуруҳга ажратади.

Биринчи гуруҳ талабалари: культурал суюқликдан микроб биомассасини сентрифугалаш усулида ажратиб олишади ва ундан белгиланган тартибда кристалл оқсилларни ажратишади;

Иккинчи гуруҳ талабалари: қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган биомассани йиғиб, ундан споралар ва кристалл оқсилларни белгиланган тартибда ажратишади.

Ҳар иккала гуруҳ талабалар оқсилларни қуйидаги чизма асосида бажаришлари ва микроскопи таҳлил қилишлари лозим. Микроскоп остида кўрган спора ва кристалл оқсиллар расмлари дафтарларга чизиб олинади.

Дарс (иккинчи жуфтлик) охирида талабалар лаборатория дафтарларига қайд етилган маълумотлар асосида коллоквиум топшириди ва машғулотга ажратилган рейтинг балини олади. Рейтинг балини тўплай олмаган талаба кейинги машғулотгача ушбу лаборатория ишини қайта топшириши мумкин.

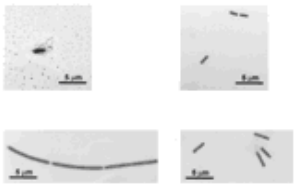
3) **Тушинтириш:**

Кристалл кўринишдаги оқсилларнинг функционал ва аминокислоталари таркибини ўрганиш уларни тоза ҳолда ажратиб олиш муаммосини туғдиради. Ушбу бактерияларда, кристалларни спора, вегетатив ҳужайра ва уларнинг фрагментларидан ажратиш учун асосан қуйидаги усуллардан фойдаланилади: хлороформ–сув, тетрабром етан–сув, тўртхлорли углеводород-1% ли натрий сулфат, полиетиленгликол 6000–декстрансулфат натрий 500, флотация, СсСл зичлиги градиентида қаватида сентрифугалаш ва х.к. Аммо ушбу усуллар ёрдамида Бац.тҳурингиенсис культураларидан тоза кристаллар ажратиб олиш катта қийинчилик туғдиради. Шу боисдан штаммлардан кристалларни ажратиб олишда биз Пендлтон усулидан маълум бир ўзгартириш киритган ҳолда қуйидаги тартибда иш олиб бориш тавсия етамиз. Пендлтон усулида икки фазали (1% ли натрий сулфат–н-ксилол) тозалаш усулидан фойдаланилган бўлса, биз биринчи босқичдаги гомогенизаторда аралаштириш ва тиндиришдаги 1% ли натрий сулфат ўрнига культурани ўстиришда фойдаланилган суюқ озиқа муҳитидан, охирги босқичда еса сувдан фойдаланамиз.

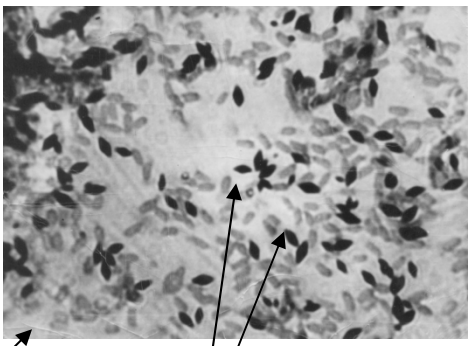
Пендлтон усулини бундай модификация қилиш бизга Бац.тҳурингиенсис вар.тҳурингиенсис бактерияси штаммларидан 99% дан кўпроқ тоза кристалл ажратиб олиш имконини беради.

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

Талабалар иш давомида ушбу культураларнинг қуйидаги расмлардагидек манзараларни кўришлари мумкин:



Продуцентларнинг вегетатив ҳужайралари



Спора ва кристалл оқсиллар кўриниши

4) **Асбоб-усуналар ва материаллар:**

- ✓ 500-700 мл-ли кимёвий стаканлар (8 та);
- ✓ н-ксилол (200 мл);
- ✓ дистилланган сув ва бир литрли колбалар;
- ✓ Петри ликобчалари (зарур миқдорда);
- ✓ Суюқ озуқа муҳитидан биомассани чўктириш учун епиндорф ёки сентрифуга стаканлари (зарур миқдорда);
- ✓ Сентрифуга;
- ✓ Микроскоп ва зарур бўёқлар;
- ✓ pH-метр.

Талабанинг коллоквиум топшириши учун топшириқлар:

1. Талаба услубий кўрсатмада берилган маълумотлар ва расмларни дафтарига қад етган бўлиши;
2. Озуқа муҳити тайёрлашнинг уч хил вариантини (ҳар хил ҳажмда) тузиб кўрсатиши;
3. Стерилизациялаш ва ўстириш шароитларини билиши;
4. Микроскоп остида продуцентнинг шаклини, унинг зарур метаболитик моддаси шаклини чизиб кўрсатиши;
5. Продуцентдан оқсил моддаси ажратишнинг усулини айтиб бериши ва амалда бажара олиш даражасини кўрсата олиши;
6. ҳар бир гуруҳ ва кичик гуруҳчалардаги талабалар ажратган оқсил ва продуцентнинг спораларини лаборантга топшириши лозим бўлади.

Юқорида берилган топшириқларни бажарган талабаларга белгиланган тартибда рейтинг баҳоси қўйилади.

Машғулотнинг мақсади:Биоёқилғилар олиш технологияларини ўрганиш

Керакли асбоб-ускуналар: Микроскоп,аналитик тарози,мензурка,петри ликопчаси ,сентрифуга,спирт лампаси,натрий гидрооксид ,натрий сулфат ,сулфат кислота,термостат,микробиологик кесгич,озуқа муҳитлар,биотехнологик обект**.**

Ишнинг бажарилиши Экологик муаммоларни кескинлашуви, қайта тикланмайдиган енергоресурслар заҳирасини тобора камайиб бориши, уларни тан нархи ошиши, органик чиқиндиларни қайта ишлаш, уларни иссиқлик ва бошқа турдаги енергияга айлантириш муаммосини тезроқ ҳал қилишни биотехнологиянинг енг долзарб масалалари қаторига кўтариб қўйди.

Маълумки, ҳайвонлар ўсимликлар асосида яратилган озуқа енергиясини ёмон ҳазм қилади ва уларнинг ярмидан кўпроғи организмга сўрилмасдан ахлат, гўнг ҳолатида чиқиб кетади. Энг аввало ҳайвонлардан чиққан бу чиқиндидан органик ўғит сифатида

фойдаланилади. Буни ўрнига ушбу чиқиндидан тикланадиган енергия манбаи сифатида фойдаланса бўлади.

Ривожланган мамлакатларда йирик шохли хайвонлар (нафақат улар) йирик фермаларда ва комплексларда тўпланиб, боқилади. Бу еса бошқа маҳсулотлар қатори уларни чиқиндиларидан (ахлатларидан) атроф-муҳитни ифлослантирмасдан фойдаланиш имкониятини яратади.

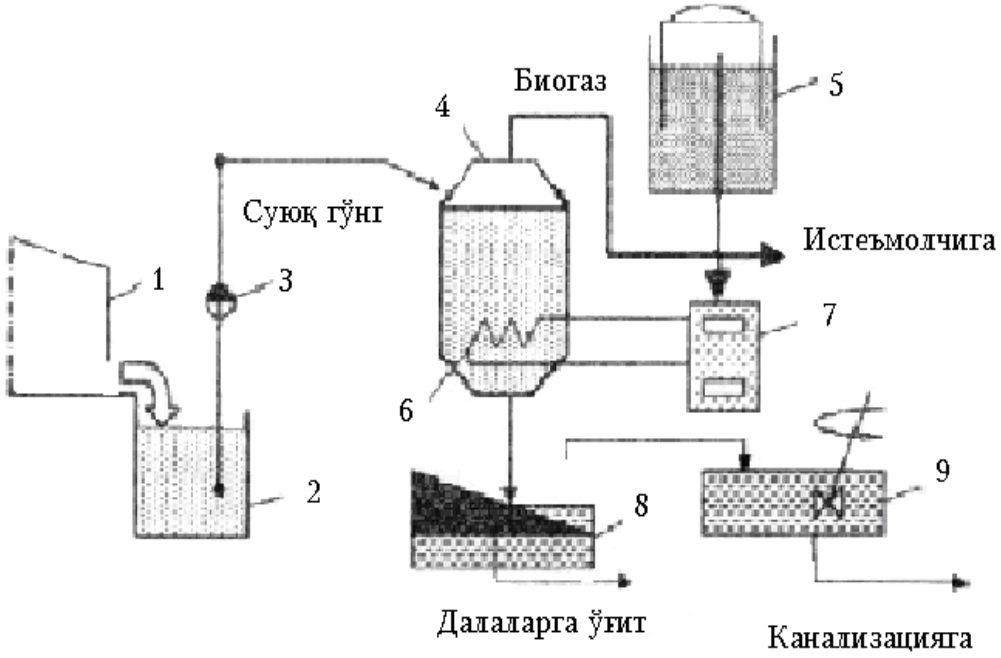
Ҳайвон ахлатларидан ва оқова сувларидан оқилона фойдаланишни йўлларидан бири уларни анаероб шароитда бижғитишдир. Бу жараёнда ахлатни зарарсизлантирилиб, бир вақтни ўзида уни енг муҳим органик ўғитлик сифатини сақлаб қолган ҳолда, ундан биогаз олиш мумкин.Метанли бижғитиш ёки биометаногенез – биомассани енергияга айлантириш жараёни қадим-қадимлардан маълум бўлган жараёндир. У 1776 йилда Волта томонидан очилган бўлиб, дастлаб у ботқоқлардаги газда метан борлигини аниқлаган. Мана шу жараёнда ҳосил бўладиган биогаз 65% метан, 30% карбонат ангидрид, 1% олтингугурт кислотаси (Ҳ2С) ва унчалик кўп бўлмаган миқдорда азот, кислород, водород ва углерод икки оксиди сақлайди.

Ботқоқ гази, баъзида клар-газ ҳам деб юритилади,кўк- ҳаво ранг бериб алангаланади, ҳид чиқармайди.Уни тутун чиқармасдан алангаланиши инсонларга ўтин, хайвонлар тезаклари ва бошқа ёқилғиларга нисбатан камроқ ташвиш туғдиради. 28 м3 биогаз енергияси, 16,8 м3 табиий газ, 20,8 л нефт ёки 18,4 л дизел ёнилғисига тенгдир.

Органик чиқиндиларни анаероб бижғитишга асосланган тозалаш иншоотларини биринчиси 1895 йилда Англияни Экзегер шаҳрида қуриб ишга туширилган еди. Бу иншоотни санитария вазифасидан ташқари кўчаларни ёритиш учун електр енергияси тайёрлаш сарф бўладиган биогаз ишлаб чиқариш бўлган.

Чиққиндиларга анаероб ишлов бериш узоқ вақт сув тозалаш стансияларини чўкмаларини ва чорвачиликни чиқиндиларини мўтадиллаш мақсадида ишлатиб келинган. Аммо, 1970 йиллардаги енергия танглиги туфайли қишлоқ хўжалик ҳайвонлари чиқиндиларидан биогаз ишлаб чиқариш ғоясига астойдиллик билан қараладиган бўлди.

Гўнгни анаероб бижғитиш орқали биогазга айлантириш жараёни мустаҳкам ёпиладиган махсус идишлар – биогаз усқурмаларида олиб борилади (1-расм.).



1-расм. Гўнг шарбатини биогаз усқурмасида қайта ишлашни технологик чизмаси

1-молхона; 2-гўнг тўпланадиган жой; 3-насос; 4-метантенк; 5-газголдер; 6-иссиқлик алмаштирувчи; 7-қозон; 8-гўнг сақланадиган жй; 9-аеротенк.

Бу технологик жараён қуйидагича олиб борилади. Ҳайвонлар сақланадиган молхоналардан (суратда 1) гўнг тўпланадиган идишга юборилади (2), кейин насос (3) ёрдамида уни метантенк (4) (гўнгни анаероб бижғиши учун махсус қурилма) га юборилади.Бижғиш жараёнида ҳосил бўлган биогаз, газголдер (5)га келиб тушади.ва ундан кейин истеъмолчига тарқатилади. Суюқ гўнгни иситиш учун ва иссиқликни бир хил ушлаб туриш учун метанотенк ичида иссиқлик алмаштириб турувчи ғовурлар ўрнатилган, улар орқали қозонхонадан (7) келган иссиқ сув айланади. Бижғиб бўлган гўнг, гўнг сақланадиган (8) чуқурликка туширилади

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

Бижғиш даврида гўнгда микроорганизмлар ривожланади ва бирин- кетин органик моддаларни кислоталаргача парчалаб беради. Ҳосил бўлган кислоталар метан ҳосил қилувчи ва синтроф микроорганизмлар таъсирида газсимон махсулотлар – метан ва карбонат ангидридига айланади. Гўнгни анаероб бижиш жараёнида органик моддаларни парчаланиш даражаси 25% дан 45% гача етади.

Органик моддаларни парчаланиши (феградасияси) кўп босқичли жараён сифатида амалга оширилиб, бунда углерод боғлари ҳар-хил микроорганизмлар таъсирида бирин-кетин узиладилар. Энг замонавий тушунчалар бўйича органик моддаларни биогазга айланиши тўрт босқичда амалга ошади:

биринчи, мураккаб биополимер молекулаларни (оқсил, липид, полисахарид ва х.к.) кичикроқ мономерларга (аминокислота, карбон сувлар, ёғ кислоталари ва х.к.) айланиши;

иккинчи, ҳосил бўлган мономерларни янада оддийроқ моддаларга; тубан кислоталар ва спиртларга бижғиш (ферментасия) асосида) айланиши, (Бунда водород ва карбонат ангидрид ҳам пайдо бўлади.);

учинчи, асетоген босқич- бу босқичда метандан олдинги моддалар (асетат, водород, карбонат ангидрид) пайдо бўлади;

тўртинчи, метаноген босқич- охирги маҳсулот, органик моддаларни метанга айланишига олиб келади.

Гўнг ёки бошқа органик моддалардан (чиқиндилардан) биогаз олишда қатнашадиган микроорганизмлар ҳамжамиятини таъсир етиш чизмаси(Заварзин бўйича).

Чизмада органик моддаларни анаероб шароитда парчаланишида ҳар ҳил гуруҳга мансуб микроорганизмларни ўзаро трофик алоқалари акс етирилган бирламчи анаероблар органик моддаларни метанни олд маҳсулотлари бўлган водород, корбонат ангидириди асетат, метанол ,метил амидлар, формиатгача парчалайдилар.

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

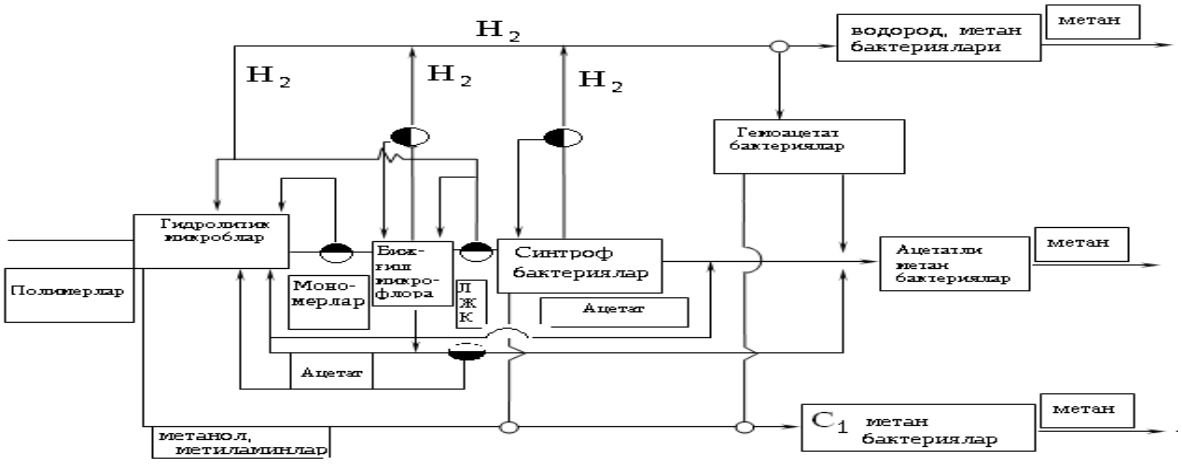
Метан хосил бўлишда бошқариш функсиясини бажараётган марказий метаболит бўлиб, водород хизмат қилади. Тизимда водородни парсиал босимини паст холатда ушлаб туриш хисобидан уни турлар орасидан бирламчи анаероблар метоболизми бевосита метанни олд маҳсулотлари хосил бўлишигача қараб ўзгартириш имкониятини яратади. Агар тизимдан водород чиқариб ташланмаса, қайтарилган махсулотлар учувчан ёғ кислоталари ва спиртлар хосил бўлади. Бу бирикмаларни метоболизми хаёт фаолияти ҳосил бўлган водородни метан бактериялар билан боғлашга бағишланган синтроф

бактериялар томонидан амалга оширилади. Метан ҳосил бўлиш учун зарур бўлган шароитлар қуйидаги жадвалда келтирилган.

1-жадвал

Метан ҳосил бўлиш шартлари

Кўрсаткичлар	Меъёрий кўрсаткичлар	Чегара кўрсаткичлари
pH	6,8- 7,4	6,4- 7,8
Учувчан кислоталар миқдори (CH3COOH бўйича)	50-500 мг/л	200 мг/л
Умумий ишқорийлик (CaCO3 бўйича)	500-1500мг/л	1000-3000
Чиқадиган газни таркиби	65-70% метан, 30-35% карбонат ангидриди ва бошқа газлар	
Тузлар		
НҲ4 (Н бўйича)		300 мг/л.
Na		3500-5500 мг/л.
K		2500-4500 мг/л.
Ca		2500-4500 мг/л.
Ҳарорат, 0C	33-37.	
Метан ишлаб чиқариш	0,3-0,4.м3/кг қуруқ органик модда ҳисобидан.	



Метан ҳосил қилувчи бактериялар, кислота ҳосил қилувчи бактерияларга нисбатан ўзларини ўсиб ривожланишлари учун юқорироқ талаблар қўядилар яни уларни кўпайишлари учун мутлақо анаэроб шароит ва кўпроқ вақт керак бўлади.

2-жадвал.

Биогазнинг физик хусусиятлари

Кўрсаткичлар	Копонентлар				60% метан ва 40% CO2 аралашмаси.
	Ш4	CO2	Ҳ2	Ҳ2С	
Хажм қисми %	55-70	27-44	1	3	100
Ёниш иссиқлик хажми мдж/м3	35,5	----	10,8	22,8	21,5
Ёниш харорати 0C	650-750	----	585	----	650-750
Зичлиги, гр/л;					

меъёрий чегара	0,72 10 2	1,98 40 8	0,09 31	1 ,54 3 49	1,20 3,20

Биогазни физикавий ҳусусиятлари уни ишлатиш имкониятларини кўрсатади. Ёнишни ҳажмий иссиқлиги, ёниш харорати, ёниш чегараси асосан Ш4 миқдори билан белгиланади чунки Ҳ2 ва Ҳ2С жуда ҳам кам бўлган миқдори бу кўрсаткичга тасир етиш даражасида емас.

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

Биогаздан електор енергияси олинганда фақатина уни 30% електр енергияга айланади холос, 70% чиқинди иссиқликдир. Ундан сув иситиш, хайвонларни сақлаш (молхоналарни иситиш), исиқхоналар ёки уларни иситиш, қуритғич хоналари ёки ускурмаларида хавони иситиш, микроклимитни бошқариш ва бошқа мақсадларда фойдаланиш мумкин.

3-жадвал.

Ҳар хил ёнилғиларни ёниш иссиқлигини нисбати

Ёнилғи тури (ёниш иссиқлиги)	Биогаз ($м^3$да) Ш4 сақловчи (%)			Табий газ $1м^3$ да	Пропан 1 кг да	қозон хона ёқилғиси 1 кг да	Дизел ёқилғиси 1 л да	Электр токи (кВТ.ч)
	56	62	70					
Биогаз 56% Ш4 (20.0 МДж/$м^3$	1,0	0,91	0,80	0,60	0,44	0,47	0,56	5,6
Табий газ (33,5 МДж/$м^3$)	1,68	1,52	1,34	1,00	0,73	0,79	0,93	9,3
қозон хона ёқилғиси (42,3 МДж/кг)	2,12	1,91	1,69	1,26	0,78	1,00	1,17	11,7

Қишлоқ хўжалик хайвонларидан ва парандаларидан чиқадиган гўнг ҳамда улардан олиниши мумкин бўлган биогаз миқдори қуйидаги жадвалда келтирилган.

4-жадвал.

Гўнгдан биогаз чиқиш кўрсаткичлари

Кўрсатгич	Сигирлар	Чўчқалар	Парандалар
Бир бошга бир суткада чиқадиган гўнг миқдори,кг	55,0	0,2	3,5
Бир бошдан бир суткада чиқадиган биогаз миқдори, $м^3$	1,62	0,02	0,32
Бир тонна қуруқ гўнгдан чиқадиган биогаз хажми, $м^3$	300	600	500

Бундан ташқари, гўнгни бижғитиш уни дезодарасия қилади (зарарсизлантиради), гелментларини, ҳамда ёввойи ўсимликлар уруғларини йўқотади, ўғицимон моддаларни енгил сўриладиган шаклга (минерал шаклга) ўтказади. Ўсимликлар учун озиқавий моддалар миқдори азот, фосфор, калий бутунлай йўқолмайди. Биогаз ускурмасидан чиққан гўнгди кимёвий таркиби қуйидаги жадвалда баён етилган.

5-жадвал.

