

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

БИОЛОГИЯ-ТУПРОҚШУНОСЛИК ФАКУЛЬТЕТИ



Эргашев Шахзод

« Плазмид ДНК сани ажратиб олиш усуллари »
мавзусидаги

РЕФЕРАТ

Текширди: проф.Тошмухаммедова Ш.С.

Тошкент-2015

Plazmid DNK sini ajratib olish usullari haqida

Plazmida DNK sini ajratish uchun ko'p usullardan foydalanishadi. Ularning barchasi 3 ta asosiy bosqichni o'z ichiga oladi: bakteriyalarning o'sishi va plazmidalar amplifikatsiyasi; bakteriyalarni yig'ish va ularni lizis qilish; plazmida DNK sini tozalash.

Barcha tozalash usullarida bakteriya va plazmida DNK sidagi farqlardan foydalanishadi:

1.E.Coli bakteriyasining xromosomasi odatda vektor sifatida ishlaydigan plazmida DNK sidan katta bo'ladi.

2.E.Coli DNK sining asosiy massasi hujayradan fragmentlashgan chiziqli molekula shaklida ajratib olinsa, plazmida DNK si esa halqali kovalent bog'langan holatda ekstraksiyalanadi.

Shuning uchun ko'pchilik tozalash usullari E.Coli lizirlangan hujayralari DNK sini uzun zanjirlarini cho'ktirish yo'li bilan ajratish ishlatiladi Bu usullar yopiq halqali DNK xususiyatlarini qo'llashga asoslangan.Plazmida DNK sining har bir komplementar zanjiri yopiq kovalent bog'langan halqadan iborat bo'lib, ularni ajratish juda qiyin. Oddiy holda DNK ni qizdirish va ph 12.5 gacha bo'lgan meyoriy ishqoriy eritmalarda DNK ko'plab vodorod bog'larini uzilishi kuzatiladi. E.coli DNKsi denaturatsiya holatida qolishiga qaramay haroratning pasayishi va ph ning neytralga qaytishi yopiq halqali molekulalarni nativ konformatsiyaga qaytishi kuzatiladi.

Plazmida DNK si E.coli DNK sidan farqli ravishda seziy xloridi gradiyentidagi muvozanatli sentrifugalashda farqli ko'rsatgich namoyon qiladi. Bunda to'yingan konsentratsiyadagi enterkolirlovchi bo'yoq sifatida etidiy bromidi yoki propidiy diyodidi ishlatiladi. Halqali kovalent bog'langan DNK lar chiziqli DNK ga nisbatan kamroq bog'laydi.Shuning uchun seziy xloridi gradiyentida yuqori zichlikdagi sohalarda enterkolirlovchi agent bor joyda kuzatiladi.Bu uslub plazmida DNK sining yuqori tozalik darajasi kerak bo'lganda ishlatiladi.Ko'plab maqsadlar uchun rekombinant DNK lar bilan ishlash uslublarini rivojlanish borasida gomogen preparat darajasigacha tozalashni zarurati qolmadi. Masalan,

restriksiyalovchi endonukleazalar bilan parchalash, ligirlash, transformatsiya va hattoki DNK ni sekvinirlash plazmida DNKsining kam tozalangan preparatlaridan foydalanish mumkin. Kultura suyuqligining katta hajmlaridan plazmida DNKsi faqat uning yuqori miqdori kerak bo'lgandagina amalga oshiriladi.

Barcha uslublar turli bakteriyalar shtammlaridan turli xil plazmidalar ajratish uchun qo'llaniladi. Umuman aytganda plazmida qanchalik kichik bo'lsa olinadigan natija shunchalik yaxshi bo'ladi. Plazmidaning molekulyar og'irligi ortishi bilan xo'jayin DNK xossalariga yaqin bo'ladi. 25 kb dan ortiq bo'lgan o'lchamga ega bo'lgan plazmidalarni ajratish ancha qiyinlashadi va chiqishi pasayadi.

