

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**ОЛИЙ ТАЪЛИМ ТИЗИМИ ПЕДАГОГ ВА РАЎБАР КАДРЛАРИНИ
ҚАЙТА ТАЙЁРЛАШ ВА УЛАРНИНГ МАЛАКАСИНИ ОШИРИШНИ
ТАШКИЛ ЭТИШ БОШ ИЛМИЙ - МЕТОДИК МАРКАЗИ**

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ПЕДАГОГ
КАДРЛАРНИ ҚАЙТА ТАЙЁРЛАШ ВА УЛАРНИНГ МАЛАКАСИНИ
ОШИРИШ ТАРМОҚ (МИНТАҚАВИЙ) МАРКАЗИ**

“БИОЛОГИЯ”

йўналиши

“МОЛЕКУЛЯР ЗООЛОГИЯ”

модули бўйича

Ў Қ У В – У С Л У Б И Й М А Ж М У А

Тошкент – 2016

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**ОЛИЙ ТАЪЛИМ ТИЗИМИ ПЕДАГОГ ВА РАЎБАР КАДРЛАРИНИ
ҚАЙТА ТАЙЁРЛАШ ВА УЛАРИНИГ МАЛАКАСИНИ ОШИРИШНИ
ТАШКИЛ ЭТИШ БОШ ИЛМИЙ - МЕТОДИК МАРКАЗИ**

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ПЕДАГОГ
КАДРЛАРНИ ҚАЙТА ТАЙЁРЛАШ ВА УЛАРИНИГ МАЛАКАСИНИ
ОШИРИШ ТАРМОҚ (МИНТАҚАВИЙ) МАРКАЗИ**

“МОЛЕКУЛЯР ЗООЛОГИЯ”

модули бўйича

Ў Қ У В – У С Л У Б И Й М А Ж М У А

Тошкент – 2016

Мазкур ўқув-услугий мажмуа Олий ва ўрта махсус таълим вазирлигининг 2016 йил 6 апрелидаги 137-сонли буйруғи билан тасдиқланган ўқув режа ва дастур асосида тайёрланди.

Тузувчи:

ЎзМУ, б.ф.н.,
А.Э.Кучбоев

Такризчи:

Byoung Ryong Jeong
Professor and Doctor of
Philosophy in Horticulture
Department of Horticulture
Gyeongsang National University
Republic of Korea

Ўқув -услугий мажмуа ЎзМУнинг Университет Кенгашининг 2016 йил 7-сентябрдаги 1-сонли қарори билан нашрга тавсия қилинган.

МУНДАРИЖА

I. ИШЧИ ДАСТУР.....	4
II. МОДУЛНИ ЎҚИТИШДА ФОЙДАЛАНИЛАДИГАН ИНТРЕФАОЛ ТАЪЛИМ МЕТОДЛАРИ.	12
III. НАЗАРИЙ МАШҒУЛОТ МАТЕРИАЛЛАРИ	15
IV. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР МАТЕРИАЛЛАРИ	69
V. КЕЙСЛАР БАНКИ.....	73
VI. МУСТАҚИЛ ТАЪЛИМ МАВЗУЛАРИ	76
VII. ГЛОССАРИЙ	77
VIII. АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ	84

I. ИШЧИ ДАСТУР

Кириш

Мазкур дастур ривожланган хорижий давлатларнинг олий таълим соҳасида эришган ютуқлари ҳамда орттирган тажрибалари асосида “Биологтя” қайта тайёрлаш ва малака ошириш йўналиши учун тайёрланган намунавий ўқув режа ҳамда дастур мазмунидан келиб чиққан ҳолда тузилган бўлиб, у замонавий талаблар асосида қайта тайёрлаш ва малака ошириш жараёнларининг мазмунини такомиллаштириш ҳамда олий таълим муассасалари педагог кадрларининг касбий компетентлигини мунтазам ошириб боришни мақсад қилади.

Жамият тараққиёти нафақат мамлакат иқтисодий салоҳиятининг юксаклиги билан, балки бу салоҳият ҳар бир инсоннинг камол топиши ва уйғун ривожланишига қанчалик йўналтирилганлиги, инновацияларни тадбиқ этилганлиги билан ҳам ўлчанади. Демак, таълим тизими самарадорлигини ошириш, педагогларни замонавий билим ҳамда амалий кўникма ва малакалар билан қуроллантириш, чет эл илғор тажрибаларини ўрганиш ва таълим амалиётига тадбиқ этиш бугунги куннинг долзарб вазифасидир. “Молекуляр зоология” модули айнан мана шу йўналишдаги масалаларни ҳал этишга қаратилган.

Ундан ташқари, бу йўналишдаги халқаро ва Ўзбекистонда олиб борилаётган илмий тадқиқотлар ва уларнинг аҳамияти тўғрисида маълумот берилади. Ўрганилаётган турлар нуклеотидлар кетма-кетлигини халқаро генбанк базасига (NCBI) жойлаштириш қондаси ва йўллари таништирилади.

Модулнинг мақсади ва вазифалари

“Молекуляр зоология” модулининг мақсади: педагог кадрларни қайта тайёрлаш ва малака ошириш курси тингловчиларини ҳайвонлар геносистематикасига оид маълумотларни бериш, уни бажаришнинг илмий-методик ва амалий жиҳатлари билан таништириш, илмий-тадқиқот лабораторияси шароитида уни амалга оширишнинг шарт шароитлари билан танишадилар.

Тингловчилар ушбу фанни ўзлаштириш борасида ҳайвонлар тўқимасидан геном ДНК ажратиш, ПЦР-амплификация ўтқозиш шарт-шароитлари ва мақсади, гель-электрофорез орқали рДНК ва мтДНК концентрацияси аниқлаш, ПЦР маҳсулотларини тозалаш, секвенирлашга бериш, олинган нуклеотидлар кетма-кетлиги Bioedit дастурида тўғрилаш, таҳлил учун танланган кетма-кетликларни тузиш, ClustalW дастурлари ёрдамида нуклеотидлар кетма-кетлигини текислаш ишларини олиб бориш, генбанк базаси маълумотлари билан солиштириш, олинган натижалар асосида турнинг аниқлаш ёки янги тур ҳақида маълумот берилади.

Шу сабабли педагог кадрларни қайта тайёрлаш ва малака ошириш курси тингловчиларига нанозаррачалардан турларни аниқлашда молекуляр таксономия усулидан кенг фойдаланиш йўллари очиқ бериш ва бу фанни биология ва бошқа турдош фанлар соҳаларида педагог кадрларни қайта тайёрлаш ва малака ошириш курсида билим олаётган тингловчиларга ўргатиш

замон талабига мувофиқлиги билан ажратиб туради.

Модул бўйича тингловчиларнинг билими, кўникмаси, малакаси ва компетенцияларига қўйиладиган талаблар.

“Молекуляр зоология” курсини ўзлаштириш жараёнида амалга ошириладиган масалалар доирасида:

Тингловчи:

- ҳозирги замон ҳайвонлар молекуляр таксономияси, систематикаси ва филогенетикаси оид маълумотлар;
- ПЦР-амплификация ўтказиш шарт-шароитлари ва мақсади;
- гел-электрофорез ўтказиш;
- ПЦР маҳсулотларини тозалаш, секвенирлашга бериш;
- олинган нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида турларни идентификация қилиш;
- турли программаларда филогенетик дарахтни тузиш ва ундан фойдаланиш;
- олинган нуклеотидлар кетма-кетлигини ҳалқаро Генбанк жойлаштириш каби **билимларга эга бўлиши;**

Тингловчи:

- ҳайвонлар тўқимасидан геном ДНК ажратиш;
- ПЦР-амплификация ўтказиш;
- гел-электрофорез қўйиш;
- олинган нуклеотидлар кетма-кетлиги бўйича Blast дастури орқали (NCBI) турларни идентификация қилиш **кўникма ва малакаларини эгаллаши;**

Тингловчи:

- “молекуляр таксономия” услуги орқали бахсли ва янги турларни аниқлаш;
- Филогенетик дарахт тузиш ва турларни молекуляр филогениясини ўрганиш каби **компетенцияларни эгаллаши лозим.**

Модулни ташкил этиш ва ўтказиш бўйича тавсиялар.

“Мобил иловалар яратиш” курси маъруза ва амалий машғулотлар шаклида олиб борилади.

Курсни ўқитиш жараёнида таълимнинг замонавий методлари, педагогик технологиялар ва ахборот-коммуникация технологиялари қўлланилиши назарда тутилган:

- маъруза дарсларида замонавий компьютер технологиялари ёрдамида презентацион такдимот ва электрон-дидактик технологиялардан;
- ўтказиладиган амалий машғулотларда техник воситалардан, экспресс-сўровлар, тест сўровлари, ақлий ҳужум, гуруҳли фикрлаш, кичик гуруҳлар

билан ишлаш, коллоквиум ўтказиш, ва бошқа интерактив таълим усуллари қўллаш назарда тутилади.

Модулнинг ўқув режадаги бошқа модуллар билан боғлиқлиги ва узвийлиги.

“Молекуляр зоология” фанини ўзлаштиришда педагог кадрларни қайта тайёрлаш ва малака ошириш курси тингловчилари биологиядан: зоология, паразитология, ботаника, генетика, молекуляр биология, биохимия ва физиология қонунлари ҳақида тушунчага эга бўлишлари керак. Зоологиядан турларнинг биологик хилма-хиллиги, турлар ичидаги полиморфизм муаммоси, систематикаси; биохимиядан - ферментатив реакциялар механизмлари, ишлаш жараёнлари; хужайра биологиясидан - хужайра тузилиши, хужайрада асосий жараёнларнинг кечиши, хужайраларнинг кўпайиши; молекуляр биологиядан - ДНК ва РНК тузилиши, интрогрессия, транскрипция, трансляция қонунлари, рибосомалар тузилиши, генетик код структура элементлари ҳақида етарли билимга эга бўлишлари шарт.

Модулнинг олий таълимдаги ўрни

Модулни ўзлаштириш орқали тингловчилар замонавий “молекуляр зоология”, яъни ҳайвонлар геносистематикаси усулини ўрнини ўрганиш, таҳлил этиш, амалда қўллаш ва баҳолашга доир касбий компетентликка эга бўладилар.

“Молекуляр зоология” модули бўйича соатлар тақсимоти

№	Модул мавзулари	Тингловчининг ўқув юклараси, соат					
		Ҳаммаси	Аудитория ўқув юклараси				Мустақил таълим
			Жами	жумладан			
				Назарий	Амалий машғулот	кўчма машғулот	
1.	Зоология фани ва тамойиллари. Ҳайвонлар биологик хилма-хиллигини ўрганишда молекуляр-генетик усуллари қўллаш. Умурткасизлар молекуляр систематикаси ва таксономиясини ўрганишда дунёда ва Ўзбекистонда бўйича олиб борилаётган илмий тадқиқотлар.	4	6	2	2	2	
2.	Молекуляр-генетик таҳлиллар учун зоологик намуналарни йиғиш талаблари. Геном ДНКсини ажратиш. Амплификация - ПЗР услубини асосий тушунчаси. ПЗР-амплификация.	8	6	2	4		2
3.	Агароза гелида электрофорез усулини асосий тушунчаси. Рибосомал ва митохондриял ДНК тозалаш.	4	6	2	2	2	
4.	Секвенирлаш – ДНКнинг бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш. Нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида организмни идентификация қилиш.	4	4	2	2		
5.	Филогенетик дарахтни тузиш. Нуклеотидлар кетма-	6	4	2	2		2

кетлигини Генбанк (NCBI) базасига жойлаштириш. ДНК – диагностика (ПЦР усули)						
Жами:	30	26	10	12	4	4

НАЗАРИЙ МАШҒУЛОТЛАР МАЗМУНИ

1-мавзу: Зоология фани ва тамойиллари. Ҳайвонлар биохилма-хиллигини ўрганишда молекуляр-генетик усулларни қўллаш. Умуртқасизлар молекуляр таксономиясини ўрганишда дунёда ва Ўзбекистонда бўйича олиб борилаётган илмий тадқиқотлар.

