

O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O‘RTA MAXSUS TA‘LIM
VAZIRLIGI

MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI O‘ZBEKISTON MILLIY
UNIVERSITITETI

JAMALOVA DILAFRUZ NE‘MATILLA QIZI

**MIKOPLAZMADAN DNKNI AJRATISH USULLARINI
OPTIMALLASHTIRISH**

5140100 – Biologiya ta‘lim yo‘nalishi

BITIRUV MALAKAVIY ISHI

Ilmiy rahbarlar: Dots. G.B.Umarova
O‘zRFA O‘sMKI kich.i.x. O.B.Alimuhamedova

Toshkent-2015

MUNDARIJA

KIRISH	3
I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI	
1.1. TORCH infeksiyalari	4
1.2. TORCH infeksiyalarining turlari va ularning homiladorlikda taʼsiri	5
1.3. TORCH infeksiyalarni vujudga keltiruvchi mikroorganizmlar. Mikoplazmoz	6
1.4. Mikoplazmalar	7
1.5. Mycoplasma hominis tuzilishi va uni diagnostika qilish usullari	9
II BOB. MATERIAL VA METODLAR	
2.1. Materiallar va jihozlar	18
2.2. Hujayra membranasini lizis qilish	19
2.3. Mycoplasma hominis DNK sini ajratib olish usullari	20
2.4. Fenol- xloroformli metod yordamida DNK ni ajratib olish	20
2.5. STAB- metodi yordamida DNK ni ajratib olish	22
2.6. GuSCN + SiO ₂ li metod yordamida DNK ni ajratib olish	25
2.7. DNK miqdorini spektrofotometriya usulida aniqlash	28
2.8. Biomaterialdan ajratib olingan DNK ni “Polimer zanjir reaksiyasi” hamda gel-elektroforez usuli yordamida sifatli baholash	29
III BOB. OLINGAN NATIJALAR TAHLILI	
3.1. Ajratib olingan DNK miqdorini spektrofotometriya usuli bilan aniqlash	32
3.2. Foydalanilgan usullarning afzallik va kamchiliklarini solishtirish	33
3.3. Ajratib olingan DNK ni PZR hamda elektroforez usuli yordamida sifatli baholash natijalari	34
XULOSA	37

KIRISH

Mavzuning dolzarbligi. Sog'liqni saqlashdagi dolzarb muammolardan biri hozirgi kunda keng tarqalib, reproduktiv salomatlikka noxush ta'sir ko'rsatayotgan, bundan tashqari homilani prenatal holatiga salbiy ta'sir ko'rsatib jinsiy yo'l orqali tarqalayotgan infeksiyalarni aniqlashdir.

Ushbu infeksiyalarning dunyo bo'yicha tarqalish ko'rsatkichi yuqori. Har yili 174 mln odam trixomoniaz, 92 mln odam xlamidioz, 62 mln odam gonoreya, 12 mln odam zahm bilan kasallanadi. Jinsiy yo'l orqali tarqaluvchi infeksiyalar sog'liq uchun og'ir asoratlar qoldirmoqda. Bugungi kunda bunday infeksiyalarni aniqlash, ularga qarshi davo choralarini ko'rish muhim ahamiyatga ega.

Ishning maqsadi. DNK ajratib olishning eng maqbul usulini aniqlash.

Ishning vazifalari. Belgilangan maqsadga erishish uchun quyidagi vazifalar belgilab olindi:

1. *Mycoplasma hominis*dan fenol-xloroformli ekstraksiya, STAB usuli, GuSCN + SiO₂ li usul yordamida DNK ajratish;
2. Ajratib olingan DNK ni spektrofotometriya, PZR, elektroforez usullari orqali miqdoriy va sifatiy baholash;
3. DNK ajratib olish usullarini taqqoslab, eng maqbulini aniqlash.

Malakaviy ishning strukturasi: malakaviy bitiruv ishi 40 ta kompyuter matnidagi betdan iborat, 9 ta rasm, 5 ta jadval va 27 ta o'zbek, rus va ingliz manba keltirilgan.

I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI

1.1. TORCH infeksiyalari. Katta yoshdagi insonlar organizmi uchun katta xavf tug'dirmasa-da, lekin tug'ilajak bola va homilador ona organizmi uchun xavfli bo'lgan bir guruh infeksiyalar mavjud. Shunday infeksiyalar guruhiga TORCH- infeksiyalarni keltirish mumkin. TORCH so'zi bir qator infeksiyalar nomining qisqartirilgan ko'rinishi bo'lib, u o'z ichiga quyidagilarni oladi:

T- toksoplazmoz (toxoplasmosis)

O- boshqa infeksiyalar (others)

R- qizilcha (rubella)

C- sitomegalovirus (cytomegalovirus)

H- herpes (herpes)

“O”, ya'ni boshqa infeksiyalar deganda, homiladorlik davrida homilaga salbiy ta'sir ko'rsatuvchi quyidagi infeksiyalar nazarda tutiladi:

-gepatit B va C

-zahm

-xlamidioz

-mikoplazmoz

-gonokokk

-OITS

-suvchechak

TORCH infeksiyani birlamchi yuqtirish homilador ayolga juda xatarli. Bunday yuqtirish natijasida ayol qon oqimida mikroblarning keskin ko'payishi kuzatilib, ularning organizm bo'ylab sirkulyatsiyasi natijasida homila qoniga o'tish ehtimoli katta bo'ladi. Xatarli tomoni shundaki, bu infeksiyalarning alomatlari ayolning umumiy holatida namoyon bo'lmay, homila rivojlanishiga va homiladorlik kechishiga juda katta zarar keltirishi mumkin. TORCH infeksiyasi

analizlari iloji bo'lsa homiladorlikdan oldin yoki homiladorlikning dastlabki davrida o'tkazilishi maqsadga muvofiq bo'ladi (Молочков, 2006).

1.2.TORCHinfeksiyalarining turlari va ularning homiladorlikda ta'siri.

Toksoplazmoz-yetarlicha keng tarqalgan kasalliklardan biri bo'lib, sayyoramizning 30% aholisi bu kasallik bilan kasallangan. Toksoplazmozning qo'zg'atuvchisi toksoplazmadir. Asosiy xo'jayini mushuk (uning organizmida toksoplazma bo'linadi va ko'payadi). Odam mushukni silaganda, iflos qo'l orqali yuqtirishi mumkin. Agar insonni immuniteti mustahkam bo'lsa, u toksoplazmoz bilan kasallanmasligi, yoki yengil formasini boshidan o'tkazishi mumkin. Kasallikka nisbatan insonda turg'un immunitet hosil bo'ladi va shuning uchun ham bu kasallik bilan hayoti davomida bir marta kasallanishi mumkin.Toksoplazmoz bilan homiladorlik davrida kasallanish xavfli hisoblanadi.

Qizilcha- viruslar orqali yuquvchi o'tkir infeksiyon kasallik bo'lib, havotomchi yo'li orqali yuqadi. Kasallik haroratning ko'tarilishi (38°C gacha) va butun tana bo'ylab tarqalish bilan kechuvchi kasallik bo'lib, u bilan kasallangan insonda bir umrlik immunitet hosil bo'ladi. Inkubatsion davrda, ya'ni odam kasallangani haqida hali bilmagan vaqtda, kasallik xavfi yuqori bo'ladi. Agar qizilcha bilan homilador ayol zararlansa, bu infeksiya bola uchun o'lim xavfini tug'dirishi mumkin. Homilaning birinchi uch oyligida qizilcha virusi homilaning ko'zi, yuragi va nerv to'qimasini zararlaydi. Homilaning dastlabki rivojlanish bosqichlarida qizilcha homilaning tushishiga olib keladi (Carles, 2006).

Sitomegalovirus infeksiyasi o'tgan asrning dastlabki davrlaridayoq aniqlangan virusli kasallikdir. Sitomegalovirus jinsiy yo'l orqali hamda ko'krak suti va qon orqali yuqadi. Agar insonning immuniteti kuchli bo'lsa, kasallik yuqmaydi, agar immuniteti past yoki umuman bo'lmasa, sitomegalovirus butun tanadagi organ va to'qimalarni zararlaydigan holatda faollashadi. Ko'pchilik bemorlar bu infeksiya bilan zararlanganini sezishmaydi ham. Bu kasallik bilan bir kasallangan odam qayta kasallanmaydi. Sitomegalovirus infeksiyasi tug'ma

xarakterga ega boʻlib, bola tugʻilgan zahotiy oq namoyon boʻladi: bolada rivojlanishdagi poroklar, bosh miyasining chala rivojlanganligi yoki bosh miyasining suv bilan qoplanishi, jigar va taloqning kattalashganligi, gepatit, pnevmoniya, tugʻma anomaliyalar koʻzga tashlanadi. Bola aniq ifodalangan aqliy va ruhiy rivojlanmaslik, tutqanoq, karlik, mushaklar rivojlanmasligi va orqa miya falajidan aziyat chekadi. Shunday holatlar boʻladiki, sitomegalovirus alomatlari 2-5 yildan soʻng namoyon boʻladi (karlik, koʻrlik, aqliy zaiflik). Shuning uchun ham bu infeksiyaning homiladorlikning dastlabki davrlarida yuqishi, homilaning tushishi bilan kechadi (Bruylant, 2006).

Gerpes- virusli kasallik boʻlib, uning ikki tipi mavjud. I- tip gerpes oddiy shamollash, labdagi yaralar bilan xarakterlansa, II- tip gerpes- urogenital gerpes hisoblanib, jinsiy aʼzolari zararlaydi. Gerpes havo-tomchi va jinsiy yoʻl bilan yuqadi, bundan tashqari vertikal yoʻl, yaʼni onadan bolaga yoʻldosh orqali yuqadi. Gerpesning I va II tiplarining surunkali koʻrinishida teri, shilliq qavatlar, MNS, koʻz va ichki aʼzolar zararlanadi. Gerpes homiladorlikda homila varaqalari va organlar sistemasi shakllanayotgan paytda juda xavfli hisoblanadi. Bu davrda homila tushishi ehtimolligi bir necha barobar ortadi. Tushmagan taqdirda ham bolada aqliy qoloqlik vujudga keladi (Furr, 1987).