Alohida blyashkalar yoki koloniyalarda o'stirilgan plazmida yoki bakteriofag DNKsini tezkor ajratishning bir nechta usullari mavjud. Ular toza DNKni restriksion nukleazalar yordamida o'rganish, gel-elektroforez, nukleotid ketma-ketligini aniqlash yoki Sauzern bo'yicha blottingni amalga oshirish uchun yetarli miqdorda toza DNKni olishga imkon beradi. Shunday qilib gibrizatsiya analizida aniqlangan blyashka yoki koloniyalar detal ravishda tavsiflanib klonlash bo'yicha tadqiqotlarda kelgusi ishlatish uchun tayyorlash mumkin.

Kam miqdordagi Plazmida DNK sini tezkor ajratish.

Oxirgi vaqtlarda bakteriyaning alohida koloniyasidan olingan kam hajmdagi plazmida DNKsini ajratish usullari yaratilgan. Ayrimlari ko'p mehnat talab qiladi, boshqalari qiyinchilik bilan amalga oshiriladi, uchinchlari esa E. Colining ayrim shtammlari uchun yaroqlidir. Ba'zi metodlar bir nechta sinama bilan baravar ishlashga imkon yaratadi, o'zining tezkorligi bilan farqlanib turadi. E. Colining odatda ishlatiladigan shtammlariga to'g'ri keladi va plazmidaning yuqori chiqishini ta'minlaydi.

Biologik materialdan nuklein kislotalarni ajratish uchun hujayralar lizisi, hujayra nukleazalarining inaktivatsiyasi hamda qidirilayotgan nuklein kislotalarini hujayra massasidan ajratish kerak bo'ladi. Odatda lizisning ideal ketma-ketligi ko'plab uslublar uchun kompromis bo'la oladi; dastlabki materialni o'zgartira oladigan

darajada qattiq va dastlabki materialni o'zgarmas 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)

Xujayra 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 osonligicha filtrlash yoki cho'ktirish bilan ajratib tashlanishi mumkin.

1.2. Ishqoriy lizis metodi

Plazmidni ajratish uchun bir qancha usullar ishlab chiqilgan. Bu usullar bir-biridan oxirgi mahsulotning tozaligi, ajratish tezligi va plazmidni bakteriya kulturasidan katta va o'rtacha miqdorda ajratishda yoki kam miqdorli kulturadan katta miqdordagi plazmid DNKni bir vaqtda ajratishda farq qiladi.

Deyarli har doim plazmidni ajratib olishda agarda o'stirilgan bakteriya kulturasini olinadi va uni antibiotikli oziq muhitida o'stirilgan kulturadan foydalaniladi.

Agar plazmid vektorlar hujayrada replikatsiya bo'lib nusxalansalar, ularni kulturadan ko'p miqdorda ajratib olish mumkin. Ularni suyuq ozuqa muhitida 18 soat qoldirib, keyin ajratib olish mumkin.

Ishlatilayotgan vektor nazoratsiz replikatsiyalansa, uni bir soatga xloramfenikolli muhitda inkubatsiya qilinadi. Xloramfenikol xo'jayin hujayrada oqsil sintezini ingibirlaydi va bakteriya xromosomasi replikatsiyasini buzadi.

Plazmid DNKni ajratib olishning ko'p usullari plazmidning kovalentli yopiq xalqali formasiga va bakteriya xromosomasiga nisbatan kichik hajmda bo'lishligiga asoslangan. Bakteriya xujayrasi sentrifuga qilish orqali yig'iladi va

hujayra devorini buzish uchun lizotsim va EDTA dan foydalaniladi. Ulardan tashqari organik suyuqliklardan, isitishdan va ionsiz detergentlardan foydalanish mumkin. Hujayra bo'laklari va bakteriya xromosomasi lizisdan keyin sentrifuga qilish orqali yo'q qilinadi. Xoh katta, xoh kichik hajmli kulturalar bilan ishlashda ishqoriy lizis metodi tashkil qilingan. Ishqoriy muhitda ifloslangan plazmid DNKsi, RNK va oqsillar, xromosoma DNK oqsillari cho'kmaga tushadi. Bu usulda olingan plazmid DNK restriksion endonukleazalar bilan qayta ishlashda va keyinchalik klonlashda yetarlicha toza hisoblanadi. Ajratib olingan plazmid DNKni keyingi tozalash uchun sentrifuga qilish mumkin.