Кириш. «Биохилма-хиллик» тушунчасини аниқлаш. Турлар хилма-хиллиги. Бахсли турлар. Турлар ичидаги полиморфизм. Геносистематика, биохилма-хилликни ўрганишдаги молекуляр-генетик усуллар тарихи. ДНК-штрихкодлаш. Молекуляр таҳлилларда қўлланиладиган маркерлар, ядро генлари. Умуртқасизлар молекуляр систематикаси ва таксономиясини ўрганишда дунёда ва Ўзбекистонда бўйича олиб борилаётган тадқиқотлар.

2-мавзу: Молекуляр-генетик таҳлилларда учун зоологик намуналарни йиғиш талаблари. Геном ДНКсини ажратиш. Амплификация - ПЗР услубини асосий тушунчаси. ПЗР-амплификация.

Молекуляр-генетик таҳлилларда зоологик намуналарни йиғиш талаблари. Стандарт фенол-хлороформ ва коммерцияли реагент тўпламлари ёрдамида умуртқасизлар намунасида геном ДНКсини ажратиш. ПЗР-амплификация ўтқизиш. ПЗР учун керакли митохондриял ва ядро праймерларини танлаш. ПЗР режими.

3-мавзу: Агароза гелида электрофорез усулини асосий тушунчаси. Рибосомал ва митохондриял ДНКсини тозалаш.

Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтқизиш. ДНК концентрациясини ўлчаш. ДНК тозалаш тўпламлари ёрдамида агароза гели ва реакция аралашмасидаги ДНКни ажратиш.

4-мавзу: Секвенирлаш – ДНКнинг бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш. Нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида организмни идентификация қилиш.

ПЗР-амплификациянинг асимметрик реакциясини флуоресцент нишонли нуклеотидлар ёрдамида ташкил этиш (секвенирлаш реакцияси) (2 режага қаранг). ПЗР-амплификация реакциясидаги асимметрик фрагментларни тозалаш. Blastn программаси ёрдамида кўплаб текислаш ишларини олиб бориш. Таҳлил учун танланган кетма-кетликларни тузиш. ClustalW, Bioedit программалари ёрдамида нуклеотидлар кетма-кетлигини текислаш ишларини олиб бориш

5-мавзу: Филогенетик дарахтни тузиш. Нуклеотидлар кетма-кетлигини ни генбанк (NCBI) базасига жойлаштириш. ДНК – диагностика (ПЦР усули).

Филогенетик дарахтни тузишда MEGA-5 программасида кўпроқ ҳақиқатга ўхшашлик усули (maximal likelihood), максимал иқтисод (maximal parsimony), чамалаб кўрилган ўртача жуфтлик (UPGMA) ва яқин қўшнилар (Neighbor-joining) дастурлари орқали текшириш. Олинган нуклеотидлар кетма-кетлигини халқаро Генбанк (NCBI) жойлаштириш. Ҳайвонлар паразитларни экспресс-ташхис усули (ПЦР технологияси).

АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР МАЗМУНИ

Ўқув машғулотларни ташкил этиш бўйича ЎЗР ФА Ўсимлик ва ҳайвонот олами Молекуляр биология ва биотехнология лабораторияси илмий ходимлари томонидан кўрсатма ва тавсиялар ишлаб чиқилади. Унда педагог кадрларни қайта тайёрлаш ва малака ошириш курси тингловчилари асосий маъруза мавзулари бўйича олган билим ва кўникмаларини машғулотлар олиб бориш жараёнида янада бойитадилар. Шунингдек, дарслик ва ўқув қўлланмалар асосида тингловчилар билимларини мустақамлашга эришиш, тарқатма материаллардан фойдаланиш, илмий мақолалар ва тезисларни тайёрлаш орқали тингловчилар билимини ошириш, мавзулар бўйича кўргазмаларни қуроллар тайёрлаш ва бошқалар тавсия этилади.

1-амалий машғулот:

Умurtқасиз ҳайвонлар тўқимасидан геном ДНКсини стандарт ва Diatom DNA тўпламидан фойдаланган ҳолда ажратиш.

Diatom DNA Prep (Россия) реагентлари тўплами ёрдамида ДНК ажратиш услуги. Бу тўплам ДНКни турли табиий материаллардан ажратиш, шунингдек клиник намуналардан ДНКни тез тозалаб олиш имконини беради. Бу усул ФХ – услубдан жадаллиги (1та намунага 30 мин. – 1,5 вақт сарфланади), токсик (заҳарли) реагентларнинг ишлатилмаслиги билан ажралиб туради. Таъсир қилиш механизми гуанидинтиоционатли лизис қилувчи реагентнинг ишлатилишига асосланган бўлиб, у ҳужайрани лизисига, ҳужайра солюбилизациясига, шунингдек ҳужайра нуклеазали денатурацияга олиб келади. Лизис қилувчи (парчалоувчи) – реагент иштирокида ДНК NucleosTM – сорбент тўпламида фаол сўрилади, сўнгра спиртли эритмада оқсил ва тузлардан осон ювилади. Сорбентдан ажратилган ДНКни ПЗР да ишлатиш мумкин. Тўпламни таркиби: парчалоувчи реагент, тузли буфер Nucleos сорбентининг суспензияси, “Экстра Ген” ион алмашинувчи аралашма суспензияси. Diatom DNA Prep 200 реагентлар тўплами ёрдамида нематодаларнинг тўқималаридан ДНКни ажратиш услуги қуйидаги босқичларни ўз ичига олади. Бу тўплам йўриқномасида кўрсатилган.

**2-амалий машғулот:
ПЗР реакциясини ўтқозиш.**

ПЗР қўйиш учун ажратилган ДНК намуналарга етарли (0,5 мкл) эппендорф пробиркаси ва шу эппендорфларга мос штативлардан фойдаланилди. Реакция аралашмасини тайёрлашда «Евроген» фирмасида ишлаб чиқарилган эритмалардан фойдаланилди. Бу реактивлар сув (тозаланган), 10x буфер, dNTP эритмаси, 50x TAG-полимераза ҳамда шу фирмада ишлаб чиқарилган нематодалар учун мос праймерлардан фойдаланилди. Бу материаллар асосида ПЗР учун аралашма (Master-mix) тайёрланади. Аралашма тайёрлашда 10 мкл ва 200 мкл пипеткалардан фойдаланилди.

**3-амалий машғулот:
Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтқозиш.**

ПЗР маҳсулотларида ДНКнинг мавжудлигини электрофорез килиш усули орқали аниқлаш мумкин. 1% агароза гель тайёрлашда 1 г агарозани 250 мл колбага солинди ва устига 100 мл ТАЕ (Tris-acetate, edta) аралашмаси солиб қўл билан агароза эригунча аралаштирилди. Микроволновка печкаси ёрдамида 2-3 дақиқа қайнатилди ва аралашманинг ҳарорати 45-50°C етгунча хона температурасида совутилди. Сўнг 3 мкл этидий бромисти аралашмаси солинди. Тайёр бўлган аралашмани 10 ёки 15та катакчадан иборат тароқ (гребёнка)га солинди ва гель қотгунча сақланди. Гель қотганга қадар 25 мкл ли ПЗР маҳсулотларидан 4 мклдан олиб 1 мкл бўёқ билан аралаштирилади. Қотган гель ТАЕ аралашмаси билан тўлдирилган камерага солинди ва гель катакчаларини ҳар бирига ПЗР аралашмаси солинди ҳамда катакчани охиригисига маркёр («DNA Ladder» – бу 1000 bp Ladder фирмаси “Fermentas” ДНК ни неча жуфт нуклеотид ўқитилганини билдиради). Камерада 45 дақиқа 80-100 вольт, 100 миллиампер кучланиш билан ДНК ҳайдалди. Электрофорез тугагандан сўнг камерадан гелни эҳтиёткорлик билан олиб, трансиллюминаторда кўз билан кўриб текширилди ва расмга олинди.

**4-амалий машғулот:
ClustalW, Bioedit программалари ёрдамида нуклеотидлар кетма-кетлигини текислаш ишларини олиб бориш.**

Сиквенсдан келган маълумотларни текислашда «Chromas version 1.45» (McCarthy, 1996 – 1998), «Clustal X version 1.81» (Thompson, Gibson, 2000), «Gendoc version 2. 5. 000» (Nicholas, 1999), «ForCon version 1.0 for Windows» (Raes, Van de Peer, 1996), PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998) биоинформатик дастурлардан фойдаланилади.

BioEdit – кетма-кетликларни тўғриловчи биологик таҳрир бўлиб, Windows 95/98 / NT / 2000 / XP / 7 ёзилган. Иш столи компютерида интуитив интерфейс билан бир қанча документларни қулай функциялари билан кетма-кетликларни тўғрилаш ва манипуляция қилиш каби функцияларни бажариш учун нисбатан осондир. Кетма-кетликлар вариантлари ва бир неча

манипуляциялар, ташқи манбаларни дастур лойиҳаларини жараёнини енгилаштиришда, кетма-кетликларга кириш ва манипуляциялашда нуқта ва кнопкаларга тегиш каби оддий операцияларни бажариш имконини беради.

**5-амалий машғулот:
BLAST (NCBI) – ишлаш.**

Объект ДНКсининг бу соҳаси кетма-кетлиги маълум бўлгач, уни маълумотлар базаси (NCBI) билан солиштирилади, қайсики объектнинг бу кетма-кетлиги бошқа барча турлар солиштирилади ва ўрганилаётган тур тезда аниқланади. Агарда кетма-кетлик базадаги мавжуд бирор бир тўғри келмаса, демак бу янги тур, яъни номаълум тур топилганидан дарак беради. Ҳайвонларнинг шундай соҳаси ўрганиш мақсадида митохондриал ёки ядро геннинг фрагментлари танланди.

**6-амалий машғулот:
Филогенетик дарахт тузиш (MEGA-5).**

Филогенетик таҳлил - BLAST ёки MSA учун аниқ бўлмаган кетма-кетликлар ўртасидаги муносабатларни аниқ кўрсата оладиган шохланган диаграммаларни ярата олади. Филогенетик дарахт, шубҳасиз, эволюциянинг ўзаро алоқаларини ва дивергенция модулига мўлжалланган эволюцион ва қиёсий тадқиқотларни учун фойдали ҳамда молекуляр ва биохимик тадқиқотларда ген ёки оксил функциялари тўғрисида гипотезанинг генерациясида муҳим ҳисобланади. Филогения катта соҳа ҳисобланиб, ўз-ўзидан бутун бир курсни эгаллайди. Мақсад фақат филогенетик дарахт тузишдан ташқари, балки “қирқиш ва қўйиш” принципларини тушуниш ва билиш керак бўлади.