1.3. Torch infeksiyalarni vujudga keltiruvchi mikroorganizmlar.

Soʻnggi yillarda aniqlanishida qiyinchiliklarga sabab boʻlayotgan, har xil antibiotiklarga turgʻunlik kasb etayotgan xlamidiyali, virusli, mikoplazmali va aralash infeksiyalar juda keng tarqalmoqda. Reproduktiv salomatlik bilan bogʻliq boʻlgan urogenital mikoplazmalarni aniqlash mikoplazmologiyadagi dolzarb muammolardan biridir. *Mycoplasma hominis* 30-44 % prostatit bilan ogʻrigan bemor siydigi va prostata bezi sekretidan ajratib olingan. Maʼlumotlarga koʻra, 1 ml sekretida 10000-100000 tagacha *Mycoplasma hominis* boʻlishi prostatit rivojlanishiga sabab boʻlar ekan (Исаков, 2006). Mikoplazmalarni yuqtirgan erkaklar bepushtligiga faqat yalligʻlanish jarayonlari emas, balki spermatogenez

jarayonining buzilishi ham sabab bo‘ladi. Mikoureaplazmali infeksiya spermatozoid iplarining buzilishiga, “paxmoq dumchalar” deb ataluvchi spirallashuvga hamda yetilmagan spermatozoidlar hosil bo‘lishiga sabab bo‘ladi. Infeksiya spermatozoidning mana shu spirallashgan ipchalariga yopishib oladi. Bundan tashqari, *Mycoplasma hominis* spermatozoidning tuxum hujayraga kirish jarayonini qiyinlashtiradi (Crawshaw, 1990). Homilaning tushishiga *Mycoplasma hominis* sintezlagan, bachadon muskullarining qisqarishini kuchaytiruvchi moddalar ham sabab bo‘ladi. Mikoplazmalar qo‘zg‘atadigan kasalliklardan biri bu mikoplazmozdir. Mikoplazmoz- erkak va ayollarning siydik-tanosil a‘zolarining yallig‘lanish kasalligidir. Siydik ajratish a‘zolarining surunkali kasalliklari bilan og‘rigan bemorlarning 50-60 % ida mikoplazmoz kuzatiladi. Infeksiyani yuqtirgan 5-15 % odamlarda kasallik alomatlari kuzatilmaydi. Ular sog‘lom ko‘rinsa-da, organizmida mikoplazmozning yashirin (inkubatsion) davri kechayotgan bo‘ladi. Mikoplazmozning simptomlarsiz formasi immunitet pasaygandagina aktiv holatga o‘tishi mumkin. Mikoplazmoz bilan kasallanish ko‘p hollarda jinsiy, ba‘zan maishiy yo‘l bilan ro‘y berishi mumkin. Kasallikning yashirin davri 3 haftadan 5 haftagacha, o‘rtacha 15-19 kunni tashkil etadi. Bu kasallikda erkaklarda uretra, urug‘ pufaklari, prostata bezlari, siydik pufagi zararlanadi. Ayollarda esa uretra, qin, kichik va katta vestibulyar bezlar, tuxum yo‘llari, bachadon tanasi, bachadon yo‘llari, tuxumdon, kichik chanoq bo‘shlig‘i zararlanadi (Garcia, 2007).

1.4.Mikoplazmalar. Mikoplazmalar sayyoramizdagi erkin yashovchi va erkin replikatsiyalovchi organizmlar orasida o‘lcham jihatdan eng kichigi bo‘lib, bakteriya va viruslar orasida oraliq o‘rinni egallaydi. Tuzilishi jihatdan polimorflikka ega bo‘lib, shakli yumaloq, ipsimon, disksimon, ellipssimon, sferik shakldagilari 0,15- 0,20 mkm, ipsimonlarining uzunligi 13 mkm gacha, diametri 20 nm gacha bo‘ladi. Bo‘linishdan hosil bo‘lgan hujayralar o‘lcham jihatdan bir-biriga teng emas. Hatto ba‘zilari tiriklikni namoyon etmaydi (Borkhsenius, 2002).

Mikoplazmalar sistematik jihatdan *Prokaryotae* olami, *Tenericutes* bo‘limi, *Mollicutes* sinfi, *Mycoplasmatales* tartibi va *Mycoplasmataceae* oilasiga mansub bo‘lib, bu oila o‘z navbatida *Mycoplasma* va *Ureaplasma* urug‘lariga bo‘linadi. Mikoplazmalar turkumiga 100 dan ortiq turlar kiradi. Ikkinchi turkum, ya‘ni ureaplazmalar turkumiga 2 ta tur kiradi: *Ureaplasma parvum* va *Ureaplasma urealyticum* (Razin, 1992). *Mycoplasma* urug‘iga mansub quyidagi vakillar yaxshi o‘rganilgan:

M. genitalium;

M. hominis;

M. fermentans;

M. penetrans (Jensen, 2006).

Mikoplazmalar xemogeterotrof organizmlar bo‘lib, chegaralangan holatda biosintezlash xususiyatiga ega. Genlarining ko‘pchiligi aminokislotalar, purin va pirimidin asoslari sintezi uchun, hujayra membranasi komponentlari sintezi uchun javob beradi. Mikoplazmalar xo‘jayin organizmidagi ozuqalarni o‘zlashtirish uchun zarur bo‘lgan nukleaza va proteaza fermentlarini sintezlaydi (Fraser, 1995). Mikoplazmalar hayot faoliyati uchun zarur bo‘lgan energiyani hosil qilish manbalari barcha vakillarda bir-biridan farq qiladi. *M. genitalium* glikoliz yo‘li bilan, *Ureaplasma spp.* mochevina gidrolizidan, *M. hominis* arginin gidrolizidan hosil qiladi (Smith, 1993).

Mikoplazmalarning 16 dan ortiq turi odamning turli xil a‘zolarida patogen yoki kommensal sifatida hayot kechiradi. Ayni paytda *M. genitalium*ni patogenlik xususiyati to‘liq o‘rganilgan (Taylor-Robinson, 2011).

Mollicutes sinfi vakillari genomiga xos asosiy xususiyatlardan biri DNK sida G+S nukleotid juftligining kamligidir (Jensen, 2006). Ko‘pchilik mikoplazmalarda bu ko‘rsatkich 24-33 % ni tashkil etadi. Masalan, *M. genitalium*da 31,7 %, *M. hominis*da 27,1 %, *Ureaplasma spp.*da 25,5 % ni tashkil etadi (Borkhsenius, 2002). Bo‘linishi: kurtaklanish, binar bo‘linish va fragmentlar orqali sodir bo‘ladi.

Yuqoridagi 16 turdan 6 tasi siydik- tanosil sistemasi aʼzolarida, 10 tasi ogʻiz boʻshligʻi va halqumda uchrashi kuzatilgan. Bugungi kunda turli kasalliklarni qoʻzgʻatuvchi 6 turga quyidagilar kiradi.

- 1.*Mycoplasma pneumonia*- respirator infeksiya boʻlib, pnevmoniyani qoʻzgʻatadi. Organizmga nafas yoʻllari orqali kiradi.
- 2.*Mycoplasma genitalium*- patogenlik xususiyati kuchli boʻlib, maxsus organellalari orqali eritrotsitlarga yopishib oladi.
- 3.*Mycoplasma hominis*- patogenlik xususiyati kamroq boʻlsa-da siydik- tanosil aʼzolarida keng tarqalgan infeksiyadir.
- 4.*Mycoplasma incognita*- OITS ga chalingan bemorlarda topilgan.
- 5.*Mycoplasma spescies*- ayirish aʼzolari epiteliysida parazitlik qiladi.
- 6.*Ureaplasma urealyticum*– asosiy ozuqa manbai mochevinadir. Demak, ular siydik aʼzolarida yashab, parazitlik qiladi.

Maʼlumotlarga koʻra, *M. hominis*, *U. urealyticum* va *U. parvum* shartli patogen hisoblanib, mutlaqo sogʻlom erkak va ayollarda ham uchrashi mumkin. Yuqoridagi vakillarni siydik-tanosil aʼzolarida patologik holatlar keltirib chiqarishdagi roli aniqlanmagan. Boshqa tomondan esa, uretrit, vaginit, servisit va bakterial vaginoz kabi kasalliklarni rivojlanishi bu mikroorganizmlar hayot faoliyati bilan bogʻliq. Olimlarning fikriga koʻra, bu mikroorganizmlar bepushtlikka, homiladorlik davrida salbiy, oqibatlariga, tugʻilajak farzandlardagi vazn yetishmaslik holatlariga sabab boʻlar ekan.

Mikoplazmalar goʻngda, oʻsimliklar toʻqimasida va hattoki, yerning issiq qatlamlarida ham uchraydi. Lekin, toʻliq hayot siklini faqat odam organizmidagina oʻtkazishi mumkin. Mikoplazmalar hayoti uchun zarur boʻlgan ozuqa va energiyani xoʻjayin organizmidan oladi. Mikoplazmalar spermatozoid, eritrotsit, fibroblast, makrofag va traxeyalarning epiteliysiga birikib olish xususiyatiga ega.

1.5. *Mycoplasma hominis* tuzilishi va uni diagnostika qilish usullari.

M. hominis genomi 665 bp oʻlchamga ega (Glass, 2006). *M. hominis*dan 537 ta

oqsil kodlovchi gen ajratib olingan. Ulardan 247 tasi *M. genitalium*, *M. hominis* va *U. parvum* uchun umumiy bo'lib, bu genlar hujayradagi asosiy jarayonlar: oqsil sintezi, nukleotidlar, DNK metabolizmi kabilarga javob beradi (Pereyre, 2009).

Ma'lumki, har qanday patogen mikroorganizm uchun adgeziya jarayoni infeksiyon holatni yuzaga keltirish va koloniya hosil qilish uchun zarur shart-sharoit hisoblanadi. Lekin, mikoplazmalar hujayra qobig'iga ega emas, shuningdek, hujayralararo bog'lanish hosil qiluvchi tuzilmalari rivojlanmagan. Ularda adgeziya jarayoni membrana komponentlari yordmida amalga oshadi. *M. hominis* hujayrasi sirtida maxsus oqsillar- adgezinlar joylashgan bo'lib, ular xo'jayin hujayra bilan bog'lanishda ishtirok etadi (Razin, 1998). *Mycoplasma hominis* patogenlik xususiyatini belgilovchi asosiy omillardan biri uning xo'jayinining hujayra membranasi bilan bog'lanish hosil qilishi hamda, buning natijasida membrana komponentlari o'rtasida almashinish jarayonining sodir bo'lishidir. Natijada xo'jayin hujayrasining antigenni tanib olish jarayoni buziladi va o'zining hujayra va to'qimalariga nisbatan hujayra antitana ishlab chiqara boshlaydi. Autoimmun jarayonlari rivojlanadi. Autoimmun antitanalar autoimmun jarayonlarga xos bo'lib, bunday jarayonlar, ayniqsa, mikoplazmali infeksiyalarda ko'p kuzatiladi.

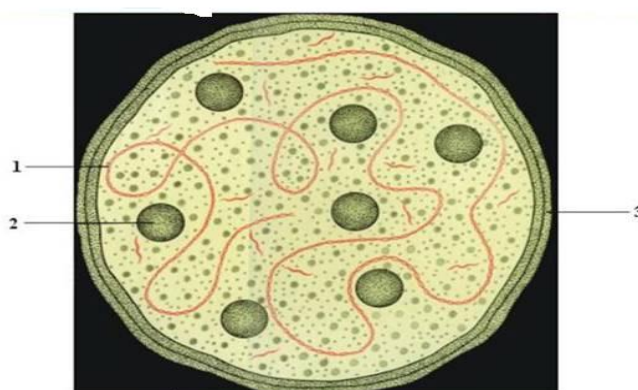
Mycoplasma hominis shartli patogen bakteriya bo'lib, faqat qulay sharoit tug'ilgandagina, parazitligini namoyon eta oladi. Hujayra qobig'i mavjud emas, shuning uchun tashqi muhitdan sitoplazmatik membranasi orqali ajralib turadi. Aniq ifodalangan polimorfizmni namoyon etadi. Uning o'sishiga sterollar bevosita ta'sir ko'rsatadi, masalan, xolesterin. U ham DNK, ham RNK saqllovchi mikroorganizmdir. *M. hominis* asosan 2 yo'l bilan yuqadi:

1. Jinsiy yo'l orqali
2. Transplasentar, ya'ni, onadan bolaga (Glass, 2006).

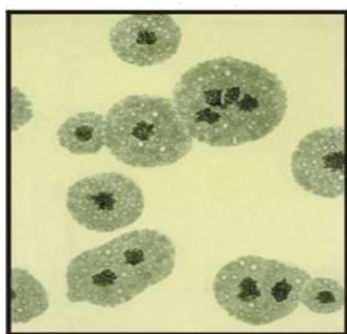
M. genitalium va *M. hominis* keng o'rganilgan mikroorganizmlardir. Tug'ruq paytida qiz bolalar bu infeksiya bilan o'g'il bolalarga nisbatan ko'proq zararlanadi. Kattalar jinsiy yo'l bilan yuqtiradi, maishiy yo'l bilan yuqishi aniqlanmagan.