Ishqoriy lizis metodining asosi bo'lib, ishqoriy muhitda chiziqli molekulyar DNK denaturatsiyaga uchraydi, plazmid DNK esa denaturatsiyaga uchramasligi hisoblanadi. Yuqori darajadagi tuzga ega bo'lgan hujayra ekstraktini neytrallaganda, denaturatsiyaga uchragan DNK xromosomasi cho'kmaga tushadi. Bitta zanjirli DNK molekulasi bir qancha uchastkalarda erimaydigan kompleks holida mavjud bo'ladi.

Detergent DCH ishlatilganda, hujayra RNKsi va oqsil ham cho'kmaga tushadi.

Xulosa qilib aytganda, plazmid DNKsini ajratish uchun ishqoriy usuldan foydalaniladi. Eksperiment davomida genom va plazmid DNK bo'lgan eritmani pHi ishqorliga almashtiriladi. Natijada eritmaning phi DNKni denaturatsiyaga uchratadi, lekin ikki zanjirli plazmid DNKsining zanjiri halqali formaga ega bo'lganligi uchun bir-biri bilan bo'g'liq holda qoladi. Eritma phi qayta o'z holiga keltirilganda genom DNKsi o'z holatiga qayta olmay, eritmada yoyilib ketadi. Plazmid DNK esa o'zgarishsiz avvalgi holatida qoladi. Endi plazmid DNKni sentrifuga qilib, ajratib olish mumkin.

1.4. Ajratib olingan DNK ni tozalash

Tozalash usullari

Hujayra ekstraktlaridan nuklein kislotalarni tozalash usullari odatda ikki va undan ortiq usullarning uyg'unligi bo'ladi

Bularga :

- cho`ktirish bilan tozalash
- xromatografiya
- sentrifugalash
- affin ajratish

Xar bir usul bilan tanishib chiqamiz. Erituvchilar tomonidan ekstraktsiya qilish plazmid DNKni turli aralashmalardan tozalash uchun ishlatiladi. Masalan, oqsillardan ajratish uchun fenol-xloroform erituvchilarining kombinatsiyasidan foydalaniladi. Izopropanol yoki etanol bilan cho`ktirish odatda plazmid DNKni kontsentrlash uchun qo`llanadi. Agar maqsadli plazmid DNKlar miqdori kam bo`lsa, aralashmaga pretsipitatsiya samarasini oshirish uchun inert tashuvchi (glikogen kabi) qo`shish kerak. Plazmid DNKlarni cho`ktirish usullarning boshqalari tuzlarning yuqori kontsentratsiyasidan foydalanish bilan selektiv pretsipitatsiya yoki almashinuv phdan foydalanish bilan oqsillarni cho`ktirishni o`z ichiga oladi.

Xromatografiya.

Xromatografiya usullari gel-filtratsiya, ionalmashinuv xromatografiya, selektiv adsorbtsiya, yoki affin bog`lanish kabi ajratish texnologiyalarni qo`llashi mumkin.

Gel-filtratsiya gelning g`ovak zarrachalariga xos bo`lgan molekulyar elak prinsipida asoslangan ma`lum o`lchamli matriks kichikroq o`lchamli molekulalarni diffuziya ta`sirida teshiklarga kirishini ta`minlaydi. Katta o`lchamli molekulalar esa poralardan o`tib erkin hajmda elyuirlanadi. Shunday qilib molekulalar ularning o`lchamining kamayishish tartibida elyuirlanadi.

Ion almashinuv xromatografiyasi- xromatografik kolonkada tashuvchining funksional guruhlari va maqsadli molekulalar o`rtasidagi elektrostatik munosabatlarda asoslangan tozalashning bir usulidir. Nuklein kislotalar(yuqori manfiy zaryad, chiziqli poli anion tutuvchi)ion almashinuv kolonkasidan oddiy tuzli buffer yordamida elyuirlanadi.

Adsorbsion xromatografiyada plazmid DNK selektiv ravishda kremniyli yoki shishali tashuvchida ma`lum tuzlar ishtirokida (xaoyrop tuzlar)

adsorbsiyalanadi. Bunday adsorbsiyaga boshqa biologik molekularlar qodir emas. Bu holda kuchsiz tuzli eritmalar yoki suv ishtirokida nuklein kislotalar elyuiranadi. Natijada olingan namunalar kelgusi amaliyotda bevosita ishlatilishi mumkin.