ЎҚИТИШ ШАКЛИ

Мазкур модул бўйича қуйидаги ўқитиш шаклларидадан фойдаланилади:

- маърузалар, амалий машғулотлар (маълумотлар ва технологияларни англаб олиш, ақлий қизиқишни ривожлантириш, назарий билимларни мустаҳкамлаш);

- давра суҳбатлари (кўрилаётган лойиҳа ечимлари бўйича таклиф бериш қобилиятини ошириш, эшитиш, идрок қилиш ва мантиқий хулосалар чиқариш);

- баҳс ва мунозаралар (лойиҳалар ечими бўйича далиллар ва асосли аргументларни тақдим қилиш, эшитиш ва муаммолар ечимини топиш қобилиятини ривожлантириш).

БАҲОЛАШ МЕЗОНЛАРИ

№	Ўқув-топширик турлари	Максимал балл	Баҳолаш мезони		
		2,5	"аъло" 2,2-2,5	"яхши" 1,8-2,1	"ўрта" 1,4-1,7
1.	Тест-синов топшириқларини бажариш	0,5	0,4-0,5	0,34-0,44	0,28-0,3
2.	Ўқув-лойиҳа ишларини бажариш	1	0,9-1	0,73-0,83	0,56-0,7
3.	Мустақил иш топшириқларини бажариш	1	0,9-1	0,73-0,83	0,56-0,7

II. МОДУЛНИ ЎҚИТИШДА ФОЙДАЛАНИЛАДИГАН ИНТРЕФАОЛ ТАЪЛИМ МЕТОДЛАРИ.

“Тушунчалар таҳлили” методи

Методнинг мақсади: мазкур метод талабалар ёки қатнашчиларни мавзу буйича таянч тушунчаларни ўзлаштириш даражасини аниқлаш, ўз билимларини мустақил равишда текшириш, баҳолаш, шунингдек, янги мавзу буйича дастлабки билимлар даражасини ташҳис қилиш мақсадида қўлланилади.

Методни амалга ошириш тартиби:

- иштирокчилар машғулот қоидалари билан таништирилади;
- ўқувчиларга мавзуга ёки бобга тегишли бўлган сўзлар, тушунчалар номи туширилган тарқатмалар берилади (индивидуал ёки гуруҳли тартибда);
- ўқувчилар мазкур тушунчалар қандай маъно англатиши, қачон, қандай ҳолатларда қўлланилиши ҳақида ёзма маълумот берадилар;
- белгиланган вақт якунига етгач ўқитувчи берилган тушунчаларнинг тугри ва тулиқ изоҳини уқиб эшиттиради ёки слайд орқали намойиш этади;
- ҳар бир иштирокчи берилган тугри жавоблар билан узининг шахсий муносабатини таққослайди, фарқларини аниқлайди ва ўз билим даражасини текшириб, баҳолайди.

“Кейс-стади” методи

«Кейс-стади» - инглизча сўз бўлиб, («case» – аниқ вазият, ҳодиса, «stadi» – ўрганмоқ, таҳлил қилмоқ) аниқ вазиятларни ўрганиш, таҳлил қилиш асосида ўқитишни амалга оширишга қаратилган метод ҳисобланади. Мазкур метод дастлаб 1921 йил Гарвард университетида амалий вазиятлардан иқтисодий бошқарув фанларини ўрганишда фойдаланиш тартибида қўлланилган. Кейсда очиқ ахборотлардан ёки аниқ воқеа-ҳодисадан вазият сифатида таҳлил учун фойдаланиш мумкин. Кейс ҳаракатлари ўз ичига қуйидагиларни камраб олади: Ким (Who), Қачон (When), Қерда (Where), Нима учун (Why), Қандай/ Қанақа (How), Нима-натижа (What).

“Кейс методи” ни амалга ошириш босқичлари.

Иш босқичлари	Фаолият шакли ва мазмуни
1-босқич: Кейс ва унинг ахборот таъминоти билан таништириш	<ul style="list-style-type: none"> ✓ якка тартибдаги аудио-визуал иш; ✓ кейс билан танишиш(матнли, аудио ёки медиа шаклда); ✓ ахборотни умумлаштириш; ✓ ахборот таҳлили; ✓ муаммоларни аниқлаш
2-босқич: Кейсни аниқлаштириш ва ўқув топшириғни белгилаш	<ul style="list-style-type: none"> ✓ индивидуал ва гуруҳда ишлаш; ✓ муаммоларни долзарблик иерархиясини аниқлаш; ✓ асосий муаммоли вазиятни белгилаш
3-босқич: Кейсдаги асосий муаммони таҳлил этиш орқали ўқув топшириғининг ечимини излаш, ҳал этиш йўллари ишлаб чиқиш	<ul style="list-style-type: none"> ✓ индивидуал ва гуруҳда ишлаш; ✓ муқобил ечим йўллари ишлаб чиқиш; ✓ ҳар бир ечимнинг имкониятлари ва тўсиқларни таҳлил қилиш; ✓ муқобил ечимларни танлаш
4-босқич: Кейс ечимини ечимини шакллантириш ва асослаш, тақдимот.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ якка ва гуруҳда ишлаш; ✓ муқобил вариантларни амалда қўллаш имкониятларини асослаш; ✓ ижодий-лойиҳа тақдимотини тайёрлаш; ✓ якуний хулоса ва вазият ечимининг амалий аспектиларини ёритиш

Кейс. ДНК дан тайёрланган наноқурилма (Гарвард университети олимлари яратган) ва “Ўргимчак” нанороботи (Колумбия университети олимлари яратган) ўзларининг кимёвий таркиби билан фарқланади. Амалиётда кўпроқ уларнинг қайси биридан фойдаланиш қулайроқ?

Кейсни бажариш босқичлари ва топшириқлар:

- Кейсдаги муаммони келтириб чиқарган асосий сабабларни белгилаш (индивидуал ва кичик гуруҳда).
- Амалиётда икки нанороботни қўллаш бўйича афзалликлар ҳақидаги маълумотларни жамланг (жуфтликлардаги иш).

«ФСМУ» методи

Технологиянинг мақсади: Мазкур технология иштирокчилардаги умумий фикрлардан хусусий хулосалар чиқариш, таққослаш, қиёслаш орқали ахборотни ўзлаштириш, хулосалаш, шунингдек, мустақил ижодий фикрлаш кўникмаларини шакллантиришга хизмат қилади. Мазкур технологиядан маъруза машғулотларида, мустақамлашда, ўтилган мавзунини сўрашда, уйга вазифа беришда ҳамда амалий машғулот натижаларини таҳлил этишда фойдаланиш тавсия этилади.

Технологияни амалга ошириш тартиби:

- қатнашчиларга мавзуга оид бўлган якуний хулоса ёки ғоя таклиф этилади;
- ҳар бир иштирокчига ФСМУ технологиясининг босқичлари ёзилган қоғозларни тарқатилади:

Ф	• фикрингизни баён этинг
С	• фикрингизни баёнига сабаб кўрсатинг
М	• кўрсатган сабабингизни исботлаб мисол келтиринг
У	• фикрингизни умумлаштиринг

- иштирокчиларнинг муносабатлари индивидуал ёки гуруҳий тартибда тақдимот қилинади.

ФСМУ таҳлили қатнашчиларда касбий-назарий билимларни амалий машқлар ва мавжуд тажрибалар асосида тезроқ ва муваффақиятли ўзлаштирилишига асос бўлади.

Намуна.

Фикр: “Молекуляр зоологияда хавфсизлик муаммоси”.

Топшириқ: Мазкур фикрга нисбатан муносабатингизни ФСМУ орқали таҳлил қилинг.

III. НАЗАРИЙ МАШҒУЛОТ МАТЕРИАЛЛАРИ

1-мавзу: Зоология фани ва тамойиллари. Ҳайвонлар биохилма-хиллигини ўрганишда молекуляр-генетик усулларни қўллаш. Умуртқасизлар молекуляр таксономиясини ўрганишда дунёда ва Ўзбекистонда бўйича олиб борилаётган илмий тадқиқотлар.

РЕЖА:

- 1.1. Зоология фани ва тамойиллари.
- 1.2. Турлар хилма-хиллиги. Жумбоқли турлар.
- 1.3. Турлар ичидаги полиморфизм.
- 1.4. Биохилма-хилликни ўрганишдаги молекуляр-генетик усуллар тарихи.
- 1.5. ДНК-штрихкодлаш.
- 1.6. Молекуляр таҳлилларда қўлланиладиган маркерлар, ядро генлари.
- 1.7. Умуртқасизлар молекуляр таксономиясини ўрганишда дунёда ва Ўзбекистонда олиб борилаётган тадқиқотлар.

Таянч иборалари: Биохилма-хиллик, баҳсли турлар, полиморфизм, ДНК-штрихкодлаш, ядро генлари, молекуляр таксономия, Гель-электрофорез, УФ-нури, ТАЕ, агароза, бромистый этидий, ДНК тозалаш тўплами, ДНК-маркер.

1.1. Зоология фани ва тамойиллари.

Зоология – ҳайвонлар ҳаётини илмий ўрганишдан иборат бўлиб, ҳайвонот олами бўйича инсонларнинг асрлар давомида йиғилган тадқиқотлари асосида яртатилгандир. Инсоният маданиятнинг турли даврларидаги мифологиясида ҳайвонлар ва уларнинг келиб чиқиши тўғрисида тур хил сирли афсоналар тўқиб чиқаришган. Эндиликда эса зоологлар, бу сирли қарашларни ўрганиш учун илм-фаннинг илғор технологиялари ва услубларига таянмоқда. Биз ҳайвонлар хилма-хиллигини тавсифлаш ва унинг систематик тизим асосида ташкил этишнинг ўрганамиз. Биосферанинг барча йўналишлари ўрганишдаги мураккаб ва қизиқарли жараён минглаб зоологлар ҳиссаси асосида қурилади.¹

Ҳайвонот олами ҳаёт эволюцияси дарахтининг ўзига хос бўлимини ташкил этади. Бу жуда катта ва қадимги бўлим бўлиб, 600 миллион йиллар илгари кембрий давригача пайдо бўлган. Ҳайвонлар оламини янада каттароқ бўлган эукариотлар деган бўлимга ҳам киритишади. Эукариотлар хужайралари мембрана билан қопланган ядрога эга бўлган организмлардир.

Ҳаёт тарихи кенг кўламдаги ва доимий рўй берувчи ўзгаришни намойиш қиладики, уни биз **эволюция** деб атаймиз. Ҳаёт шажараси илк ҳаёт

¹ Hickman et al., 2008, 3 бет

шаклларидан бошлаб, ҳозирги кунда яшаётган миллионлаб турларгача ривожланди ва тармоқланди, тобора янги хусусиятлар шаклланди ва аждодлардан авлодларга ўтиб келди. Бу жараён орқали, тирик тизимлар жуда нодир ва ажойиб хусусиятларни яратишдики, унинг ўхшаши нотирик оламда умуман учрамайди. Кутилмаган хусусиятлар, ҳаётнинг эволюцион тарихида, кўпгина турли шажараларда пайдо бўлиб, ҳозирги пайтда кузатилаётган организмларнинг мисли кўрилмаган хилма-хиллигини юзага келтирди.