M. hominis yangi tugʻilgan qiz chaqaloqlarning 25 % ida uchraydi. Ayollar 20- 50 % hollarda tashuvchi hisoblanib, erkaklarda bu infeksiyalar kam uchraydi. *M. hominis* odamlarda quyidagi infeksiyon kasalliklarni keltirib chiqaradi:

- Bachadon va tuxum yoʻllari yalligʻlanishi;
- Gardnerellyoz (bakteriyali vaginoz);
- Pielonefrit;
- Uretrit (Razin, 1998).



Mikoplazma tuzilishi:
1. DNK; 2. Ribosoma 3. Lipoprotein membrana



Mikoplazma koloniyasi

1-rasm. *Mycoplasma hominis* tuzilishi va uning koloniyasi (Кирьянов, 1983)

Diagnostikasi. Bugungi kunda mikoplazmalarni laboratoriyalarda diagnostika qilishning quyidagi usullari keng tarqalgan:

Immunoferment analiz (IFA);

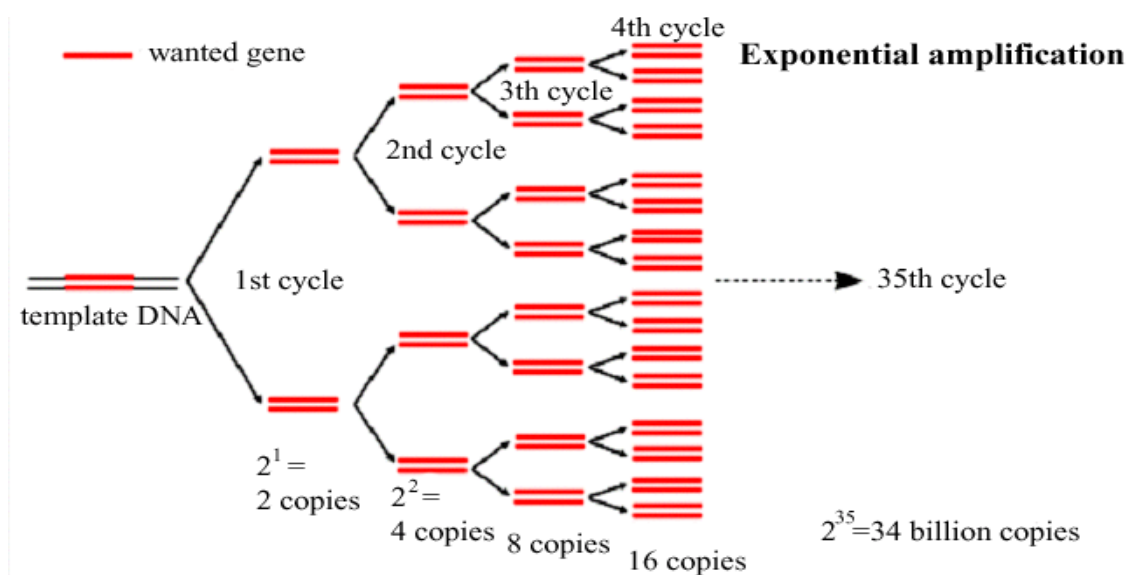
Polimer zanjir reaksiyasi (PZR, Real vaqtdagi PZR);

Maxsus bakterial muhitga ekish.

IFA- immunodiagnostik usul bo'lib, bu usulning mohiyati, maxsus antitanalar ishtirokida qo'zg'atuvchini aniqlashga imkon beradi. Immunoferment analizi o'z nomidan kelib chiqqan holda, ikki komponentdan- immun hamda ferment reaksiyasidan iborat. Immun reaksiyasi- bu antigen bilan antitanani bir-biri bilan bog'lanib, kompleks hosil qilishi bilan kechadigan spesifik reaksiyadir (Бейли, 1989). Fermentativ reaksiya bu- kimyoviy jarayon bo'lib, bunda bir modda ferment ishtirokida boshqa bir moddaga aylanadi. Antitanalarning 5 turi mavjud. (A, M, G, D, E). Diagnostikada asosan G va M turlari qo'llaniladi. Bu usulning gomogen (suyuq) va geterogen (qattiq) fazali turlari mavjud. Geterogen usulni 1971 yilda Veyemen va uning shogirdlari ishlab chiqqan. Bu usulda AG yoki AT qattiq tashuvchiga adsorbsiya qilib qo'yiladi. Gomogen usulni esa 1972 yilda Rubinshteyn ishlab chiqqan. Bugungi kunda qattiq fazali IFA keng tarqalgan. IFA bir nechta bosqichlarni o'z ichiga oladi. Birinchi reaksiya aniqlanayotgan antitana (immunoglobulin lg) va qo'zg'atuvchi antigeni (AG) o'rtasida ketadi. Bunda antitanani biror tashuvchi bilan ulaymiz. Uning ustiga aniqlanayotgan mikroorganizm (antigen) solinadi. Spesifik AG qolib, qolgani yuvilib ketadi. Agar qo'zg'atuvchi ko'p bo'lsa, hamma tashuvchini to'ldiradi, kam bo'lsa, ba'zi AT lar bo'sh qoladi. So'ngra ular ustiga konyugat (AT+E) solinadi. Konyugat AG bor joyga o'tiradi. Qolgani yuvilib ketadi. Keyin E ustiga substrat (S) solinadi. Hosil bo'layotga mahsulot (P) miqdori AG miqdoriga teng. Mahsulot qancha ko'p bo'lsa, qo'zg'atuvchi shuncha ko'p bo'ladi. Miqdoriy analizdan so'ng sifatiy baholash uchun bo'yash kerak. Buning uchun esa rangli mahsulot hosil qiluvchi fermentlar (peroksidaza, ishqoriy fosfataza, amilaza) ishlatiladi. Bizning yurtimizda infeksiyon kasalliklarni aniqlashda bu usuldan keng foydalaniladi (50-70%) (Егоров, 1991).

IFAg nisbatan ancha sezgir usullardan biri bu PZR dir. PZR (Polimer Zanjir Reaksiyasi) aniqlanayotgan genom (DNK, RNK) ma'lum qismining

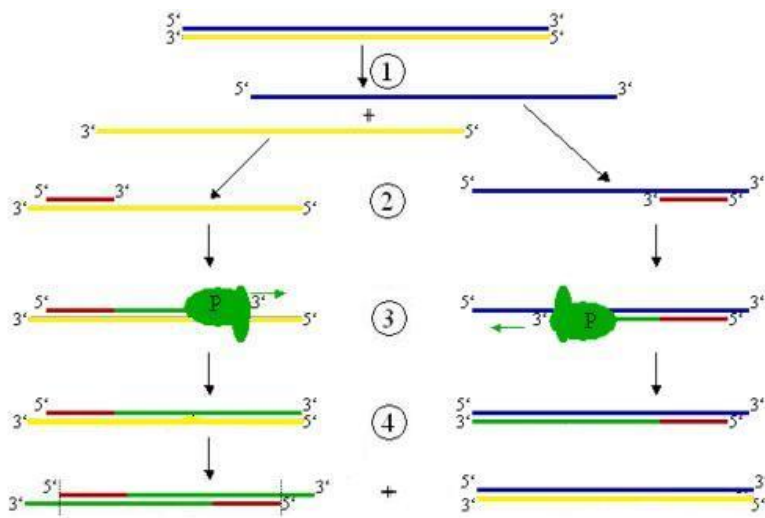
(uchastkasi) DNK- polimeraza va qaytalama transkriptaza fermentlari ishtirokida bir necha million marotaba ko‘payishiga imkon beruvchi jarayondir. Bunda aniqlanayotgan genom fragmentiga mos praymerlar (oligonukleotidlar) ishtirokida DNK amplifikatsiyalanadi. Avval, aniqlanishi lozim bo‘lgan DNK qizdirish orqali ikkiga ajraladi (denaturatsiya), so‘ngra praymerlar ishtirokida DNK ning komplementar qismlari o‘rtasida bog‘lanish sodir bo‘ladi (gibridizatsiya). Keyin termostabil DNK- polimeraza fermenti yordamida DNK zanjiriga komplementar ravishda 5’ uchdan 3’ uchga tomon ikkinchi zanjir sintezlana boshlaydi (elongatsiya). Bu jarayon bir necha marta takrorlanadi. Diagnostika uchun birgina DNK molekulasi mavjudligi yetarlidir. Bugungi kunda polimer zanjir reaksiyalarining juda ko‘p modellari keng tarqalgan. Ular maqsadga muvofiq holda tanlanadi va o‘tkaziladi. Bu modellarning barchasida reaksiya borish mexanizmi deyarli farq qilmaydi. Hozirgi kunda bu usul yordamida diagnostika qilish 90-100 % aniq natija olishga imkon beradi. Bu jarayonda bir necha sikl amalga oshiriladi. Har bir siklning o‘zi uch bosqichdan iborat bo‘ladi. Bu jarayonlar oxirida DNK molekulasi bir necha million marotaba ko‘payganligi kuzatiladi. Polimer zanjir reaksiyasining umumiy ko‘rinishi quyidagi rasmda keltirilgan.



2-rasm. Polimer zanjir reaksiyasining sxematik ko‘rinishi (Vierstraete, 2001)

Infeksion kasalliklarni aniqlashda keng qoʻllanilayotgan PZR usuli boshqa usullardan quyidagi xususiyatlari bilan farqlanadi:

- Yuqori darajada sezgirligi;
- Yuqori darajada spesifikligi;
- Universalligi (Азимова, 2013).



3-rasm. Birinchi siklning sxemati tasviri (Vierstraete, 2001)

1. Denaturatsiya 94-96°C; 2. Gibridizatsiya 68°C; 3. Elongatsiya 72°C (P-polimeraza); 4. Birinchi siklning tugashi. Hosil boʻlgan ikki zanjirli DNK keyingi bosqichlar uchun matritsa vazifasini bajaradi. Shuning uchun ham, har bir sikldan soʻng matritsali DNK ikki marta koʻpayib boraveradi.