Гўнг кимёвий таркибининг бижғиш жараёни вақтига қараб ўзгариши (%)

Бижғиш даври, кун	Азот		P_2O_5	K_2O	С:Нумумий
	Умумий Н	Аммонийлик Н- $НХ_4$			
0 (назорат)	0,32	0,13	0,11	0,24	12,2
5	0,31	0,13	0,11	0,24	11,9
10	0,31	0,16	0,11	0,24	10,5
15	0,31	0,16	0,11	0,24	9,6

Гўнгни анаероб бижғитишда уни таркибидаги калий ва фосфор бутунлай ўзгармайди. Азот моддалари гўнга ишлов беришни бошқа усуллари ишлатилганда 30% йўқотилса, анаероб бижғишда 5% йўқолади.шуни ҳам еслаб қолиш лозимки, янги гўнгни азот органик шаклда бўлса, анаероб бижғиш оқибатида у ўсимлик учун қулай бўлган аммоний шаклига ўтади.

Гўнгни анаероб бижғитиш атроф мухитни муҳофазаси учун қанчалик фойдали еканлигини иқтисодий ҳисоб китоб қилиш анча мушкул вазифа. Бу йўл билан ишлов берилган гўнг, биологик мўтадил холатда бўлиб, хашоротларни ўзига тортмайди.

Анаероб бижғишдан кейин гўнгдаги қўланса хид берадиган моддалар йўқолади

6-жадвал.

Бижғитилган гўнг таркибида кучли ҳид берадиган моддалар миқдори

Бирикмалар	Табиий гўнг, %	Бижғитилган гўнг, %
Фенол	100	4
Крезол «П»	100	10
Скатол	100	79
Мой кислота	100	3

Анаероб ишлов беришда поле вируслар миқдори 98,5% га камаяди, индекс Э.коли 108 дан 105-104 гача, паразитларни уруғи 90-100% йўқолади

Табиий ресурслардан фойдаланганда қўйилмдиган екологик талаблар хўжалик ҳисоб китоби шароитида, «улардан фойдаланилганда ўрнига қўйиш» деган иборалар қонуний жужжатлар асосида ишга тушганда алоҳида аҳамият касб етади.

Энергиянинг бахоси кўтарилиб кетаётган манашу даврда айниқса анаероб биологик жараёндан фойдаланиш катта иқтисодий фойда келтиради. Гўнгни анаероб шароитида тозалаш нафақат еанергия манбаи сифатида, балки қўшимча енергия манбаи сифатида қаралмоғи лозим.

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ

ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ”

фанидан

АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАРИ

Тузувчи: А.Сатторов

Термиз – 2022

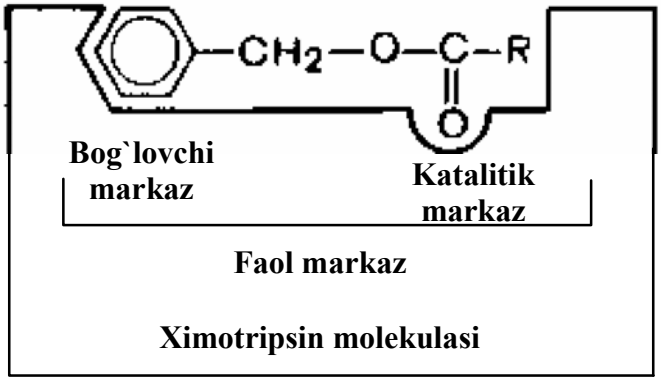
1-2-Амалий машғулот

Мавзу: Ферментлар барқарорлигига та`сир этувчи омиллар.

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

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

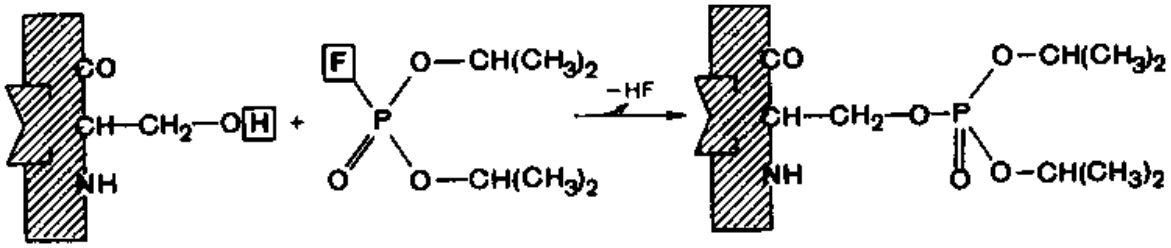
Фаол марказда субстрат билан бевосита таъсирланувчи каталитик марказ ва субстратга мосликни махсус таъминловчи ва уни фермент билан комплексини шакллантирувчи боғловчи марказ ёки тўқнашувчи ("лангар") майдон фарқланади.



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

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

Бу модда тузилиши жиҳатдан холинга яқин бўлиб фаол марказда жойлашган сериннинг ОН гурухи билан таъсирланади, натижада ферментнинг фаоллиги йўқолади. Бошқа қатор ферментларнинг фаол марказида ҳам серин бўлгани сабабли ДФФ томонидан шу аминокислотани фосфорлаши туфайли фаолсизланиши юз беради.



Фаол фермент ДФФ Нофаол фермент

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

1-жадвал

Баъзи ферментларнинг серин аминокислотаси атрофида жойлашган аминокислоталар кетма-кетлиги

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

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

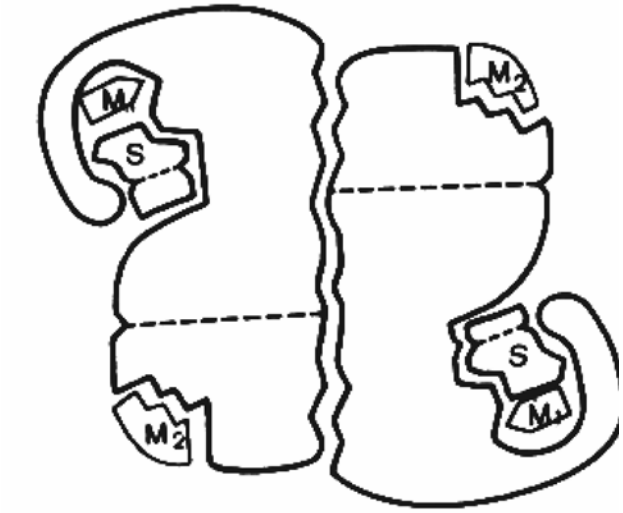
Фаол марказдан ташқари фермент молекуласида аллостерик марказ ҳам бўлиши мумкин.

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

Фаоллиги фаол марказнинг ва шу билан биргаликда аллостерик марказнинг ҳолатига боғлиқ бўлган ферментларни аллостерик ферментлар деб юритилади. Уларнинг фарқли хусусиятлари олигомер фермент молекуласида маконда бир-биридан ажралиб турадиган бир неча хил фаол марказлар ва бир

неча хил аллостерик бошқарувчи марказларнинг бўлишидадир.

Схематик жиҳатдан аллостерик фермент қуйидаги расмда кўрсатилган:



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

3- Амалий машғулот

Мавзу: Иммобилланган ферментларни тиббиётда ва технологияда қо`ллаш

Ферментлар ва ферментлар системаси амалий фаолиятнинг ҳар хил сохаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат сохаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органиқ синтез, кимиёвий тахлил ва. хзо. Шунга қарамасдан амалий ензимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жахон бозорида жуда қиммат еди. Микробиологиянинг ривожланиши натижасида ферментларни керакли миқдори ишлаб чиқариш мумкин бўлди. Ферментларнинг қўлланилишини яна 2та сабаб қийинлаштиради. Биринчидан - ферментларни сақлаш қийин ва ҳар хил таъсирлар, айниқса иссиқликка чидомсиз. Иккинчидан, ферментлардан кўп маротаба фойдаланиш, уларни реагентдан ва реаксия маҳсулотларидан ажратишнинг мураккаблиги натижасидадир. Лекин хозирги шунда бу муаммолар хал қилинган.

Иммобилизасияланагн ферментларнинг яратилиши натижасида амалий ензимология олдида янги принсипиал истиқболлар очилди. Дж. Нелъсон ва Э. Гриффин 1916 йилдаёқ кумирда адсорбсияланган (яъни иммобилизасияланган) инвертаза каталитик фаоллигини сақлашини аниқладилар. 1936 йилда Дж. Пфанмйўллер ва Г.Шлейх ёгоилик кипигида адсорбсияланган протеолитик ферментлар (терини ошлашда ишлатилади) га

патент олдилар. Ферментлар билан ташувчиларининг мустахкам конъюгатлари 1953 йилда Н.Грубхофер ва Д. Шлейт томонидан олинди.
Ферментларни ташувчиларга бириктириш натижасида гетероген катализаторлар яратилиб уларга 1971 йилда иммобилизасияланган ферментлар деб кам берилди. Унинг маъноси анча аниқ бўлиб, бу фермент препаратларининг еримайдиган ташувчиларга бириктиришдир. Лекин иммобилизасия тушунчасини анча кенгтушуниш керак: бу оқсилл молекуласининг (ёки унинг франгментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. еримайдиган ташувчига бириктиришдан ташкари буни оқсил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки молекулалар ўртасидаги боглар қуйи молекуляр бифунксионал реагентлар ёки ферментни ерувчи полимерга бириктириб еришиш мумкин.
Иммобилизасияланган ферментлар бир катор афзалликларга ега.
Биринчидан, гетероген катализатор реаксия муҳитидан осон ажралади бу еса :а) реаксияни керакли вақтда тўхтатиш имконини беради ; б) катализатордан қайта фойдаланиш; в) фермент аралашмаган максулот олиш мумкин. Охиргиси айниқса озиқ-овқат ва фермесевтика ишлаб чиқаришда жуда муҳимдир.
Иккинчидан: гетероген катализаторларнинг қўлланилиши ферментатив жараённи узлуксиз олиб бориш имконини беради. Масалан: оқиб ўтувчи колонкаларда реаксия тезлигини бошқариш , шу билан бирга маҳсулот ҳосил бўлишини оким тезлигини ўзгартириб еришиш мумкин.
Учинчидан: ферментнинг иммобилизасия ва модификасияси катализатор хусусиятини мақсадга мувофик ўзгаришига олиб келади каталитик активлигининг пҲга, ион таркибига ва муҳитининг бошқа параметрларига богликлиги, унинг ҳар хил денатурасияловчи таъсирларга нисбатан баркаролигини таъминлайди.
Туртинчидан: ферментларнинг иммобилизасияси уларнинг каталитик активлигини ташувчи хусусиятларига ҳар хил физик омиллар таъсир еттириб (нур. товуш) бошқариш мумкин. Бу асосда механо ва товушга сезгир датчиқлар, паст товушларни кучайтиргичлар ва яратиш имконини беради.

4-Амалий машғулот

Мавзу: Иммуноензим таҳлилининг гомоген ва гетероген усуллари

Иммуноензим тахлили 60-йилларни ўрталарида вужудга келиб, аввал, гистологик препаратда антигенни идентификасиялаш, кейин еса иммунодиффузия ва иммуноелектрофорез тестларида пресипитасия чизикларини аниклашда кулланилган. Бундан ташкари биологик суюкликларда антигенлар ва антителаларни микдорий тахдили учун ишлатила бошланган. Методни гетероген усулини ишлаб чикишда Е.Энгвалл ва Р.Перлманн, шунингдек, уларга боглик булмаган равишда В.К Ван Веемен

ва А.Шуурслар 1971 йили уз тадкикот ишларини олиб борганлар ва ушбу усулнинг муаллифи хисобланадилар. 1972 йили еса Е.К. Рубенштейн уз шогирдлари билан ИЭТ гомоген усулини ишлаб чикишга муваффак булганлар. Ушбу ИЭТ лари усулларини ишлаб чиккан муаллифлар айнан, уз тадкикот ишларида ва шунингдек, амалиётда ИЭТ талабларига жавоб бера оладиган фермент молекулаларини ва уларнинг кофакторларини нишон сифатида куллаб, конъюгат олиш мумкинлигини исботлаганлар. Сабаби юкорида айтиб ўтилгандек, ферментлар уз субстратлари иштирокида кимёвий реаксияни 10-10 маротаба тезлаштирар еканлар, шу билан бирга улар антиген ва антителалар уртасида буладиган иммунокимёвий жараёнларнинг сезгирлигини хдм бир неча бор ошириб, аникланиши керак булган модда микдорини (пкМ) жуда кичкина кийматларда аникдаш учун керакли ферментатив реаксия турини катализлаш имкониятга ега моддалар хисобланадилар. Шунинг учун иммунокимёвий реаксияларда, факат фермент молекулалари емас, балки уларнинг кофакторлари хдм махсус маркерлар сифатида ИЭТ нинг турли усулларида кенг кулланилмокда.

Хрзирги вактда иммуноензим тахдили (ИЭТ) усулининг хилма-хил турлари ишлаб чикилган. ИЭТ турли хил моддаларни аниклаш учун кенг кулланилади. Жумладан, доривор препаратларни, гормонларни, антителаларни, вирус ва бактериал антигенларни, озик-овкат токсинларини, фитотоксинларни, наркотик моддаларни, хдмда сифилиз, малярия таксоплазмоз, алвеокок, кизилча ва гелминтларни, салмонеллезни ва касаллик тугдирувчи микроорганизмларни... диагнозтика килишда кенг кулланилади. Модомики, ИЭТ антителаларни аникдашда хам кулланилар екан, бу еса уз навбатида куп касалликларни бошланиш боскичида олдини олиш ва серодиагностика килиш имкониятини яратади.

ИЭТнинг асосий мохияти шундан иборатки, биокатализатор молекуласи реаксия кетадиган зонада антиген билан ёки антитела билан богланган шаклда булишидир. Антиген ёки антителанинг фермент молекуласи билан богланган шакли конъюгат деб юритилади. ИЭТни утказиш вактида антиген антитана молекуласи билан боглангандан сунг. ушбу комплексни аниклаш учун, ферментнинг субстрати киритилади ва реаксия натижасида хосил буладиган махсулотлар аникданади.

Шуни айтиб утиш лозимки, ИЭТда ферментатив реаксияни детексия килиш хосил булган махсулотни аникдаш билан чегараланмай, балки реаксияси натижасида рангли узгариш, иссиклик ажралиш ёки ютилиш. флюресенсия, парамагнит хусусиятларни ёки бошка физик-кимёвий параметрларни узгариши натижасида аниклашни амалга ошириш мумкин.

Хрзирги кунда кулланиладиган иммуноензим тахлили методларининг умумий куринишини схематик равишда куйидагича изохлаш мумкин.

И боскич. **Иммун компонент сифатида кулланиладиган моддаларни олиш:**

- Оксилларни макромолекуларни модификасиялаш;
- Конъюгантларни олиш;

- Микроорганизм ва вирусларни антиген сифатида куллаш учун тайёрлаш.

ИИ боскич. Антигенларни ажратиш, тозалаш модификасиялаш.

ИИИ боскич. Антителаларни ажратиш, тозалаш ва модификасиялаш:

- Иммунизасия юли билан аник антигенга антитела олиш.
- Конъюгантларни синтези учун ферментларни ёки уларнингсубстратларини, кофакторларни ёки ушбу ферментни еффекторларини олиш.
- Ташувчиларни танлаш ва уларга антигенларни иммобиллаш.
- Маълум антигенга карши олинган антителаларни ажратиш ва тозалаш.
- фермент конъюгатларини антитела ёки антиген билан " олиш.
- Иммибилланган Антигенларни ёки антителаларни олиш.
- Бав фрагментларни ажратиш ва уларни модификасиялаш ва иммобиллаш.

ИВ боскич. ИЭТ методларини ишлаб чикиш:

- ИЭТни утказиш усулини танлаш ва ишлаб чикиш.
- ИЭТни утказиш ва олинган натижани аникдаш учун керакли асбобни танлаш.
- Аникланадиган мода учун калибровка тайёрлаш ва аниклашни амалга ошириш.

ИЭТни утказишда иммун компонентларнинг тозалик даражаси мухим ахамиятга егадир. Сабаби ИЭТнинг сезгирлик даражаси компонентларга ва айникса унда нишон сифатида кулланилаётган фермент молекуласи фаоллигига боглик булади. Антитела серологик жихатдан фаол ва антигенга нисбатан титри юкори булиши учун, антигеннинг иммуногенлик хусусияти юкори булиши булиши керак. Шунда антиген керакли антителаларнинг узлуксиз синтезини амалга оширишга кодир булади. ИЭТда ишлатилаётган иммун компонентларнинг титри юкори булмаса, ушбу оксиллар модификасиядан сунг денатурасияланиши хисобига инактивланади. Айникса токсинлар холатидаги оксил табиатли баъзи моддалар, вируслар, баъзи микроорганизмларни фаол булмаган штаммларини антиген сифатида олиш конъюгатларни кимёвий синтезида ижобий натижа бермайди. Шу сабабли антиген антителаларни маълум манбадан ажратиш ва уларни тозалаш ва калибровка егри чизикларини тайёрлаш талаб етилади. Антителаларни тозалашда биосферик хроматография Кулланилади. Бунинг учун аввало биоспесифик ва иммуносорбентлар синтезлаш керак. Ушбу иммуносорбентлар ИЭТнинг гетероген вариантларини ишлаб чикишда керак булади.Иммуносорбентлар олиш учун ммобилизасияланган антигенларни синтезлаш зарур. Чунки гетероген ИЭТ каттик ташувчи юзасида олиб борилади.

ИЭТни кайси усули амалга ошмасин унда албатта нишон сифатида фермент молекулари ишлатилади деб юкорида айтиб ўтилган еди. Шу сабабдан аввало антиген ёки антитела конъюгати синтезланади. Бунинг учун антигенга нисбатан аник спесифик булган антитела тикувчи компонент билан

модификасияланади яъни антитела фермент молекуласига кимёвий (ковалент) богланади. Кимёвий синтезланган конъюгатларнинг ферментатив ва серологик фаолликлари аникланади. Конъюгатлар тахлилни утказиш учун ярокли булса, нихоят сунги боскичда ИЭТ утказилади. Олинган маълумотлар керакли асбоблар ёрдамида тахлил килинади. Бу уринда шуни кайд етиш лозимки, иммуноензим тахлилини утказишда бир канча коидаларга риоя килиш талаб етилади.

Иммуноензим тахлилини амалга ошириш қоидалари

Иммуноензим тахлилини ишлаб чиқишда, яратишда бир катор коидаларга риоя килиш керак. Биринчидан аникланаётган моддани, яъни антигенни тахлил килишда юкори даражада мое келадиган, унга ута спесифик булган антитаналарни танлаб олиш талаб етилади. Иккинчидан шундай ферментни нишон сифатида ишлатиш учун танлаб олиш керекки, у антиген ёки антитана билан шунингдек, ташувчи билан кимёвий усулда богланганда хам, уз хусусиятини узгартирмаслиги ва бир вактнинг узида антиген ва антитана уртасида кечадиган иммунологик реаксияга таъсир килмаслиги ва айникса, ферментатив фаоллигини саклаб колиши керак. Учинчидан ИЭТни утказишда кулланиладиган реагентлар ва асбоб ускуналар, шунингдек иммун компонентларни иммобиллаш учун ишлатиладиган ташувчилар хар томонлама кулай ва иктисодий жихатдан талабга жавоб берадиган булиши лозим. Ниҳоят ахамиятли омиллардан яна бири ИЭТда компонентларни баркарорлигини таъминлаш мухимдир. Бунда юкори баркарорликка ега булган компонентларни олиш учун тикувчи агентлар ёрдамида ташувчиларга иммобиллаш жараёнини амалга ошириш ёрдамида еришиш мумкин. Бу уринда шуни айтиб утиш лозимки, иммуноензим тахлилини, асосан иккита катта усулга ажратиш мумкин: Гетероген ва гомоген усулларга. ИЭТнинг гетероген усули каттик ташувчи иштирокида олиб борилади Бунда иммун комплекс ташувчига иммобилланган антитана ёки антиген ва фермент билан нишонланган антитана ёки антиген билан иммун комплекс хосил килади ва иммун реаксия амалга ошгандан сунг, ферментатив фаолликни улчаш оркали антиген микдори калибровка чизиги ёрдамида аникланади.

ИЭТнинг гомоген усулида еса барча жараёнлар суюк мухитда, яъни каттик ташувчи иштирок етмаган шароитда олиб борилади. Иммун комплексни регистрасия килиш жараёни каталитик ёки фермент реаксиялари кетиши билан боглик узгаришлар асосида амалга оширилади. Юкорида кайд етилган иккала усул учун хам умумий талаб шундан иборатки, антиген ёки антитаналарни стандарт еритмалари асосида олдиндан колибровка чизигини яратиш керак булади. Чунки, аникланаётган модда микдорини аниклаш, ИЭТ натижасини тахлил килиш ана шу колибровка асосида курсатиб берилади.

5-Амалий машғулот

Мавзу: Векторларни конструксиялаш.коинтегратив векторлар.

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

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

Бактерия ва тубан еукариот организмлар ҳужайраларида асосий хромосомадан ташқари, кичик ўлчамга ега бўлган халқасимон ёки чизиқсимон структурага ега бўлган қўшимча хромасомалар мавжуддир бу мини-хромосомалар плазмидлар деб аталади. Плазмид ДНКаси кўпи билан 3-10 тагача генларни ўзида сақлайди. Бу генлар, асосан антибиотик ёки заҳарли токсинларни парчаловчи ферментларни синтезига жавобгардир. Шу туфайли плазмидлар бактерия, ачитқи ва замбуруғларнинг антибиотик ва заҳарли токсинларга чидамлилигини таъминлайди.

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

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

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

Трансмиссибл плазмид асосий хромосомага бириккандан кейин ўз мустақиллигини йўқотади. Асосий хромосомадан мустақил равишда ўз-ўзини репликасия қила олмайди. Айни пайтда бундай плазмидларда жойлашаган генлар асосий хромосомада ўз фаолиятини бажаради. Ҳужайра бўлинганда рекомбинасияланувчи плазмид генлари асосий хромосома генлари бириккан ҳолда наслдан-наслга берилади. Иккинчи тоифа плазмидлар автоном ҳолда репликасияланувчи плазмидлар деб аталади. Бундай плазмидлар асосий хромосамага бирика олмайди, асосий хромосомалардан мустақил равишда ўз-ўзини репликасия йўли билан ўнлаб ва ҳатто юзлаб марта кўпайтира олади. Автоном плазмидлар бактерия ёки замбуруғ бўлинганда қиз ҳужайралар орасида тасодифий равишда тақсимланади. Шу билан бирга автоном плазмид бир ҳужайрадан иккинчисига ҳужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидан ўта олади.