Тирик тизимларнинг умумий хусусиятлари. Ҳаёт эволюциясидаги энг муҳим хусусиятлар кимёвий ягоналик (бетакрорлик); мураккаблик ва иерархик тузилиш; кўпайиш (ирсийлик ва ўзгариш); генетик дастурга эга бўлиш; атроф-муҳит билан ўзаро муносабатда бўлиш ва ҳаракатни ўз ичига олади. **1. Кимёвий ягоналик.** *Тирик тизимлар ягона (такрорланмас) ва мураккаб молекуляр тузилишни намоён қилишади.* Тирик тизимлар, макромолекулалар деб аталувчи йирик молекулаларни бирлаштирадики, улар нотирик материянинг кичик молекулаларига нисбатан анчагина мураккаб. Биз биологик молекулаларнинг тўрт асосий тоифасини ажратамиз: нуклеин кислоталари (полинуклеотидлар), оксиллар, углеводлар ва ёғлар (липидлар). **2. Мураккаблик ва иерархик тузилиш.** *Тирик тизимлар ягона (такрорланмас) ва мураккаб иерархик тузилишни намоён қилишади.* Нотирик материя ҳам ҳеч бўлмаганда атомлар ва молекулалардан тузилган ва у ҳам кўпинча юқори даражадаги тартибли тузилишга эга. Аммо, тирик оламдаги атомлар ва молекулаларнинг ўзаро боғланиш схемалари нотирик оламда учрамайди. Тирик тизимларда шундай иерархик тузилишни кузатамизки, у макромолекулалар, ҳужайралар, организмлар, популяциялар ва турларни, мураккабликнинг ўсиб бориши тартибида ўз ичига олади. **3. Кўпайиш.** *Тирик тизимлар ўзларини кўпайтира олишади.* Ҳаёт ўз-ўзидан пайдо бўлмайди, балки ҳаётнинг илгариги шаклидан кўпайиш йўли билан юзага келади. Генлар янги генларни яратиш учун ўзларини репликация (ўз нусхаларини яратиш) қилишади. Ҳужайралар янги ҳужайраларни яратиш учун бўлинишади. Организмлар, янги организмларни яратиш учун, жинсий ёки ножинсий йўллар билан кўпайишади. Популяциялар янги популяцияларни ҳосил қилиш учун қисмларга ажралиши мумкин; турлар ҳам, турланиш деб аталувчи жараён орқали янги турларни ҳосил қилиш учун қисмларга бўлинишлари мумкин. **4. Генетик дастурга эга бўлиш.** *Генетик дастур ирсиятнинг ишончлилигини таъминлайди.* Организмларнинг ривожланиши ва яшаши учун зарур бўлган оксил молекулалари *нуклеин кислоталари*да кодланган. Ҳайвонлар ва кўпгина бошқа организмларда генетик маълумот ДНКда жойлашган. ДНК нуклеотидлар деб аталувчи қисмларнинг чизиқли ва узун занжиридан иборат бўлиб, ҳар бир нуклеотид битта қанд фосфатини (деоксирибоза фосфат) ва тўрт азотли асослардан бирини (аденин, цитозин, гуанин ёки тимин, қисқача белгиланиши, мос равишда А, Ц, Г ва Т) ўз ичига олади. Нуклеотидли асосларнинг кетма-кетлиги ДНК молекуласи орқали белгиланадиган оқсилдаги аминокислоталар тартиби учун кодни (махсус маълумот) ўз ичига олади. ДНКдаги асослар ва оқсилдаги аминокислоталар кетма-кетлиги ўртасидаги мослик *генетик код* деб аталади. **5. Моддалар алмашинуви.** *Тирик*

организмлар атрофдаги озиқ моддаларни истеъмол қилиш орқали ўзларини сақлаб қолишади. Озиқ моддалар тирик тизимларни қуриш (синтез қилиш) ва таъминлаш учун кимёвий энергия ва молекуляр қисмларни қўлга киритиш учун фойдаланилади. Бу муҳим кимёвий жараёнларни биз моддалар алмашинуви (метаболизм) деб атаймиз. **6. Ривожланиш.** Барча организмлар ўзига хос ҳаёт циклидан ўтишади. Ривожланиш организмнинг пайдо бўлишидан (одатда тухумхужайранинг сперма орқали уруғланишидан) бошлаб, вояга етишигача бошидан кечирадиган ўзгаришларни тавсифлайди. Ривожланиш одатда шакл ва ўлчамлардаги ўзгаришларни ҳамда организм доирасидаги тузилмалар орасидаги фарқланишни намоён қилади. **7. Атроф-муҳит билан ўзаро муносабат.** Барча ҳайвонлар атроф-муҳит билан ўзаро муносабатини ўрганувчи фан *экология* деб аталади. Ҳайвонларнинг географик тақсимланиши ва кўплигига таъсир қилувчи омилларни ўрганишга алоҳида қизиқиш намоён бўлмоқда. Экология фани атроф-муҳитдаги қўзғатувчилар орқали қандай таъсирланиши ва ўз моддалар алмашинуви ва физиологиясини тартибга солган ҳолда уларга қандай жавоб қайтаришини тадқиқ қилади. **8. Ҳаракат.** Тирик тизимлар ва уларнинг қисмлари тизим ичидан аниқ ва назорат қилинадиган ҳаракатни намоён қилишади. Тирик организмларнинг атроф-муҳитдан олган энергияси, уларга бошқариладиган ҳаракатларни амалга оширишга имкон беради.²

Фан тамойиллари. Табиат фани. Фан - бу табиий олам тўғрисида саволлар бериш ва баъзан бу саволларга аниқ жавоблар олиш усулидир. Фан, замонавий талқинга кўра, инсоният тарихида яқинда (охирги 200 йил ичида ёки шунга ўхшаш) шаклланган бўлсада, табиат тўғрисида саволлар бериш анъанаси қадимдан мавжуд. Бу бўлимда, зоология фан сифатида қандай методологияни қўллашини кўздан кечирамиз. Бу хусусиятлар фанларни илмий билиш тизимидан ташқари бўлган соҳалар, масалан, санъат ва диндан ажратади. **Илмий метод.** Фаннинг ушбу асосий мезонлари *гипотетик-дедуктив метод*ни шакллантиради. Бу методнинг биринчи қадами қизиқтираётган саволга потенциал (кутиладиган) жавоблар ёки гипотезалар тузишдан иборат. Бундай гипотезалар одатда табиатни бундан олдинги кузатишларига асосланади ёки шундай кузатувларга асосланган назариялардан келиб чиқади. Илмий метод бир қатор қадамлар кетма-кетлиги шаклида қисқача тавсифланиши мумкин: 1). Кузатиш; 2). Савол бериш; 3). Гипотеза; 4). Эмпирик текширув; 5). Хулосалар; 6). Нашр.³

Бу соҳадаги ишларнинг улкан ютуқларга эришиши ва кучайтирилишига қарамасдан, ҳозирги вақтда биохилма-хилликни ўрганиш ҳолати даражаси қийин аҳволдадир. Ҳозирги даврда 1,9 млн яқин тирик организмлар мавжуд бўлиб, кейинги 250 йил ичида уларнинг катта қисмига тавсиф берилган. Турли тадқиқотчиларнинг фикрига кўра, ҳозирги пайтда кўпи ёки ками билан фақатгина умуртқали ҳайвонларнинг (90 % яқин) ва юксак ўсимликларнинг

² Hickman et al., 2008. 4-9 бетлар

³ Hickman et., 2008. 11-12 бетлар

(85% яқини) турларига тавсиф берилган. Буғимоёқлиларнинг 25 % яқин турлари талқин қилинган (шу жумладан 10 % хашаротлар), 5 % кўзикорин ва диатом сув ўтлари ва б.қ. (Шнеер, 2007).

Инсон хўжалик фаолияти натижасида турлар хилма-хиллиги тез ва фожияли камайишига олиб келмоқда-ки, агарда биз турларни фақатгина классик морфологик усуллар орқали тадқиқот ишлари олиб борадиган бўлсак, катта эҳтимоллик мавжудки-ки, биз улар устида тадқиқот олиб бориш, хатто кўп қисмини аниқлаш имконига эга бўлмай қоламиз. Ҳозирги даврда дунёда 15000 яқин таксономист-морфолог тадқиқотчилар бор. Ҳозирда ер юзида кўплаб турлар мавжуд бўлиб, қайсики уларни аниқлаш учун дунёда 1-2 мутахасистлар тўғри келади. Ҳисоб-китобларга қараганда, агарда янги турларни аниқлашни жадаллаштириш шароитини 30 маротабага кўпайтирсак, мавжуд бўлган биохилма-хилликни тавсиф этиш учун 25 йил керак бўлар экан (Woodruff, 2001).

2000 йиллар бошида таксономик маълумотларни кенг ва тўлиқ фойдаланишни таъминлаш мақсадида интерактив каталоглар (Catalog of Life) тузиш таклифларни пайдо бўла бошлади (Bisby, 2000; Godfray, 2002). Бу вақтда бир гуруҳ тадқиқотчилар, пайдо бўлган муаммоларни самарали ечишда ДНК-систематика ёрдам беради дейишди (Tautz, 2002, 2003). Бундай таклифнинг пайдо бўлишига сабаб секенирлаш технологиясида революцион (Сэнгер-секвенирлаш технологияси) ўзгаришлари бўлди. Алоҳида ДНК фрагментларни, ўртача узунликдаги 1000 ж.н. секвенирлаш бемалол ва етарлича арзон усул бўлиб қолди. Молекуляр-генетик усуллардан фойдаланиб, биохилма-хиллик ва систематика муаммоларни тавсиф этиш хаддан ташқари қизиқарли бўлиб қолмоқда. Бироқ, шак-шубҳасиз, фақатгина молекуляр-генетик усуллардан фойдаланишда систематиклар билан ҳамкорликда бўлмасдан, мавжуд турни аниқ баъҳолаш мумкин, лекин уларни тавсифлаш борасида ёрдам бера олмайди. Ҳозирги пайтдаги бу мавжуд нуқтаи-назар асосидаги бу ҳолат шундан иборатки, биохилма-хилликни ўрганиш аниқ гуруҳларнинг мутахасистларига таянган ҳолда ҳамда молекуляр-генетик усуллар асосида амалга ошириш лозимдир (Шнеер, 2007). Бундай қарашларнинг афзаллиги шубҳасиз шундаки, алоҳида олинган кетма-кетликларнинг ДНК-маркерлари у ёки бу турлар вакиллари мутахасист томондан мазкур турнинг дастлабки аниқ идентификацияси қилинмаганлиги кам маълумотлидир (бундай усулдаги биохилма-хиллик кенг тарқалган), лекин фақатгина морфологик усулларни қўллаш ҳам, биохилма-хилликни ҳали аниқланмаган қисмини очиб беролмайди.

2003 йили “ДНК-штихкод” усули ёки молекуляр “баркодинг”ни таклиф этишди. Бу усулнинг замирида шундай фараз мавжудки, қайсики геном соҳасининг унча катта бўлмаган размери топилди (600-800 нуклеотидлар), шундай қилиб, битта тур индивидлари ёки турли хил турлар кетма-кетлиги узунлиги бир хил бўлади. Шундай соҳани ДНК-штрихкод (barcode) деб аташди. Объект ДНКсининг бу соҳаси кетма-кетлиги маълум бўлгач, уни маълумотлар базаси (IBOL) билан солиштирилади, қайсики объектнинг бу кетма-кетлиги бошқа барча турлар солиштирилади ва ўрганилаётган тур тезда

аниқланади. Агарда кетма-кетлик базадаги мавжуд бирор бир тўғри келмаса, демак бу янги тур, яъни номаълум тур топилганидан дарак беради. Ҳайвонларнинг шундай соҳаси ўрганиш мақсадида митохондриал геннинг фрагментлари, яъни цитохромоксидазанинг кодловчи 1 суббирлиги (CO1) танланди. Бу усул ҳозирги вақтда жуда кенг тарқалди, маълумотлар базаси (IBOL) доим янги кетма-кетликлари билан тўлдирилмоқда.