Reaksiya muhitdagi asosiy komponentlar:

1. Praymerlar- 15 tadan 30 tagacha nukleotiddan iborat boʻlgan, DNKning oʻzi tanlagan uchastkalariga oʻtiradigan oligonukleotiddir. Praymerlar PZR mahsulotlarining (amplikonlarning) hosil boʻlishida katta rol oʻynaydi.
2. DNK-polimeraza- DNKning ikkinchi zanjirining 3ʼ uchiga komplementar bogʻlanuvchi ferment.

3. Dezoksinukleotidtrifosfatlar aralashmasi (dNTF) – dATF, dSTF, dTTF, dGTF lar qurilish materiali bo‘lib xizmat qiladi. Ular DNK- polimeraza yordamida DNKning bir zanjiriga komplementar holda kelib birikaveradi.

4. Bufer- ma‘lum konsentratsiyadagi kationlar va anionlar aralashmasi bo‘lib, optimal muhitni va pH ni stabil tutib turadi.

5. Aniqlanuvchi namuna- o‘zida biror bir taxmin qilinayotgan mikroorganizm DNK sini tutuvchi namuna.

Qo‘shimcha komponentlar:

1. Ichki kontrol- sun‘iy DNK molekulasiga bo‘lib, o‘zida PZR uchun alternativ matritsa tutuvchi va har bir probirkadagi amplifikatsiya jarayonini nazorat qiluvchi DNK.

2. DNK-zondlar- 30 nukleotiddan ortiq bo‘lmagan oligonukleotidlar bo‘lib, ular flurosentlikni namoyon qiladi va bu bilan PZR reaksiyasida deteksiya jarayonida ishtirok etadi (Патрушев , 2005).

Siklik haroratli rejim. Amplifikatsiya jarayoni haroratga bog‘liq bo‘lgan 3 ta bosqichni o‘z ichiga oladi:

1.Denaturatsiya. Reaktsion aralashma 92-95° C gacha qizdiriladi, bunda qo‘sh zanjirli DNK molekulalari ajralib bir zanjirli bo‘lib qoladi.

2.Gibridizatsiya. Bu bosqichda praymerlar bir zanjirli DNK molekulasiga birikadi. Birikish komplementarlik asosida kechadi.

3. Elongatsiya (sintez). Bu bosqichda DNK ning ikkinchi zanjiri DNK –polimeraza yordamida sintezlanadi (Глик , 2002).

Siklik haroratli rejim bir necha marta takrorlanadi (30- martadan ortiq).

PZR ni olib borish bosqichlari:

I.Biologik materialni tayyorlash. Biologik namunada DNK reaksiyani spetsifikligiga xalaqit beruvchi barcha yot moddalardan tozalanib, ajratib olinishi kerak.

II. Amplifikatsiya. Amplifikatsiya jarayoni kechishi uchun reaksiyon komponentlari mavjud bo'lgan muhit va unga biologik namuna qo'shilgan bo'lishi lozim. Lekin ba'zan muhitdagi praymerlar DNK bilan emas balki, bir-biri bilan birikib, praymer-dimerlarni hosil qiladi. Bu esa PZR natijalarini elektroforez usuli yordamida aniqlanganda qiyinchiliklar tug'diradi va natijalarning xato bo'lishiga zamin yaratadi.

PZR ni „ISSIQ START” qo'llab amalga oshirish. Amplifikatsiya jarayonida nospetsifik mahsulotlarning hosil bo'lishini oldini olish uchun „Issiq start” (ing. Hot start) nomli yo'l tanlanadi. Uning asosida praymerlarning spetsifik birikishlari yotadi.

Ma'lum bo'lishicha DNK dagi GS tarkibli praymerlarda vodorod bog'lari nostabil bo'lgan ma'lum „plavleniya T_m ” temperaturaga ega bo'lar ekan. Agar bu temperatura ma'lum chegaradan oshsa, praymerlar denaturatsiyaga uchraydi. Bu jarayonni oldini olish uchun issiq startning bir necha usullari amalga oshiriladi.

1. Probirkani denaturatsiya temperaturasigacha ko'tarishdan oldin reaksiyon muhitga kerakli komponentlardan biri masalan, DNK- polimeraza, praymerlar yoki dNTP lar qo'shiladi.

2. Reaksiyon muhitdagi komponentlarni qatlam bo'yicha ajratib solish, ya'ni pastiga-praymerlar, yuqorisiga- DNK- polimeraza va DNK namunasi. Chunki bu komponentlar bosqichli temperaturani talab qiladi (45-85°C).

3. DNK- polimeraza uchun monoklinal antitana qo'llash. Monoklinal antitana bilan birikkan ferment birinchi denaturatsiyadan keyingina aktiv holatga o'tadi, ya'ni qachonki antitana DNK- polimerazani qaytmas denaturatsiyalaydi va faol markazini bo'shatadi.

III. Deteksiya. Amplifikatsiya jarayonini aniqlashning bir necha usullari mavjud. Zamonaviy usullarga fluoressent zondlarning DNK matritsasi bilan gibridlanishi texnologiyalari kiradi. Yuqorida aytib o'tilganidek, zondlar reaksiyon aralashmaga boshqa komponentlar bilan birgalikda beriladi. Zond tarkibida fluorofor va gasitel

nomli uchastkalar bir biriga yaqin joylashgan boʻladi. Reaksiya borishidan oldin fluoressensiya ketmaydi. Reaksiya mobaynida temperatura koʻtariladi va matritsaning denaturatsiyasi yuz beradi va zondlar u bilan gibridlanish imkoniga ega boʻladi. Elongatsiya bosqichida DNK- polimeraza 5'- ekzonukleaza faolligi taʼsirida zondni parchalaydi va fluorofor gasiteldan ozod boʻladi. Va aynan mana shu davrda fluoressensiya sodir boʻladi. Parchalangan zondlar miqdori, shunga asosan fluoressensiya koʻrsatkichi PZR spetsifik mahsulotlarining miqdoriga bogʻliq boʻladi (Pierce, 2007).



4-rasm. PZR ni oʻtkazish uchun amplifikator

II BOB. ILMIY TADQIQOT MATERIALLARI VA METODLARI

2.1. Materiallar va jihozlar

JIHOZLAR

- Laminar boks–tashqi muhitdan mukammal himoyalangan, aeroatsiya tizimi hamda antiseptik jihozlar (UBIQ lampalar)ga ega bo‘lgan xona bo‘lib, bu yerda sterillangan havo muhitini talab qiladigan amallar bajariladi;
- Termostat (TC-80M-2);
- Muzlatkichli kamera (+4⁰C -20⁰ C);
- Inkubatorlar (IncubatorES-20) – ma‘lum ozuqa muhitidagi shtammlarni o‘stirish uchun qo‘llanilib, unda haroratni boshqarish imkoniyati mavjud;
- Elektron pH-metr (METTLER TOLEDO Seven Easy);
- Elektron tarozi (Sartorius);
- Spektrofotometr (Analytic jena Specol 1300);
- Vortex (Stuart scientific Vibro GENE SA4);
- Sentrifuga (Jouan MR 1812);
- Minisentrifuga (sovitish qurilmasi bilan) – markazdan qochma kuch ta‘sirida kolloid, dispersion va boshqa turdagi qattiq jinsli moddalarni geterosistemadan ajratib beruvchi qurilma;
- Amplifikator- 4 bosqichda ish olib boruvchi bu qurilma DNK molekulalarini cheksiz amplifikatsiyalashga imkon beradi;
- Elektroforez uchun jihozlar – elektroforez qurilmasi,vannacha, teflon taroqcha, tok manbaini boshqarib turuvchi stabilizator;
- Gel-elektroforez (Bio-Rad PAC 1000) uchun elektr manba.

Reaktivlar:

Tadqiqot obyektimiz sifatida *Mycoplasma hominis* mikoplazmasi mavjud mazoklardan (biomaterial) foydalandik. Mazkur bionamunalar Toshkent shahar SES (Sanitar Epidemiologik Stansiya) idan olib kelingan.

Kremniy dioksidi SiO₂(silikagel);
GuSCN (guanidintiosianat);
d H₂O (ionlardan tozalangan suv);
Tris- HCl (trisgidrooksimetilaminometan);
EDTA (etilendiamintetrauksus kislota);
Triton X-100, etanol (70%), Aseton , Xloroform;
STAB (setiltrimetilammoniybromid);
Izopropanol, NaCl, NaOH, Fenol, Izoamil spirti;
Proteinaza K (oqsillarni yo'qotish uchun);
RNKaza A (DNK aralashmasidagi RNK ni ajratadi);
Praymerlar (Mycoplasma hominis uchun);
F 5'AATTGATATGTTTAAAGATGATGAAAGAGA 3'
R 5'TGTATSAASAGSATSSATTAATTSS 3'
Dezoksinukleotid trifosfatlar (d NTF);
Tag- polimeraza (DNK- polimeraza);
Kons. HCl;
Buferlar: elektroforez uchun - TAE; Tris OH; EDTA (0.5M, pH- 8.0); Muz sirka kislota;
Gellar: Agaroz (polisaxarid)
Gel hosil qilish temperaturasi (0,8 %) 34-38°C
Gel zichligi (0,8 %) $\geq 1100\text{g/sm}^2$

2.2. Hujayra membranasini lizis qilish. Biologik materialdan nuklein kislotalarni ajratish uchun hujayralar lizisi, hujayra nukleazalarining inaktivatsiyasi hamda aniqlanayotgan nuklein kislotalarini hujayra massasidan ajratish kerak bo'ladi. Odatda lizisning ideal ketma-ketligi ko'plab usullar uchun kompromis bo'la oladi. Dastlabki materialni o'zgartira oladigan darajada qattiq va dastlabki materialni o'zgarimas holda saqlanishiga yordam berishi lozim. Odatdagi lizis amali quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi:

- Mexanik buzish (masalan, gomogenizatsiya, gipotonik lizis);
- Kimyoviy ishlash (masalan, detergent, xaotrop agentlar yordamidagi lizis, yoki tiolli tiklanish);
- Oqsillarni fermentativ parchalanishi (masalan, proteinkinaza K yordamida)

Hujayra membranalarini buzilishi va hujayra ichi nukleazalarini inaktivatsiyasi bir vaqtda amalga oshirilishi mumkin. Misol uchun bitta eritma hujayra membranasi uchun detergent va hujayra ichi fermentlarini inaktivatsiyasi uchun xaotrop tuzlarni tutishi mumkin. Hujayra lizisi va nukleazalar inaktivatsiyasidan so‘ng, hujayra membranasi osonlikcha filtrlash yoki cho‘ktirish bilan ajratib tashlanishi mumkin.

2.3. *Mycoplasma hominis* DNK sini ajratib olish usullari. *Mycoplasma hominis*dan DNK ajratib olishning bir necha usullari mavjud. Shulardan quyidagi usullarni qo‘llab, DNK ajratib oldik:

1. Fenol- xloroformli usul yordamida DNK ajratib olish;
2. STAB- usuli yordamida DNK ajratib olish;
3. GuSCN- silikagelli usul yordamida DNK ajratib olish.