Sentrifugalash.

Selektiv sentrifugalash tozalashning kuchli usullaridan hisoblanadi. Masalan, katta tezlanishdagi sezir xloridning o'zi hosil bo'luvchi gradiyentlaridagi ultrasentrifugalash plazmidalarni tozalash uchun ishlatib kelinadi. Ko'pincha sentrifugalashni boshqa usullar bilan kombinatsiyada ishlatiladi. Aylanadigan kolonkali xromatografiya, gel-filtratsiya va sentrifugalashni o'z ichiga olib DNK yoki RNKlarni quyi molekulyar aralashmalar (tuz, nukleotidlar va bosh) dan tozalash uchun, buferni almashtirish va o'lcham bo'yicha seleksiya uchun ishlatiladi. Ayrim uslubiyotlar xromatografik matriksda selektiv adsorbsiya bilan sentrifugalardagi elyuirashni bitta turdagi nuklein kislotalarni selektiv tozalash uchun ishlatiladi.

Affin ajratish.

Oxirgi yillarda tozalashning ko'plab uslubiyotlari nuklein kislotalarning affin immobilizatsiyasi magnit ajratish bilan birgalikda amalga oshiriladi. Masalan, poly(A)+mRNK streptavidin bilan qoplangan magnit zarrachalarga nishonlangan biotinli oligonukleotidlar yordamida (oligo(dt)) yordamida bog'lanishi mumkin. So'ngra magnit yordamida zarrachalar majmuasi (bog'lanmagan aralashmalar kabi) eritmadan chiqarib tashlanishi mumkin. Qattiq fazali texnika nuklein kislotalarning tozalanishini soddalashtiradi. Chunki birgina magnit ajratish bosqichi bilan sentrifugalash, organik erituvchilar bilan ekstraksiyalash va fazali ajratish kabi bir muncha bosqichni o'rnini bosa oladi.

1.5 Fenol va xloroform bilan ekstraksiya

Ajratib olingan plazmid DNKni oqsillardan tozalash uchun fenol va xloroform bilan ekstraksiya qilinadi. Ularning 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 organic faza o'rtasida ingichka chiziqli ko'rinishida bo'ladi. Agar fenol va buferning phi neytral bo'lsa suvlida ham DNK va RNK bo'ladi. Agar fenol va buferning phi kislotali bo'lsa DNK organik fazaning pastki qismida, RNK esa suvli fazaning yuqori qismida bo'ladi.

Yuqorida aytilganidek, plazmid DNK fenol va xloroform bilan ekstraksiya qilish orqali tozalanadi. Bu usuldan RNK va hamma fermentlarni yo'q qilish va inaktivatsiya qilish uchun hamda keyingi bosqich bo'lgan klonlashga o'tish uchun qo'llaniladi. Agar nuklein kislotalar og'ir molekula aralashmasidan masalan, hujayra lizatlaridan ajratilayotgan bo'lsa unda qo'shimcha kuch talab qilinadi. Organic aralashmani ekstraksiya qilishdan oldin ko'pgina oqsillarni proteolitik fermentlar yordamida gidroliz qilinadi. Nuklein kislota eritmasida oqsillarni yo'q qilishning standart metodlaridan biri bu - birinchisi fenol va xloroformning 1:1 aralashmasi hisoblanadi. Ikkinchisi xloroformning aralashmasi hisoblanadi. Bu ikki hil muolajaning qo'llanilishi natijasida deproteinizatsiya yanada samaraliroq bo'ladi. Fenol oqsillarini aktiv denaturatsiya qiladi. Lekin u RNK-azani to'liq ingibirlamasligi natijasida RNK molekulalari erigan bo'ladi.

Bu 2 ta muammo (RNK va oqsilni yo'q qilish) fenol va xloroformning 1:1 aralashmasini ishlatish orqali hal qilinadi. Ohirgi ekstraksiya natijasi shuni ko'rsatadiki, xloroform nuklein kislota eritmasidagi fenol qoldiqlarini ham to'liq yo'q qiladi. Shuning uchun fenol va xloroformning 1:1 aralashmasini ishlatish yaxshi samara beradi.