Бироқ бу усулда ҳам бир неча камчиликлар мавжуд. Биринчидан, табиий, митохондриал генлар фрагментлари бўйича турлар мансублигини аниқлашга нисбатан эътироф. Бу ҳолатда митохондриал интрогрессия (introgression-интрогрессия – турлар ўртасидаги гибридланиш натижасида бошқа турни гени олиши) билан тўқнашиш келишни мумкин, псевдогенлар мавжудлиги ва бошқаларни ҳисобга олиш керак. Бундан ташқари, фақат митохондриал ДНК кетма-кетлиги билан ядро ДНКси полиморфизмини баҳолай олмаслиги мумкин, бу ҳали аниқланмаган биохилма-хиликни баҳолашда жуда муҳимдир. Шундай бўлсада, бу усул ҳар доимгидай ҳозирда биохилма-хиликни ўрганишда асосий молекуляр-генетик усул бўлиб хизмат қилмоқда.

Систематика ва филогенияда молекуляр-биологик белгиларнинг қўлланилиши ўтган асрнинг 70-йилларида туғилди. Бу вақтда систематик тузилишлар учун эукариотларнинг нуклеотидлар кетма-кетлигининг 18S, 5,8S ёки 28S рДНК генлари универсал маркер сифатида танланиши, юқорида айтилгандек, сиквенирлаш усулининг такомиллашуви ва материлларни қисқа муддатда олиш ва қайта ишлаш имконини берди. Геномда рибосомал кетма-кетликлар кўплаб нусхаларда бор бўлиши ва бир неча қисмлардан тузилади, кайсики улардан бири, рибосома функционал суббирлигига тегишли (18S, 5,8S ёки 28S) бўлиб, асосан стабилдир, яъни эволюцион консервативдир, бу ҳолда, ITS1 ва ITS2 ички спайсер кетма-кетлиги, қарама-қарши ўлароқ, эволюцион ўзгарувчандир (лабилний). Консерватив соҳалар полимер занжирли реакциялар биринчи босқичда - праймерларни тадқиқ қилинаётган ДНК- матрицага уланишида, вариабель соҳалар эса, турларни идентификациялашда хизмат қилади. Турга хос вариабель соҳаларнинг ўхшашлик даражаси турли хил турларнинг эволюцион қариндошлигини ифодалайди. Рибосомал геннинг айнан бу муҳим хусусияти улар қисмларидан турли даражадаги таксономик муаммоларни ечишда фойланилади (Blaxter, 1998; Nadler et al., 2000; Nguyen et al., 2001). Биринчи бўлиб, молекуляр маълумотлар асосидаги классификация тизими Nematoda синфида бўлиб, бундан 15 йил олдин пайдо бўлди (Blaxter et al., 1998). Бу маълумотлар ўша даврда SSU 18S rDNA соҳаси бўйича олинган бўлиб, бу классик системадан бутунлай фарқ қилади.

Систематика ва филогения ўзининг тузилишини «рибосомал» ва «оқилли» дарахтлар тузиш учун янги улкан усулга эга бўлди, секвенирлаш эса оддийгина лаборант иши бўлиб қолмоқда. (Бу ҳали бизда эмас). Шунини айтиш мумкин-ки, биологияда янги парадигма шаклланди – органик оламнинг барча шаклларида ДНК турли-туман кўринишлари бор.

Бироқ, таклиф этилган молекуляр филогенетик дарахтларда номувофиқликлар пайдо бўлди. Гоҳида бу тузилишнинг фарқи нафақат

сиквенсинг техник такомиллашмаганлиги эмас, балки битта лабораторияда олинган маълумотларда ҳам кузатилди. Бунинг сабаблари ўрганилмоқда ва таҳлил қилинмоқда. Ҳаммаси очик ойдин маълум бўлаяптики, систематика ва филогенетиканинг сермахсул ривожи, морфологик, физиологик ва молекуляр маълумотлари билан биргаликда – организмларнинг систематикаси ва филогенетикасининг синтетик тизимини ишлаб чиқишдир. Шундай қарашлар юз йилликнинг 90 йиллардан бошлаб актив ишланмоқда.⁴

Филогенетик реконструкцияларни юқори тақономик даражада бажариш учун бошқа генлар ёки ядро ДНКси соҳалари, масалан, элонгация омили (elongation factor, Ef-la), оксил иссиқлик стреси генлари, миозинлар, гистонлар фойдаланилади. Шу билан бирга оксилларнинг аминокислоталар кетма-кетлиги ва РНКнинг иккиламчи тизимлари ҳам тақосланади. Оила ва авлодлар даражасида эса митохондриял генлар таҳлил қилинади.

Шундай қилиб, ҳар қандай йирик таксонларнинг таксономик муаммоларни ечишда “молекуляр” усулларни тўлақонли қўллашда шу гуруҳга ичига кирувчи турлар, авлодлар ва х.к. масштабли нуклеотидлар фарқини ўрганиш ҳамда бу фарқларда аниқланган тадқиқот омиллари, шу жумладан ўрганилаётган популяциялар (“географик” омил) ўзаро узоқлигини таъсирини ўрганишни талаб қилади.

Ушбу мажмуада эукариот организмларни 18S, 5,8S ва 28S рибосома ДНК кодловчи генлари бўйича идентификация қилишда қўлланиладиган қулай маркерларни ишлатиш оддий ва тушунарли шаклда тавсифлаган. Ҳамма босқичлар – материал йиғишга оид талаблар, ДНК ажратиш ва ПЦР-амплификация ҳамда филогенетик дарахт тузиш аниқ ва кетма-кет баён этилган.

Бу қўлланма “Хайвонлар молекуляр систематикаси ва филогенетикаси”ни ўрганувчиларга мўлжалланган бўлиб, молекуляр-генетик маълумотларни асосида ҳайвонлар систематикаси, таксономияси ва филогениясини, морфологик ва физиологик маълумотлар билан бирга кенг қўллаш имконини беришга хизмат қилади.

Биологик хилма-хиллик тушунчаси. Биохилма-хилликни ўрганиш биологиянинг асосий вазифаларидан бири ҳисобланади. Аммо, биринчи навбатда "Биологик хилма-хиллик" тушунчасига нималар киришини аниқлаш зарур. Замонавий концепцияга кўра, организмлар биохилма-хиллигини барча муҳитлардаги тирик организмлар, қуруқлик, денгиз ва бошқа сув экотизимлардаги экологик комплекслар: тур ичида, турлар ва экотизимлар ўртасида хилма-хиллик ташкил қилади. (*Рио-де-Жанейро, 3-14 июн 1992 йил, Бирлашган Миллатлар Ташкилотининг атроф-муҳит ва ривожланиш конференциясида қабул қилинган биологик хилма-хиллик тўғрисидаги Конвенция*).

Бунга кўра биологик хилма-хиллик уч типга бўлинади:

- экотизимлар ва ландшафтлар (яшаш жойининг хилма-хиллиги);
- турлар хилма-хиллиги;

⁴ Patterson, 1994; Margulis и др., 1996

- генофонд (генетик хилма-хиллик).

Генетик хилма-хиллик ёки генетик полиморфизм – популяцияларнинг белгилар ёки табиатнинг генетик маркерлари хилма-хиллиги [Ramel, 1998]. Генетик хилма-хиллик тур ёки популяция гуруҳлари, популяцияларнинг генетик хусусиятлари муҳим таркибий қисми ҳисобланади. Генетик хилма-хиллик генетик маркерларни танлашга, бир қанча ўзгарувчан параметрларда ифодаланади [Leffler, 2012]:

1. Виртуал гетерозиготали - π , яъни, популяцияда икки тасодифий танланган генотипли нофункционал нуклеотид сайт ўртасидаги фарқ нисбати.
2. Локусдаги аллеллар сони.
3. Генетик масофа (популяциялар ўртасидаги генетик хилма-хилликни баҳолаш).

Биз биохилма-хилликни фақат икки турдаги яъни турлар хилма-хиллиги ва популяциянинг генетик полиморфизмини молекуляр-генетик методлардан фойдаланиб ўрганамиз.

1.2. Турлар хилма-хиллиги. Жумбоқли турлар.

Кўп ҳолларда фақат морфологик мезонлар ёрдамида турлар таркибини ўрганиш қийин ёки “бахсли, мужмал турлар”ни ажратиш ҳатто имконсиз [Bickford, 2006]. Бу ҳолда албатта молекуляр генетик методларни қўллаш керак.

Жумбоқли (мужмал) деб номланган турлар, икки ёки ундан ортиқ тур бир тур сифатида тасвирланган (бир номга эга) ва энг камида ташқи морфологик фарқлар кузатилади [Bickford, 2007]. Биринчи, бу турлар молекуляр-генетик усуллардан анча аввал Линней класификацияси қабул қилинган пайтда кашф этилган.

Жумбоқли турлар, шунингдек, ўхшаш турлар ёки эгизак турлар ҳам дейилади. Биринчи марта “эгизак-турлар” атамасини [Майер, 1963] киритган. “Жумбоқли турлари” термини кейинчалик пайдо бўлди [Henry, 1985], аммо кўпроқ тўғрироқ деб ҳисобланди, баъзи муаллифлар “эгизак-турлар” атамасини фақат қиз турлар учун, қайсики умумий бир шохдан ривожланган турларга хос деб ҳисоблашди. Бирқанча, жумбоқли турлар ҳақиқатдан ҳам қиз турларга мос келади, бу ҳолларда синоним ҳисоблаш мумкин, аммо кўп муаллифлар ҳаммасини “жумбоқли турлар” деб аташмоқда [Knowlton, 1986]. Бундан ташқари, бир қанча муаллифлар “жумбоқли турлар” ва “псевдомужмал турлар” тушунчаларига ажратган. Аниқланган морфологик белгиларга қараб ажратиш билан бирга мужмал турлар молекуляр-генетик методлар ёрдамида ажратилади. Бу ҳолда турлар “псевдокриптик” турлар деб аталади [Saez, 2003].

Симпатрик жумбоқли турлар. Сўнги уч ўн йилликларда молекуляр генетик усуллар ёрдамида псевдокриптик ва жумбоқли турларнинг сони ДНК-кетликлар таҳлил асосида аниқланди [Carr, 2010]. Бу усуллар ПЗР (полимераза занжирли реакция) асосида амплификация методлари ва ривожланиши ҳамда муҳим кўпайтириш усулларига асосланган технологиялар асосида амалга оширилади. Биз тур асоси ҳар доим

морфологик ўзгаришлар билан бирга эмас ва бу ҳолатда, турларнинг ҳақиқий сони ҳам муҳим саналади, бу фақат морфологик кузатишлар асосида изоҳланади. Бироқ, баъзан генетик усуллардан фойдаланиш тасвирланган турларнинг сонини ошириш учун эмас балки камайтириши мумкин.