2.4. Fenol va xloroform bilan ekstraksiya. Nuklein kislotalar aralashmasidan oqsillarni yo‘qotish uchun qo‘llaniladigan standart usullardan biri dastlab fenol bilan, so‘ngra fenol-xloroform (1:1) aralashmasi bilan ishlov berish hisoblanadi. Bu usulning ijobiy tomoni shundaki, bu ikki organik eritmalar yordamida deproteinlash jarayoni effekti ortadi. Fenol oqsillarni faol denaturatsiyaga uchratsa ham, lekin, u RNK aza faolligini to‘liq ingibirlay olmaydi, unda RNK molekulalari eriydi (Маниатис, 1984). Bu ikki muammo fenol- xloroform (1:1) aralashmasi orqali bartaraf etiladi hamda reaksiya oxirida xloroform bilan ekstraksiyalash nuklein kislotalardan fenol qoldig‘ini to‘liq yo‘qotish uchun qo‘llaniladi. Shuni ta‘kidlab o‘tish joizki, “xloroform” eritmasi deyilganda, xloroform va izoamil spirtining 24:1 hajmiy nisbatdagi aralashmasi nazarda tutiladi. Xloroform oqsillarni denaturatsiyalaydi, izoamil spirti esa suvli va organic fazani aniq

ajralishini ta'minlaydi. Fenol va xloroformning zichligi suvning zichligidan farq qilganligi sababli fenol va xloroform qo'shilgan lizat hujayrasini sentrifuga qilganda alohida 2 ta qatlam hosil bo'ladi. Pastki qatlam - organik aralashmadan tashkil topgan eritma, ustki qatlam - suvli eritmadan tashkil topgan. Bu holatda oqsil denaturatsiyaga uchraydi va peritsipitat hosil qiladi. U suvli va organik faza o'rtasida ingichka chiziq ko'rinishida bo'ladi. Agar fenol va buferning pH i neytral bo'lsa suvli qatlamda DNK ham RNK bo'ladi. Agar fenol va buferning pH i kislotali bo'lsa DNK organik fazaning pastki qismida, RNK esa suvli fazaning yuqori qismida bo'ladi.

Fenol eritmasi tarkibi:

0,1 M Tris-HCl (pH=8,0); 0,1 % li oksixinolin; 0,2 % li β -merkaptotetanol.

TE- bufer eritmasi (pH 7,4):

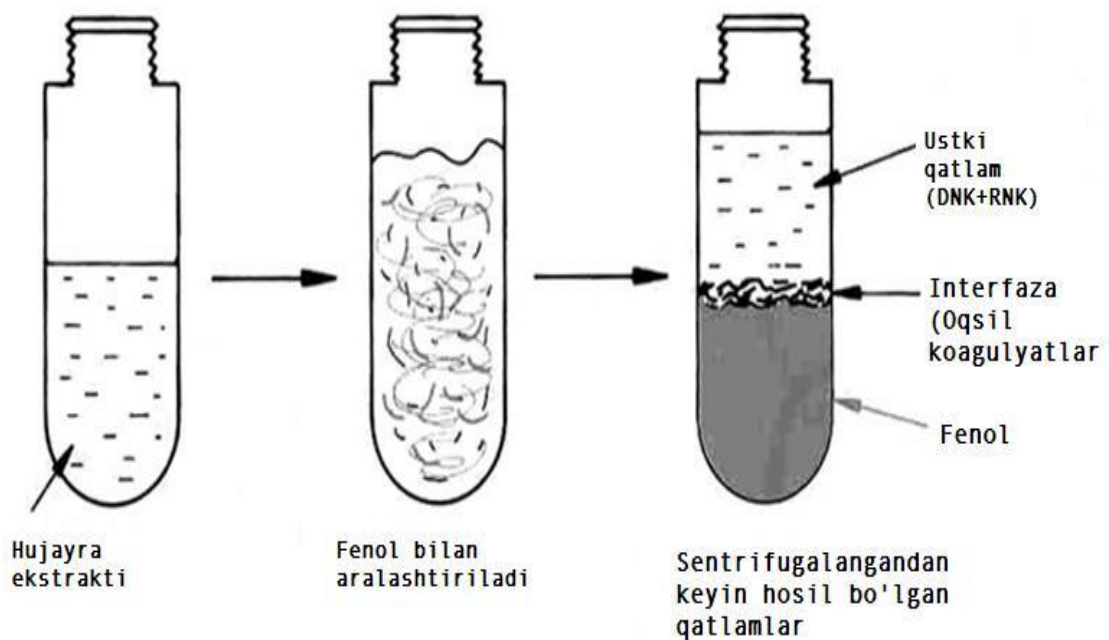
10 mM Tris-HCl, pH 7,4;

1mM EDTA, pH 8,0.

Ishning borishi:

1. 1,5 ml li probirkaga 50 μ l bionamuna solinadi;
2. 500 μ l lizis qiluvchi bufer eritmadan qo'shiladi va vorteksda 30 sek. aralashtiriladi;
3. Supernatant to'kib tashlanadi va 25 μ l Proteinaza K qo'shiladi;
4. 30 daq. termostatda 55°C da vaqti-vaqti bilan aralashtirgan holatda inkubatsiyalanadi;
5. 500 μ l fenol/ xloroform/ izoamil spirti (25:24:1) eritmalari chayqatilgan holda qo'shiladi. Dastlab sut rangli aralashma hosil bo'ladi;
6. Sentrifugada 18.000 ayl/daq 5 daq. sentrifuga qilinadi;
7. Ustki suvli faza yangi probirkaga olinadi;
8. Fenol/ xloroform/ izoamil spirti (25:24:1) eritmalari bilan ekstraksiya qilish interfaza tiniq holatga kelgunicha takrorlanadi (p:5,6,7);

9. Supernatant ($=300-450 \mu\text{l}$) olib tashlanadi va ustiga 2-2,5 marta ko'proq hajmdagi sovutilgan 96 % li etanol eritmasi qo'shiladi;
10. 1-2 soatga -20°C ga qoldiriladi;
11. 30 sek. 15000 ayl/daq. da sentrifugalanadi;
12. Cho'kmaga 70 % li etanol qo'shiladi va aralashtiriladi;
13. Spirt to'kib yuboriladi va 12-jarayon takrorlanadi;
14. Vaakuumli sentrifugada quritiladi;
15. $50 \mu\text{l}$ dein. Suv yoki TE buferda eritiladi;
16. Ajratib olingan DNK ni "PZR" da miqdor va sifat jihatdan aniqlanadi.
17. DNK eritmasini $+4^{\circ}\text{C}$ da 3 haftagacha saqlash, yoki, -20°C da bir necha oygacha saqlash mumkin (Маниатис, 1984).



5-rasm. FFE usulining sxematik tasviri (Маниатис, 1984)

2.5. STAB- metodi yordamida DNK ni ajratib olish

STAB- bufer

20 gr/l STAB	4 gr
1,4 M NaCl	16,4 gr

0,1 M Tris-HCl 3,15 gr

20 Mm Na₂EDTA 1,5 gr

- 100 ml ionlardan tozalangan (deionlashgan) suv quyiladi;
- 1 M NaOH yordamida eritma pH ini 8,0 gacha olib boriladi;
- hajmini 200 mlgacha yetkaziladi va avtoklavlanadi;
- buferni 4°C da 6 oygacha saqlanadi.

Cho'ktirish uchun STAB –eritma

5 gr\l STAB 1 gr

0,04 M NaCl 0,5 gr

- 100 ml ionlardan tozalangan (deionlashgan) suv quyiladi;
- 1 M NaOH yordamida eritma PH ini8,0 gacha olib boriladi;
- hajmini 200 mlgacha yetkaziladi va avtoklavlanadi;
- eritmani 4°C da 6 oygacha saqlanadi.

NaCl 1,2 M:

- 7,0 gr NaCl ni 100 ml deionlashgan suvda eritiladi;
- avtoklavlanadi va xona t° C da saqlanadi.

70 % li etanol eritmasi:

- 70 ml toza etanolni 30 ml steril deionlangan suvda eritiladi.

RNK aza A :

10 mg\ml- 20° C da saqlanadi.

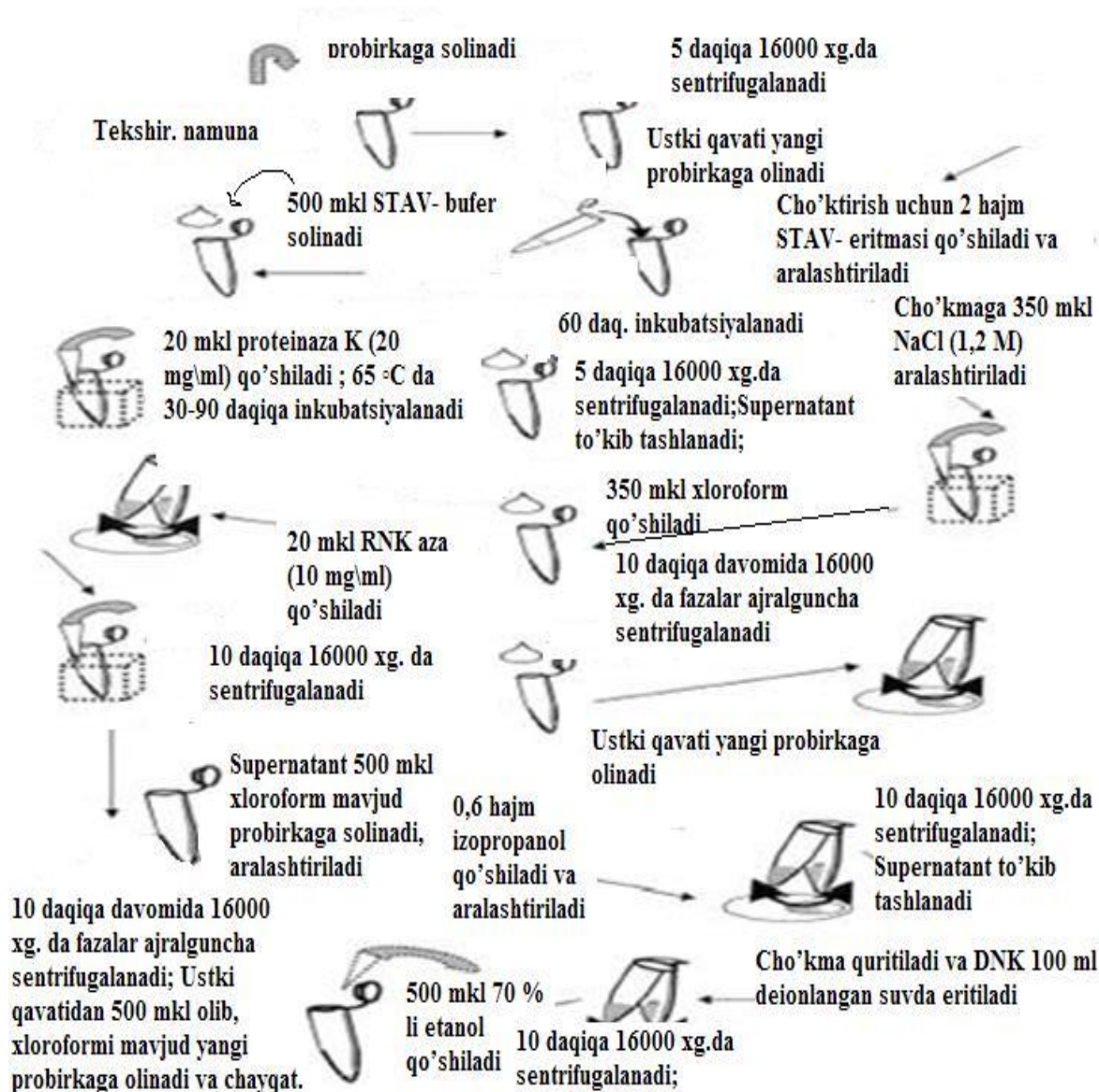
Proteinaza K :

20mg\ml - 20° C da saqlanadi.