1.6. Etanol yoki izopropil spirti yordamida konsentrlash

DNK ni konsentrlash uchun ko'p hollarda qo'llanilayotgan usullardan biri etanol bilan cho'ktirish hisoblanadi. DNK cho'kmasini 20° C yoki undan kam temperaturada kerakli konsentratsiyaga kelguncha mos buferda sentrifuga

qilinadi. Bu jarayonda eng tez va DNKning ko'p miqdorda ajralishi ro'y beradi, hattoki DNK nanogrammda bo'lsa ham.

DNKni cho'ktirish uchun, 2 hajm etanol o'rniga 1 hajm izopropanol olish mumkin. Bunday almashtirishning afzalligi shundaki, bunda kam hajmda sentrifuga qilish mumkin. Lekin izopropanol etanolga qaraganda kam uchuvchan, shuning uchun uning qoldiqlarini eritmadan yo'q qilish qiyinroq. Bundan tashqari -70°C da isopropanol qo'llanilishi naatriy xlor va saxarozani DNK bilan cho'kib qolishiga olib kelishi mumkin. Agar suyuqlikni kam miqdorda bo'lishi shart bo'lmasa, cho'ktirish jarayonini etanol bilan qilish samaraliroq. Etanol bilan cho'ktirilgan DNK yana osongina past ion kuchiga ega bo'lgan masalan, TE buferi bilan aralashib ketaveradi. Shuning uchun ham kam ion kuchiga ega kichik hajmli bufer bilan DNKni eritish mumkin. Keyin ion kuchini kerakli darajaga yetkazish mumkin. DNK cho'kmasini suv bilan ham aralashtirsa bo'ladi. Bu aralashmani -20°C da 6 oy saqlash mumkin. Agar DNKni klonlashda yoki PSRda ishlatmoqchi bo'lsak, uni suvda eritish ma'qul.

Foydalangan adabiyotlar:

1. O'zbekiston Respublikasi Prezidenti Islom Karimovning 2011 yilning asosiy yakunlari va 2012 yilda O'zbekistonni ijtimoiy – iqtisodiy rivojlantirishning ustuvor yo'nalishlariga bag'ishlangan O'zbekiston Respublikasi Vazirlar Maxkamasining majlisidagi «2012 YIL VATANIMIZ TARAQQIYOTINI YANGI BOSQICHGA KO'TARADIGAN YO'L BO'LADI» mavzusidagi ma'ruzasini o'rganish bo'yicha o'quv qollanma. Toshkent 2012 yil
2. Biotexnologiya asoslari ma'ruzalar matni. b.f.n . N.A Xo'jamshukurov. Toshkent -2008
2. Glaser, R. W., S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, and A. I. Sokirko. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers — formation and evolution of pores. *Biochimica Et Biophysica Acta* 940:275-287.
3. Melikov, K. C., V. A. Frolov, A. Shcherbakov, A. V. Samsonov, Y. A. Chizmadzhev, and L. V. Chernomordik. 2001. Voltage-induced nonconductive

pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. Biophys J 80:1829-1836.

11. Sukharev, S. I., V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, and Y. A. Chizmadzhev. 1992. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells — the effect of DNA interaction with electropores. Biophys J 63:1320-1327.

12. Безуглый А.П., 2008. Аквафорез – возможности неинвазивной мезотерапии. "Нувель эстертик" №6:170-179.

14 Т. Маниатис Э. Фрич. ДЖ. Сэмбрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва «мир» 1984

15. Biotexnologiya fanidan ma'ruza amatni. Qarshi davlat universiteti. Biologiya fanlari nomzodi I.Hayitov. Qarshi 2007

18. K. C. Melikov, V. A. Frolov, A. Shcherbakov, A. V. Samsonov, Y. A. Chizmadzhev and L. V. Chernomordik."Voltage-Induced Nonconductive Pre-Pores and Metastable Single Pores in Unmodified Planar Lipid Bilayer" Biophysical Journal. 80. (2001) 1829-1836.