Бир қанча турлар муҳим морфологик хилма-хилликка эга ва баъзи ҳолларда кўп сонли систематиклар морфологик, ранг ўзгариши [Knowlton, 1987]. Генетик таҳлил бир неча турли таксонлар кенжа турлар ва турлар орасида асоссиз генетик изоляция йўқлигини кўрсатади, бу эса чалғитувчи бўлиши мумкин [Nygren, 2011]. Баъзи сут эмизувчиларни ўрганиш тарихида бир қанча турлар алоҳида бир неча турларга ажратилган ва яна тафтиш қилиш натижасида бир неча морфологик типлар кейин бир тур эканлиги кузатилган [Linnaeus, 1746, 1758; Agassiz, 1862; Haeckel, 1879; Mayer, 1910; Kramp, 1961]. Бу жумбоқли симпатрик турлар биохилма-хилликни ҳисобини олишда муҳим, популяция тузилиши ва динамикасини ўрганиш, шунингдек, жамоалар экологиясини ўрганиш учун жуда муҳим эканлигини айтиш лозим [De Leon, 2010]. Кўплаб популяция динамикаси (айниқса, денгиз) жамоалари ҳали яхши ўрганилмаган ва буни сабабларидан бири мужмал турлари сони кўплигидир [Eckert, 2003]. Бироқ, турларнинг морфологик маълумотлари ва биологик маълумотлари бир қанча саволлар туғдиради, турлари орасидаги генетик масофалар ва қайсики тур ичидаги генетик полиморфизмга мос келади. Турнинг биологик концепцияси алоҳида тур сифатида танлаш учун асосий мезон кўра бир тур доирасида организмлар бир-бири билан эркин ва кўпайишда изоляцияланмаган ҳолда кўпайишади [Mayr, 1970]. Симпатрик жумбоқли турлар орасида молекуляр-генетик хилма-хиллик борлиги улар ўртасида чатишиш йўқлиги мураккаб турларнинг мавжудлиги исботидир.

Аллопатрик турлар ва космополит турлар. Географик ажралган турлар, географик изоляцияланган турларни ўзаро чатиштириш имкони йўқ, бу эса аллопатрик турларни изоҳлашга қатъий далил бўла олмайди. Айрим муаллифлар аллопатрик гуруҳлар ўртасида дивергенцияни назорат қилишда 3-5% нуклеотидларнинг алмашишини мумкин деб ҳисоблайди. Кўпчилик муаллифларнинг фикрига кўра ядро геномининг 5%гача кам ёки кўп фарқ қилиши икки синоним турларнинг чатишишида кам хатоликни келтириб чиқаради. Айрим муаллифларнинг фикрича, бу саволга жавоб топишда турли таксон қиз турлари орасида кўпайиш бўйича изоляцияланган турларнинг дивергенцияси натижасидир. Бироқ, полиморфизм даражаси геном даражасида нафақат юқори таксонлар, балки яқин турлар ўртасида ҳам, шу таксон даражасида ҳам ўзгаради. Кўпайиш бўйича изоляцияланиш ва маълум генетик масофада жойлашиши ишончли боғлиқлик катта генетик масофа деб белгиланган (бу турларнинг пайдо бўлиш вақти) бу эса улар ўртасидаги кўпайиш вақтини белгилайди [Coayne, Orr, 1989, 1997; Sasa, Chippindale, Johnson, 1998; Presgraves, 2002; Mendelson, 2003]. Ҳайвонларда репродуктив тўсиқ *Drosophila* авлоди вакиллари орасидаги симпатрик турлар орасида дивергенция даражаси камроқ аллопатрик ва кўпайишдан кейин кўпайишдан олинги алоҳидаланишга нисбатан тезроқ содир бўлади (пуштсиз ёки стерил дурагайларда [Coayne, Orr, 1989, 1997; Howard, 1993; Butlin, 1995; Hostert,

1997] пайдо бўлади. Бу бепуштлиқ гибрид турлар ўртасидаги зарарли эпистатик таъсирлар изчил аста-секин тўпланиши натижасида ривожланади, бу “турлар хилма-хиллиги соати” деб ҳам аталади [Coyne, Orr, 1989, 1997; Sasaet, 1998; Orr, Turelli, 2001].

Денгиз умуртқасизларидан полихетлар синфининг географик тарқалиши ва турлар таркиби яхши мисол бўлади. Ҳозирги вақтда полихетларнинг 10000 дан ортиқ тури маълум бўлиб гуруҳ ҳамма жойда тарқалган ва улар денгиз экосистемасининг муҳим компонентларидан ҳисобланади, уларнинг географик тарқалиши деярли ўрганилмаган. Полихетларнинг каттагина қисми космополит турлардир. Анъанавий систематик ёндашувга асосан бир тур морфологик жиҳатдан фарқ қилмайдиган турлардан ҳосил бўлади. Ҳозирги замонда полихетларнинг биогеографиясига доир илмий ишлар кўпайиб бормоқда. Ҳозирги кунда “кенг тарқалган” кўптукли чувалчангларнинг турларини асослашда классик таксономия усулари космополитизм ходисасини асослашга етарли бўлмай қолди. Кўп ҳолларда юқорида айтилганидек, репродуктив алоҳидаланишга қатъий далиллар топилмади, аммо, кенг қамровли таҳлиллар шуни кўрсатмоқда-ки ҳам генетик, ҳам морфологик фарқлар билан бирга турларнинг экологик фарқлари мавжуд. Масалан, *Owenia fusiformis* Delle Chiaje, 1844 (Oweniidae), *Sternaspis scutata* Ranzani, 1817 (Sternaspidae) ва *Scoloplos armiger* (Muller, 1776) (Orbiniidae) турлари ҳамма океанларда, ҳар хил чуқурликларда ва амалда турли хил хароратларда учраши аниқланган. Аммо, охириги маълумотларга асосан *O. fusiformis* комплекс турлар деб топилмоқда. Ҳозирги кундаги тўлақонли тадқиқотлардан RAPD усули ёрдамида аниқ нуклеотидлар кетма-кетлиги солиштирилмаган. Унинг ёрдамида аниқланишича *Neopetitia (Petitia) amphophthalma* Siewing, 1956 (Syllidae) улар космополит турлар эмас балки *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) нинг алоҳида амфианлантик тарқалган комплекс турлар вакилидир. Кейинчалик ядро ва митохондрия маркерлардан фойдаланиб тадқиқотлар олиб бориш йўлга қўйилди. *S.armiger* (Orbiniidae) тури В. Блейдорн [Bleidorn, 2006] ҳаммуаллифлигида ўрганилган космополит турдир. Юқорида айтиб ўтилганидек, бу турларнинг вакиллари ҳамма жойларда, ҳам литораль, ҳам сувнинг чуқур қисмларида учрайди. Шимолий муз океани худудида бу тур полихетларнинг кенг тарқалган тури ҳисобланади. Ядро ва митохондрияли маркерлар ёрдамида олиб борилган тадқиқотлардан маълумки *S.armiger* космополит тур ҳисобланмайди, ўзи комплекс тур саналади. Тинч океанида эса иккита *S.armiger* турлари ва икки ёки уч тури Атлантика океанида аниқланган. Яна бир ёрқин мисол, Нигреннинг молекуляр-генетик тадқиқотлари ҳисобланади. Циркумбореаль ва трансарктика турлар ва уларнинг морфологик фарқлари катта қизиқиш уйғотади. Ўтган асрнинг бошланиши ва ўрталарида бир қанча нинатерилилар турлари (денгиз юлдузлари ва денгиз типратиконлари) морфологик белгиларига асосан трансарктика ва циркумбораль тарқалиши ҳақида илмий ишлар чоп этилган.

Кейинчалик айрим асосий таксонлар қариндош-турлар ҳисобланган. Комплекс денгиз юлдузларининг *Leptasteria* авлоди арктика ва субарктика

турлар ўрганилиши натижасида ўзига Арктика ва Шимолий Атлантиканинг марказий Калифорниядан то Аляскагача бўлган ҳудудда тарқалган 60 турни бириктириши маълум бўлди. Аляска ҳудудидаги комплекс турлар дастлабки уринишларда денгиз юлдузларининг аллазим вариацияси сифатида ўрганилган, ҳозирги вақтда эса кенг қамровли тадқиқотлар, Арктика ва Антарктиканинг кўплаб нуқталаридан текширишлар учун тўпланган материаллар кўп сонли генлар аниқланган.

Молекуляр методлар ушбу гуруҳларни ажратиш учун асосий манба бўлиб хизмат қилди. Шу каби ишлар кўплаб олиб борилмоқда. Жумбоқли турларнинг комплексини тадқиқ қилиш жуда қийин. Аммо, бу каби ишлар ўрганилмаган биохилма-хилликни тадқиқ қилишда катта аҳамиятга эга биохилма-хилликни тадқиқ қилишда мужмал турлар ёки тур ичидаги полиморфизмни ўрганиш жуда муҳим саналади.

Жумбоқли пайдо бўлиши. Молекуляр-генетик маълумотлар жумбоқли (мужмал) турларни чуқур сувлардаги моллюскалардан то чучук сув балиқларигача ва тропик капалаклардан то арктика ўсимликларигача алоҳида турларни гуруҳларга ажратишда генетик дифференциация қилишда морфологик ва географик маълумотларни тўлдиришда, экологик ёки хулқий фарқларни тўлдиришда муҳим саналанади. ISI Web of Science (<http://scientific.thomson.com/products/wos/>) ва Zoological Record Plus (<http://www.csa.com/factsheets/zooclust-set-c.php>) базаларидаги маълумотларни ўрганиш натижасида “жумбоқли турлар” ва “эгизак турлар”га доир охириги 50 йилда 3500 дан ортиқ мақолалар мавжуд. Бундай катта яширин генетик хилма-хиллик жумбоқли турлар сони билан яшаш муҳит ўртасида боғлиқлик бор йўқлиги ҳақида савол туғилишига сабаб бўлади. Жумбоқли турларга бағишланган мақолаларни санасак кўпчилик тадқиқот ишлар у ёки бу гуруҳ хайвонлар билан боғлиқ. Кам сонли мақолалар юксак ўсимликлар ва микроорганизмларнинг жумбоқли турларига бағишланган. Шундан келиб чиққан ҳолда олимларнинг у ёки бу гуруҳларнинг жумбоқли турларини ўрганиши натижасида яқдил бир хулосага келиши қийин. Кўпчилик пашшаларнинг космополит турлари турли хил континентларда тарқалган (жумбоқли турлар сони нисбатан камроқ), аммо, кўпчилик моллюскалар билан шуғулланувчи мутахассислар (хаваскорлар чиройли чиғаноқларини теришади) фикрича моллюскаларнинг тарқалиши морфологик хилма хилликка боғлиқ (“парчаланган” турлар). Тропик ва ўлик ҳудудлардан аниқланган жумбоқли турларни сони санашда бир қанча муаммоларни келтириб чиқаради. Маълумки икки, уч ёритилган турлар тропик минтақалардан топилган, аммо жумбоқли турларнинг ярми ўлик ҳудудлардан аниқланган. Бу эса жумбоқли турларнинг пайдо бўлиш қонуниятини ёритишда ўлик ҳудудлардани топилган турлар кўпчилик тадқиқотчилар томонидан аниқланганлиги билан изоҳланади [Carroll, 2004].

Жумбоқли турларнинг пайдо бўлиши биринчи навбатда организмни аниқлашда морфологик белгиларига асосланади. Юқорида таъкидланганидек турлар хилма-хиллиги ҳар доим ҳам морфологик ўзгаришлар билан бирга бўлади [Templeton, 1981].

1.3. Тур ичидаги генетик полиморфизм.

Тур ичидаги ва популяциялар ичидаги полиморфизм жуда кўп саволларни келтириб чиқаради. Табиий популяциялардаги генетик хилма-хилликни сақланишининг қандай механизми мавжуд? Популяция ичидаги полиморфизмлик даражаси унинг сони билан боғлиқ-ми? Генетик хилма-хилликни паст даражаси қанчалик ўзгарувчан шароитда мослашиши имкониятини камайтиради? Бу саволлар замонавий популяцион генетиканинг ривожланишига туртки бўлди ва эволюцион генетика ва қиёсий геномиканинг молекуляр-эволюция-нол-гипотезасининг нейтрал назариясини ривожланиши имконини берди [Kimura, 1968; Kreitman, 1996; Fay, 2003]. Бу саволнинг тушуниш учун бундан 50 йил олдинги аллозим тадқиқотларида ўзгаришлар юз берди [Crow, 2008; Lewontin, 1974].