Ishning borishi:

- 1.Mikrosentrifugalashga mo'ljallangan 1,5 ml li steril probirkaga 50 µl gomogen namunadan solinadi;
- 2.300 mkl steril deinlangan suv quyiladi va petli bilan aralashtiriladi;
- 3.500 mkl STAB- bufer solinadi va petli bilan aralashtiriladi;

- 4.20 mkl Proteinaza K (20 mg/ml) qo'shiladi va chayqatilgan holda aralashtiriladi. So'ngra 65 °C da 30-90 daqiqa inkubatsiya qilinadi;
- 5.20 mkl RNK aza (10 mg/ml) qo'shiladi, chayqatilgan holda aralashtiriladi 5-10 daqiqa inkubatsiya qilinadi;
- 6.10 daqiqa 16000 xg. da sentrifugalanadi;
7. Supernatant 500 mkl xloroform solingan probirkaga olinadi va 30 sekund aralashtiriladi;
- 8.10 daqiqa davomida 16000 xg. da fazalar ajralguncha sentrifugalanadi;
9. Ustki qavatidan 500 mkl olib, xloroformi mavjud yangi probirkaga olinadi va chayqatilgan holda aralashtiriladi;
- 10.5 daqiqa 16000 xg. da sentrifugalanadi;
11. Ustki qavati yangi probirkaga olinadi;
12. Cho'ktirish uchun 2 hajm STAB- eritmasi qo'shiladi va aralashtiriladi;
13. Xona t° C da 60 daqiqa inkubatsiya qilinadi;
- 14.5 daqiqa 16000 xg. da sentrifugalanadi;
15. Supernatant to'kib tashlanadi;
16. Cho'kmaga 350 mkl NaCl (1,2 M) aralashtiriladi;
17. 350 mkl xloroform qo'shiladi va 30 sekund chayqatilgan holda aralashtiriladi;
- 18.10 daqiqa davomida 16000 xg. da fazalar ajralguncha sentrifugalanadi;
19. Ustki qavati yangi probirkaga olinadi;
20. 0,6 hajm izopropanol qo'shiladi va chayqatilgan holda aralashtiriladi;
- 21.10 daqiqa 16000 xg. da sentrifugalanadi;
22. Supernatant to'kib tashlanadi;
23. 500 mkl 70 % li etanol qo'shiladi va chayqatilgan holda aralashtiriladi;
- 24.10 daqiqa 16000 xg. da sentrifugalanadi;
25. Supernatant to'kib tashlanadi;
26. Cho'kma quritiladi, DNK 100 ml deionlangan suvda eritiladi (Wagner, 1987).



6-rasm. STAB usulining sxematik tasviri

2.6. GuSCN + SiO₂ li metod yordamida DNK ni ajratib olish. Sorbsiyali ekstraksiya- silikagel sirtida xaotrop tuzlar ishtirokida tanlab sorbsiyalashga asoslangan usuldir. Ingibitorlar va klinik namunaning boshqa komponentlari eritmada qoladi. Sentrifugalash natijasida silikagel va nuklein kislota cho'kmaga tushadi, PZR ingibitorlarini tutgan supernatant esa to'kib tashlanadi. Bir necha marta yuvish jarayonlari esa yuqori tozalikka ega DNK molekulasini ajratib

olishga imkon beradi. Nuklein kislotalar ekstraksiyasida dastlabki bosqichlardan biri biologik materialni lizisga uchratishdir.

Lizis qilish uchun odatda, xaotrop agentlardan foydalaniladi, masalan, guanidintiosionat. U vodorod, vandervals hamda gidrofob bog'larni destabillashtiradi. Buning natijasida nuklein kislotalar eruvchanligi pasayadi, oqsillar esa denaturatsiyalanadi (Fujiwara, 2005). Sorbsiya jarayoni yuqori ion kuchiga ega eritmada, pH 3,5-6,5 (optimum pH 5) da, 37°C dan yuqori haroratda yaxshi ketadi. Lizis/sorbsiya bosqichlaridan so'ng sentrifugalash jarayoni ketadi, bunda silikagel va NK cho'kma hosil qiladi. Supernatant to'kib tashlanadi. Keyin 1-3 martagacha 70 % li etanol bilan yuvib tashlanadi. Spirtli yuvishlar xaotrop tuz qoldiqlarini to'liq yo'qotish uchun zarur. Tugallanish bosqichida, NK ni silikageldan ajralishi past ion kuchli eritmada sodir bo'ladi. pH 8-9 da DNK oson ajraladi va butunligini saqlab qoladi (Melzac, 1996).

SiO₂ eritmasini tayyorlash:

60 gr SiO₂

500 ml d H₂O

Tayyorlanishi: probirkaga solib aralashtiramiz, 24 soat xona haroratida qoldiramiz. 430 ml suyuqlikni so'rib olish orqali to'kib tashlaymiz. Qayta suspenziyalaymiz, ya'ni, 500 ml d H₂O ni energetik aralashtirgan holda solamiz. Xona haroratida 5 soat qoldiramiz. 440 ml suyuqlikni so'rib olish orqali to'kib tashlaymiz. Qolgan cho'kmaga 600 µl kons. HCl quyamiz, pH 2,0 ga yetkuncha. Alikvotni 4 ml dan qilib bir nechta probirkaga solib chiqamiz. Avtoklavlaymiz. Xona haroratida 6 oygacha saqlanadi.

Lizis qiluvchi bufer L

120 gr GuSCN 100 ml

0,1 M Tris-HCl (pH=6,4)

Suv hammomida 60-65 °C da eritma holiga keltiriladi. Xona haroratida, qorong'uda 3 haftagacha saqlanadi.

Lizis qiluvchi bufer L6

120 gr GuSCN 100 ml

0,1 M Tris-HCl (PH=6,4)

Eriguncha isitiladi, soʻngra quyidagilar qoʻshiladi:

22 ml 0,2 M EDTA (PH=8,0)

2,6 gr Triton X-100 (zichligi 1,07 gr\sm)

Vorteksda aralashtiriladi va xona haroratida, qorongʻuda 3 haftagacha saqlanadi.

TE bufer (PH=8,0)

10 mM Tris-HCl (PH=8,0)

1 mM EDTA

Avtoklavlanadi.

Ishning borishi:

1.1,5 ml li mikrosentrifugaga moʻljallangan probirkaga 900 μ l L6 va 40 μ l SiO₂ solinadi;

2.Vorteksda aralashtiriladi;

3.50 μ l bionamunadan olib, probirkaga solinadi;

4.5 sekund davomida vorteksda sekin aralashtiriladi;

5.Xona haroratida 10 daqiqa qoldiriladi;

6.5 sekund davomida vorteksda aralashtiriladi;

7.Sentrifugada 12000 ayl\sek da 15 sekund sentrifugalanadi va supernatant toʻkib tashlanadi;

8.Choʻkma 2 marta 1 ml L2 bufer bilan yuviladi, soʻngra 2 marta 1 ml 70% li etanol bilan yuviladi. Keyin 1 marta 1 ml aseton bilan yuviladi va uni vorteksda 1 daqiqa toʻliq suspenziyalanadi;

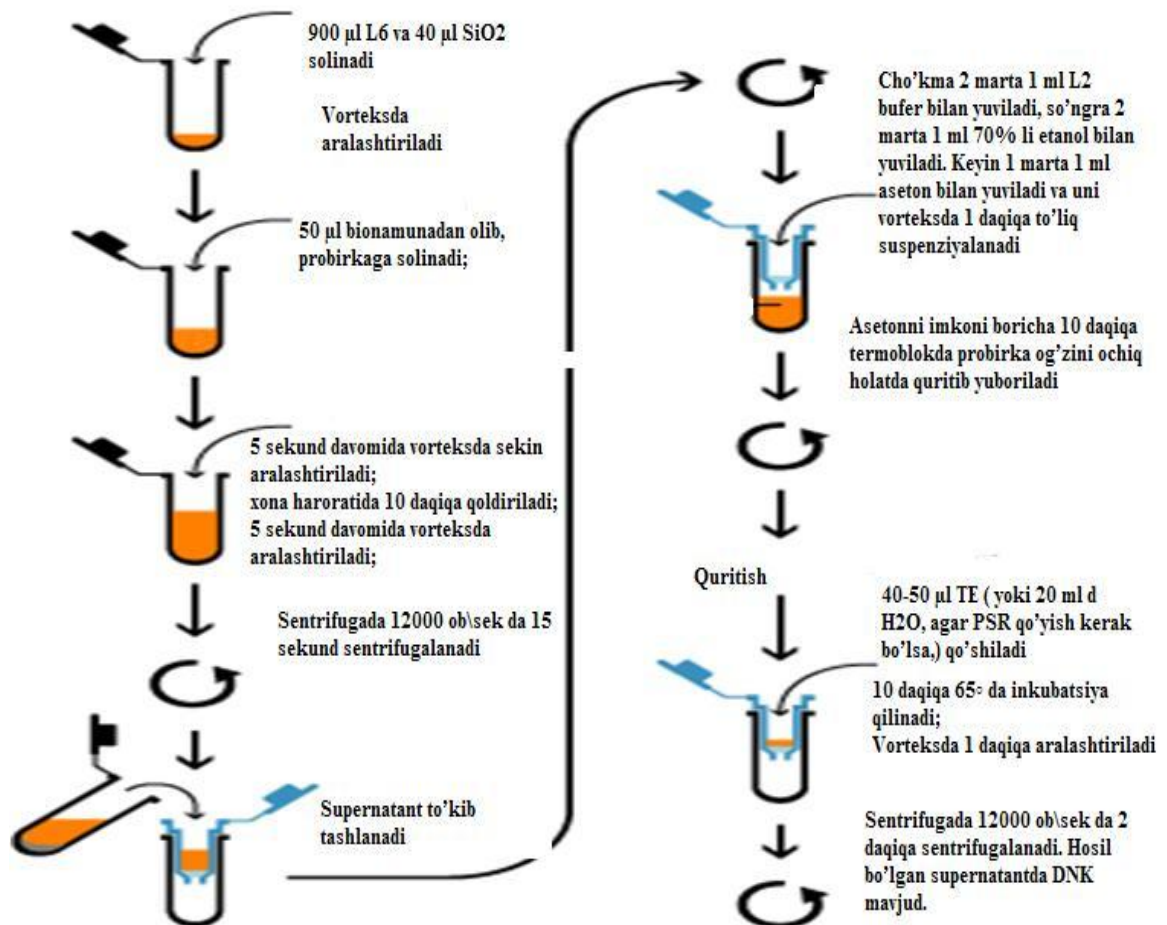
9.Asetonni imkoni boricha 10 daqiqa termoblokda probirka ogʻzini ochiq holatda quritib yuboriladi;

10.40-50 μ l TE (yoki 20 ml d H₂O, agar PZR qoʻyish kerak boʻlsa,) qoʻshiladi;

11.10 daqiqa 65 °C da inkubatsiya qilinadi;

12. Vorteksda 1 daqiqa aralashtiriladi;

13. Sentrifugada 12000 ay\sek da 2 daqiqa sentrifugalanadi. Hosil bo'lgan supernatantda DNK mavjud (Boom, 1993).



7-rasm. GuSCN + SiO₂ li metod yordamida DNK ni ajratib olishning sxematik tasviri (Boom, 1993)

2.7.DNK miqdorini spektrofotometriya usulida aniqlash. Ajratib olingan DNK miqdorini aniqlash uchun qulay usullardan biri spektrofotometriyadir. Bu usul uchun odatda past ion konsentratsiyaga ega bo'lgan bufer (masalan, TE bufer) ishlatiladi. Nuklein kislotalar konsentratsiyasi 260 nm to'liq in uzunligida aniqlanadi. Tajriba uchun olinadigan nuklein kislota miqdori kyuvetalar hajmiga bog'liq. Biz 100 mkl li kyuvetalardan foydalandik. Bunda 5 mkl DNK

aralashmasini suv yordamida 100 mkl gacha yetkazdik va spektrofotometr qurilmasiga joylashtirdik. Har bir usul uchun 20 tadan bionamuna oldik. Natijalar keyingi bobda jadval ko‘rinishida ifodalangan.