Хўжалик аҳамияти қимматли бўлган генларни ажратиш учун ген библиотекаси тузилади. Хромосомал ДНК асосида ген библиотекасини тузиш қуйидагича амалга оширилади:
ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилади ва маълум шароитда реассосиасия қилинади. Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади. Олинган рекомбинант ДНК бактерия ҳужайрасига трансформасия қилинади. Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига еътибор бериш керак. Бу кўрсатгич қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади,

$$Нқ = \frac{лн\ (1-п)}{р} \Big/ лн\ (1-х/й)$$

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва рқ0,99 га тенг бўлса 99% хромосомал ДНК нинг мос қисми клонланади.

Генларни клонлашда кўпинча кДНК библиотекасини тузиш мақсадга мувофиқдир. Бу ҳолда махсус поли (Й) ва олиго (дТ) колонкалари ёрдамида учларида поли (А) нуклеотидлар кетма-кетлигини сақловчи иРНК тРНК ва пРНК дан ажратиб олинади. Олинган иРНК молекуласи олиго (дТ) нуклеотидлари билан аралаштирилиб реассосиасия қилинади. Бунда иРНК молекуласининг поли (А) учида дА-дТ қўш занжирли сегмент ҳосил бўлади. Ушбу икки занжирли сегментнинг олиго (дТ) учи кДНК синтезини амалга оширувчи ревертаза ферменти учун праймер (кДНК синтезининг бошланиш нуқтаси) вазифасини ўтайди.
Синтез қилинган кДНК молекуласи қисқа учли икки занжирли структура билан тугалланади. кДНК синтезида матриса вазифасини ўтаган иРНК молекуласи НаОҲ билан парчаланади натижада қисқа икки занжирли ва тўлиқ иРНК молекуласига комплементар бўлган бир занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади.
Ҳосил бўлган қисқа икки занжирли структура кДНК нинг иккинчи занжирини синтез қилишда праймер вазифасини ўтайди. ДНК-полимераза И ферменти ёрдамида кДНК нинг иккинчи занжири синтез қилинади. Ҳосил бўлган кДНК нинг бир занжирли қисми СИ-нуклеаза ферменти ёрдамида парчаланади ва икки занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади. Шу юсинда ҳосил бўлган кДНК молекуласи вектор молекулаларига уланган ҳолда клонланади.
Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурасия қилинади (100^0С ҳароратда 5 мин., 0,2 Н НаОҲ еритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил

қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроселлюлоза филтрига бириктирилади. Олинган филтр [г$^{-32}$П] АТФ нуклеотиди билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизасия қилинади.
Молекуляр гибридизасия жараёнида филтрга бириккан рекомбинант ДНК молекуласига комплементарлик қонунияти асосида нишонланган иРНК молекулалари бирикади.
Ҳосил бўлган гибрид ДНК молекуласи денатурасия қилиниб нишонланган иРНК молекуласи ажратиб олинади (елюсия ёрдамида). Олинган иРНК молекуласи ҳужайрасиз оқсил синтез қилиш тизимида текшириб курилади. Ҳосил бўлган оқсил молекуласининг идентификасия қилиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади.

6-Амалий машғулот

Мавзу: Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оқсил ва гормонлар (интерферон, инсулин) олиниши.)

Табиатда бирор микроорганизм ҳужайрасига ташқаридан ёт генетик материал кирса, у дарҳол ҳужайра нуклеаза ферментлари орқали парчалаб ташланади.
ДНК молекуласини майда бўлакларга бўлувчи ферментлар кесувчи ендонуклеазалар ёки рестриктазалар деб аталади. Ҳар бир рестриктаза тўрт ёки кўпроқ махсус нуклеотид жуфтларни таниб олиб боғланади ва ДНК молекуласини кесади. Айрим рестриктазалар ДНК қўш занжирини қайчи сингари шартта икки бўлакка бўлади. Бундай рестриктазаларга Алу И, Дра И, Ҳае ИИИ, Ҳпа И, ЭцоР В, Ҳинц ИИ, Пву ИИ, Рса И, Сца И, Сма И ва бошқаларини мисол қилиб келтириш мумкин (5-жадвал).
Шу билан бирга қўш занжир ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар ҳам мавжуд (Аат ИИ, Ацц ИИИ, Апа И, Бам ҲИ, ЭцоРИ, Ҳинд ИИИ ва бошқалар). Бу рестриктазалар функсияси жиҳатдан транспозазага ўхшашлиги кўриниб турибди. Шунинг учун ҳам бу рестриктазалар ҳосил қилган "ёпишқоқ" учлардан фойдаланиб, ҳар хил ДНК бўлакларини бир - бирига боғлаш осонлашади. Ана шу хусусияти туфайли бу хил рестриктазалар ген мухандислигида кенг қўлланилади. Ҳозирги кунгача 500 дан ортиқ хилма хил рестриктазалар тоза ҳолда ажратиб олинган ва ўрганилган.
Одатда микроорганизм ирсий моддасининг хромосомаси бир нечта миллион нуклеотид жуфтлари изчиллигидан иборат. Ўсимлик ёки ҳайвон геноми бир неча юз миллиондан то 1 миллиардгача нуклеотид жуфтлари изчиллигидан тузилган. Бундай буюк молекулани юқорида қайд қилинган хилма - хил рестриксион ендонуклеазалардан фойдаланиб кўплаб бўлакларга бўлиш мумкин. Эндонуклеаза иштирокида парчаланган ДНК бўлаклари електрофорез мосламасида махсус молекуляр "елак"

тешикларидан юқори кучланишли электр майдони таъсирида молекуланинг заряди ва ўлчамига биноан ажратилади. ДНК бўлаги махсус бўёқ билан бўяш натижасида ультрабинафша нурлари ёрдамида оддий кўз билан кўрилади.

1-жадвал.

Ген мухандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

Рестриктазалар	Рестриктаза олинган микроорганизмлар	Рестриктазаларнинг “аниқлайдиган” ва кесадиган охирги учлари
Эцо РИ	Эсчеричиа цоли РИ	-Г-А-А-Т-Т-С- -С-Т-Т-А-А-Г-
Ҳинд ИИИ	Ҳаемопҳилус инфлуензае	-А-А-Г-С-Т-Т- -Т-Т-С-Г-А-А-
Сал И	Стрептомйцес албус	-Г-Т-С-Г-А-С- -С-А-Г-С-Т-Г-
Бам И	Бациллус амйлолиқуефациенс	-Г-Г-А-Т-С-С- -С-С-Т-А-Г-Г-
Ҳпа ИИ	Ҳаемопҳилус параинфлуензае	-С-С-Г-Г- -Г-Г-С-С-
Алу И	Артҳробацтер лутеус	-А-Г-С-Т- -Т-С-Г-Т-
Ҳаем ИИИ	Ҳаемопҳилус аегйптиус	-Г-Г-С-С- -С-С-Г-Г-
Сма	Серратиа марцесценс СД	-С-С-С-Г-Г-Г- -Г-Г-Г-С-С-С-

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

Хулоса қилиб айтганимизда ген мухандислиги биотехнологиясининг моддий асосларига бактерияларнинг клонлаш, трансформасия ва трансдуксия жараёнлари, транспозонлар, плазмидалар ва рестриксион ендонуклеаза ферментларини тўла фундаментал асосларини ўрганиш киради. Юқорида қайд қилинган биологик фаол моддалар ген мухандислиги биотехнологиясининг амалий жараёнларида ўта қимматли омил ҳисобланади.

7-Амалий машғулот

Мавзу: Фитовируслар. Уларнинг биотехнологиядаги аҳамияти.

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

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

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

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

Шуни ҳам ҳисобга олиш керакки, барча алмашинмайдиган аминокислоталар озуқа оқсили таркибида организмнинг талабидан келиб чиққан ҳолда, маълум нисбатда бўлишлари керак. Агарда улардан бирортаси етишмасдан қолса, қолганлари ҳам оқсил синтезида ишлатилмайди, чунки

оқсилнинг синтез механизми шуни талаб қилади. Бундай шароитда оқсил моддаларининг синтезини давом еттириш овқат ёки озуқа харажатларининг ошишига олиб келади. Бундай ҳодисаларнинг олдини олиш учун, бир томондан озиқа таркибидаги оқсил моддаларини, иккинчи томондан еса оқсил таркибидаги алмашинмайдиган аминокислоталар миқдорини назорат қилиб бориш зарур бўлади. Оқсил таркибидаги аминокислоталарни баҳолаш учун уларнинг биологик озуқа бирлигини аниқлаш керак. Алмашинмайдиган аминокислоталарни мўтадил миқдорда сақлайдиган озуқа ёки озиқ-овқат оқсиллари биологик сифатли оқсил деб юритилади.

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

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

1-жадвал.

Ҳар хил оқсиллар таркибидаги алмашинмайдиган аминокислоталар миқдори (100 г оқсилда г ҳисобида)

Амино-кислоталар	**Сигир сути**	**ФАО еталони**	**Соя**	**Шоли**	**Буғдой**	**Макка-жўхори**	**Арпа**	**Нўхат**
Лизин	6,6	4,2	6,6	3,5	2,6	2,5	3,2	6,5
Триптофан	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	0,6	1,2	0,8
Метионин	2,4	2,2	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7	1,4
Треонин	4,6	2,8	3,8	3,5	2,6	3,2	3,9	3,8
Валин	6,9	4,2	5,4	6,5	4,6	4,4	5,4	4,5
Лейсин	9,9	4,8	7,9	8,0	6,9	11,2	7,2	6,5
Изолейсин	6,6	4,2	5,3	4,6	3,4	2,7	3,5	5,0
Фенилаланин	4,9	2,8	5,1	5,2	4,3	4,1	5,1	4,8

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

Бу жадвалдан кўриниб турибдики, бошқа ўсимликларга қараганда соя ўсимлиги оқсили алмашинмайдиган аминокислоталар миқдори бўйича бир қатор устунликларга ега екан. Бу оқсилда фақатгина метионин ва триптофан миқдори бироз пастроқ. Нўхат оқсили ҳам нисбатан яхши биологик баҳога ега, аммо буғдой, маккажўхори, арпа оқсиллари таркиби ФАО талабларидан анчагина узоқда.

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

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

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

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

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

2-жадвал.

Баъзи бир микроорганизмлар оқсилларида алмашинмайдиган аминокислоталар миқдори

(100 г оқсилга ҳисобида)

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

8-Амалий машғулот

Мавзу: Биосенсорлар. Ферментли ва иммуносенсорлар.

Вируслар билан прокариот ҳужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинасия механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўтадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипулясиялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар қўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтказадиган ситема -плазмидалар ҳам бор . Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халқали молекулалар -плазмидлар ва мўтадил вируслар вектор деб аталади (1-жадвал).

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

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

1-жадвал

Векторлар	Нусхалар миқдори	Ўлчами, минг нуклеотидлар

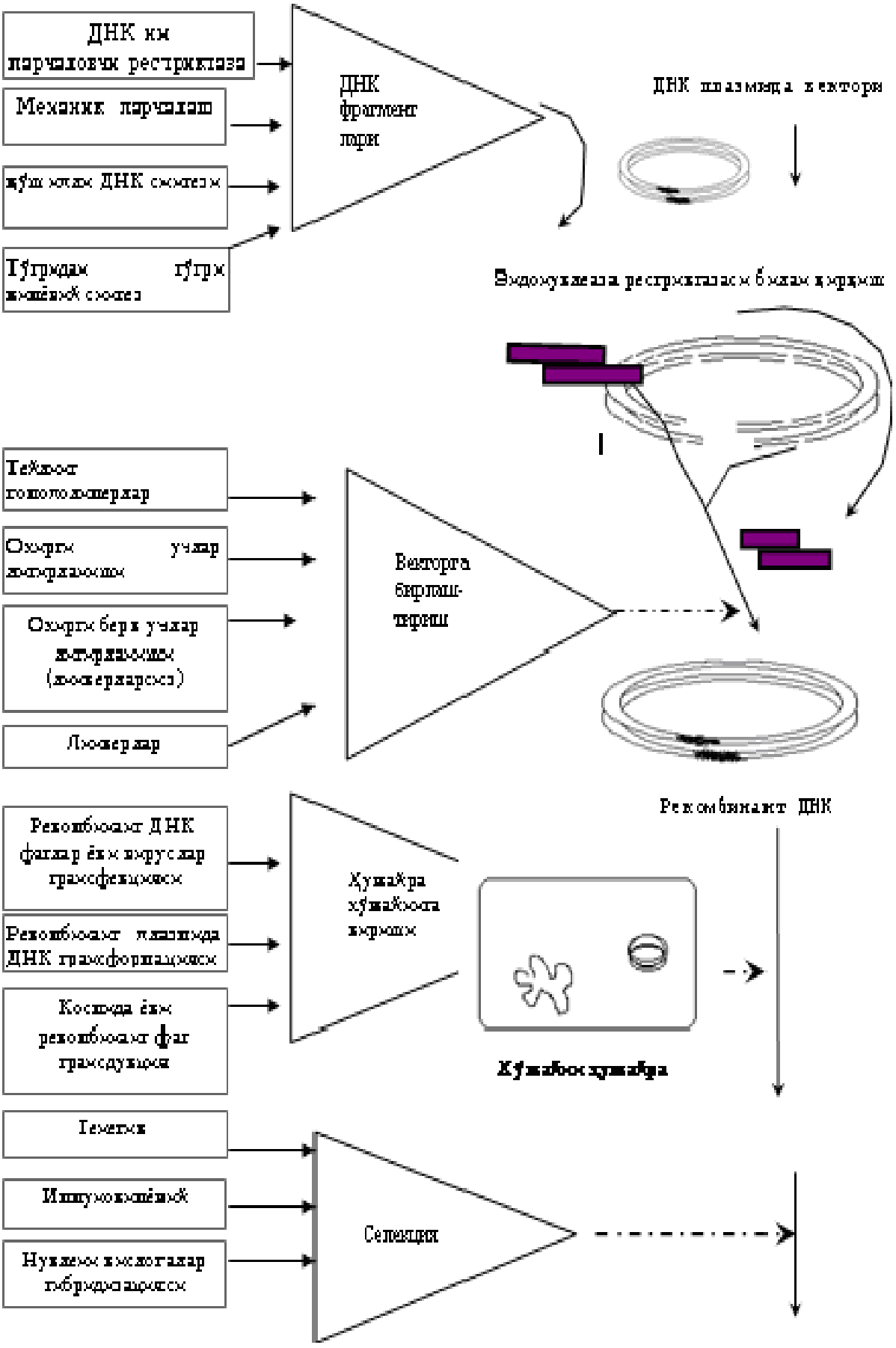
клонлаш учун плазмид векторлари: пБР 322 пАСУ 184	 40-50 ~20	 4,4 4,0
клонлашда махсус катталикдаги векторлар: л Чрон 4А космида пҲС 79	100-200 ~20	41,8 6,4
генлар експрессияси учун плазмид векторлари: п трп ЭД5-1	40-50	6?7

Ген мухандислиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипулясиялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функсионал қисмларга бўлиш, керакли жойидан кесиш, керак емас қисмини олиб ташлаш, керак бўлган қисмларини бошқа генлардан ёки синтез йўли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофиқ организмга киритиб (масалан одамнинг инсулин генини микроб ҳужайрага ёки сичқоннинг ўсиш гармони генини каламушга), зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва хакозо ғоялар ва технологияларнинг йиғиндисидир (1-чизма).

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

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

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



1чизма. Ген мухандислиги манипулясиялари механизми

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

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

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

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

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

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

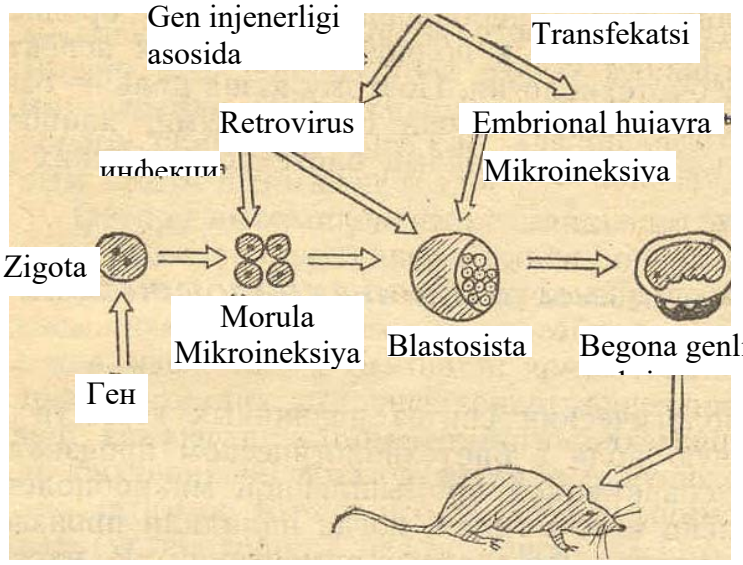
9-Амалий машғулот

Мавзу: Биоёқилғи олиш техналогияси.

Ҳайвонларда ген инженерлигини қўллаш инсон учун керакли (фойдали) генларни геномга жойлашнинг бажарилишига боғлиқ. Мана шундай клонлаштирилган генни ҳужайра ядросига жойлаб қўйишнинг икки усули: пронуклеусга генни пуркаш ва вирус траснфексияси усуллари мавжуд.

Биринчи усул билан керакли ген олдин ДНК молекуласига уланиб сўнгра пронуклеусга жойлаб қўйилади. Шундай ё‘л билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан (НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон ҳужайрасига киритишди. Сичқон ҳужайрасида ушбу фермент бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон ҳужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфексияси (трансфексияси) ҳайвонлар ҳужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар ҳужайра трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам ҳизмат қилади.



1-расм. Генларни ҳайвонларнинг генетик аппаратига кўчириш усуллари

Ҳозирги вақтда ҳар хил ретровируслар (тескари транскрипсия қилувчи РНК сақловчи вируслар оиласи) системаси векторлари яратилган бўлиб, улар қушлар ва сутемизувчилар организмига ташқаридан ген киритиш хусусиятига ега.

Генлар организмга киритишда вируслардан ташқари мобил елементлар ҳам мавжуд бўлиб бу 1983 йилда дрозофила геномидан ажратилган. Энг кўп қўлланиладиган усуллардан бири генларни зиготанинг пронуклеусига инъексия қилишдир. Қишлоқ хўжалик ҳайвонлари зиготасида пронеклеусни ажратиш қийин бўлгани учун инъексияни аниқ қилишни қийинлаштиради.

Шунга қарамай Ҳаммер ва бошқалар 1985 йилда биринчи бўлиб трансген чўчқа олдилар. Лекин тажрибалар маҳсули жуда паст еди. Масалан, битта трансген қўзи олиш учун 1032 зиготага инъексия қилиш, 20 та трансген чўчқа боласини олиш учун еса 20035 зиготга инъексия қилишга тўғри келади.

Зооинженерлар учун генларни ҳайвон ҳужайрасига киритиш ва геномига тартиб билан жойлаштириш усуллари муҳим ҳисобланади. Ҳозирги вақтда шу соҳада бир неча хил методлар ишлатилади. Жумладан вирус билан киритиш, химиявий, физиковий ё‘л билан, ҳужайраларни қўшиш ва янги усул-ретровирусни ишлатиш.

Биринчи усулда ДНК сақлайдиган вируслар генларни кўчириб ўтказишда вектор сифатида фойдаланилади. Лекин кўпчилик ҳозиргача ўрганилган вируслар киритилган ҳужайрани емирилиши ва ё‘қ қилиниши (литик вектор) мумкин. Бундан ташқари улар трасформация қилишда ретровирусларга нисбатан кам самара беради. Шунинг учун ҳам уларни ҳайвонларда кенг миқёсда ишлатиш мумкин емас. Лекин бундай векторлар ваксиналарни ишлаб чиқаришда самара бериши мумкин.

Иккинчи усул генларни тартиб билан жойлаштиришда кенг қўлланилади ва бунда ДНК фосфот калсий билан қўшиб ҳужайрага киритилади. Бу усулнинг ва бошқа химик усулларнинг ижобий томони шундаки улар нисбатан оддий ва алоҳида асбоб-ускуна талаб қилмайди, ҳамда инфексия чақирмайди. Шунинг учун ҳам бу усул мутлоқ ҳавфли емас. Лекин бу усулнинг камчилиги ташқаридан киритилган ДНК нинг жуда кам ўзлаштирилишида.

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

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

Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг кўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар кўпайишда айрим гармонларнинг таъсир кучи аниқланган. Масалан, ФСГ (фолликулаларнинг етилиши назорат қилади) ва ЛГ (лютинлаштирувчи гармон). Ген инженерияси олдида мана шу гармонларни биотехнологик усул билан ишлаб чиқиш ва шу билан уларнинг кўпайишига таъсир қилиш мумкин.

Шу нуқтаи назардан, серпуштлилиги юқори бўлган ҳайвонларнинг селексия қилиш ё‘ли билан уларнинг сонини ошириш мумкин. Масалан. Бурула зотли қўйларда серпуштлик гени ўрганилиб, унинг тухумдонга таъсири аниқланган. Шу зотни бошқа меринос қўйлар билан чатиштириш натижасида ва уларни танлаш, саралаш ишлари олиб борилганда қўйларнинг

серпушлилигини 40-60%га ошириш мумкин. Лекин шу даражага етказиш учун камида 30 йил керак бўлади. Серпуштлик хусусияти генларнинг полиген таъсирига боғлиқ. Мана шу жиҳатлардан фойдаланиб, ген инженерлик усули билан бурула-ген деб аталмиш генни бошқа қўйлар геномига жойлаб қўйиш туфайли уларнинг пуштдорлигини ошириш мумкин.