Ҳозирги вақтда севенирлаш технологиясининг революцияси натижасида бу каби саволларга тегишли маълумотларни системалаш ишлари қилинмоқда. Шундай қилиб, турли эукариот таксонлари вакилларнинг нуклеотидларининг ўзгарувчанлигини учта локусини қиёслаш орақали иш қилинди [Leffler, 2012]. Бунда таққослаш учун фақат ўзгарган синоним сайтларидан фойдаланилди. Шуни айтиш керак-ки, ўзгарган синоним сайтлар нейтрал бўлмаслиги ҳам мумкин, ўзгарган синонимлар РНК стабиллигига ва сплайсингга таъсири каби маълумотлар мавжуд [Chamary, 2006].

2003 йили Hebert [Hebert, 2003a,b] ўз мақоласини эълон қилди, унда ДНК-штрихкодни асослайди ва бу дастурни ривожлантиришни таклиф этади. Бунгача молекуляр-филогенетик тадқиқотларига бағишлаган кўпгина мақолалар эълон қилинган ва битта ва шу генетик маркердан фойдаланиб, ҳайвонларни яқин турларини таққослаш орқали ягона тизим яратиш эди.

Трихостронгилид нематодаларининг полиморфизм гипотезаси.

Trichostrongyloidea Cram, 1927 катта оиласи – Nematoda синфининг кенг тарқалган таксонлари бири ҳисобланади. Унинг вакиллари кенг доирадаги хўжайинларда паразитлик қилиб, дунёнинг деярли барча мамлакатларида қайд қилинган. Бу катта оилани йирик вакили Trichostrongylidae Leiper, 1912 оиласи бўлиб, уларнинг ичида турлар таркиби ва тарқалиш кенглиги бўйича биринчилардан бири Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 кенжа авлоди ҳисобланади.

Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 кенжа оиласига мансуб баъзи бир турларнинг эркак зотлари (кўп ҳолатларда иккита) морфологик шаклларида кўра ўзаро фарқланишга эгаллиги тахмин қилинади (Drozdz, 1995). Бу гипотезага асос бўлган ҳолат – баъзи эркак зотлар бошқа турга мансуб эркак зотлари билан бирга учратиши кузатилди. Жуфтликдаги бу морфалардан (шакллар) бири доминант ҳолатда бўлиб, индивидлари миқдорига кўра доминант ҳолатда бўлади (мажор), иккинчиси эса кам, яъни минор деб аталади. Мажор ва минор морфлардан иборат эркак индивидларни анъанавий тарзда таснифлашда уларнинг спикуласи ва жинсий конуссимон соҳаси бўйича фарқланишларга кўра, турли хил авлодларга кириши аниқланади.

Дастлаб, Ostertagiinae кенжа оиласида *Ostertagia*, *Orloffia*, *Teladorsagia*,

Marshallagia va *Spiculopteragia* авлодларининг морфаларини аниқлаш орқали ўн тўртта полиморф турларга ажратилган эди (Drozd, 1974). Улардан бешта авлоди мажор формаларга (*Ostertagia*, *Orloffia*, *Marshallagia*, *Teladorsagia*, *Spiculopteragia*) va тўртта авлоди эса минор турларга (*Skjabinagia* Kassimov, 1942; *Grosspiculagia*; *Rinadia*; *Apteragia* Jansen, 1958) ажратилди. Кейинчалик бу рўйхат ўн тўққизтага кенгайтирилди (Drozd, 1995). Шундай қилиб, қувушшоҳлилар сўйилиб кўрилганда *Skjabinagia* “турлари” доим *Ostertagia* авлоди мажор турлари билан биргаликда учрашлиги қайд этилди. Ўз навбатида *Rinadia* va *Apteragia* авлоди “турлари” ҳам сони жиҳатдан кўп учровчи *Spiculopteragia* авлоди турлари билан, *Grosspiculagia* “турлари” эса *Marshallagia* авлоди турлари билан учради. Бунда ҳар қайси жуфтлик маълум тур белгилари билан ўхшайди, лекин авлод белгилари билан фарқ қилади. Ҳар бир популяцияда мажор va минор формаларнинг хиссалари, одатдагича, ҳар қайси жуфтлик учун ўзгармай қолади. Йиғилган маълумотлар асосида шундай **гипотезага** келиш мумкин-ки, бу жуфтликлар битта турнинг полиморф формалардир, қайсики морфологик жиҳатдан фарқланади va шунинг учун турли авлодларга жойлаштирилган (Drozd, 1995).

1.4.Биохилма-хиликни ўрганишда молекуляр-генетик усуларнинг қўлланилиш тарихи.

Биохима-хилик va систематикани ўрганишда 1960-1970 йилларда Аллозим технологияси (изофермент) анализи ишончли жойни эгаллади. Бу изоферментлар полиморфизмни очилиши билан боғлиқ. Фосфолипидлар таркиби бўйича ҳам талай ишлар амалга оширилди.

Паразит нематодалар турининг популяцион структурасини аниқлаш учун биринчи навбатда турли ферментлар, оксиллар электрофорези методларини қўллашга асосланган. Бунда криптик турларни аниқлашда электрофорез ҳаракатида оқиллар изоформаларни бўлиниш усулидир.

Бу методлар кўп меҳнат талаб қилувчи va аниқланадиган ферментларнинг етарли даражада турғун (стабил) бўлмаслиги боис ҳамиша ҳам ишончли эмас эди. Шунга қарамадан, муҳим натижалар олинган. Муҳим ишлар гуруҳига италиялик проф. Л.Паджининг тадқиқотларини киритиш зарур. Унинг раҳбарлигида денгиз ҳайвонларининг паразит аскаридалари асосий ферментларининг ўзгарувчанлик спектрлари тадқиқ қилинди. Жумладан, *Pseudoterranova decipiens* нематодаси популяцион структурасини ўрганиш учун 16 та энзим локуси, шу жумладан бир нечта малатдегидрогеназа, эстеразалар va бошқа ферментлар ишлатилди (Paggi et al., 1991). Бу ферментларнинг спектрларидаги аниқ фарқлар ушбу нематоданинг шимолий атлантика популяцияси учта генетик мустақил турлардан иборатлигини кўрсатди (А, В, С). Фақат бир марта дурагай индивид – А va В шакллари чатишишининг ҳосили аниқланди. Паджи va ҳаммуаллифларининг кўрсатишича, ҳар бир учталиқ шакл (форма)лар чегарасида генетик хилма-хилликнинг даражаси жуда кам бўлиб, ушбу формалар ўртасида эса анча катта (ҳар бир гуруҳ ичидаги фарқдан икки даражада кўп). Ушбу уч гуруҳининг ажралиш даври 2-4 миллион йилни ташкил этади. Ферментларни

тадқиқ этиш натижасидагина ушбу уч гуруҳ ўртасидаги морфологик фарқлар, шунинг учун уларнинг географик тарқалиш хусусиятлари аниқланди. Шунинг ҳам таъкидлаш зарурки, бу формаларнинг ҳар бирига ўзига хос хўжайинлари мавжуд.

Худди шундай ишлар *Ostertagiinae* кенжа оиласи нематодларининг таксономик ҳолати бўйича кўп изланишлар олиб борилган. Жумладан, *Teladorsagia* (= *Ostertagia*) авлодини учта, *T. circumcincta*, *T. davtiani* ва *T. trifurcata* турлари статуси борасида ноаниқликлар мавжуд эди. Кейинчалик, бу турларни аллозим анализи асосида кўриб чиқиб, улар битта турнинг турли морфалари деган хулосага келишган (Andrews & Beveridge, 1990).

Янги услублардан фойдаланиш, хусусан ПЗР, полиморф турлар борасидаги муаммоларни ечишда ва янги маълумотларни олишда имкон яратди. Бундай амалга оширилган тадқиқотларда *Ostertagia gruehneri* Skrjabin, 1929 ва *O. arctica* Mizkewitsch, 1929 турларининг ITS-1 ички транскрипцияланувчи спейсер) ва ITS-2 соҳалари бўйича нуклеотидлар кетма-кетлиги солиштирма тарзда ўрганилганда, яққол тарздаги фарқланишлар қайд қилинмаган бўлиб, бу ҳолат уларнинг битта турга мансуб эканлигидан далолат беради (Dallas et al., 2000). Бундай амалга оширилган тадқиқотларда *Teladorsagia circumcincta* (Stadelman, 1894), *T. trifurcata* (Ransom, 1907) ва *T. davtiani* (Andreeva et Satubaldin, 1954) турларини рибосома ДНКси таркибида ITS-2 соҳаси (ички транскрипцияланувчи спейсер) солиштирма тарзда ўрганилганда яққол тарздаги фарқланишлар қайд қилинмаган бўлиб, бу ҳолат уларнинг битта турга мансуб эканлигидан далолат беради (Stevenson et al., 1996, Амиров ва бошқ., 2014).

1.5. ДНК-штрихкодлаш.

Аслида нима таклиф қилинган эди? Фойдаланиладиган намунадан ДНК ажратишда, биринчи навбатда таксономик таркиби шу соҳадаги эксперт томондан ҳар томонлама аниқланган ва ваучер намунанинг сақланган бўлиши керак. Агарда, намуна жуда кичик бўлса ва ундан бирор қисмидан ДНК ажратишни имкони бўлмаса, унда аниқ фотографияси бўлиши шарт (е-ваучер). Генбанк (GenBank) базасидаги маълумотларнинг аниқ эмаслиги ва муаммолардаги хатолар алақачон илмий адабиётларда муҳокама қилинмоқда. Сўз, секвенирлаш ҳатосида, намунадаги турларни таксономиясини аниқлашда бепарволик (этикетларни чалкаштириш, материални етарлича текширмаслик) ёки объектив сабаблар таъсирида, вариабельлик ҳолларда ва ёмон ажралувчи турлар хусусида боради [Tautz, 2002; Harris, 2003; Vilgalys, 2003]. Масалан, айрим гуруҳ қўзиқоринларнинг нотўғри аниқланиши, то 20 % ташкил қилиши мумкин [Bridge, 2003; Nilsson, 2006]. Намуналарнинг йиғиш тизимида аниқ маълумотлар учун алоҳида аҳамият берилади (йиғиш жойи, аниқ координаталари, йиғувчининг фамилияси). Илгари маълумотлар базасида бундай фикрлар муҳокама қилинган, лекин ҳозирда бундай маълумотлар албатта бўлиши шарт. Барча организмлар учун хос бўлган маркер танлаш идеяси мавжуд эди. Мисол учун, ҳашаротлар систематикасига бағишланган обзорда [Caterino, 2000],

муаллифлар маркерларни стандартизация қилиш муҳимлигини муҳокама қилишди, шундай қилиб, турли тадқиқотчилар, турли маркерларни алоҳида гуруҳлари бўйича яхши самарасини ҳисобга олдилар (асосан қуйи таксономик даражадаги гуруҳлар учун), натижада қиёслаш ва умумлаштира олмадилар.