2.8. Agaroz gelidagi elektroforez. Agaroz gelidagi elektroforez - standart metodlardan hisoblanib, u asosan DNK fragmentlarini tozalash, ajratib olish, fraksiyalarga taqsimlash va identifikatsiyalash maqsadida amalga oshiriladi.

DNKning elektroforez jaryonida, agaroz gelida migratsiyasi (ko‘chishi) ning tezligi quidagi 5 ta asosiy ko‘rsatkich bilan aniqlanadi:

- DNK molekulasining o‘lchami – molekulyar massa o‘nlik logarifmiga teskari proporsional tarzda tezlik bilan harakatlanadi;
- Agarozaning konsentratsiyasi. Har xil konsentratsiyadagi gellarni qo‘llash orqali, bir-biridan o‘lcham jihatidan farq qiluvchi DNK fragmentlarining katta to‘plamini ajratish mumkin.

1- jadval

Geldagi agarozaning miqdori, %	Bir chiziqli DNK molekulasining samarali migratsiyalanishi, kb
0,3	60 – 5
0,6	20 – 1
0,7	10 - 0,8
0,9	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

- Molekula konformatsiyasi – molekulyar massasi jihatidan bir xil ammo konformatsiyasi jihatidan turli xil bo‘lgan DNKning ajralishi quyidagicha kechadi:

I forma – superspiral holdagi DNK (juda tez)

II forma - relaksirlangan DNK (bir zanjirli uzilishlar bilan)

III forma – bir chiziqli DNK (ba‘zida I formadan tezroq);

- Elektr maydon kuchlanishi - < 5 V/sm holda yaxshi;

-Asoslar tarkibi va temperatura.

Elektroforez o'tkazish. 1. Ma'lum hajmdagi elektroforez buferiga aniqlangan miqdorda agaroz kukunidan solinadi;

2. Agaroz pechda eritiladi va 50°C gacha sovitilib, konsentratsiyasi 0.5 mg/ml ga yetgunga qadar bromli etidiydan (10 mg/ml suvli eritmada va yorug'lik o'tkazmas idishda 4°C harorat ostida saqlaniladigan) qo'shiladi;

3. Oldindan teflon taroqchalar o'rnatib qo'yilgan elektroforetik plashkaga quyiladi va gel qotgunga qadar kutiladi;

4. Plashkani gorizontaal elektroforez qurilmasidagi o'zi uchun ajratib qo'yilgan joyga o'rnatiladi va gelning yuza qismini 1mm balandlikda ko'mib turadigan holat yuzaga kelgunicha elektroforez buferidan quyiladi;

Elektroforez	- 0,04 M tris-asetat
bufer TAE (50x):	- 0,002 M EDTA

5. Namunalarga bo'yovchi buferdan solib, pipetka yordamida namunalarni geldagi lunkalarga yuklanadi.

Bo'yovchi bufer	0,25% ko'kbromfenol,
	0,25 % ksilolsianol,
	15% suvdagi fikol.

6. Gelda namunalarni 2,5-5 sm masofaga yurgunga qadar 50 V kuchlanish ostidan haydaladi;

7. Gelni UB-nuri yordamida suratga olinadi va natijani muhokama qilinadi (Маниатис, 1984).

Biomaterialdan ajratib olingan DNK ni "Polimer zanjir reaksiyasi" usuli yordamida sifatli baholash. Ishning olib borilish jarayoni quyidagi etaplardan iborat:

Reaksion aralashmaning umumiy hajmi 20 mkl, 10 mkl DNK namunasini saqlagan holda;

1. Probirkaga 2 mkl PZR bufer eritmasi quyiladi (100mM Tris-HCl, 500 mM KCl);

2. Keyin 1 mkl 50 mM MgCl₂ eritmasi qo‘shiladi;
 3. Keyin 0,8 mkl 10mM dNTP aralashmasi solinadi;
 4. So‘ngra 1,6 mkl F praymeri va 1,6 mkl R praymeri solinadi;
 5. Hosil bo‘lgan aralashmaga 10 mkl tekshirilayotgan namuna va 0,5 mkl Taq-polimeraza qo‘shiladi;
 6. Reaktsion aralashmani dd H₂O bilan 20 mkl ga yetkaziladi (9,8 mkl);
 7. Manfiy kontrol PZR (K-) – probirkaga 10 mkl dd H₂O qo‘shiladi;
- Musbat kontrol PZR (K+) – DNK namunasi qo‘shiladi.

Amplifikatorga joylashtirishdan avval probirka devoridagi tomchilarni 1-3 sekund sentrifuga\ vorteksda sentrifugalash yo‘li bilan cho‘ktirish tavsiya etiladi. (Глик, 2002).

Quyidagi harorat rejimlarida inkubatsiya qilinadi:

2-jadval

Sikl	Harorat °C	Vaqt	Sikl takroriyligi
1	95	15 min	1
2	95	5s	5
	60	20s	
	72	15s	
3	95	5s	40
	60	20sFluorescent signalining deteksiyasi	
	72	15s	

III BOB.OLINGAN NATIJALAR TAHLILI

3.1. Ajratib olingan DNK miqdorini spektrofotometriya usuli bilan aniqlash. *Mycoplasma hominis*ni aniqlashga doir molekulyar genetik analizlarning ijobiy natija berishi mikroorganizm DNK sining sifati va miqdoriga bogʻliq. DNK ni ajratib olish uchun biz fenol-xloroformli usul (FXE), STAB (setiltrimetilammoniybromid) usuli va guanidintiosionatli (GuSCN+SiO₂) usullarni qoʻlladik. Ajratib olingan DNK miqdorini spektrofotometrda oʻlchab, quyidagi natijalarni oldik.

3-jadval

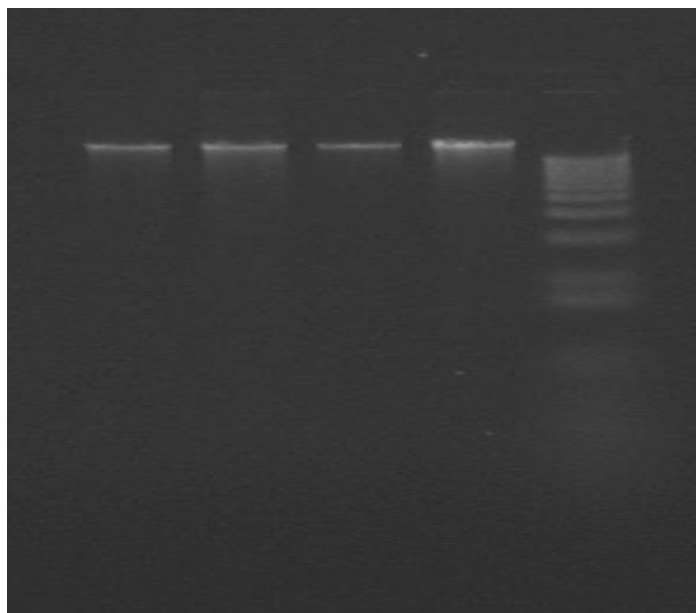
**Yuqorida qoʻllanilgan usullarda ajratib olingan DNK miqdorini solishtirish
(n=20; M±m)**

	Har bir usul boʻyicha ajratib olingan DNK konsentratsiyalarining arifmetik oʻrtachasi (ng/mkl)		
	FXE	STAB	GuSCN+ SiO ₂
A 260\280 nm	65,1±0,17	9,62±0,013	63,7±0,16

Spektrofotometriya usulida DNK miqdoriy analiz qilinganda, koʻpchilik holatlarda nuklein kislotalar bilan birgalikda nukleotid qoldiqlarni ham miqdoriy oʻlchaydi. Lekin PZR uchun butun DNK molekulalari lozim. Shuning uchun ham PZR ga yaroqli DNK mavjud yoki mavjud emasligini tekshirish uchun gel-elektroforez usulidan foydalandik. Bunda har bir namunadan 10 mkldan oʻlchab, elektroforez lunkalariga solindi. Oxirgi lunkaga esa marker (namunadagi DNK oʻlchamini aniqlash uchun) solindi. Elektroforez jarayonini olib borish ketma-ketligi yuqorida keltirilgan.

Quyida ajratib olingan DNK namunalarining elektroforez tahlili keltirilgan.

AmpliSens GuSCN STAB FXE Marker
+SiO₂



8-rasm. DNK namunalarining elektroforez tahlili

3.2.Foydalanilgan usullarning afzallik va kamchiliklarini solishtirish.

Biomaterialdan nuklein kislotalarni ajratib olishda qoʻllanilgan usullar bir-biridan kamchilik va afzalliklari bilan farq qiladi. Ular orasidan eng optimal boʻlgan usulni tanlab oldik va qolgan usullar bilan solishtirdik. Bunda usullarning toksiklik darajasi, jarayonni olib borish muddati va qiyinchiliklari, qoʻllanilgan reaktivlarning arzon yoki qimmatligi, ajratib olingan DNK ning tozalik darajasi, PZR ga xalaqit beruvchi mahsulotlarning hosil boʻlish miqdori kabi koʻrsatkichlar asos qilib olindi. Bu usullarni qoʻllashda foydalanilgan biomaterialning miqdori ham muhim ahamiyatga ega. Chunki baʼzi usullar kam miqdordagi NK saqlovchi namunalardan ekstraksiyalashda qoʻl kelsa, yuqoridagi uch usul kam miqdordagi biomaterialdan (mazoklar, oʻrtacha 200-300 mkl atrofida boʻladi) NK larni ajratishda samarali natija berdi. Har bir usulda oʻziga xos lizis qiluvchi moddalardan foydalanilgan (guanidintiosionat, setiltrimetilammoniybromid, fenol-xloroform kabilar). Yuqoridagilardan kelib chiqib, bu uchala usul oʻzaro

taqqoslandi va ularning ijobiy hamda salbiy tomonlari quyida jadval ko‘rinishida berildi.