Тиббиёт соҳасида ембрионларни кўчириб ўтказиш бефарзандлик муаммосини ҳал қилишда муҳим аҳамиятга ега. Аммо бу усулнинг уй ҳайвонларини урчитишда қўлланилиши кўпчиликка коронги бўлса керак. Шунинг учун ембрионларни кўчириб ўтказишинг ўзи нима ва бу усулда қандай муаммолар мавжудлиги шу мақсадда кўрсатиб ўтишни ўз олдимизга мақсад қилиб куйдик.

Эмбрионларни кўчириб ўтказиш - оталанган қиз ҳужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қуйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ё‘ллар билан бажарилмокда. Масалан: куй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида ембрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ё‘ли билан амалга оширилса, қорамолларда ҳамда йилқиларда бу усул махсус асбоблар ёрдамида танага зиён етказмасдан бажарилади. Албатта бу ишларни амалга оширишда мутахассисдан юқори даражада билим ва уқув талаб етилади. Бунда ҳар бир ҳайвон турининг тана тузилиши ва физиологиясининг ўзига хослигини унитмаслик керак. Негаки, ембрионни бир турдаги ҳайвондан олиб иккинчисига қўйиб бўлмайди.

Уй ҳайвонлари ичида ембрионларни кўчириб ўтказиш қорамолларда яхши ўрганилган бўлиб, бунинг учун ембрион олинадиган сигир (донор) танасига махсус гормонлар юборилади, натижада улар тухумдонида кўплаб киз ҳужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ё‘ли билан ана шу киз ҳужайралар оталантирилади ва 6-12 кун ўтгандан кейин ҳали микроскопик ҳажмда (0,5-2 мм) бўлган ембрионлар махсус суюқлик ёрдамида бачадон ювиш ё‘ли билан идишларга тушириб олинади. Суюқлик ичидаги ебрионлар махсус микроблар ёрдамида топилиб сифати аниқланади. Шундан кейин кўчириб ўтказишга ярайдиган ембрионлар бошқа сигирлар (реципиентлар) бачадонига махсус катетерлар ёрдамида жойлаб қўйилади. Кўчириб ўтказилган ембрион "Янги" она қорнида ривожланиб кетиши учун, реципиент сигир куйга келгандан кейинги вақт ембрион ёшига тўғри келиши керак. Сабаби, донор ва реципиент сигирлар бачадонидаги суюқлик таркиби ана шундагина бир-бирига мос бўлади. Одатда ҳар бир донор учун 5 тадан рециепиент тайёрланади.

Мана шу барча техник жараёнлар хатосиз амалга оширилган тақдирда кўчириб ўтказилган ембрион "янги" она қорнида ўсиш ва ривожланишни давом еттириб 285 кундан кейин тўлақонли бузоқ бўлиб туғилади.

Агар биз шу соҳада қилинган ишлар тарихига назар ташлайдиган бўлсак, ембрион шаклини тасвирлаш ХВИИИ асрга бориб тақалади. ХИХ асрнинг охирларида биринчи маротаба Валтер Хип томонидан ембрионни кўчириб ўтказишга уриниб кўрилган. Виксонсия Университетида Виетт томонидан

1950 йили биринчи маротаба ембрионни кўчириб ўтказишдан бузоқ олинган. 1974 йили ембрионни кўчириб ўтказиш бўйича умумжаҳон жамияти (МОПЭ) тузилиб бунга 26 мамлакат кирган. Шу жамият маълумотига қараганда жаҳонда ембрионни кўчириб ўтказиш усули билан 1981 йили 35 минг бузоқ олинган бўлса, 1995 йилга келиб 1 миллиондан зиёдроқ бузоқ олинди. Бу усул айниқса АҚШ, Франсия, Англия, Олмония, Голландия, Исроил каби чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда кенг ёʻлга қўйилган. Хуш, бу соҳага шунчалик қизиқишнинг сабаби нимада? Биринчидан ушбу усул билан ҳайвонлар урчишидаги табиий тўсиқ бузилиб улар кўпайишдаги имкониятлар кенгайтирилади. Маълумки, урғочи уй ҳайвонлари бутун умри давомида 5-10 тадан зиёд насл колдирмайди. Ваҳоланки уларнинг тухумдонида юз минглаб пишиб етилмаган қиз хужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ёʻл билан 50 минг сигирни қочириш мумкин, лекин табиий шароитда улар фақат ўнлаб насл қолдириш имкониятига ега. Ҳайвонлар кўпайишидаги мана шу жуда катта имкониятлар фойдаланилмайди. Бу имкониятлардан тўлақонли фойдаланишда ембрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Айниқса бу усул юқори маҳсулдор ҳайвонлар сонини тез кўпайтиришда катта аҳамиятга ега. Масалан, битта юқори маҳсулдор сигирдан ембрионни кўчириб ўтказиш ёʻли билан йилига 10 ва ундан ортиқ бузоқ олиш мумкин. Бундай бузоқлар ирсий жихатдан бир-бирига яқинлиги билан табиий шароитда олинган бузоқлардан фарқ қилади. Бу еса уларни парваришлашда ва кейинчалик сут маҳсулоти ишлаб чикишда қўл келади. Бу усулнинг яна бир устунлик томони шундаки, қарилиги туфайли табиий шароитда насл қолдириш имкониятига ега бўлмаган юқори маҳсулдор сигирлардан ҳам кўплаб ембрионлар олиб реципиент-сигирларга ўтказиш мумкин. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини танлаш ва саралаш туфайли ҳозирги пайтда янги технологияга ҳамда жўғрофий иқлимга мос янги зотлар яратилган. Бундан 100 йил олдин сигирларнинг ўрта сут маҳсулдорлиги йилига 100-200 литрни ташкил қилган бўлса, ҳозирги пайтда бу кўрсаткич айрим мамлакатларда 5 минг литрдан ошиб кетади. Лекин Ўзбекистон шароитида бу кўрсатгич хали ҳам паст бўлиб ўртача 2300 литрни ташкил етди.

Эмбрионлар кўчириб ўтказишда донор сигирлар сут маҳсулдорлиги поданикидан 3 минг кг юқори бўлганда яхши самара бериб 5 минг кг дан кам бўлмаслиги керак. Сигирларнинг сут маҳсулдорлигини ошириш учун юқорида айтилган усулни қўллаш яхши натижа беради.

Айниқса ҳозирги пайтда муаммо бўлиб турган масала ҳайвонларни ҳар хил касалликларга чидамлилигини ошириш борасида бунда ҳам ембрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Бунинг учун юқори маҳсулдор ҳайвонлардан олинган ембрионлар, шароитга мослашган, касалликка чидамли реципиентларга қўйилади. Ҳозирги пайтда ембрионларни музлатиш ва ҳоҳлаган пайта еритиб реципиент ҳайвонларга қўйиш амалиётида - кенг

қўлланилмоқда. Махсус музлатгичларда музлатилган ембрионлар дунёнинг ҳоҳлаган бурчагига олиб борилиш ва шартнома асосида юқори маҳсулдор подалар яратилиши мумкин. Энг муҳими шу пул билан ембрионларни бир мамлакатдан иккинчисига олиб ўтилганда касаллик тарқалиши ехтимоли ё‘қолади.

Бу усулнинг қимматли томони яна шундаки ё‘қолиб бораётган ҳайвонлар ембрионлари узоқ, муддатга музлатилиб улар генофонди яратилади. Эмбрионларнинг кўчириб ўтказишнинг яна бир муҳим томони шундаки, уларни бўлакларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун ембрионлар 60 та ҳужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлакларга бўлинади ва ҳар қайсиси биттадан реципиентга ўтказилади. Натижада бир хил ирсиятга ега бўлган ҳайвонлар олинади.

Ҳозирги пайтда чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда ҳайвонларнинг кунлик ўсишдаги биологик потенсиали егалланди. Аммо сигирлар орасида йилига 25 минг ва ундан ортиқ сут берадиган ҳайвонлар мавжуд. Ўртача сут маҳсулотини юқори даражага етказиш учун олимлар томонидан ембрионлар пронеуклеусига юқори даражада сут беришни назорат қиладиган генларни ўрнатиш устида иш олиб борилмокда.

Юқорида биз урғочи ҳайвонлар тухумдонида юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчилик лабораторияларида ана шу қиз ҳужайралар олиниб, махсус суюқликларда парвариш қилиниб оталаниш даражасига етказиш на танадан ташқари (ин витро) оталантирилиб реципиентларга қуйиш муаммоси устида ишлаяпти. Бу соҳадаги жиддий муаммолардан бири ембрионларнинг қайси жинсга мансублигини аниқлаш. Ҳозирда мавжуд бўлган усуллардан фойдаланилганда 70 % ембрионларни жинси тўғри аниқланяпти. Ана шу муаммолар босқичма-босқич амалга оширилса ембрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳайвонларни урчитишда асосий усул бўлиб қолади.

Маълумки амалий селексия иккита муҳим ёндошишга боғлиқ, биринчидан ирсий хилма-хиллик ва иккинчидан генотиплар селексиясига. Ҳужайра технологияси ирсий хилма-хилликни яратишда мутлоқ бошқача ё‘л тутади. Бунга ўзини клонлаш натижасида ҳужайрада индуциялашган мутант олиш, ҳужайра селексияси, соматик ҳужайраларни гибридлаш, ситоплазматик генларни кўчириб ўтказиш ва бошқалар киради: сигирлар, айниқса юқори маҳсулдор сигирдан насл олиш паст даражада бўлганлиги учун генетик прогресс чекланган бўлади. Мана шу табиий тўсиқни олиб ташлаш усули ембрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳисобланади. Эмбрионларни кўчириб ўтказиш еса ўз навбатида қуйидаги 4 омилга боғлиқ: 1) кўплаб тухум ҳужайраларни чиқариш ва уларни оталантириш: 2) ембрионни йиғиш: 3) ембрионни кўчириб ўтказиш: 4) ембрионни музлатиш ва сақлаш. Мана шу омиллар ичида биринчиси, яъни кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун, донор сигирлар суперовуляция қилинади. Шуни айтиш керакки, жаҳон миқёсида ҳам ҳозирги пайтга келиб, гармонлар билан ишлов берилган

ҳайвонлар қанча ва қандай сифатда ембрион беришни олдиндан таваккал қила олмайди. Кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун донорларга, гонадотропин гармони юборишдан олдин улар тухумдонидаги сарик таначанинг хажми 1,5 см дан ошган бўлмаслиги яхши натижалар бериши еътироф етилган. Агар тухумдонлардан бирида ҳажми 10 мм ва ундан каттароқ фолликула борлиги аниқланса, унда ҳайвонларни гармонлар билан ишлов бергандан қатъий назар яхши натижалар бермаслиги олимлар томонидан исботланган. Бундан хулоса шуки, урғочи ҳайвонларни гармонлар билан ишлов беришдан олдин, уларни тухумдонларининг физиологик ҳолати яхшилаб текширилиши керак. Тажрибалар шуни кўрсатдики ҳайвонларнинг ҳаммаси ҳам гонадотропин гармонига бир хил реаксия беравермайди.

Гонадотропин гармонларини ҳайвон танасига юбориш улар жинсий даврнинг 10-12 кунларни яхши натижалар беради. Бундан ташқари сифатли ембрионлар олиш йил фаслларига ва озиқа тўйим-лилигига боғлиқлиги тажрибаларда исботланди. Сунъий ё‘л билан овуляция чақириш қўй ва ечкиларда ҳам қорамолларникидек бўлиб, фақат танага гармон юборишни жинсий даврининг 11-13 кунлари ташкил қилинади ва уларнинг куйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчқалар кўп насл берадиган ҳайвонлар гуруҳига кириб, улардан ембрион олиш гармонлар билан ишлов бермасдан ҳам бажариш мумкин. Шунга қарамасдан гармонлар билан ишлов берилганда 33-38 % кўпроқ ембрионлар олиш мумкин. Отларда гармонлар билан ишлов берилиб, ембрионлар олиш тўлиғича ишлаб чиқилмаган. Шундай қилиб, юқоридаги маълумотлардан аён бўладики, ҳайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, ембрионлар олиш кўп таъсирга боғлиқ. Шунинг учун ҳам ҳайвонлардан сунъий ё‘л билан ембрион олишни олдиндан айтиш қийин.

Гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонларни ўз вақтида қочириш сифатли ва керакли миқдорда ембрион олишда муҳим аҳамият касб етади. Гармонлар билан ишлов берилгандан кейин куйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сариқ таначалар сони билан ўлчанади. Овуляция натижасида чиққан тухум ҳужайралар ва улар оталанишдан кейин ривожланаётган ембрионларни, ҳозирги пайтда мавжуд бўлган зондлар билан, 60-70 % ини ювиб олиш мумкин. Шундан 20 % оталанмаган тухум ҳужайраларни ташкил қилади.

Ҳозирги пайтда ембрионларнинг сифатини аниқлаш уч ё‘налишда олиб борилмоқда; 1) ембрионларнинг ташқи кўринишидаги бир-бирига боғлиқлик, уларнинг ёшига мувофиқлиги ва улар кўчириб ўтказилгандан кейин яшаб кетиши; 2) ембрионлари модда алмашинувини ўрганиб, улар ҳаётчанлигини аниқлаш; 3) ембрионлар қобиғи ва бластомерлар ситоплазмасининг ҳар хил бўёқларга нисбатан адсорбсион қобилиятини ўрганиш. Бу усулларни барчаси ҳам камчиликлардан ҳоли емас. Шунга қарамасдан ҳозир амалиётда ембрионлар фақат уларнинг морфологик кўриниши билан баҳоланиб, сифати аниқланмоқда.

Маълумки, ембрионларни кўчириб ўтказишда баҳоси юқори бўлган оталанган тухум ҳужайралардан фойдаланиш яхши самара беради.
Реципиент сигирларга ембрионларни кўчириб ўтказиш жараёни донор-сигирлардан ембрионларни ювиб жойлаштирилган асбоб (катетер) тухумдонида сариқ таначаси бор бачадон шохининг юқори қисмига усталик билан олиб борилиб ташланади.
Отларда ембрионларни кўчириб ўтказиш қорамоллардагидек ва жарроҳлик ёʻли билан амалга оширилиши мумкин. Куй ва чучкаларда бу жараён факат жаррохлик усули билан амалга оширилади. кўчириб ўтказиладиган ембрионлар сони чучкаларда 4 тадан кам бўлмаслиги керак. Бундан кам бўлган ҳолда ембрионлар бачадон деворига ёпишмайди (инплантация) ва уларда кейинги ривожланиш бўлмайди.
Эмбрионларни кўчириб ўтказишда уларни донор-сигирдан ювиб олингандан кейин реципиент-сигирга жойланганига кадар бўлган вактда қандай сақлаш муҳим аҳамиятга ега. Бу давр 37 градусли ҳароратда, кўпчилик олимларнинг фикрича, 2 соатдан ошмаслиги керак. Лекин бу даврни узайтириш учун ембрионларни махсус асбобларда музлатиш ва керак бўлганда еритиб фойдаланиш мумкин.
Эмбрионларни музлатиш махсус автомат асбобларда амалга оширилиб, белгиланган дастурда ишлайди, у 3 қисмидан иборат бўлиб: електрон блоки, музлатиш камераси ва суюқ азот сақланадиган идишдан иборат. Музлатгич вазифасини азот пар бажаради. Ҳозирги пайтда ембрионларни музлатиш ва еритиб реципиент ҳайвонларга кўчириб ўтказиш натижасида кўплаб бузоқ, қўзи ва чўчқа болалари олинмоқда.
Эмбрионлар донор ҳайвонлардан ювиб олингандан кейин, ёки сунъий шароитда тухум ҳужайралар ўстирилиб, ин витро шароитида оталантирилгандан сўнг ҳар хил микроманитуляция ишлари олиб борилиши мумкин, Масалан, ембрионлар ядросини бошқа ядросизлаштирилган тухум ҳужайрага кўчириш кўплаб бир хил насл олишни клонлашни беради. Бу усул айниқса сигирларни хирургиясиз ёʻл билан ювиш ишлатила бошлангандан кейин кенг қулоч ёйди. Агар юқори маҳсулдор донор-сигиридан бешта 32 ҳужайрали ембрион ювиб олинса ва ҳар бир ҳужайра ядроси алоҳида тухум ҳужайрага кўчирилса, бир донордан 160 ембрион олинган бўлади. Бригц ва Кинг (1952) аниқлашича ембрионлар ёш пайтида улар ядроси кўчирилса ҳужайранинг ривожланиши яхши бўлади. Ядроси кўчириб ўтказиладиган ембрион кечки стадияда бўлса, ҳужайра ривожланиши бўлмайди. Чунки ембрионлар бу даврда узларини РНК синтезини амалга ошира бошлайди. Олдинги даврда эса она транскрипсияси амалга оширилади. Шундай қилиб қўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш ембрионлар ядросини қайтадан программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум ҳужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир ембриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

Биоэлектроника принциплари. Биосенсорлар яратиш ва қўллаш. Иммунокомпонентлик асосидаги биосенсорлар

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

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

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

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

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

Бозорда (сабзавот ва мевалар таркибидаги нитрат, нитрит ва хилма хил ядохимикатларни аниқлаш учун) биосенсорларга талаб кундан кунга узлуксиз ортиб бормоқда, бунга қуйидаги кўрсаткичлар гувоҳлик беради: 1986 йилнинг ўзидагина АҚШ да биосенсорлар ишлаб чиқариш умумий миқдори 14,4 млн. долларни ташкил етган бўлса, 1991 йилга келиб еса 365 млн. долларни ташкил етганлиги қайд етилган.

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

Мавзу: Чиқиндисиз технология яратиш.

Аероб ва анаероб микроорганизмлар оқова сувларда учрайдиган органик материаллардан тозалаш хусусиятига эга. Ачитқи, нефтни қайта ишлаш заводи, сут ва пишлоқ ишлаб чиқарувчи корхоналар, картофел ва крахмални қайта ишловчи заводлардан чиқадиган чиқиндиларни анаероб жараён ёрдамида тозалаш бўйича катта муваффақиятларга эришилган. Бу жараёнда фаол биологик компонентлар қайта ишлатилади, қолдиқ маҳсулотлар камаяди, сезиларли даражада нохуш ҳидлар тарқалиши камайтирилади. Энг муҳими метан ҳосил бўлади.

Булардан ташқари кимёвий зарарланиш (биотсидларнинг дечруксияланиши каби)нинг назорат қилиш учун микроб штаммларидан фойдаланилади.

Псеудомонас турига мансуб бактерияларда оксиредуктаза ёки гидроксилазалар бўлиб, улар юқори токсиқ углеводородлар ва ароматик бирикмаларни парчалаш хусусиятига эгадир. Псеудомонас нинг айрим штаммлари таркибида ушбу ферментларни кодловчи генлар плазмида таркибида учрайди. Бундай плазмидаларнинг 4 хили мавжуд: ОСТ (октан ва ва деканни парчаланиши), ХЙЛ (ксилол ва толуолни парчаланиши), САМ (камфорани парчаланиши) ва НАҲ (нафталинни парчаланиши). САМ ва НАҲ плазмидалари бактериал ҳужайраларни чатиштириб ўзининг ўтказувчанлигини таъминлайди, қолган плазмидалар эса бактерияга бошқа плазмидалар киритилгандагина ўтказилиши мумкин.

Кейинчалик бу штаммларнинг гибрид плазмидалари олинган бўлиб, улар тозаланмаган нефтда бошқа штаммларга нисбатан углеводородларни метаболитлаш хусусиятига эгадир. Улар ёрдамида ҳарорат ва бошқа омилларни назорат қилган ҳолда оқар сувларни тозалаш мумкин.

Айрим микроблар молекулаларни шундай ўзгартириш хоссасига эгаки, уларнинг ўзи бошқа микроблар таъсирида парчаланади. Бундай «кометаболизм”ни Дафтон ва Хси (Калифорния университети) кучли токсик паратион инсектитсидини Псеудомонаснинг 2 та штамми таъсирида парчаланишини кўрсатиб беришган.

Токсик молекуланинг кимёвий ўзгаришининг натижаси тўлиқ парчаланиш эмас, балки детоксификатсиядир: фосфорилланиш, метилланиш, атсетилланиш ва б.лардир. Детоксификатсияни катализловчи ферментлар плазмида таркибидаги генлар билан кодланади. Олимлар кучли ва кўп ишлатиладиган гербитсид – 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксисирка кислотаси)ни метаболитловчи микроб културасини олишга эришганлар. Улар тозалаш чансияларидан бир нечта микроорганизмларни ажратиб олиб уларни органик бирикмаларни плазмидаси таркибида парчаловчи ферментларни кодлайдиган гени бўлган бошқа бактериал штаммлар билан аралаштирганлар. Сўнг аралашма фақатгина 2,4,4-Тда хемочатда ўчирилган. 10 ойдан сўнг бактерияларнинг ўсиш суръати 2,4,5-Тнинг бактерияларнинг ўсиши учун ишлатилиши ҳисобига тезлашган.

Ген инженерлиги методлари асосида бундай натижаларга эришиш кўзда тутилмоқда. Бу кўплаб бирикмаларни (кимёвий саноатда ажраладиган ва биопарчаланмайдиган) бузиш хусусияти ва ассимилятсия қилувчи микроб штаммларини кончруксиялаш муаммосини ечишга хизмат қилади.

