

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА
МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ОЗИҚ-ОВҚАТ МАХСУЛОТЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИ
ФАКУЛТЕТИ**

БИОТЕХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСИ

МОЛЕКУЛЯР БИОЛОГИЯ

ФАНИДАН

РЕФЕРАТ

**МАВЗУ: ЎСИМЛИКЛАР ВА МИКРООРГАНИЗМЛАР ГЕН
ИНЖЕНЕРИЯСИ**

**Бажарди: Азимов Ш.
Текширди: Н.А.Хўjamшукуров**

Тошкент-2013

Режа:

1. Трансген ўсимликлар олиш босқичлари
2. Генни танлаш ва уни клонлаш.
3. Генни киритиш ва унинг реципиент ўсимлик геномидаги экспрессияси.
4. Трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.
5. Агробактериялар асосида ўсимликлар трансформацияси
6. Ўсимликлар ген муҳандислиги векторлари
7. Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари

Жинсий гибридизация ва танлашга асосланган анъанавий селекция усуллари ўсимликларнинг янги генотипларини олиш имкониятини беради. Улар йирик ҳажмдаги қишлоқ хўжалик экинларининг гибрид ва навлари, шунингдек, селекциянинг нодир нусхаларини олишни таъминлайди.

Рекомбинант ДНК лар технологияси прокариот, шунингдек эукариот келиб чиқишга эга генларни ажратиш, бу ген (ёки бир неча генлар) реципиент ўсимлик хромосомасига кўчириб ўтказиш ва унинг экспрессиясини таъминлашга шароит яратади. Бу технологияни қўллаш изланишни бирмунча аниқ мақсадли қилади ва генетик аппарат билан манипуляция қилиш имкониятларини кенгайтиради.

Ген муҳандислиги технологияси трансген ўсимлик олишнинг қуйидаги босқичларини ўз ичига олади: 1) генни танлаш ва уни клонлаш; 2) реципиент - ўсимлик генотипини танлаш; 3) генни киритиш ва унинг реципиент – ўсимлик геномига экспрессияси; 4) трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.

Генни танлаш ва уни клонлаш. Генни танлаш, ўсимликка хўжалик аҳамияти қимматли маълум бир белгини ўтказиш заруриятдан келиб чиқади. Ҳозирги вақтда, асосан, ўсимликлар трансформацияси учун моноген белгилар, яъни, пестицидларга чидамлилиқ, ёки бошқа хил стресс омилларга чидамлилиқни белгиловчи генлар кенг қўлланилади. Бу белгиларга жавобгар генларнинг кўпчилиги бактерия геномларидан ажратиб олинган. Кейинги вақтларда чидамлилиқ белгиларига жавобгар донор сифатида ёввойи ўсимлик турлари геномлари танланмоқда. Турли хил тур, авлод ва ҳатто оилаларга мансуб ўсимликларнинг биологик жиҳатдан бир-бирига мос келмаслиги сабабли бундай генларни реципиент ўсимликлар геномига жинсий гибридизация усули орқалигина киритиш мумкин эмас.

Реципиент ўсимлик генотипини танлаш. Реципиент сифатида ишлаб чиқариш амалиёти талабларига ҳосилдорлиги, уруғ - меваси сифати, биотик ва абиотик стрессларга чидамлилиги билан жавоб бера оладиган, лекин фақат биргина салбий белги, масалан, зараркунанда ҳашаротга чидамсиз нав ёки линиялар танлаб олинади. Бундай ўсимликлар геномига ҳашаротларни нобуд қилувчи прототоксин оксили экспрессиясини таъминловчи в *bt2* бактерия генини киритиш танлаб олинган навда ҳосилдорликни сезиларли ошишига сабаб бўлади. Шунингдек, реципиент ўсимлик генотипини танлашда хужайраларнинг яхлит (фертил) етук ўсимликка қадар регенерация қилиш хусусияти ҳам инобатга олинади, чунки бу белги генотипга ҳам бир қадар боғлиқдир.

Генни киритиш ва унинг реципиент ўсимлик геномидаги экспрессияси. Ўсимликлар геномига бегона генларни кўчириб ўтказиш муаммоси бегона генларни икки паллали ва баъзи бир паллали ўсимликлар геномига кўчириб ўтказиш имконини берувчи тупроқ агробактериялари *Agrobacterium tumefaciens* таркибидаги *Ti* – плазмидларининг аниқланиши билан бирмунча енгиллашди. Сўнгги вақтларда ўсимлик хужайралари трансформациясида биобаллистик трансформация усули, айниқса, бир паллали ўсимликлар учун кенг қўлланилмоқда.

Трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш. Трансформант хужайралардан етук ўсимликни регенерация бўлиши хужайралар тотипотентлигига боғлиқ, аммо бу ҳар доим ҳам амалга ошавермайди. Тотипотентлик белгиси икки паллали ўсимликлар: тамаки, картошка, лавлаги, соя, рапс, беда, помидор, сабзи, карам ва баъзи мевали дарахтларда яққол ифодаланган. Бир паллалилар, айниқса, бошоқдошларда бу белги кучсиз ифодаланган бўлиб, уларда хужайрадан етук ўсимликни регенерацияси жараёни жуда қийинчиликлар билан кечади. Ҳозирги вақтда ғалла экинларига мансуб баъзи ўсимликлар маккажўхори, шоли, бугдой, сули кабиларни регенерация қилиш усуллари ишлаб чиқилган.

Агробактериялар асосида ўсимликлар трансформацияси. Баъзи тупроқ бактериялари турлари (*Agrobacteria*)нинг икки паллали ўсимликларни зарарлаши ва бунда ўзига хос шиш – гардишсимон бўртма ҳосил қилиши олдиндан маълум эди. Бу шишлар

зарарланган жойда мунтазам равишда бўлиниб ўсадиган дедифференциаллашган хужайралардан ташкил топган. In vitro шароитида ўстирилганда шиш хужайралари нормал ўсимлик хужайралари ўсиши учун зарур гормонлар учрамайдиган муҳитда ҳам ўса оладилар. Агар зарарлантирилгандан сўнг барча агробактерияларни антибиотиклар қўшиб инактивация қилинса ҳам шиш хужайралари тартибсиз (назорат қилинмайдиган) бўлиниш хусусиятини сақлаб қоладилар. Шиш ҳосил қилувчи кучли индукторлардан бири *Agrobacterium tumefaciens* мисолида шиш чақирувчи восита Ti – плазмида деб номланган (инглиз тилидан Tumor inducing – шиш чақирувчи) махсус плазмида бўлиб, унинг бир қисми ўсимлик хужайраси хромосомасига ўрнашиб олиши аниқланган

Т-ДНК нинг ўсимлик хромосомасига интеграцияси ва (гардишсимон) шиш ҳосил бўлиши. Ti – плазмида узунлиги 200 м.н.ж (минг нуклеотид жуфт) дан иборат ҳалқасимон ДНК дан ташкил топган. У бактерия хужайраларида автоном репликация бўла олиш хусусиятига эга. Ti – плазмидаларни улар синтезлайдиган опинлар типига кўра 4 та гуруҳга бўлиши мумкин. Кўпинча нопалин ёки октопин аминокислоталарини кодирлайдиган Ti – плазмидалар учрайди. Агробактерия хужайраси плазмидаларнинг фақат бири октопин ёки нопалин кодирлайдиган типини сақлаши мумкин.

Агробактериялар ёрдамида ўсимликлар трансформацияси амалга оширилиши учун учун ушта шарт бажарилиши лозим:

1. Бактерия хужайраси юзасида бактериянинг ўсимлик хужайраси билан бирикиши учун зарур махсус полисахаридлар синтезини амалга оширувчи тўртта генни агробактериялар хромосомасидаги фаоллашуви;
2. Ti – плазмиданинг *vir* –худуди, яъни ДНК нинг ўсимлик хужайраси ядросига кўчириб ўтказилиши инициацияси учун зарур қисмининг фаоллашуви;
3. Т-ДНК нинг мавжуд бўлиши.

Коинтегратив векторлар. Керакли генни клонлаш учун ёрдамчи (оралиқ) вектор сифатида E. соли асосидаги плазмидалардан фойдаланилади. Уларга Т-ДНК нинг чегараланган Т-ДНК кетма-кетликлари фрагменти ва селектив (одатда, антибиотиклар канамицин, гигромицин ёки гербицидга) чидамлилиқ белгисини кодирлайдиган гени жойлаштирилади, бу эса келгусида трансген ўсимликларни танлашни амалга ошириш имконини беради. Бундай вектор кичик ҳажмга эга, ундан Т-ДНК худудига керакли ген кетма – кетлигини улаб, клонлаш мақсадида фойдаланилади.