4- jadval

Usullarning qiyosiy tahlili

Usul nomi	Ijobiy tomonlari	Salbiy tomonlari
STAB	Qo‘llanilgan reaktivlarning zaharli tas‘iri mavjud emasligi;	PZR uchun yaroqli toza holdagi DNK ajratib olish unumining pastligi. Ushbu usuldan odatda o‘simlik hujayralaridan DNK ajratishda qo‘llaniladi, sababi u fenolli ingibitorlarni yo‘qotadi;
GuSCN+SiO₂	1.Silikagelning sorbent sifatida qo‘llanilishi yuqori tozalikka ega DNK ajratib olishga imkon beradi; 2.Olingan DNK da PZR ga xalaqit beruvchi ingibitorlar kam (fenol, izopropanol, SDS kabi)	Ishni olib borish jarayonining uzoqligi, kontaminatsiya ehtimolligi mavjudligi.
FXE	DNK ajratib olish unumining yuqoriligi.	1.Ishlatilayotgan reagentlarning yuqori toksik ta‘sirga egaligi; 2. PZR ingibitorlarining haddan ortiq ko‘pligi.

3.3. Ajratib olingan DNK ni PZR – Polimeraza zanjir reaksiya usuli yordamida tahlil etish natijalari. Hozirgi kunda turli xil infeksiyalarni aniqlashda “PZR” usuli keng qo‘llanilmoqda. Ushbu usul biologik namunalarda infeksiya qo‘zg‘atuvchi mikroorganizmlarning bevosita genetik materiali - DNK ning juda kichik konsentratsiyalarini aniqlash imkoniyatini beradi. Spektrofotometrda aniqlangan DNK miqdorini sifatli baholash uchun PZR usulidan foydalanildi.

Quyidagi jadvalda ajratib olingan DNK namunalarining PZR tahlili keltirilgan.

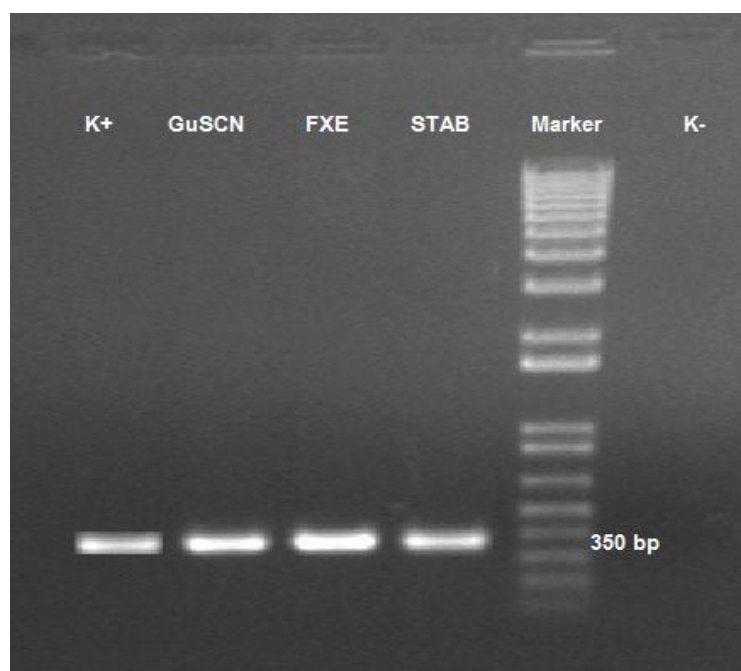
5-jadval

DNK ajratib olish usullari bo'yicha olingan PZR natijalari

№	FXE usuli	K+ (AmpliSens- tijorat to'plami)	K- (AmpliSens- tijorat to'plami)	STAB usuli	K+	K-	GuSCN+SiO₂ usuli	K+	K-
1	+	+	-	+	+	-	+	+	-
2	-	+	-	-	+	-	-	+	-
3	+	+	-	+	+	-	+	+	-
4	+	+	-	+	+	-	+	+	-
5	+	+	-	+	+	-	+	+	-
6	+	+	-	+	+	-	+	+	-
7	+	+	-	+	+	-	+	+	-
8	+	+	-	+	+	-	+	+	-
9	+	+	-	+	+	-	+	+	-
10	+	+	-	+	+	-	+	+	-
11	+	+	-	+	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	+	-	+	+	-
13	-	+	-	-	+	-	-	+	-
14	+	+	-	+	+	-	+	+	-
15	+	+	-	+	+	-	+	+	-
16	+	+	-	+	+	-	+	+	-
17	+	+	-	-	+	-	+	+	-
18	+	+	-	+	+	-	+	+	-
19	-	+	-	+	+	-	+	+	-
20	-	+	-	-	+	-	+	+	-

Ushbu jadvaldan ko‘rinib turibdiki, FXE usulida ajratib olingan 20 ta namunadan 16 tasida, STAB usulida 20 ta namunadan 16 tasida, GuSCN + SiO₂ usulida esa 20 ta namunadan 18 tasida mikroorganizm DNK si mavjudligi aniqlandi.

Yuqorida keltirilgan DNK namunalari PZR mahsulotining elektroforegrammasi quyida berilgan.



9-rasm. Ushbu rasmda Toshkent shahar SES idan olingan 1- namunaning PZR tahlili keltirilgan. Tahlil natijalari shuni ko‘rsatdiki, uchala usulda ajratib olingan namunalarda ham *Mycoplasma hominis* DNK si mavjud bo‘lib, hosil bo‘lgan amplikon (PZR reaksiyasi mahsuloti) o‘lchami 350 bp ga teng.

XULOSA

1. *Mycoplasma hominis* dan ajratib olingan DNK miqdorini spektrofotometriya usulida aniqlash shuni ko'rsatdiki, FXE bo'yicha 65,1 ng/mkl, STAB usuli bo'yicha 9,62 ng/mkl, GuSCN + SiO₂ usuli bo'yicha 63,7 ng/mkl unum bilan infeksiya DNK sini ajratib olish mumkin.
2. Ajratib olingan DNK namunalarini PZR usulida tahlil qilish shuni ko'rsatdiki, FXE usulida olingan 20 ta namunadan 16 tasida, STAB usulida 20 ta namunadan 16 tasida, GuSCN + SiO₂ usulida 20 ta namunadan 18 tasida mikroorganizm DNK si mavjudligi aniqlandi.
3. Tadqiqotlarimizda qo'llanilgan *Mycoplasma hominis* DNK sini ajratib olish usullarini taqqoslab, eng maqbul usul GuSCN + SiO₂ li usul ekanligi aniqlandi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI

Kitob va monografiyalar:

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. - Москва, "Мир", 1989.- Том 1-2.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — Москва, "Мир", 2002. — 589 с.
3. Егоров А.М. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. Москва, "Высшая школа", 1991.- 90с.
4. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека.- Москва, "СпецЛит", 2006.- 304 с.
5. Маниатис Т., Фрич Е., Дж. Сембрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - Москва "Мир" 1984.- 408 с.
6. Молочков В.А., Иванов О.Л., Чеботарев В.В. Инфекции, передаваемые половым путем. Клиника, диагностика, лечение. — Москва, "Медицина", 2006.- 632 с.
7. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. — Москва, "Наука", 2005. — В 2 т.
8. Pierce KE and Wangh LJ. Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells. *Methods Mol Med.* 2007.- **132p.**

Maqolalar:

9. Азимова Ш.С., Юсупова Э.Г. va Сасмаков С.А. Рекомбинантные белки и диагностика инфекционных заболеваний.//Фан ва Турмуш.-Т.13, вып. 3-4.- С.45-47.
10. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-vanDillen, and J. Vander Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids.// *J. Clin. Microbiol.*-1990, V 28.-p.495-503.

11. Borkhsenius S.N., Chernova O.A., Vonskiy M.S. Mycoplasmas: Molecular and Cell Biology, the interaction with the immune system of mammals, pathogenicity, diagnostics. // SPb., Science. 2002. 319 p.
12. Bruylant S., De Ridder C., Nuytten H., Nuytinck G. Comparison of the LIAISON® and AXSYM® assays for serological diagnosis of cytomegalovirus infection.// Corata, Bruges, October 2006.
13. Carles M.J., Douard-Enault C., Lachaud L., Charachon S. Comparative evaluation of the VIDAS® and LIAISON® toxoplasmosis, rubella and cytomegalovirus panels in a French University Hospital.// ECCMID, Nice, Apr. 2006
14. Crawshaw, S., Stocker, D., Sugrue, D., and Haran.M. Evaluation of the Significance of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Female Genital Tract Infection—A Retrospective Case Note Study.// International Journal of STD and AIDS 1:3 191-194.1990
15. Fraser C.M., Gocayne J.D., White O. et.al. The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium.// Science 1995; 270: 397-403p.
16. Fujiwara M., Yamamoto F., Okamoto K., Shiokawa K., Nomura R.// Anal. Chem.- 2005. Vol. 77(24). P.- 8138-8145.
17. Furr. P., and Taylor-Robinson, D. Prevalence and Significance of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in the Urines of a Non-Venereal Disease Population. // Epidemiology and Infection. 98:3 353-359. 1987
18. Garcia C, Ugalde E, Monteagudo I, Saez A, Agüero J, Martínez-Martínez L, *et al.* Isolation of Mycoplasma hominis in critically ill patients with pulmonary infections.// Clinical and microbiological analysis in an intensive care unit.
19. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N. et.al. Essential genes of a minimal bacterium.// Proc Natl Acad Sciences. USA 2006; 103: 425-430 p.
20. Jensen J.S. “Mycoplasma genitalium infections” Dan Med Bull. 2006; 53: 1-27 p.
21. Melzac K.A., Sherwood C.S., Turner R.F., Haynes C.A.// J. of colloid and interface science-1996. Vol. 181. P. 635-644.

22. Pereyre S., Sirand- Pugnet P., Beven L. et.al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas // PLoS Genet 2009.- 5(10).
23. Razin S. *Mycoplasma* taxonomy and ecology. In: Maniloff J, Mc Elhaney R.N, et.al. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. // Washington, D.C. Amer Soc Microbiol.- 1992.- 3-22 p.
24. Razin S., Yogev D., Naot Y. “Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas”// Microbial Mol Biol Rev. – 1998. V. 62, 1094-1156 p.
25. Smith D.G., Russel W.C., Ingledew W.J., Thirkell D “Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealiticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis” // J. Bacteriol.- 1993. V. 175, 3253-3258p.
26. Taylor-Robinson d., Jensen J.S. “*Mycoplasma genitalium*: from chrysalis to multicolored butterfly” // Clin Microbiol.- 2011. Rev- 24, 498-514 p.
27. Wagner D.B., Furnier G.R., Saghay-Marroof M.A., Williams S.M., Dancik B.P. and Allard. R.W. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. // *Proceedings of the National Academy of Science USA*.- 1987.- V. 84, 2097-2100 p.