қишлоқ хўжалиги, ўрмон ва озиқ-овқат саноати чиқиндиларидан турли мақсадларда, хусусан, биомассани ошириш, ҳамда ундан энергия олиш ва шу йўл билан атроф-муҳит ифлосланишини камайтиришда ишлатилади. Уларни микроорганизмлар ёрдамида бижғийдиган бирикмаларгача парчалаш ёки уларни оқсилларга айлантириш мумкин. Оқава сувларда сув ўтларини културасини кўпайтириб, нафақат сувларни тозалаш, балки оқсил ва микроелементларга бой биомасса олиш мумкин.

Кўплаб чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни қайта ишлаш мумкин. Маълумотларга кўра турли бошоқли ўсимликлардан тахминан 1700 млн. т. сомон чиқади ва буларнинг кўп қисми ишлатилмайди. Ёки ананасни консерватсиялашда унинг 20% игина ишлатилади, асосий қисми эса чиқиндига чиқади. Унинг меваси, пўчи ва бошқа чиқиндилари шарбат олиш учун эзилади, қуритилган қолдиқлари эса молларга ем сифатида берилади. Спиртли бижғитиш билан ушбу заводлардан оқизиладиган чиқиндиларни камайтириш мумкин.

Бижғиш давомида турли органик моддаларни алмашиниши билан боғлиқ бўлган биотехнологик жараёнлар атроф-муҳитни ҳам кимёвий ҳам биологик жиҳатдан ифлослантиради. 1970 йилларнинг бошларида ўтказилган тадқиқотларга кўра фарматсевтикада ишлатиладиган ферментатсия – бу ифлосланишнинг асосий манбаидир. Масалан, бу антибиотиклар олинадиган ишлаб чиқаришга хосдир. Ферментатсиянинг чиқиндилари маълум бир метаболитик маҳсулотларнинг микробли ҳужайралари ва озуқа муҳитининг ишлатилмаган компонентлари ҳисобланади.

Таркибида углевод бўлган чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни анъанавий микробли бижғиш ёки биотехнологик жараёнлар йўли билан қайта ишлаш мумкин. Масалан, сахарозани кричаллаш учун бошланғич сироп ҳисобланган ва технологик сиклдан чиқариб ташланадиган меласса – шакар олишдаги йўлдош маҳсулот ҳисобланади. Унинг таркибида шакардан ташқари сулфитлар, карбонатлар ва калсий, магний тузлари мавжуд. Мелассани бижғиш давомида қолган шакарнинг ҳаммаси ҳам ишлатилмайди.

Крахмал донларнинг, картофел ва маниокнинг қуруқ массасини 50%ини ташкил этади. Бу маҳсулот жўҳори ва маниокдан олинади. У кислотали ёки ферментатив гидролизга осон учрайди ва ундан декчрин ва глбкоза олинади. Ушбу гексозалардан спирт ва фруктозали сироп олишда фойдаланилади.

Селлюлоза ва гемитселлюлозани микробли деградатсия ва конверсияга учратиб этил спирти ёки кимёвий саноат учун хомашё олиш мумкин. Слочридиум тҳермоселлум таркибидаги селлюлаза ва гемитселлюлаза генларини лочридиум нинг бошқа турларига ўтказиб селлюлоза ва гемитселлюлозани этил спирти, атсетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб ҳужайралари ёрдамида ўзига яқин бўлган бирикмаларга айланишидир. Сҳу билан бирга микроорганизмлар кимёвий синтезнинг муҳим ва мураккаб жараёнларнинг маълум бир босқичига таъсир қилади.

Биоконверсиянинг қадимги тури – сирка олиш жараёнида этил спиртини сирка кислотага айланишидир.

Биоконверсия бир типдаги реаксия ва маълум бир чруктура (череоспетсификлик) билан боғлиқлиги сабабли ўзига хосдир. Биоконверсияда изопропанол атсетонга, глитсерин дигидроатсетонга, Л-тирозин Л-диоксифенилаланинга, глюкоза глюкон кислотага ва охирида 2-кетоглюкон ёки 5-кетоглюкон кислотага ва сорбит Л-сорбозага айланади. Сорбитнинг сорбозага биоконверсияси кимёвий саноатдаги ягона биологик реаксиядир.

Биоконверсияга асосланган методлар ёрдамида чероид гормонлар синтез қилинган. 1930 йилнинг бошларида Кендалл ва Райхштейн буйрак очи безидан ревматоид артритни даволашда ишлатиладиган кортизон ажратиб олишган. Кортизон синтезининг биринчи оралиқ маҳсулоти прогечорондир. Биоконверсия 370С ҳароратда сувли муҳитда ва атмосфера босимида олиб борилади. Ҳозирги кунга келиб чероид ядросининг углерод атомини маълум бир микроорганизмлар ёрдамида гидроқсиллаш ва керакли чероидни олиш мумкин.

Микроорганизмлар чероидларни олиш учун хомашёни (масалан, черинлар) ишлаб чиқаришда ҳам ишлатилади.

Баъзи ҳолларда биоконверсияни амалга ошириш учун аралаш културалар ёки микроб штаммларини кетма-кет қўшиш керак бўлади. Буларнинг ҳар бири биоконверсиянинг ўзига хос босқичини амалга оширади. Иммобилланган ҳужайралардан фойдаланиш ферментларга нисбатан биоконверсия самарадорлигини оширади ва унинг сарф-ҳаражатини камайтиради.

Микроорганизмларнинг саноатда ишлатиладиган штаммларини қўллаш учун 2 усулдан фойдаланилади: штаммларни скрининги ва ажратиб олишда юзага келадиган қийинчиликларни бартараф этиш учун ДНКнинг махсус учачкаларида мутатсияларни индуксиялаш; ген инженерияси ва табиий жинсий жараённи кенгайтириш учун протоплачларни қўшилиши; табиий генларни ўтказиш ва янги генларни рекончруксия қилиш учун рекомбинант ДНКни қўллаш.

Микроб ҳужайраларида маълум бир ген нусхаси сонини кўпайтириш генларни амплификатсиялаш орқали амалга оширилади ва натижада ушбу геном кодлайдиган маҳсулот ишлаб чиқариш кескин ортади. Бундай техник ёндашув ҳужайрада плазмидалар сонини кўпайтириш билан боғлиқдир. Одатда битта ҳужайрага 1-30 та нусха тўғри келади ва 2-250 ген мавжуд. Сҳу билан бирга ҳужайрада плазмида генлари 3000 нусхагача оширилган. Генларни амплификатсиялаш Э.цолининг учун кенг ишлатилган. Ҳозирга келиб ичалган хромосома гени ёки генлар гуруҳини плазмидага ўтказиш,

сўнгра плазмидани амплификатсиялаш учун ичак таёқчасига ўтказишга эришилган. Ундан ташқари бир ҳужайрадан бошқасига полиетиленгликол иштирокида трансформатсиялаш йўли билан Басиллус плазмидаси ўтказилган. Псеудомонас плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Сҳу йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ

ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ”

фанидан

СЕМИНАР МАШҒУЛОТЛАРИ

Тузувчи: А.Сатторов

Термиз – 2022

231

1- Семинар машғулоти

Мавзу: Замонавий тадқиқот усуллари. Пзр асосида турли генетик касалликларни аниқлаш.

Режа :

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

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

2-Семинар машғулоти

Мавзу: Доривор усимликлардан олинадиган биологик фаол моддалар ва уларни аниқлаш усуллари.

Режа :

1. Иммобилланган ферментларни тиббиётда қўлланиши.
2. Иммобилланган ферментларни технологияда қўлланиши.
3. Иммобилланган ферментларнинг ишлаб чиқаришда қўллашнинг афзаллик томонлари

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

3-Семинар машғулоти

Мавзу: Трансген балиқ яратиш технологияси

Режа :

1.ДНК ларни модификация қиладиган метилазалар.
2.ДНК полимеразалар
3.ДНК полимеразалар ва уларнинг турлари.

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

4-Семинар машғулоти

Мавзу: Озиқ – овқат саноатида ферментлардан фойдаланиш

Режа :

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

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

6. Давронов Қ. Хўжамшукуров Н Умумий ва техник микробиология Тошкент 2006. 243б

5-Семинар машғулоти

Мавзу: Хроматография усуллари ва уларни амалиётда қо`ллаш

Режа :

1. Трансген ҳужайралар.
2. Трансген ҳужайраларни саралаб олиш.
3. Трансген ўсимликларнинг истиқболлари..

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

6-Семинар машғулоти

Мавзу: Фармасевтика саноатида ферментларнинг ишлатилиши ва аҳамияти

Режа :

1. Биотехнологияда одам ҳужайра культураларини қўллаш.

2. Биотехнологияда ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш.

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

7-Семинар машғулоти

Мавзу: Биоуғит олиш технологияси

Режа :

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

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

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

6. Давронов Қ. Хўжамшукуров Н Умумий ва техник микробиология Тошкент 2006. 243б

5.Иловалар

1.1 ФАН ДАСТУРИ

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

Руйхатга олинди
№БД5140100-3.14
"7" 01 2018 йил

Олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги 2018 йил "2" 01 даги "12"-сонли буйруғи билан тасдиқланган

Биотехнология фанининг

ЎҚУВ ДАСТУРИ

Билим соҳаси:	100000	– Гуманитар соҳа
Таълим соҳаси:	140000	– Табиий фанлар
Таълим йўналиши:	5140100	– Биология (Умумий биология)

Тошкент – 2018

Фаннинг ўқув дастури Олий ва ўрта махсус, касб-хунар таълими ўқув-методик бирлашмалари фаолиятини мувофиқлаштирувчи кенгашнинг 2019 йил "7" 01 даги "1"-сон мажлис баёни билан маъқулланган.

Фаннинг ўқув дастури Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий университетида ишлаб чиқилди.

Тузувчилар:

Ташмухамедова Ш.С. - ЎзМУ Биология-тупроқшунослик факультети, Микробиология ва биотехнология кафедраси профессори, биология фанлари доктори

Мирзарахметова Д.Т. - ЎзМУ Биология-тупроқшунослик факультети, Микробиология ва биотехнология кафедраси доценти, техника фанлари номзоди

Тақризчилар:

Каршиев Т. - Тошкент кимё-технология институти, Биотехнология кафедраси доценти, биология фанлари номзоди

Давранов К.С. - ЎзМУ Биология-тупроқшунослик факультети, Ботаника, экология ва ўсимликлар физиологияси кафедраси профессори, биология фанлари доктори

Фаннинг ўқув дастури Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий Университетининг Илмий-методик кенгашида тавсия қилинган (2019 йил "26" 12 даги "6" -сонли баённома).

Кириш

Биотехнология фанини ҳозирги вақтда жадал суръатлар билан ривожланиши бевосита биология фанининг тараққиёти билан узвий боғликдир. Биотехнология фанлар ичида ҳозирги кунда етакчи ўринни эгалламокда. Сабаби, биологиянинг молекулар даражага кўтарилиши, ҳозирги кунда бир қатор масалаларни биотехнология фанисиз ечиш имконини бермайди. Шу сабабдан хам биотехнология турли йуналишлари инсон ҳаёти учун керакли бўлган озик-овкат махсулотларини, шунингдек энергия муаммоси, турли экологик муаммоларни, биологик фаол ва доривор моддалар ишлаб чиқариш муаммоларини ҳал қилиши мумкин. Биотехнология аввало, экологик жихатдан катта истикболга эга, унинг ёрдамида энергия кам даражада сарфланади, чикиндисиз технологиялар яратиш амалга оширилади, шу маънода хам биотехнология турли препаратлар: жумладан инсулин, интерферон, турли гормонлар, биологик фаол моддалар олишда, биотехнологик жараёнларни қўллаш ҳар жихатдан мухим ахамиятга эгадир.

Фаннинг мақсади ва вазифалари

Биотехнологияни ўкитишдан максад талабаларга ҳозирги замон биологияси ва чегарадош фанлар ютукларига асосланган, янги технологик жараёнлар яратиш ва технология назарияси асосларидан билим беришдан иборатдир. Ҳозирги кунда Биотехнология йуналишини жадал суръатда ривожланиши натижасида, замон талабига жавоб бера оладиган мутахассисларни тайёрлаш талаб этилмокда. Шу сабабли бакалавр йуналишидаги талабаларга биотехнология асослари фанидан умумий билим бериш максалга мувофикдир

Фан бўйича билим, кўникма ва малакаларига қўйиладиган талаблар

Биотехнология фанини ўзлаштириш жараёнида бакалавр микроорганизмларни тиббиётда ва халк хўжалигидаги роли, фойдали микроорганизмларни биотехнологик усулда ажратиш ва улардан биологик фаол моддалар олиш, биотехнология ёрдамида ҳозирги замон биологияси муаммоларини ечиш йўллари, ген ва ҳужайра инженерияси имкониятлари ва уларни амалиётда қўллаш, ферментлар ва уларни қўллаш имкониятлари *ҳақида тасаввурга эга бўлиши;*

биотехнология билан экология, тиббиёт ҳамда озик-овкат махсулотлари ва кишлок-хўжалик саноатлари ўртасидаги алокани, биологик махсулотлар олиш максадда, конкрет биотехнологик жараённи ишлаб чикишни, ген ва ҳужайра мухандислиги истикболларини, биотехнологик усулларни қўллашда керакли микроорганизмлар ва ферментлар, мухит ва шарт-шароитларни топа билишни, турли иммобилланган микроорганизмлар ва фермент препаратларини олишни, замонавий тажриба курилмалари ва ўлчов асбобларидан хамда замонавий ахборот технологияларидан фойдаланишни, фан бўйича тавсия этилаётган зарурий адабиётларни танлашни, виртуал электрон билим манбаларидан фойдаланишни, таълим техник воситаларидан

фойдаланишни; танланган мавзунинг долзарблигини ва аҳамиятини асослашни ***билиши ва улардан фойдалана олиши;***

ферментларни каталитик фаоллигини аниқлай билиш; биотехнологиялар ёрдамида янги маҳсулотлар олиш ва мавжуд бўлган технологияларни такомиллаштириш мақсадида гипотеза таклиф этиш, ишнинг мақсади ва муайян вазифаларини шакллантириш, методикаларни танлаш, муаммо ечимининг илмий аргументациясини таклиф қилиш ва ривожлантириш, эксперимент қурилма ва тадқиқот жараёнини баён қилиши, альтернатив ечимларни танқидий англаш, хулосалар ва олинган натижаларни баҳолаш шакллантириш ва аниқ таклифлар бериш ***кўникмаларига эга бўлиши керак.***

Фаннинг ўқув режадаги бошқа фанлар билан ўзаро боғлиқлиги ва услубий жихатдан узвийлиги

Биотехнологияни ўзлаштиришда талабалар биологиядан: микробиология ва вирусология, генетика, молекуляр биология, биохимия, биофизика, физиология, ботаника ва зоология конунлари хақида тушунчага эга бўлишлари керак. Микробиологиядан: саноат микробиологияси жараёнлари, микроорганизмларни ўстириш ва кўпайтириш услублари, микроблар ёрдамида антибиотиклар, органик кислоталар, ноёб ва керакли моддалар биосинтези, микробларни саклаш ва уларнинг фаол хусусиятларини йўқотмаслик; биохимиядан-ферментатив реакциялар механизмлари, уларнинг фаол марказининг тузилиши, ишлаш жараёнлари, модификация усули ёрдамида барқарорлигини ошириш; биофизикадан-мембраналар тузилиши, транспорт жараёнлари механизмлари, биоэнергетиканинг асосий қонунлари; фотосинтез ва нафас жараёнларига оид реакциялар; ҳужайра биологиясидан ҳужайра тузилиши, ҳужайрада асосий процессларнинг кечиши, ҳужайраларнинг кўпайиши; молекулар биологиядан-ДНК ва РНК тузилиши, транскрипция, трансляция қонунлари, рибосомалар тузилиши, генетик код структура элементлари ва х.к. Кимёвий технологиядан: асосий технологик жараёнлар, реакторларнинг тузилиши ва ишлаш принциплари, биореакторларни амалиётда қўллаш усуллари хақида етарли билимга эга бўлишлари шарт.

Фаннинг илм-фан ва ишлаб чиқаришдаги ўрни

Биотехнология нафақат фан сифатида, балки ўрнини, ишлаб чикаришда ҳам алоҳида ўрин эгаллаб келмоқда. Ишлаб чикариш биотехнологияси анъанавий ва замонавий биотехнологияга бўлинади. Анъанавий биотехнология нон маҳсулотлари, шароб, пишлоқ ва бошқа ишлаб чикариш технологияларини ўз ичига олади. Замонавий биотехнология эса, микроорганизмлар ёрдамида турли оксил табиатли ва бошқа моддалар олиш технологиясига, ферментлар ёрдамида биологик фаол моддалар синтез қилишга, биокатализ асосида бижғиш жараёнини назорат қилишга, ген мухандислиги ёрдамида олинган организмларни ишлаб чикаришда қўллашга йўналтирилган.

Фанни ўқитишда фойдаланиладиган замонавий ахборот ва педагогик технологиялар

Талабаларнинг биотехнология фанини ўзлаштиришлари учун ўқитишнинг илғор ва замонавий усулларидан фойдаланиш, янги информацион-педагогик технологияларни тадбик қилиш муҳим аҳамиятга эгадир. Фанни ўзлаштиришда дарслик, ўқув ва услубий қўлланмалар, маъруза матилари, таркатма материаллар, электрон материаллар ҳамда виртуал стендлардан фойдаланилади. Шунингдек, атрофлича билим олишни таъминлаш мақсадида талабаларга мустақил иш мавзулари ҳам берилади. Фанни замонавий педагогик услублар – "Кластер", "Бумеранг", "Дебатлар", "Арра", "Меню", "Ижодий ўйинлар" тарзида ўтиш ҳам кўзда тутилгандир. Биотехнологиянинг долзарб муаммоларига бағишланган йўналишлари бўйича талабаларнинг хоҳишига қараб курс ишлари берилади. Биотехнология асосларини ўқитишда ўқув дастурлари, компьютер, ўқитишнинг техник воситалари, видеофильмлардан фойдаланилади.

АСОСИЙ ҚИСМИ

Маърузалар

Кириш. Биотехнология фанининг предмети, мақсади ва вазифалари; фаннинг тадқиқот усуллари, асосий объектлари биотехнология фанининг бошка фанлар билан ўзаро боғлиқлиги, фаннинг бошқа турли соҳалардаги муаммоларни ечишда тутган ўрни, шунингдек, биотехнология йўналиши бўйича мутахассис тайёрлашдаги ўрни ва унинг асосий йўналишлари ҳақидаги масалалар.

Ферментлар мухандислиги

Ферментларни олиш технологияси. Ўсимлик ва ҳайвон органларидан ферментлар ажратиб олиш усуллари. Биоспецифик хроматография ва бу усулни ўта тоза ферментлар олишда қўллаш. Биоспецифик сорбентларнинг олиниш усуллари. Биоспецифик сорбент турлари. Уларга кимёвий ишлов бериш ва десорбциясига таъсир этувчи омиллар. Биоспецифик сорбентлар асосида яратилган технологик жараёнлар.

Ферментларни иммобиллаш

Иммобилланган ферментлар. Иммобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари. Қўлланиладиган ташувчилар турлари. Юқори молекулали табиий органик ташувчилар. Аноганик моддалар асосида олинган ташувчилар. Синтетик усулда олинган полимерларни ташувчилар сифатида ишлатиш. Уларга функционал фаол гуруҳлар киритиш усуллари. Бифункционал гуруҳлар қўллаш. Иммобиллаш жараёнига таъсир этадиган омиллар. Иммобилланган ферментларни хоссаларини ўзгариши. Иммобиллаш усулларни фермент барқарорлигига таъсир этиши ва ферментлар барқарорлигини ошириш.

Трансген ҳужайраларни саралаб олиш. Одам геноми. Ген хариталари. Ҳайвон организмига янги генлар киритиш. Ирсий касалликларни даволаш.

Ҳужайра мухандислиги

Ҳужайраларни ўстириш ва сақлаш. Ҳужайра культуралари. Ўсимлик бошланғич тўқима ҳужайралари. Ўсимликни ўстириш усулларидаги фарқлар. Юксак ўсимликларни соматик ҳужайраларини гибридлаш. Ўсимлик ҳужайраси мухандислиги ютуқлари. Биотехнологияда одам ва ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш. Ҳайвон ҳужайраси инженерлигида миқдорий усуллар. Вакциналар, ферментлар, гормонлар. Гибридом технологиялар. Моноклонал антитаналар олиниши.

Табиий органик бирикмалар биотрансформацияси

Атроф-муҳитни ифлосланиши ва токсик бирикмаларни биодеградацияси. Биотанол ишлаб чиқариш. Крахмал тутувчи чиқиндиларини қайта ишлаш. Целлюлоза тутувчи чиқиндиларини қайта ишлаш. Силослаш ва компостлаш жараёнлари. Биопроцессларни назорат қилиш йўллари. Узлукли ва узлуксиз жараёнлар. Микроорганизмларни ва ферментларни иммобилланган холатда биотехнологик қайта ишлашда қўллаш. Аэроб ва анаэроб жараёнлар. Ферментация. Реакторлар. Чиқиндилар (саноат, коммунал ва қишлоқ ҳўжалиги чиқиндилари). Биоёқилғилар ишлаб чиқариш. Турли биотехнологик усуллар ёрдамида қимматбаҳо маҳсулотларни олиш. Минералларни қайта ишлаш биотехнологияси. Технологик жараёнларини такомиллаштириш ва уларнинг техник-иқтисодий кўрсатгичларини кўтариш.