Конъюгация йўли билан бундай оралиқ векторни ўсимлик геномига Т-ДНК қисмининг интеграцияси учун зарур бўлган генларни сақлайдиган бошқа векторга эга махсус *Agrobacterium tumefaciens* штамми хужайраларига кўчириб ўтказилади. Бу вектор муайян ўлчамга эга ва у Ti – плазмиданинг *vir*-худуди, Т-ДНК нинг чегараланган кетма-кетликларига эга ва оралиқ векторларга аналогик pVP322 плазмидаси фрагментларидан ташкил топган. Конъюгациядан сўнг иккала векторнинг гомологик қисмлари ўртасида рекомбинация амалга ошади, бунинг натижасида оралиқ векторнинг керакли ген ва селектив маркер тутувчи қисми *vir*- худуди ва Т-ДНК нинг чегаланган кетма-кетликлари билан бирга иккинчи векторга кўчириб ўтказилади. Шундай қилиб, иккита плазмида ўртасидаги рекомбинация натижасида коинтегратив вектор олинади. Бундай коинтегратив векторга эга агробактерия хужайралари селектив озика муҳитларида танлаб олинади ва келгусида ўсимликлар трансформацияси учун қўлланилади.

ДНК сақловчи вируслар асосидаги ўсимлик векторлари. Ўсимликларни зарарловчи вирусларнинг фақат 1-2 % игина ДНК сақловчи бўлади. Айнан улар рекомбинант ДНК олиш технологиясида қўллаш учун жуда қулай ва ўсимликларга генларни кўчириб ўтказувчи векторлар учун асосий воситалар ҳисобланади. Бу борада карамгулдошлар оиласига мансуб ўсимликларни зарарлайдиган гулкарамнинг CaMV (cauliflower mosaic virus) мозаика вируси энг истикболли бўлиб ҳисобланади. Бу вирус қисмлари диаметри 50 нм атрофида бўлиб, 8000 ж.н. узунлиқдаги ҳалқасимон ДНК тутати. CaMV геномининг катта бўлмаган ҳажми билан худди бактерия плазмидаси

сингари вирус ДНК си билан *in vitro* шароитида ишлаш имкони мавжуд ва уни ўсимлик баргига ишқалаш орқали киритиш мумкин.

Кўчиб юрувчи генетик элементлар (транспозонлар) асосидаги векторлар. 1990-йилларда ўсимлик хужайралари трансформацияси учун ўзига хос тузилишига эга ва геном бўйлаб транспозиция бўла оладиган ДНК кетма-кетликлардан иборат кўчиб юрувчи генетик элементлар асосидаги векторлардан фойдаланила бошланди. Мазкур усулнинг моҳияти шундаки, кўчиб юрувчи генетик элементлар ўсимлик хромосомасига бирламчи интеграциясидан сўнг қирқиш ва кетма-кет жойланиш йўли билан геном бўйлаб ўрнашиб олади. Ўсимликлар учун *Ac/Ds* векторлар тизими кенг қўлланилади.

Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари қуйидагилар:

Ўсимликларга генларни тўғридан - тўғри кўчириб ўтказиш.

ДНК микроинъекцияси.

Электропорация.

Липосомаларга жойлаштириш.

Биобаллистик трансформациялар усули.

Ўсимликлар трансформациясининг далиллари. Ўсимликлар трансформацияси векторлари таркибига функционал гендан ташқари селектив нишон генлари киради. Бу ген одатда антибиотиклар канамицин (*nptII* -гени) ёки гигромицин (*nptII*- гени) га чидамлилиқ генларини кодирлайди, шунинг учун трансген ўсимликларни дастлабки танлов ишларини тегишли антибиотиклар сақловчи озиқа муҳитларида олиб борилади. Бундай муҳитда геноми таркибида селектив нишон гени бўлган ўсимликларгина регенерация қила олади. Бироқ селектив муҳитда ўса олиш хусусиятининг ўзи ўсимликнинг трансген табиатини исботловчи ягона далил бўла олмайди.