Амалий машғулотларни ташкил этиш бўйича тавсия ва кўрсатмалар

Талабалар томонидан амалий машғулотларни бажарилиши мустақил ижодий ишлашни шаклланишига, илмий тадқиқот элементларини англашга, илмий адабиётларни ўқиш ва таҳлил қилишга ёрдам беради. Талаба амалий машғулотларни бажариш жараёнида ундан хам мураккаброқ бўлган вазифани – малакавий битирув ишини бажариш учун, назарияларни англаш, уларни умумлаштириш ва амалиётда қўллаб мустақил илмий-тадқиқот фаолиятни бошлашга тайёргарлик кўради. Амалий машғулотларни қилиш талабада ахборотларни анализ қилиш қобилиятини ривожланишига ва окибат натижада назарий билимларни мустахкамлашга олиб келади. Амалий машғулотлар бажарилиши талабадан фаннинг турли сохалари бўйича амалиётда олган билимларини мустахкамлашни, янада чуқурлаштиришни ва умумлаштиришни талаб қилади. Ҳар бир танланган мавзу илмийликни, замонавийликни талаб қилади, чунки хар бир топширикда янгилик элементлари бўлиши лозим. Амалий машғулотларнинг энг мухим омилларидан бири, унинг индивидуаллиги, талабанинг қизиқиши ва қобилиятига қараб белгиланади.

Ферментлар иштирокидаги технологик жараёнлар

Амалий энзимология ютукларини амалиётда қўллаш. Глюкоза-фруктозали шинни олиш. Аминокислоталар рацемизацияси. D, L-аминокислоталарнинг бир биридан ажратиш. Лактозасиз сут олиш. Сут зардобидан шакарсимон моддалар олиш. Крахмал ва целлюлозани ферментлар ёрдамида парчалаш технологияси. Целлюолитик микроорганизмларнинг целллюлозага таъсир этиш механизмлари. Целлюлоза гидролизига таъсир этувчи омиллар.

Ген мухандислиги

Организм (in vivo) ген инженерлиги. Генлар тузилиши ва экспрессиянинг бошкарилиши. Кодланадиган ва кодланмайдиган нуклеотидларнинг жойланиши. Интронлар. Транспозонлар. Бактериялар ва эукариотлардаги транспозиция механизмлари. Ген инженерлигида қўлланадиган ферментлар. Рестриктазалар. Рестрикция ва модификация тизимлари. ДНК-полимеразалар ва уларнинг турлари. РНК асосида комплементар ДНК полимерларини синтез килиш механизми. Праймерлар. ДНК-лигазалар. ДНКлар рекомбинация жараёни. Векторлар ва уларни ҳужайрага жойлаштириш. Векторларнинг умумий хусусиятлари. Векторларнинг хужайрага интеграцияси. Селектив маркер генлар. Плазмидалар ва вируслар вектор сифатида. Плазмидаларнинг автоном репликацияга учраши. Репликонлар. Плазмидаларнинг бактериал хужайрага интеграцияси. Бегона генлар экспрессияси. Бактерия ҳужайраларида клонланувчи генлар экспрессияси. Микроорганизмлар иштирокида бирламчи ва иккиламчи метаболитлар ишлаб чикариш. Суперпродуцент щтаммлар яратиш. Интерфероннинг ген инженерия усулида олиниши. Соматотропин. Инсулин. Эритропоэтин. Ферментлар.

Ўсимлик ген мухандислиги

Ўсимлик ген мухандислиги. Протопластлар. Каллус тўкима. Ўсимлик гибридларини олиш. Бегона генларни ўсимликларга киритиш йўллари. Бир-уруғ ва икки-уруғ паллалик трансген ўсимликлар олиш. Трансген ҳужайраларни саралаб олиш. Агробактер тумифациенс бактерияси ва унинг хусусиятлари. Ti-плазмида. Опинлар. Ti-плазмидалар тузилиши. Ti- ва Ri-плазмидалар ёрдамида протопластларга бегона ДНК-лар киритиш. Ўсимлик ген мухандислигида қўлланиладиган маркер генлар. Трансген хужайраларнинг саралаб олиш. Трансген ўсимликларни истиқболлари.

Ҳайвон ген мухандислиги

Ҳайвон ген мухандислиги. Ҳайвон ҳужайраларининг ўзига хос маркерлари. Ҳайвон ҳужайралари трансформацияси ва трансфекцияси. Ҳайвонларга бактериал генларни киритиш. Вирусларни вектор сифатида қўлланилиши. Липосомалар асосида ёд генларни ҳужайрага киритиш. Эмбрионал ўзак хужайраларни трансген хайвонлар яратишда қўллаш.

Амалий машғулотларга тавсия этиладиган тахминий мавзулари рўйхати:

1. Ферментлар фаол марказларини тузилиши.
2. Ферментлар барқарорлигини таъминловчи факторлар.
3. Иммобилланган ферментларни тиббиётда ва технологияда қўллаш.
4. Иммунобиотехнология. Иммуноэнзим тахлили.
5. Векторлар ва уларни қўллаш.
6. Ген муҳандислигида ишлатиладиган ферментлар.
7. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оқсил ва гормонларни (интерферон, инсулин ва бошка) олиниши.
8. Ўсимликлар ген мухандислиги. Ті-плазмидаларни ва фитовирусларни ўсимлик ген муҳандислигида ишлатилиши.
9. Ҳайвон ва одам ген мухандислиги.
10. Геном мухандислиги (ҳужайра мухандислиги).
11. Биоэлектроника принциплари. Биосенсорлар яратиш ва қўллаш.
12. Иммунокомпонентлик асосидаги биосенсорлар.
13. Чиқиндисиз технология яратиш.

Изох: Ишчи ўқув дастурни шакллантиришда амалий машғулотлар мавзулари ўқув режадаги соатларга мос холда ва ОТМ имконияти даражасида танлаб бажарилади.

Лаборатория машғулотларни ташкил этиш бўйича тавсия ва кўрсатмалар

Лаборатория ишлари хар бир талаба томонидан айрим-айрим бажарилади. Бунда аввало талаба бажариладиган лаборатория ишининг назарий ва амалий томонини қисқача изохлаб беради. Сўнгра лаборатория ишининг бажарилиши давомида олинган натижаларни хулосалаб ўз дафтарига ёзиб қўяди. Ушбу хулосалар ўқитувчи томонидан оғзаки мулоқот шаклида текширилади.

Лаборатория машғулотларга тавсия этиладиган тахминий мавзулари рўйхати:

1. Чиқиндисиз технология яратиш.
2. Фермент фаоллигини аниқлаш.
3. Ферментни меъёрий кўрсатгичларини аниклаш.
4. Ферментни ковалент иммобиллаш.
5. Ферментни бифункционал агент оркали иммобиллаш.
6. Ферментни физик-кимёвий хусусиятини ўрганиш.
7. Чиқиндилар асосида ташувчи (сорбент) синтезлаш.
8. Бактерия полисахаридларини ажратиб олиш.
9. Биогаз олиш учун органик чиқиндиларга ишлов бериш.
10. Биогаз олиш учун микрорганизмлар ассоциациясини яратиш.

Изох: Ишчи ўқув дастурини шакллантиришда лаборатория машғулотлар мавзулари ўқув режадаги соатларга мос холда ва ОТМ имконияти даражасида танлаб бажарилади.

Мустақил таълимни ташкил этишнинг шакли ва мазмуни

Мустақил ишлаш учун талабаларга биотехнологияга оид маълумотлар мавжуд бўлган турли адабиётлар тавсия этилади. Бундан ташқари зарур холларда лабораториялардаги мавжуд асбоб ва ускуналар ҳам уларни яхши билувчи мутахассис ёки ўқитувчи иштирокида талабалар ихтиёрига берилади. Мустақил ишлаш учун бериладиган мавзулар ва ишлар индивидуал характерда бўлиб, талабаларнинг биотехнологик жараёнларни янада чуқуррок ўрганишга каратилгандир. Тавсиялар индивидуал талабга асосланади ва жорий, оралик назорат шаклида ёки реферат хамда мулокот тарзида топширилади.

Мустақил таълим учун қуйидаги мавзудаги топшириқларни бажариш тавсия этилади:

1. Ҳужайра мухандислигидаги технологик жараёнлар.
2. Гибридомалар технологияси.
3. Моноклонал антителолар олиш.
4. Ген мухандислиги ёрдамида ноёб оксилларни синтезлаш.
5. Ферментлар ёрдамида органик моддалар синтези ва стереоизомерлар олиниши.
6. Иммобилланган ферментлар иштирокида биоёқилғи олиш.
7. Азот-боғловчи ўсимликларни ген мухандислиги ёрдамида яратиш.
8. Вирусларни ген мухандислигида қўлланилиши.
9. Атроф-муҳитни саклашда биотехнологиянинг роли.
10. Ноанъанавий усулда ёқилғи олиш технологияси.
11. Ферментлар ёрдамида аминокислоталар синтези.
12. Иммуноэнзим тахлилининг гетероген усули.
13. Трансген ҳайвонлар олиниши.
14. Микроорганизмлар ёрдамида трансген оксиллар олиш технологиялари.
15. Биотехнология усулларини кимёвий реакцияларда қўллаш.
16. Биоэтанол олиш технологияси.
17. Водород олиш технологияси.
18. Биосенсорлар.
19. Биоэлектроника.
20. Иммуноэнзим тахлилининг гомоген усули.

Изох: Ишчи ўқув дастурини шакллантиришда мустақил таълим мавзулари ўқув режадаги соатларга мос холда танлаб бажарилади.

Дастурнинг информацион-услубий таъминоти

Дарсни ўтишда мавзуларнинг мураккаб ва оддийлигига караб таълимнинг замонавий (хусусан интерфаол) усуллари, педагогик ва ахборот – коммуникация (медиатаълим, амалий дастур пакетлари, презентацион, электрон-дидактик) технологиялар қўлланилади. Таъминот вазифасини замонавий дарсликлар, ўқув қўлланмалари ва бошқа ўқув-услубий адабиётлар, диссертациялар, монографиялар, илмий мақолалар, амалий

кўрсатмалар, электрон адабиётлар, интериет ва бошка маълумотлар бажаради.

Тавсия этилган адабиётлар

Асосий адабиётлар:

1. Комилов Х.М., Рахимов М.М., Одилбекова Д.Ю. Биотехнология асослари. Тошкент: Extremum. 2010.
2. Мирхамидова Р., Вахабов А.Х., Давранов К., Турсунбоева Г.С. Микробиология ва биотехнология асослари. Тошкент: Ilm Ziyo. 2014.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:Мир. 2002.

Кўшимча адабиётлар:

4. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.:Мир. 1987.
5. Овчинников Ю.А. Био-органическая химия. М.: Просвещение. 1987.
6. Альбертс. Молекулярная биология клетки. М.:Мир. 1994.
7. Введение в прикладную энзимологию. Под ред. Березина И.В. Мартинека К.М. М.:МГУ. 1997.
8. Рекомбинатные молекулы: значение для науки и практики (Под ред. Бирса и Бериса Э.). М.: Мир. 1980.
9. Безбородов А.М. Биохимические основы микробиологического синтеза. М.: Наука. 1980.
10. Биотехнология (Под ред. Егорова Н.С., Самуилова Д.В.) В 8 кн. М.: Высшая школа. 1978.
11. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар мухандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш буйича услубий кўлланма. Тошкент: УзМУ. 2007.
12. Мирзарахметова Д.Т. Основы биологической специфичности. Услубий кўлланма. Тошкент: УзМУ. 2006. 112 с.
13. Мирзарахметова Д.Т., Щербак Е.Ю., Садыкова К.А. Методические рекомендации по проведению большого практикума курса «Биотехнология». Тошкент: УзМУ. 2007. 56б.
14. Smyth J.E., Biotechnology. Cambridge:Cambridge University Press, 2009.
15. Kimball Nill. Glossary of Biotechnology terms. New York:CRC Press LLC., 2002.
16. Glick B.R., Pasternak J.J., Patten G.L. Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. Washington:ASM Press. 2010.
17. Nair A.J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. New delhi:Infinity Science Press LLC, 2007.

Интернет ва Ziyonet сайтлари

http://www.natlib.uz/uz/
http://www.lib.mn/
http://www.molbiol.ru
http:// www.zyio.net
http://www.ncbi.nlm.nih.gov

5.2 ИШЧИ ЎҚУВ ДАСТУРИ

O’ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIY VA O’RTA MAXSUS TA’LIM VAZIRLIGI

TERMIZ DAVLAT UNIVERSITETI

RUYXATGA OLINDI

№_BD5140100-3,14
2019 YIL “07” 01

“Tasdiqlayman”

O’quv ishlari prorektori R.To’rayev

_____

2022_YIL «____»_____

Biotexnologiya
fanidan
(Kunduzgi ta’lim shakli 4-kurs talabalari)

Ishchi o’quv dasturi

bilim sohasi: 100000 – gumanitar soha
ta’lim sohasi: 140000 – tabiiy fanlar
ta’lim yo’nalishi: 5140100– biologiya

Soatlar taqsimoti

umumiy o’quv soati	-220 soat
shu jumladan:	
ma’ruza	-44 soat
amaliy	-20 soat
tajriba mashg’uloti	-32 soat
seminar	-16 soat
mustaqil ish soati	-108 soat

Termiz-2022

Ushbu ishchi dastur Oliy va o`rta maxsus ta’lim vazirining 2019 yil 7-yanvardagi 1-son buyrug’i bilan tasdiqlangan namunaviy fan dasturi asosida ishlab chiqilgan.

Tuzuvchi:

Sattorov A.S. TerDU Botanika kafedrasi
katta o’qituvchisi, biologiya fanlari nomzodi

Taqrizchilar:

Begmatov A.M. TerDU Botanika kafedrasi mudiri

Qodirova D.N. TerDU Botanika kafedrasi dotsenti,
biologiya fanlari nomzodi

Fanning ishchi o’quv dasturi Botanika kafedrasining 2022 yil “___”_____ dagi “__”-sonli yig’ilishida muhokamadan o’tgan va fakultet Kengashida muhokama qilish uchun tavsiya etilgan.

Kafedra mudiri: _____ A.Begmatov

Fanning ishchi o’quv dasturi Tabiiy fanlar fakulteti Kengashida muhokama etilgan va tasdiqlashga tavsiya qilingan (2022 yil “___ ”_____dagi “___” - sonli bayonnoma).

Fakultet Kengashi raisi:_____ dots. A. Xurramov

Fanning ishchi o’quv dasturi Termiz Davlat Universiteti o’quv metodik Kengashining 2022 yil “__” _____ “_” -sonli majlisida tasdiqlangan va foydalanishga tavsiya etilgan.

O’MB boshlig’i_____ K.Yangarov

I. Kirish

Biotexnologiya fanini hozirgi vaqtda jadal sur’atlar bilan rivojlanishi bevosita biologiya fanining taraqqiyoti bilan uzviy bog’liqdir. Biotexnologiya fanlar ichida hozirgi kunda yetakchi o’rinni egallamokda. Sababi biologiyaning molekular darajaga ko’tarilishi, hozirgi kunda bir qator masalalarni biotexnologiya fanisiz yechish imkonini bermaydi. Shu sababdan ham biotexnologiya turli yunalishlari inson hayoti uchun kerakli bo’lgan oziq-ovkat mahsulotlarini, shuningdek energiya muammosi, turli ekologik muammolarini, biologik faol va dorivor moddalar ishlab chiqarish muammolarini hal qilishi mumkin. Biotexnologiya avvalo, ekologik jihatdan katta istiqbolga ega, uning yordamida energiya kam darajada sarflanadi, chiqindisiz texnologiyalar yaratish amalga oshiriladi, shu manoda ham biotexnologiya turli preparatlar: jumladan insulin, interferon, turli gormonlar, biologik faol moddalar olishda, biotexnologik jarayonlarni qo’llash har jihatdan katta istiqbolga ega.

II. O’quv fanining maqsad va vazifalari

Biotexnologiyani o’qitishdan maqsad talabalarga hozirgi zamon biologiyasi va chegaradosh fanlar yutuqlariga asoslangan, yan.gi texnologik jarayonlar yaratish va texnologiya nazariyasi asoslaridan bilim berishdan iboratdir. Xozirgi kunda Biotexnologiya yo’nalishini jadal sur’atda rivojlanishi natijasida, zamon talabiga javob bera oladigan mutaxxassislarni tayyorlash talab etilmoqda. Shu sababli bakalavr yo’nalishidagi **talabalarga biotexnologiya asoslari fanidan umumiy bilim berish maqsadga muvofiqdir**

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

“Biotexnologiya” o’quv fanini o’zlashtirish jarayonida bakalavir biotexnologiya bilan ekologiya, tibbiyot hamda oziq-ovqat mahsulotlari va qishloq xo’jalik sano’atlari o’rtasidagi aloqani, biologik mahsulotlar olish maqsadida, konkret biotexnologik jarayonni ishlab chiqishni, gen va hujayra muhandisligi istiqbollarini, biotexnologik usullarni qo’llashda kerakli mikroorganizmlar va fermantlar, muhit va shart- sharoitlarni topa bilishni, turli immobillangan mikroorganizmlar va ferment preparatlarini olishni, zamonaviy tajriba qurilmalari va o’lchov asboblaridan hamda zamonaviy axborot texnologiyalaridan foydalanishni, fan bo’yicha tavsiya etilayotgan zaruriy adabiyotlarni tanlashni, virtual electron bilim manbalaridan foydalanishni, ta’lim texnik vositalaridan foydalanishni, tanlangan mavzuning dolzarbligini va ahamiyatini asoslashni bilishi va amaliy ko’niklmalarga ega bo’lishi kerak.

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

Biotexnologiyani o’zlashtirishda talabalar biologiyadan: mikrobiologiya va virusologiya, genetika, molekulyar biologiya, bioximiya, biofizika, fiziologiya, botanika va zoologiya qonunlari xaqida tushunchaga ega bo’lishlari kerak. Mikrobiologiyadan: sanoat mikrobiologiyasi jarayonlari, mikroorganizmlarni o’stirish va ko’paytirish uslublari, mikroblar yordamida antibiotiklar, organik kislotalar, noyob va kerakli moddalar biosintezi, mikroblarni saqlash va ularning fa’ol xusussiyatlarini yo’qotmaslik; bioximiyadan-fermentativ reaktsiyalar mexanizmlari, ularning fa’ol markazining tuzilishi, ishlash jarayonlari, modifikatsiya usuli yordamida barqarorligini oshirish; biofizikadan-membranalar tuzilishi, transport jarayonlari mexanizmlari, bioenergetikaning asosiy qonunlari; fotosintez va nafas jarayonlariga oid reaktsiyalar; hujayra biologiyasidan hujayra tuzilishi, hujayrada asosiy protsesslarning kechishi, hujayralarning ko’payishi; molekular biologiyadan - DNK va RNK tuzilishi, transkriptsiya, translyatsiya qonunlari, ribosomalar tuzilishi, genetik kod struktura elementlari va x.k. Kimyoviy texnologiyadan: asosiy texnologik jarayonlar, reaktorlarning tuzilishi va ishlash printsiplari, bioreaktorlarni amaliyotda qo’llash usullari xaqida yetarli bilimga ega bo’lishlari shart.

Fanning ilm fan va ishlab chiqarishdagi o'rni

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

Fanni o'qitishda zamonaviy axborot va pedagogik texnologiyalar

Talabalarning biotexnologiya fanini o'zlashtirishlari uchun o'qitishning ilg'or va zamonaviy usullaridan foydalanish, yangi informatsion-pedagogik texnologiyalarni tadbiq qilish muhim ahamiyatga egadir. Fanni o'zlashtirishda darslik, o'quv va uslubiy qo'llanmalar, ma'ruza matnlari, tarqatma materiallar, elektron materiallar hamda virtual stendlardan foydalaniladi. Shuningdek atroflicha bilim olishni ta'minlash maqsadida talabalarga mustaqil ish mavzulari ham beriladi. Fanni zamonaviy pedagogik uslublar – "Klaster", "Bumerang", "Debatlar" tarzida o'tish ham ko'zda tutilgandir. Biotexnologiyaning dolzarb muammolariga bag'ishlangan yo'nalishlari bo'yicha talabalarning xoxishiga qarab kurs ishlari beriladi. Biotexnologiya asoslarini o'qitishda o'quv dasturlari, kompyuter, o'qitishning texnik vositalari, videofilmlardan foydalaniladi.

Asosiy Qism

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

Fanning tadqiqot usullari, asosiy ob'ektlari, biotexnologiya fanining boshqa fanlar bilan bog'liqligi, fanning boshqa turli sohalardagi muammolarni yechishdagi tutgan o'rni, shuningdek, biotexnologiya yo'nalishi bo'yicha mutaxasis tayyorlashdagi o'rni va uning asosiy yo'nalishlari.
Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB, klaster.
Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

2-mavzu: Fermentlar muxandisligi (4 soat)

Fermentlarni olish texnologiyasi. O'simlik va hayvon organlaridan fermentlar ajratib olish usullari. Biospetsifik xromatografiya va bu usulni o'ta toza fermentlar olishda qo'llash. Biospetsifik sorbentlarning olinish usullari. Biospetsifik sorbent turlari. Ularga kimyoviy ishlov berish va desorbtsiyasiga ta'sir etuvchi omillar. Biospetsifik sorbentlar asosida yaratilgan texnologik jarayonlar.
Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB, klaster.
Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

3-mavzu: Fermentlarni immobillash. (6 soat)

Immobillangan fermentlar. Immobillashning fizik va kimyoviy usullari. Qo'llaniladigan tashuvchilar turlari. Yuqori molekulali tabiiy organik tashuvchilar. Anogranik moddalar asosida olingan tashuvchilar. Sintetik usulda olingan polimerlarni tashuvchilar sifatida ishlatish. Ularga funktsional faol guruhlar kiritish usullari. Bifunktsional guruhlar qo'llash. Immobillash jarayoniga ta'sir etadigan omillar. Immobillangan ferment xossalarining o'zgarishi. Immobillash usullarining ferment barqarorligiga ta'sir etishi va fermantlar barqarorligini oshirish.
Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU.
Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

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

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

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

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

5-mavzu: Gen muxandisligi (6-soat)

Organizm (in vivo) gen injenerligi. Genlar tuzilishi va ekspressiyaning boshqarilishi. Kodlanadigan va kodlanmaydigan nukleotidlarning joylanishi. Intronlar. Transpozonlar. Bakteriyalar va eukariotlardagi transpozitsiya mexanizmlari. Gen muxandisligida qo'llaniladigan fermentlar Restriktazalar. Restriktsiya va modifikatsiya tizimlari. DNK-larni modifikatsiya qiladigan metilazalar. DNK-polimerazalar va ularning turlari. RNK asosida komplementar DNK polimerlarini sintez qilish mexanizmi. Praymerlar. DNK-ligazalar. Rekombinat DNK-lar to'g'risida tushuncha. Vektorlar va ularni hujayraga joylashtirish. Vektorlarning umumiy xususiyatlari. Vektorlarni hujayraga integratsiyasi. Selektiv marker genlar Plazmidalar va viruslar vektor sifatida. Plazmidalarning avtonom replikatsiyaga uchrashi. Replikonlar. Plazmidalarning bakterial hujayraga integratsiyasi. Begona genlar ekspressiyasi. Bakteriya hujayralarida klonlanuvchi genlar ekspressiyasi. Mikroorganizmlar ishtirokida birlamchi va ikkilamchi metobolitlar ishlab chiqarish. Superprodutsent shtammalar yaratish.Interferonning gen injeneriya usulida olinishi. Somatotropin. Insulin. Eritropoetin. Fermentlar.

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

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

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

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

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

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

7-mavzu: Hayvon gen muxandisligi (4 soat)

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

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

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

8-mavzu: Hujayra muxandisligi (4 soat)

Hujayralarni o’stirish va saqlash. Hujayra kulturalari. O’simlik boshlang’ich to’qima hujayralari. O’simlikni o’stirish usullaridagi farqlar. Yuksak o’simliklarni somatik hujayralarini gibridlash. O’simlik hujayrasi muhandislik yutuqlari. Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo’llash. Hayvon hujayrasi injenerligida miqdoriy usullar. Vaksinalar, fermentlar, gormonlar. Gibridom texnologiyalar. Monoklonal antitanalar olinishi.

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

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

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

Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi. Bioetanol ishlab chiqarish. Kraxmal tutuvchi chiqindilarni qayta ishlash. Sellyuloza tutuvchi chiqindilarni qayta ishlash. Siloslash va kompostlash jarayonlari. Bioprotseslarni nazorat qilish yo’llari. Uzlukli va uzluksiz jarayonlar. Mikroorganizmlar va fermentlarni immobillagan holatda biotexnologik qayta ishlashda qo’llash. Aerob va anaerob jarayonlar. Fermentatsiya. Reaktorlar. Chiqindilar (sanoat, kommunal va qishloq ho’jaligi chiqindilari). Bioyoqilg’ilar ishlab chiqarish. Turli biotexnologik usullar yordamida qimmatbaho mahsulotlarni olish. Minerallarni qayta ishlash biotexnologiyasi. Texnologik jarayonlarni takomillashtirish va ularning texnik iqtisodiy ko’rsatgichlarini ko’tarish.

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

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

Maruza mavzulari va soatlari

№	Maruza mavzulari	Soat
1	**Kirish. Biotexnologiya fanining predmeti, maqsadi va vazifalari.(4s)** 1.2 Kirish. Biotexnologiya fanining predmeti, maqsadi va vazifalari .(2 s) 1.3 Biotexnologiya fanining tadqiqot usullari, asosiy ob’ektlari, zamonaviy yo’nalishlari. (2s)	4
2	**Fermentlar muxandisligi (4s)** 2.1 Fermentlarni olish texnologiyasi. O’simlik va hayvon organlaridan fermentlar ajratib olish usullari. (2s) 2.2 Fermentlarni tozalash. Biospetsifik xromatografiya va bu usulni o’ta toza fermentlar olishda qo’llash. (2s)	4
3	**Fermentlarni immobillash. Immobillashning fizik va kimyoviy usullari. (6s)** 3.1 Immobillangan fermentlar. Immobillashning fizik va kimyoviy usullari.(2s) 3.2 Qo’llaniladigan tashuvchilar turlari, tabiiy organik, anogranik va sintetik usulda olingan polimerlarni tashuvchilar sifatida ishlatish.(2s) 3.3 Immobillash jarayoniga ta’sir etadigan omillar. Immobillangan ferment xossalarining o’zgarishi va fermantlar barqarorligini oshirish.(2s)	6
4	**Fermentlar ishtirokidagi texnologik jarayonlar (4s)**	4

	4.1 Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Glyukoza-fruktozali shinni olish.(2s) 4.2 Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Laktozasiz sut olish. Sut zardobidan shakarsimon moddalar olish. Kraxmal va sellyulozani fermentlar yordamida parchalash.	
5	**Gen muxandisligi (6 s)** 5.1 Organizm (in vivo) gen injenerligi. Genlar tuzilishi va ekspressiyaning boshqarilishi.(2s) 5.2 Gen muxandisligida qo'llaniladigan fermentlar Restriktazalar. Restriktsiya va modifikatsiya tizimlari.(2s) 5.3 Plazmidalar va viruslar vektor sifatida. Plazmidalarning avtonom replikatsiyaga uchrashi. Superprodutsent shtammalar yaratish. (2s)	**6**
6	**O'simlik gen muxandisligi (6 s)** 6.1 O'simlik gen muxandisligi. Protoplastlar. Kallus to'qima.(2s) 6.2 O'simlik gibridlarini olish. Begona genlarni o'simliklarga kiritish yo'llari.(2s) 6.3 O'simlik gen muxandisligida qo'llaniladigan marker genlar. Transgen hujayralarni saralab olish.(2s)	**6**
7	**Hayvon gen muxandisligi (4 s)** 7.1 Hayvon gen muxandisligi. Hayvon hujayralarining o'ziga xos markerlari va bacterial genlarni kiritish. (2s) 7.2 Transgen hayvonlar yaratish. Transgen hujayralarni saralab olish. Odam genomi. Gen xaritalari.(2s)	**4**
8	**Hujayra muxandisligi (4 s)** 8.1 Hujayralarni o'stirish va saqlash. Hujayra kulturalari. (2s) 8.2 Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo'llash.(2s)	**4**
9	**Tabiiy organik birikmalar biotransformatsiyasi (6 s)** 9.1 Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi. Bioetanol ishlab chiqarish.(2s) 9.2 Mikroorganizmlar va fermentlarni immobillagan holatda biotexnologik qayta ishlashda qo'llash. Aerob va anaerob jarayonlar.(2s) 9.3 . Chiqindilar (sanoat, kommunal va qishloq ho'jaligi chiqindilari va ularni qayta ishlash). Bioyoqilg'ilar ishlab chiqarish.(2s)	**6**
Jami:		**44**

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

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

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

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

T/r	**Amaliy mashg'ulot ishlarining mavzulari**	**Soat**
1	Fermentlar faol markazining tuzilishini o`rganish.	
2	Fermentlar barqarorligini ta`minlovchi omillar	2
3	Immobillangan fermentlarni tibbiyotda va texnologiyada qo`llash imkoniyatlarini o`rganish	2
4	Immunobiotexnologiya. Immunoenzim tahlili. Immunokomponentlik asosidagi biosensorlar.	2
5	Vektorlar va ularni qo`llash	2
6	Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar	2
7	Gen muhandisligi usullari yordamida noyob oqsil va gormonlar (interferon, insulin) olinishi	2
8	O`simliklar gen muhandisligi. Ti-plazmidalarni va fitoviruslarni o`simliklar gen muhandisligida ishlatilishi	2
9	Hayvon va odam gen muxandisligi.	
10	Genom muxandisligi (xujayra muxandisligi)	2
11	Bioelektronika prinsiplari. Biosensorlar yaratish va qo`llash.	
12	Immunokomponentlik asosidagi bisensorlar	2
13	Chiqindisiz texnologiya yaratish.	2
Jami		20

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

Laboratoriya mashg'ulotlarini tashkil etish bo'yicha tavsiya va ko'rsatmalar

Laboratoriya ishlari har bir talaba tomonidan alohida-alohida bajariladi. Bunda avvalo talaba bajariladigan laboratoriya ishining nazariy va amaliy tomonini qisqacha izohlab beradi. So'ngra laboratoriya ishining bajarilishi davomida olingan natijalarni xulosadlab o'z daftariga yozib qo'yadi. Ushbu xulosalar o'qituvchi tomonidan og'zaki muloqat shaklida tekshiriladi.

Laboratoriya mashg'ulotlari mavzulari ro'yxati.

№	Laboratoriya mashg'ulotlari mavzulari	Soati
1	Chiqindisiz texnologiya yaratish.	4
2	Ferment faolligini aniqlash	2
3	Fermentni me'yoriy ko'rsatkichlarin aniqlash.	4
4	Fermentlarni kovalent immobillash.	2
5	Fermentni bifunktsional agent orqali immobillash.	2
6	Fermentlarning fizik-kimyoviy hususiyatlarini o`rganish.	4
7	Chiqindilar asosida sorbent sintezlash	2
8	Bakteriya polisaxaraitlarini ajratib olish	2
9	Biogaz olish uchun organik chiqindilarga ishlov berish.	6
10	Biogaz olish uchun mikroorganizmlar assotsiassiyasini yaratish.	4
Jami		**32**

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

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

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

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

T/r	Seminar mashg'uloti mavzulari	Soat
1	Fermentlarning o'ziga xos xususiyatlari, tabiiy va immobillangan fermentlarning o'xshashligi va farqli tomonlari.	**2**
2	Immobillangan fermentlarni tibbiyotda va texnologiyada qo`llash imkoniyatlarini o`rganish	**2**
3	DNK-larni modifikatsiya qiladigan metilazalar. DNK-polimerazalar va ularning turlari.	**2**
4	Superprodutsent shtammalar yaratish.Interferonning gen injeneriya usulida olinishi. Somatotropin. Insulin. Eritropoetin. Fermentlar.	**2**
5	Transgen hujayralarni saralab olish. Transgen o'simliklarning istiqbollari.	**2**
6	Hayvon organizmiga yangi genlar kiritish. Irsiy kasalliklarni davolash.	**2**
7	Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo'llash.	**2**
8	Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi.	**2**
Jami		**16**

Mustaqil ishni tashkil etishning shakli va mazmuni

Mustaqil ishlash ishlash uchun talabalarga biotexnologiyaga oid ma’lumotlar mavjud bo’lgan turli adabiyotlar tavsiya etiladi. Bundan tashqari zarur hollarda laboratoriyadagi mavjud asbob va uskunalar ham ularni yaxshi biluvchi mutaxassis yoki o’qituvchi ishtirokida talabalar ixtiyoriga beriladi. Mustaqil ishla uchun beriladigan mavzular va ishlar individual harakterda bo’lib talabalarning biotexnologik jarayonlarni yanada chuqurroq o’rganishga qaratilgandir. Tavsiyalar individual talabga asoslanadi va joriy, oraliq nazorat shaklida yoki referat hamda muloqot tarzida topshiriladi.

Mustaqil ish uchun quyidagi topshiriqlarni bajarish tavsiya etiladi:

№	Mustaqil mashg’ulotlari mavzulari	Soati
1	Hujayra muxandisligidagi texnologik jarayonlarini o’rganish.	6
2	Gibridomalar texnologiyasi.	6
3	Monoklonal antitelolar olish	4
4	Gen muhandisligi yordamida noyob oqsillarni sintezlash	6
5	Fermentlar yordamida organik moddalar sintezini va stereoizomerlar olinishni o’rganish.	4
6	Immobillangan fermentlar ishtirokida bioyoqilg’i olish	6
7	Azot-bog’lovchi o’simliklarni gen muhandisligi yordamida yaratish.	6
8	Viruslarni gen muhandisligida qo’llanilishi	4
9	Atorf muhitni saqlashda (muhofaza qilishda) biotexnologiyaning roli	6
10	Noananaviy usulda yoqilg’i olish texnologiyasi.	6
11	Fermentlar yordamida aminokislotalar sintezi	6
12	Immunoenzim tahlilining getrogen usuli	2
13	Transgen hayvonlar yaratish usullarini o’rganish.	6
14	Mikroorganizmlar yordamida transgen oqsillar olish texnologiyalari	6
15	Biotexnologiya usullarini kimyoviy reaktsiyalarda qo’llash	6
16	Bioetanol olish texnologiyasida fermentlarni roli va axamiyati.	6
17	Vodorod olish texnologiyasi	6
18	Biosensorlar.	6
19	Bioelektronika	6
20	Immunoenzem tahlilining gomogen usuli	6
Jami		**108**

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

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

Talabalarning mikrobiologiya fanini o‘zlashtirishlari uchun o‘qitishning ilg‘or va zamonaviy usullaridan foydalanish, yangi informatsion-pedagogik texnologiyalarni tadbiq qilish muhim ahamiyatga egadir. Fanni o‘zlashtirishda darslik, o‘quv va uslubiy qo‘llanmalar, ma’ruza matnlari, tarqatma materiallar, elektron materiallar, virtual stendlar hamda gerbariylardan foydalaniladi. Fanning o‘qitish turlari dasturda ko‘rsatilgan mavzular ma’ruza, amaliy mashg‘ulotlar shaklida olib boriladi. Shuningdek atroflicha bilim olishni ta’minlash maqsadida talabalarga mustaqil ish mavzulari ham beriladi. Fanni zamonaviy pedagogik uslublar – “aqliy xujum”, “fsmu”, “menyu” tarzida o‘tish ham ko‘zda tutilgandir. Ma’lumotlar ko‘rgazmali o‘quv qurollari, kodoskop, multimedia, mikroskop, total va kesmali preparatlar yordamida olib boriladi. Ma’ruza va laboratoriya darslarida mos ravishdagi ilg‘or pedagogik texnologiyalardan foydalaniladi.

2. Ta’lim texnologiyalari va metodlari:

Darsni o‘tishda mavzularning murakkab va oddiyligiga qarab ta’limning zamonaviy xususan interfaol usullari,pedagogik va axborot - kommunikatsiya (mediata’lim, amaliy dastur paketlari, prezintatsion elektron – didaktik) texnologiyalar qo‘llaniladi.

izoh: ta’minot vazifasini darslik, o‘quv qo‘llanmalar va boshqa o‘quv adabiyotlar, monografiyalar, dissertatsiyalar, elektron adabiyotlar hamda internet ma’lumotlari bajaradi.

3. Talabalar bilimini baholash mezonlari

Talabaning labarotoriya mashg‘ulotlaridagi, mustaqil ta’lim topshiriqlarini bajarishi hamda faolligi “5” baholik tizimda baholanib boriladi va nazorat turlarida inobatga olinadi.

Nazorat turi **yozma(og`zaki)** shaklda o`tkazilganda:

- talaba fan (mavzu) bo‘yicha mustaqil qaror qabul qilsa, ijodiy fikrlasa, bilimini amalda qo‘llay olsa va savol mohiyatini bilib, xulosa chiqarganligi uchun “5” (a’lo) baho;
- talaba fan (mavzu) bo‘yicha qisman mustaqil qaror qabul qilsa va ijodiy fikrlasa hamda bilimini amalda qo‘llay olsa, berilgan savolning mohiyati haqida tushunchaga ega bo‘lsa “4” (yaxshi) baho;
- talaba fan (mavzu) bo‘yicha bilimini amalda qisman qo‘llay olsa, savol mohiyatini tasavvur qilsa “3” (qoniqarli) baho;
- talaba fan dasturi talablarini o‘zlashtirmagan bo‘lsa va fan hamda savollar mohiyati haqida tasavvurga ega emas deb topilganda “2” (qoniqarsiz) baholar bilan baholanadilar.

Yakuniy nazorat turi fakultet dekani, o‘quv-uslubiy boshqarma bilan kelishgan holda va o‘quv ishlari bo‘yicha prorektor tomonidan tasdiqlangandan grafik asosida tegishli fan bo‘yicha o‘quv mashg‘ulotini olib borgan o‘qituvchi ishtirokisiz o‘tkaziladi.

Yakuniy nazorat shakli fan xususiyati va o‘quv auditoriya soatidan kelib chiqib, kafedra tomonidan belgilanadi.

Oraliq nazorat

Test shaklida o‘tkazilsa variant 30 ta savoldan iborat bo‘lsa quyidagicha baholanadi:

26-30 “5” (a’lo)

21-25 “4” (yaxshi)

17-20 “3” (qoniqarli)

16 va undan kam bo‘lsa “2” (qoniqarsiz)

“yozma” shaklda o‘tkazilsa savollar tarkibi 3 tadan iborat bo‘ladi va har bir savol “5” baholi tizimda baholanadi, amaliy, seminar va tajriba mashgulotlarining umumiy bahosining o‘rtachasi olinib, on bahosi bilan o‘rtacha bahoni hisobga olishni tavsiya etamiz.

Nazorat ishi.

Har bir semestrda talabaga nazorat ishi bo'yicha bittadan mavzu qo'shimcha beriladi va yakuniy nazorat oldidan fan o'qituvchisiga topshiradi hamda yakuniy nazorat vaqtida qo'shimcha baholanadi.

Yakuniy nazorat

"test" shaklida o'tkazilsa variant 30 ta savoldan iborat bo'lsa quyidagicha baholanadi:

26-30 "5" (a'lo)

21-25 "4" (yaxshi)

17-20 "3" (qoniqarli)

16 va undan kam bo'lsa "2" (qoniqarsiz)

"yozma" shaklda o'tkazilsa savollar tarkibi 5 tadan iborat bo'ladi va har bir savol "5" baholi tizimda baholanib o'rta baho hisobga olinadi.

Tavsiya etilgan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar

1. Komilov X.M., Raximov M.M., Odilbekova D.Yu. Biotexnologiya asoslari. Toshkent. 2010.

2. Mirxamidova R., Vaxabov A.X., Davranov K.. Tursunboeva G .S. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Toshkent: llm ziyo. 2014.

3. Glik B., Pasternak DJ. Molekulyarnaya biotexnologiya: printsipы i primenenie. M.:Mir. 2002.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. 1. Sasson A. Biotexnologiya : sversheniya i nadejdы M.Mir.1987

5. 2.Ovchinnikov Yu.A. Bioorganicheskaya ximiya. M.Prosveщenie.1987

6. 3.Al'berts. Molekulyarnaya biologiya kletki. M.Mir.1994

7. 4.Vvedenie v prikladnuyu enzimologiyu. Pod red. Berezina I.V. Martineka K.M. M: MGU.1997

8. 5. Rekombinatnыe molekulы: znachenie dlya nauki i praktiki. (Pod red. Birsa i Berisa E) M.Mir.1980

9. 6. Bezborodov A.M. Bioximicheskie osnovы mikrobiologicheskogo sinteza. M.Nauka.1980

10. 7.Biotxnologiya. (Pod red. Yegorova N.S., Samuilova D.V.) v 8 kn. M.Vыsщaya shkola. 1978

11. 8.Mirzaraxmetova D.T., Raximov M.M. «Fermentlar muxandisligi» fanidan amaliy mashg'ulotlar o'tkazish bo'yicha uslubiy qo'llanma. Toshkent: UzMU. 2007. 56b.

12. 9.Mirzaraxmetova D.T. Osnovы biologicheskoy spetsifichnosti. Uslubiy qo'llanma. Toshkent: UzMU. 2006. 112s.

13. 10. Mirzaraxmetova D.T., Щerbak Ye.Yu., Sadыkova K.A. Metodicheskie rekomendatsii po provedeniyu bolshogo praktikuma kursa «Biotexnologiya». Toshkent: UzMU. 2007. 56b.

14. 11.Smyth J.E., Biotechnology. Cambridge: Cambridge Univcrsity Press, 2009.

15. 12.Kimball Nill. Glossary of Biotechnology terms. New York: CRC Press LLC., 2002.

16. 13.Glick B.R.. Pasternak J.J.. Patten G.L. Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. Washington. ASM Press. 2010.

17. 14.Arora D.K., Bridje P.D., Bhatnagar D. Fungal. Biotechnology in Agriculturan, Food and Environmental Applications. N.Y.:Marsel Dekker, Ins, 2004.

18. 15.Jordening H.J., Winter J, Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. Weinheim: Wiley- VCH Verlag GMBH&Co.KGaA, 2005.

19. 16.Evans G.M., Furlong J.C. Environmental Biotechnology. Theory and Applications. West Sussex: John Wiley& Sons. LTD, 2003.

20. 17.Nair A.J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. New Delhi: lnflnity Science Press LLC, 2007.

Internet saytlari:

http ://www.natlib.uz/.uz/
http://www.Lib.mn/
http\\www.molbiol .ru
http:/, www.ziyo.net
http: www.ncbi.nlm.nih.gov

ТАКЛИФ ВА МУЛОХАЗАЛАР

ЭСЛАТМА

ТЕСТЛАР

1. Бир ҳужайранинг генетик жиҳатдан бир хил бўлган авлоди нима деб аталади?

А.Клон
Б.Мутантлар
С.Ревертонтлар
Д.Супрессорлар

2. Хромасом мутасияларни кўрсатинг?

А. Барча жавоб тўғри
Б. Хромасомалар сонинг ўзгариши
С. Генларнинг жойлашиш тартиби ва сонинг ўзгариши
Д. Айрим генларнинг ўзгариши

3. Хромасома бўлакларининг тушиб қолиши нима деб аталади

А. Делесиялар
Б. Дупликасиялар
С. Трансподисиялар
Д. Инверсиялар

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

А.Транслокасиялар
Б.Инверсиялар
С.Транпозисиялар
Д.Амплификасиялар

5. Нима миссенс-мутасияга олиб келади?

А.Транспозисия ва транверезиялар
Б.Дупликасиялар
С.Дупликасия ва транспазисия
Д.Трансверсиялар

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

А.Ревертантлар
Б.Супрессорлар
С.Леки-мутант
Д.Клонлар

7. Из қолдириш (отпечаток) методи биотехнологияга ким томонидан киритилган?

А.Д.Ледерберг ва Э.Ледерберг
Б.Н.Н.Дубинин
С.В.В.Суходелес
Д.Д.Ж.Уоцон

8. Ичак таёқчаси хромасомаси қандай намоён бўлади?