Т-ДНК кетма-кетликлари борлигини тўлиқ исботлашда полимераза занжир реакцияси (ПЗР) таҳлили ва Т-ДНК бўлагини радиоактив зонд сифатида қўллаш орқали трансген ўсимлик хромосома ДНК сининг блот – гибридизациясига асосланган молекуляр таҳлили ўтказилади. Бундай таҳлилларни ўтказиш жуда қиммат турса-да, олинган натижалар трансформация амалга ошганлиги, Т-ДНК – конструкцияларнинг қанчаси ўсимлик геномига ўрнаша олганлиги тўғрисида ишончли маълумот олиш имконини беради.

Ўсимлик геномига бегона генларнинг экспрессияси Бегона генларнинг ўсимлик геномига экспрессияси натижасида бир қатор муаммолар келиб чиқади. Биринчи марта ўсимликлар трансформацияси учун фойдаланиладиган генлар бактериялардан ажратиб олинган бўлиб, уларни ўсимлик хужайралари трансформацияси учун тўғридан – тўғри ишлатиб бўлмасди.

Бактерия генлари эукариот хужайраларда транскрипция бўлиши учун уларнинг промотор кетма-кетликларини ўсимлик генлари промоторлари ёки бошқа ўсимлик хужайрасида транскрипцияни иницация қила оладиган промоторларига алмаштириш лозим бўлади.

Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш Ўтган асрнинг 1970 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) муҳандислик яратилди. Бу усулнинг асосида хужайрадан 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 эга бўлган оксил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оксиллар муҳандислиги деб аталади.

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

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

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

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

Ишлаш учун эса, уларни бактериядан ажратиш, бактерия генини бошқарувчиси (регулятори) билан жиҳозлаш ва қайтадан бактерияга киритиш зарур. Бугунги кунда ҳар хил генлар сақловчи ва керакли маҳсулот синтез қилувчи бир қатор трансген бактериялар яратилган ва муваффақият билан ишлатилиб келинмоқда. 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 этади.

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

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР

1. Антипова Л.В., Глотова И.А., Жаринов А.И. Прикладная биотехнология: УИРС для специальности 270900: Учеб. пособие для вузов. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2000. -420 с
2. Бекер М.Е., Лиепиныш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. – 284 с.
3. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн./Под. ред. Н.С.Егорова., В.Д.Самуилова. М.: Высшая школа, 1997. – 228 с.
4. Волова Г. Биотехнология. Изд-во отделения Российской Академии наук. 1999. – 252 с.
5. Глазер В.М., Зинченко В.В, Каменева С.В., Шестаков С.В. Большой практикум по генетике микроорганизмов. Изд. Московского университета, 1985, 94.
6. Евтушенков А.Н. Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию. Изд. БелГУ, 2002. -104 с.
7. Ефимова М.В. Введение в прикладную биотехнологию. Изд.: Петропавловск-Камчатский. 2004. -96 с.
8. Карпинская Р. Фило-софские проблемы молекуляр-ной биологии. М.: Мысль. 1971. – 230 с.
9. Картель Н.А. Биоинженерия: методы и возможности «Ураджай», Минск, 1989, 141.
10. Кильчевский А., Нинонович Г., Французенов В., Ермоленнов В., Воробьева Е. Сельскохозяйст-венная биотехнология. Изд. Горкий. 1999. – 24 с.
11. Ковалева Т. Биотехнология. Часть 1. Физико-химические свойства ферментов. Воронеж. 2001. – 78 с.
12. Лавлес А. Генетические эффекты алкилирующих соединений. М.: Наука. 1970. -254 с.
13. Уотсон Дж., Курц А., Туз Р. Рекомбинантные ДНК. Москва. «Мир», 1986, 259
14. Алимухамедов М. Юқори молекулали бирикмаларнинг кимёси ва физикаси. Т.: ТКТИ. 2000. – 125 б.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование Москва. Мир. 1984. 477
16. Ковалева Т. Биотехнология. Часть 1. Физико-химические свойства ферментов. Воронеж. 2001. – 78 с
17. Б.Альбертс, Д.Брей, Д.Льюис, М.Рэфф, К. Робертс, Д.Уотсон. Молекулярная биология клетки. Изд, Мир., 1986, 224
18. Глик Б., Пастернак Дж. [Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.](#) Мир, 2002, 589.
1. www.molbiol.ru
2. www.biotex.com
3. www.ziyonet.uz
4. www.molbio.com