А.ДНК молекуласининг ҳалқасимон шакли
Б.Чизиқсимон ДНК молекуласи шаклида
С.РНК молекуласининг ҳалқасимон шаклида

9. “__бу рекликонлар, доимий равишда хромасомадан ташқарида ирсийланади” ушбу иборада нима назарда тўтилган?

А.Плазмида
Б.Векторлар
С.Космида
Д.Бактерия

10. Битта хромасомага нечта йирик плазмида тўғрикелади?

А.1-4
Б.10-200
С.6-12
Д.100-150

11. Ҳужайраларнинг ўзаро мулоқоти, натижасида, донор ҳужайрадан ресипиянт ҳужайра генетик информасиянинг берилиши яъни генетик алмашинув жараёни нима деб аталади?

А.Конюгасия
Б.Танскрипсия
С.Трансляция
Д.Репликасия

12. Бактерия вируслари нима деб аталади?

А.Бактериофаглар
Б.Бошқа синф бактериялари
С.Кўк-яшил сув ўтлари
Д.Плазмидлар

13. Фаг заррачалари нималардан иборат?

А.ДНК, РНК ва оқсилдан
Б.Фақат ДНК
С.Фақат РНК
Д.Фақат оқсилдан

14. Фагларнинг ҳаёт сикли қачондан бошланади?

А.Фаг заррачасининг ҳужайрага тегиши билан
Б.Бактериал ҳужайра лизисидан сўнг
С.Фаг хромасомасининг кўп каррали репликасияси вақтида
Д.Фаг қобиғининг ҳосил бўлиши вақтидан

15. Фаглар томонидан амалга ошириладиган донор ҳужайрадан, ресипиент ҳужайрага генетик информасиянинг берилиши қуйидаги жараёнларнинг қайси бирига тўғри келади?

А.Трансдуксия
Б.Транслясия
С.Терминасия
Д.Трансподисия

16. Трансдуксияни ким биринчи бўлиб тарифлаб берди?

А.Сендер ва ледерберг
Б.Ватанабе
С.Сикитя
Д.Суходолис

17. Трансдуксияловчи заррачаларнинг ҳосил бўлишининг асосий босқичи бўлиб нима ҳисобланади?

А.ДНК нинг бактериофага шайланиши
Б.Оқсил биосинтези жараёни
С.Транскрипсия жараёни
Д.Транслясия жараёни

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

А.Трансформасия
Б.Транспозисия
С.Транслясия
Д.Терминасия

19. Ажратиб олинган фаг ДНК сининг бактерия ҳужайрасига ўтишива у ерда етилган фаг зарраларининг ҳосил бўлишига шароит яратиб берувчи жараёни нима де-йилади?

А.Транфексия
Б.Трансформасия
С.Транспозисия
Д.Транслясия

20. ДНК молекулаларининг қандай формалари мавжуд?

А.Катянанлар
Б.Конкатамерлар

С.Мономерлар
Д.Юқоридагиларнинг барчаси

21. Ген инженерлигида намунавий тадқиқот неча босқичдан иборат?
А.4
Б.5
С.3
Д.2

22. Ген инженерлигида ДНК молекулаларининг муҳим манбаи нима ҳисобланади?
А.Турли хил организмларнинг генетик материаллари бўлаклари
Б.Генларнинг кимёвий синтези
С.Генларнинг химико-орерментатив синтези
Д.Муҳим манбалар йўқ

23. Ҳозиги вақтда рестриктазаларнинг неча хили фарқланади?
А.3
Б.8
С.5
Д.10

24. ДНК даги бир хил кетма-кетликни аниқловчи ферментлар нима деб аталади?
А.Изошизомерлар
Б.Мегазалар
С.Полимеразалар
Д.Гидролазалар

25. Ушбу таъриф қайси жавобга тўғри келади?
“__ўз таркибида бир ёки бир неча растриктазалар таниши мумкин бўлган қисқа синтетик қўшспиралли олигануклеотидлар”.
А.Изошизомерлар
Б.Линкерлар
С.Гилролазалар
Д.Лигазалар

26. Рекомбинант ДНК ни хўжайин ҳужайрасига киришини ва уни репликасиясини таъминловчи қисми нима деб аталади?
А.Вектор
Б.Плазмида
С.Космида
Д.Фазмида

27. Ичак таёқчаси бактериясининг неча хил векторлари мавжуд?
А.4
Б.2
С.3
Д.1

28. Плазмидалар ҳужайрага қандай йўл билан киритилади?
А.Трансформасия
Б.Трансдуксия

С.Инексия
Д.Механиқ йўл билан

29. Трансформасияда ДНК нинг нечта молекуласи иштирок етади?
А.10000-1000тадан 1та
Б.100тадан 2та
С.50тадан 5та
Д.100-1000тадан 3та

30. Ичак таёқчаси бактериясида жойлашган вирус нима деб аталади?
А.Бактериофаг лямбда
Б.Бактериофал алфа
С.Бактериофаг гамлея
Д.Бактериофаг бетта

31. Космидаларни биринчи бўлиб таърифлаган олим?
А.Коллиз ва Кон
Б.Ледерберг
С.Конда и Маккей
Д.Симон

32. Клонотек геномлар яратишга ва еукариот ДНК нинг катта бўлакларини клонлашга мослашган йирик хажмли векторлар нима деб аталади?
А.Космидлар
Б.Фазмидлар
С.Плазмидлар
Д.Бактерифаглар

33. Фазмидлар нима?
А.Фаг ва плазмидлар ўртасидаги гибридлар
Б.Лямда фагининг ёпишқоқ учли ДНК ли, плазниум
С.ДНК нинг катта бўлакларини клонлашга мослашган векторлар
Д.Хромасомадан ташқаридаги генетик елементлар

34. Таркибида плазмидалар ва репликасияси ва селексияси учун зарур бўлган ва фагнинг литик етилишига зарур генларни сақловчи ишлаб чиқарилган лямбда бактериофаглари нима деб аталади?
А.Фазмидлар
Б.Космидалар
С.Плазмидлар
Д.М13 фаги

35. Кўп миқдорда оқсил олиш учун нима қили лозим?
А.МРНК турғунлигини таъминлаш ва оқсил кротеолизини тўхтатиш
Б.МРНК турғунлигини камайтириш
С.МРНК турғунлигини ошириш
Д.Оқсил протеолизини ошириш

36. Сайт-спесиорик мутагенез техникаси қандай имкониятлар беради?
А.Мутасияларни геннинг аниқланган участкасига олиб киради
Б.Мутасияларни геннинг бирон бир участкасига олиб киради
С.Матасиялардан химоялайди

Д.Генга мутасияларнинг киришига йўл қўймайди

37. “Ҳаёт сикли давомида дифференсияровканинг бир неча босқичи маълум бўлган тупроқ грамманфии бактериялар” қуйидаги таъриф қайси жавобга тўғри келади?

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

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

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

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

А.Ачитқилар
Б.Басиллалар
С.Аксиномисетлар
Д.Илдиз бактериялар

40. Бактерия ҳужайрасида бегона оқсиллар експрессиясини оптимизасиялаш муаммосини кўрсатинг.

А.Юқоридагиларнинг ҳаммаси тўғри
Б.Протеолизга қарши кураш
С.МРНК нинг стабиллизасияси
Д.Баъзи оқсил ҳужайралари учун заҳарланишни олдини олиш

41. Биокатолитик тизимлар иммобилизасиясининг асаосий методларини кўрсатинг

1. Адсорбсия ёки химиявий боғланиш
2. Полимер тузилишга қўшилиш
3. Имкапсуласия
4. Полифункционал агентлар ёрдамида кўндаланг тикиш
5. Изоелектрик фокуслаш

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

42. Имобилизасия нима?

А.Ферментлар фаоллигини сақлаш учун унинг ҳаракати ва тузилишини чегаралаш
Б.Ферментлар фаоллигини ўзгариши
С.Ферментлар синтези
Д.Ферментларнинг католитик активлиги ва тузилишининг ўзгариши

43. Иммобилизасиянинг адиорбсион усули нимага асосланади?

А.Табиий ва сунъий ташувчилар юзасига ферментларни бириктириш

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

44. Ферментлар иммобилизасиясида нима рўй беради?
А.Гомоген ҳолатдан гитероген ҳолатга ўтади
Б.Ферментлар гетероген ҳолатдан гомоген ҳолатга ўтади
С.Ферментлар структураси ўзгаради
Д.Ҳамма жавоблар тўғри

45. Ферментлар ва риагентлар бўлинишига нима имкон беради?
А.Барча жавоблар тўғри
Б.Реаксияни керакли вақтда тўхтатиш
С.Реаксиядан сўнг ферментларни қайта тиклаш
Д.Фермент қўшилмаган маҳсулот олиш

46. Ҳужайра ва органлар учун иммобилизасиянинг қайси усулидан фойдаланиш мақсадга мувофиқ?
А.Полимер қўшилишга бриктириш
Б.Кўндаланг тикиш йўли билан
С.Адсорбсия усули ёки киёвий синтез
Д.Инкосуласия усули

47. Инкосуласия усули нимага асосланади?
А.Ярим ўтказгич қобиқ билан қопланганлигига
Б.Биокатолизаторларнинг ўтказмас қобиқ билан қопланганлигига
С.Ҳужайраларнинг оқсил копсуласига қўшилганлигига
Д.Ҳужайра қобиғининг бузилишига

48. Ҳужайралар гел билан қўшилганда уларда қандай ўзгариш содир бўлади?
А.Нормал ўсади ва кўпаяди
Б.Ўсиши сусаяди ёки тўхтайди
С.Ёмон кўпаяди
Д.Махсулот ажратмай уни ичида тўплайди

49. Биокатализаторни полимер тузилишга киритгач нима ҳосил бўлади?
А.Гранулалар, ҳужайралар, толалар
Б.Гранулалар, гел массаси
С.Толалар ва таёқчасимон ҳосилалар
Д.Тасмалар

50. Ферментлар функсиялари.
А.Католитик
Б.Янги брикмалар синтези
С.Химиявий реаксияни узади
Д.Синтетик реаксияларга ҳалақит беради

51. 17 асрда биринчи марта “ҳужайра” сўзидан ким фойдаланган?
А.Роберт Гук
Б.Г. Шванн
С.А. Левингук
Д.Р. Вихров

52. Про-ва еукариот ҳужайраларга хос бўлмаган, нотўғри жавобни кўрсатинг.

А.Рибосомалар прокариотларда бор,еукариотларда йўқ

Б.Либосомалар прокариотларда бор, еукариотларда йўқ

С.Прокариотларда ҳужайра девори бор, еукариотларда еса йўқ

Д.Про-ва еукариотларда ҳам плазматик мембрана бор

53. Ферментатив регулясия бу -

А.Фермент молекулаларига метоболит маҳсулотлари таъсир қила бошлаганда ферментларнинг миқдорига боғлиқ бўлмаган ҳолда улар активлигининг ўзгариши

Б.Фермент миқдорининг камайиши билан унинг фаоллигининг ўзгариши

С.Фермент фаоллигининг ўзгармаслиги

Д.Биохимиявий реаксия тезлигининг катализатор ферментлар таъсири натижасида секин ўзгариши

54. Конститутив ферментларга мисоллар кўрсатинг.

А.Глюкозани пируватга айлантирувчи гликолиз ферментлари

Б.Пируватни глюкозага айлантирувчи ферментлар

С.Пируватни глюкозага ва глюкозани пируватга айлантирувчи ферментлар

Д.Ҳамма жавоблар нотўғри

55. Ферментлар индуксияси бу -

А.Химиявий брикма - индукторнинг пайдо бўлишига жавоб сифатида фермент синтезининг нисбий ўзгариши

Б.Ферментлар синтези тезлигининг ошиши

С.Ферментлар синтези тезлигининг камайиши

Д.Фермент фаоллигининг регулясияси

56. Ферментлар синтезининг сустлашуви ёки тўхтаб қолиши нима деб аталади?

А.Ферментларнинг координирланган репрессияси

Б.Ферментларнинг координинрлайдиган индуксияси

С.Ферментатив регулясия

Д.Ҳамма жавоб нотўғри

57. Репрессия ёрдамида нималар синтези бошқарилади?

А.Ҳамма жавоб нотўғри

Б.Амминокислоталар

С.Витаминлар ва бошқа бирламчи метолитлар

Д.Пурин ва меримидинлар

58. Метоболизм тезлиги қандай аниқланади?

А.Энергия тақчиллиги билан

Б.Муҳитдаги у ёки бу субстратлар консентрасияси билан

С.Ҳужайранинг енергияга бўлган еҳтиёжи билан

Д.Барча жавоблар тўғри

59. АТФ синтезининг ягона йўлини кўрсатинг.

А.Субспрорап фосфорланиш

Б.Фосфорланиш ёки електронлар ташилиши

С.Учкарбон кислота сикли оралиқ махсулотларининг оксидланиши

Д.Барча жавоблар тўғри

60. Ҳужайра ички протеолиз стимулясияси қачон кузатилади?

А.Барча жавоблар тўғри

Б.Аминокислоталар тақчиллигида
С.Азот манбаси тақчиллигида
Д.Энергия ва углнвод тақчиллигида

61. Агар ҳужайрани юқоримолекуляр бирикмалар, масалан: крахмал аммонит ва минерал тузлар бўлган муҳитга жойлаштирсак у:
А.Барча жавоблар тўғри
Б.Аввал крахмални глюкозагача гидролизлайди
С.Глюкозани ҳужайра ичига етказиб беради
Д.Глюкозани икки ва уч-углеводлибирикмаларга ажратади ва бу кичик молекулаларни уч карбон кислота циклига киритади

62. Янги ўсимлик навлари яратиш учун йўналишлар мавжуд?
А.Барча жавоблар тўғри
Б.Гибридизасия асосидаги селексия
С.Табиий ва сунъий реаксиялар
Д.Ген муҳандислиги

63. Туганак бактериялар қайси авлодга мансуб?
А. Рҳизобиум
Б.Агробацтериум
С.Азотобацтер
Д.Клебсиелла

64. Қайси бирикмалар ўсимлик хўжайин ва туганак азотафиксаторлар ўртасида симбиоз мунособатини ўрнатувчи генларга ега?
А.Сйм
Б.Пак
С.Сфх
Д.Осм

65. Нам етишмовчилиги, иссиққа, совуққа ва ер шўрлигига қарши ўсимлик чидамлилигини генлар қандай бирикмаларга оид?
А.Осм
Б.Сйм
С.Пак
Д.Сфх

66. Ўсимликларда CO_2 нинг функсиясини мувофиқлаштирувчи генлар қандай бирикмаларга оид?
А.Сфх
Б.Сйм
С.Пак
Д.Осм

67. Қайси фототроф микроорганизмлар оқсил манбаи бўла олади?
А.Барча жавоблар тўғри
Б.Спирулина
С.Члорелла
Д.Счнедесмус

68. CO_2 ва H_2O ёнишида олинадиган екологик ёқилғи.
А.Этанол

Б.Газохол
С.Гидрогеназа
Д.Биогаз

69. Бензиннинг 10-20% ни нима ташкил қилади?
А.Газохол
Б.Этанол
С.Гидрогеназа
Д.Биогаз

70. Таркибида Фе С - ситрлар бўлган фермент.
А.Гидрогеназа
Б.Этанол
С.Газохол
Д.Биогаз

71. Ёмон сифатлт ўсмалар ва маълум микроорганизм гуруҳларига нисбатан физиологик фаолликка ега бўлган ҳаётий фаолият маҳсулоти.
А.Антибиотиклар
Б.Гармонлар
С.Интерферанлар
Д.Интерлейкинлар

72. Юқумли вирусларнинг таъсирига жавоан инсон ва ҳайвон ҳужайралари нима ажратади?
А.Интерлейкинлар
Б.Антибиотиклар
С.Гармонлар
Д.Интерферонлар

73. Иммун жавобини ташкил қилишда қатнашадиган калта полипептидлар?
А.Интерлейкинлар
Б.Интерфиронлар
С.Антибиотклар
Д.Гармонлар

74. Рекомбинат ваксиналар қандай олинади?
А.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади
Б.Касаллик қўзғатувчи генлар клонлаштирилади
С.В - гибридон ҳужайралари махсулотлари
Д.Тўғри жавоб йўқ

75. Ваксина антигенлар қандай олинади?
А. Касаллик қўзғатувчи генлар клонлаштирилади
Б.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади
С.В - гибридон ҳужайралари махсулотлари
Д.Тўғри жавоб йўқ

76. Маноклонал антителалар нима?
А.В - гибридон ҳужайралари махсулотлари
Б.Касаллик қўзғатувчи генлар клонлаштирилади
С.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади

Д.Тўғри жавоб йўқ

77. Озиқ биомассасида оқсил, нуклиен кислоталар ва липидлар қанча миқдорда бўлиши керак?

А.80%, 2%, 1%
Б.90%, 1%, 0,5%
С.60%, 10%, 5%
Д.10%, 55, 3%

78. Бактериялардан қайси бири С ёрдамида оксидлаб Фе, Су, Зн ва бошқа металларни ишқорлайди?

А.Тҳиобациллус феррооҳйданс
Б.Чромбацтериум виолацеум
С.Зоолгоца рамигера
Д.Хантомонас цампестрис

79. Қайси бир бактерия олтинни еритади?

А.Чромбацтериум виолацеум
Б.Зоолгоца рамигера
С.Хантомонас цампестрис
Д.Тҳиобациллус феррооҳйданс

80. Қайси бир бактерия оқава сувлардан Ҳ, Су, Сд ни ажратиб олади?

А.Зоолгоца рамигера
Б.Хантомонас цампестрис
С.Тҳиобациллус феррооҳйданс
Д.Чромбацтериум виолацеум

81. Қайси бактериянинг ҳужайрадан ташқари полисоҳариди нефтни ажратиб олишда фойдаланилади?

А.Хантомонас цампестрис
Б.Тҳиобациллус феррооҳйданс
С.Чромбацтериум виолацеум
Д.Зоолгоца рамигера

82. Ўстириш учун енг зарур моддаларни кўрсатинг.

А.$НҲ_3$, $Ҳ_2$ С, $СО_2$, $Н_2$, $О_2$
Б.$Ҳ_2$ $СО_2$, Кцл, $Ҳ_2$ $СО_3$, Мг $СО_4$
С.На Сл
Д.Барча жавоб тўғри

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

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

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

А.$СО_2$ ва $Ҳ_2О$
Б.$НҲ_2$ ва $Ҳ_2О$

С.$Х_2С$ ва CO_2

85. Арзон ва мўл хом ашёни кўрсатинг.

А.Ксилоза
Б.Лактоза
С.Меласса

86. Углерод ва енергиянинг кенг тарқалган манбалари бўлиб ҳисобланувчи компонентлар.

А.Нефт
Б. $(НХ_4)_2\ CO_4$
С.Мочевина
Д.$НХ_3$

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

А.CO_2
Б.CO_2
С.$НХ_3$

88. Гемиселлйўлозаларнинг асосий компоненти

А.Саҳароза
Б.Лактоза
С.Ксиллон
Д.Крахмал

89. Қайси ферментлар гурухи атомлар группасини бир бирикмадан иккинчи бирикмага ташишни амалга оширади?

А.Трансфераза
Б.Изомеразалар
С.Гидромазалар
Д.Оксидоредруктазалар

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

А.Гидроназалар
Б.Лиазалар
С.Лигазалар
Д.Тронеферазалар

91. Саноатнинг қайси соҳаларида амилазалардан фойдаланилади?

А.Текстил, нон пишириш, пиво ишлаб чиқариш
Б.Озиқ-овқат, тери, гўшт саноатида
С.Фармасефтикада, фотографияда
Д.Озиқ-овқат, текстил, резина

92. Бактериал протеазалардан фойдаланиш

А.Кир ювиш воситалари,оқсил гидролизатларини олиш (озуқа ишлаб чиқаришда) терини юмшатишда
Б.Глюкозани ажратишда, шарбатларни ёрқинлаштиришда
С.Кўпик миқдорини мувозанатлаштиришда тиш пастасига қўшилади
Д.Болалар озуқасини ишдаб чиқаришда

93. Ферментларни чизиқ бўйлаб жойлашиши қандай имкониятларни беради?

А.Ўзини бошқариш имконини беради
Б.Турли хил тугалланган махсулотларга олиб келади
С.Ингибирлашнинг тескари алоқа бўйича ўзини бошқариш
Д.Ҳамма жавоблар тўғри

94. Кофакторлар функсияси.

А.Ферментлар фаоллигини тўхтатади
Б.Ферментлар синтези учун зарур
С.Католитик актив ишларни амалга ошириш учун зарур
Д.Ҳамма жавоб нотўғри

95. Температура оширилганда ферментатив ревксия тезлиги қандай ўзгаради?

А.Маълум чегарагача тўғри пропорсионал ўзгаради
Б.Ўзгармайди
С.Тўғри пропорсионал
Д.Тескари пропорсионал

96. Адсорбсия йўли билан иммобилизасия методи ёрдамида биообектларни фиксасия қилиши мумкин бўлган органик тошувчиларни кўрсаниг?

А.Мейтран, полиетилен, полистеран
Б.Нуклеин кислоталар, ферментлар
С.Оқсиллар, ёғлар, бензол
Д.Карбонатлар, глисирин, кўмир

97. Этонол олиш учун, ачитқи ва бактериялар ҳужайралари иммобилизасияси учун органик тошувчини кўрсатинг?

А.Ионлари алмашадиган смолалар
Б.Селйўлоза
С.Полинуритон
Д.Хитин

98. Оқова сувларни тозалашда қайси тошувчилардан фойдаланилади?

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

99. Аспаргиназа ферменти қайси тошувчига адсрбсия қилинади?

А.Пахта матога
Б.Полистеролга
С.Полиетиленга
Д.Селйўлозага

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

А.Псалиота цампестрис
Б.Аспергиллус

С.Сопринус
Д.Сферцораеиус