Танланадиган ягнона ген қуйидаги хоссаларга эга бўлиши керак: у нисбатан қисқа фрагментли соҳа бўлиши керак, етарлича вариабель бўлиб, яқин қариндошлик турларни ажратиши, бунинг учун бу фрагмент ўзидан ён томонларда консерватив соҳа бўлиши керак (етарлича консерватив бўлиши, чунки кенг ўзига хос праймерлар билан амплификация қилиниши керак). Секвенирлаш энгил ва арзон бўлишлиги учун нисбатан кичик размердаги фрагментлар (700-800 ж.н атрофидаги) бўлишлиги керак. Текислашни оддий бўлишлиги учун унда бўлиниш (инделей) таркиби кам бўлиши керак. Стандарт ген сифатида 5' фрагменти, оксил митохондриясининг цитохром-оксидаза кодловчи 1 суббирлиги (CO1 ёки сох1) танланди, қайси-ки илгари турлар ўртасидаги ўғарувчанлик даражасини яхши кўрсатган [Moore, 1995]. CO1 гени тадқиқ қилинган митохондриал геномларнинг ҳаммасида иштирок этади, у 1540 нуклеотидларни ўз ичига олади, қиёсий тадқиқотлар учун одатда унинг вариабель қисми яқин 650 ж.н. фойдаланилади. Унинг амплификацияси учун стандарт паймерлари яратилди [Folmer, 1994; Zhang, Hewitt, 1997].

Ядро генларига нисбатан митохондриал генлар билан ишлаш анчагина қулай. Бу генларни энгилгина амплификация қилинади (айниқса бузилган материаллар), ҳар бир хужайрада 100-10000 митохондрийлар бор. Митохондриал геномнинг полиморфизм даражаси ядро геномига нисбатан анча юқори (5-10 марта), интронлар сақламайди. 2000 йиллардан бошлаб митохондриал ген билан турларнинг аниқлаш ва ажратишни исботлашга оид кўпгина ишлар чоп этилди. Асосийси тадқиқотчилар учун қулайлиги, лекин маркернинг етарли даражада сифатлилигидир. Шунинг учун-ки CO1 геннинг фрагментлари фақатгина турларни аниқлашда (хайвонларда) фойдаланиш мумкин, бу борада кўплаб ишлар бажарилди.

Ҳайвонларнинг турли гуруҳларига мансуб 13000 ошиқ жуфтликдаги турларида CO1 гени фрагментлари билан тақосланган [Hebert, 2003a] бўлиб, турли хил тур организмлари 2% камроқ фарқ қилади, битта тур организм учун эса 1% ошмайди [Hebert, 2003b]. Тадқиқ қилинаётган хайвонларнинг бу кетма-кетликнинг ички ва турлар ўртасидаги фарқланиш (диверганция) даражаси 5-20 мартага фарқ қилди. Кўпгина тадқиқот ишларда CO1 генлари фрагментлари билан тўғри идентификация қилинган гуруҳлари 96-100% ташкил қилди.

Хеберт ва унинг ҳаммуалифлари 2004 йилда CO1 гени фрагментлари асосида ДНК-штрихкоднинг самарасини исбот қилиш бўйича 4та иш чоп этишди. Улар турли гуруҳ хайвонларда бажарилган, капалакларда (Hebert, 2004a), кушларда [Hebert, 2004b], ўргимчакларда [Barrett, Hebert, 2004] ва оёқдумлиларда [Hogg, Hebert, 2004]. Муаллифлар ўзларининг маълумотлари ва ҳамда генбанк базаси маълумотларидан фойдаланишди. Одатда,

Кимуранинг иккипараметрли модулидаги масофаларни ҳисобга олган ҳолда кетма-кетликнинг фарқини топишди [Ней, Кимура, 2004] ва ички ва тур ўртасидаги вариабелликни таққослашди. Айрим ҳолатларда самарали таксономик идентификация қилинганларига баъҳо берилди, бунинг учун ўрганилган битта турнинг кетма-кетликлари олинди, дарахт қилинди (яқин қўшнилар усули), кейин навбат билан бошқа индивидларнинг кетма-кетликлари қўшилди ва бу турлар кластер қилинди ва текширилди.

2004 йили Шимолий Американинг қушлари бўйича иш эълон қилинди [Hebert, 2004b], бунда илгари морфологик аниқланган, ўрнатилган ДНК-штрихкод ёрдамида турлар ўртасидаги тегишлилик текшириб кўрилди. CO1-кетма-кетлиги бўйича турлар ўртасидаги фарқ, ички турларга қараганда 19-24 марта кўп (тегишли 7,05-7,93%, қарама-қарши 0,27-0,43%) эканлиги аниқланди ва маълумотларга баъҳо берилди.

Канада Артикасидан оёқдумлиларнинг (*Collembola* туркуми) 13 авлодига мансуб 19 тури ўрганилди (ҳар бир вакилидан 1-3тадан). Битта авлодга мансуб бўлган турлар ўртасидаги фарқлар 8-19 % ташкил этди-ки, бу ҳолда битта турнинг идивидлари ўртасидаги фарқлар эса кўпинча 1 % кам бўлди. Бу ишда учратилган иккитасидаги фарқланиш (дивергенция) истисно тариқасида (5 и 13%), муаллифлар бунга бир-бирига ўхшаган “эгизак” турларнинг ҳали аниқланмаган далили деб ҳисобладилар.

Натижада Хебертни “штрихкоднинг отаси” деб атай бошладилар [Marshall, 2005] ва уни ҳаммуаллифлари шу хулосага келишди, ДНК-ШК ҳали тавсифи берилмаган турлар ва янги турларни идентификация қилиш яроқлидир, бу тўлиғича исбот қилинди. Бунда CO1- фрагменти бўйича ички ва турлар ўртасидаги фарқ 10 мартагача фарқ қилиши (10xSST - species-screening threshold) таклиф этилди ёки турлар кетма-кетлиги ўртасидаги фарқ тахминан 2-3 %, турларни аниқлаш чегарасидир [Hebert, 2004b]. Иккинчи критерий ўзаро (реципрокной) монофил бўлиш, жумладан кетма-кетликни ўрнини тўлдириб бўлмасликдир.

1.6. Молекуляр таҳлиллар учун фойдаланиладиган генетик маркерлар, ядро генлари.

Юқорида айтилган фикрлардан келиб чиққан ҳолда маълум бўлдики, тадқиқотчиларнинг ҳамма талабларга жавоб берадиган ягона маркер танлаш мумкин эмас. Турларни тўғри аниқлаш ва ажратиш, тур ичидаги ва популяциялар ичидаги полиморфизм даражасини аниқлаш ҳамда филогенетик дарахтлар тузиш учун бир неча маркерлардан фойдаланган ҳолда амалга оширилди. Мисол учун симпатирик турларни ажратиш учун, яъни турлар ўртасида чатишиш бор йўқлигини исботлаш учун ядро ва митохондриял маркерлар фойдаланиш орқали амалга оширилади. Бироқ, идеал маркер талабини тузиш мумкин [Cruickshank, 2002].

1. У геномда битта нухсада бўлиши керак. Агарда кўпнусахали генлардан фойдаланилганда, нухсалар нуклеотидлар кетма-кетлигидан фарқ қилиши мумкин, ҳаммасидан ёмони, бўлиниш ва қўшимчаларни бўлиши (рРНК кодловчи ички транскриб бўлмаган спейсер генлари), ПЗР маҳсулотларини

векторда “клонирование” ишларини қилиш ва кейинчалик бир неча бактериал клонлардан қўйилган плазмидаларни секвенирлаш, бу эскирган кенг таҳлилларни қилиб бўлмаслигига ёки кўп харажатлилигига олиб келади [Patwardhan, 2014].

2. Шундай қилиб, кейинги таҳлиллар учун қабул қилинган маркерлар сифатидаги ген кетма-кетлиги, бошқа организмларнинг шу генини кетма-кетлиги билан текислаш процедурасидан ўтиш керак, текислаш осон амалга оширилиши керак. Бу шуни билдирадики, таҳлил қилинадиган кетма-кетлик узунлиги бўйича катта фарқ қилмаслиги, қўшиш ва бўлинишлар кўп бўлмаслиги лозим. Бироқ, айрим ҳолларда кўрилатган соҳани текислаш қийин бўлиши ёки иккиламчи тизимдагини қиёслаш (тРНК), бундай кетма-кетликларни ишлатиш мумкин бўлади [Kjer, 1995].

3. Аҳамиятга эга бўлган маълумотни олиш учун алмаштириш сони оптимал бўлиш керак. Агар гени эволюцияланиши тез бўлса, бу гомоплазияга олиб келади, бу олинадиган маълумотларни ишончлилигини пасайтиради. Бошқа томондан, консерватив соҳанинг (масалан, рРНК кодловчи) яқин кетма-кетлигини таққослашда (ёки яқинда ажралган турлар) бу генетик таҳлил билан уларнинг ажратиб бўлмайдигани [Patwardhan, 2014].

4. Фрагментларни амплификация қилишда ишлатиладиган праймерлар генининг консерватив соҳасига мос бўлиши, чунки ўрганилаётган систематик жиҳатдан узок бўлган организмларни фрагментларини амплификация қилиш мумкин бўлади. Бироқ, улар ниҳоятда “универсал” бўлмаслиги керак, тескари ҳолатда геномнинг бошқа соҳаларини ўзига хос бўлмаган амплификацияга олиб келади [Yli-Mattila, 2000].

Қуйида кенг тарқалган ядро ва митохондрия маркерлар кўриб чиқилади.

Рибосомал РНК (рРНК) кодловчи ядро генлари. Рибосомал генлар ўзининг универсаллиги ва юқори консерватив ва вариабель доменларини бўлиши билан маркерлар ичида энг яхшилари ҳисобланиб, нисбатан узок гуруҳларни ҳам филогенетик алоқаларини ўрганишда фойдаланилади [Patwardhan, 2014]. Ҳамма организмларда рибосомалар асосан икки суббирликларда, кичик (18S – эукариотларда ва 16S – қолган ҳаммасида) ва катта. Бактериялар ва археобактерияларда катта суббирликнинг икки вариантда: 5S, 5,8S ва 23S/28S. рРНКнинг ички тизими катта ва кичик суббирликлари, тегишли 10 ва 8 вариабель соҳаларни ҳосил қилади. рРНК оксилкодловчи генларга нисбатан камроқ эволюциялайди [Schmidt, 2007].

16S рРНК – фойдаланилган маркерлар ичида биринчиларидан биридир. Биринчи бўлиб, ПЗР ва секвенирлаш давридан олдин, 1960 йилларда Dubnau ва ҳаммуалифлари 16SPНК кетма-кетлиги таҳлили учун *Bacillus Cohn*, 1872 авлоди турларида қўллашди [Dubnau, 1965]. Бироқ, Возанинг [Woese, 1987] классик ишларидан кейин, бу ген бактериялар таксономиясида қўлланила бошлади. Бу генининг кетма-кетлиги узунлиги 1550 ж.н. иборат бўлиб, турли гуруҳ бактериялар учун олигонуклеотид “имзолари” хусусиятга эга бўлиб, ҳам вариабель ва ҳам консерватив соҳаларни ташкил этади [Clarridge, 2004]. Ҳозирги вақтда секвенирлашни янги авлодлари қўллаган ҳолда метагеном

тадқиқотлардан фойдаланилмоқда (одатда 4-5-4 секвенирлаш, бунда ўқиш катта узунликда бўлади).

5S рРНК – 120та нуклеотидли кўпгина организмларнинг рибосомаларида қанташувчи юқори консерватив кетма-кетлик бўлиб, айрим кўзикоринлар, айрим ҳайвонлар ва кўпчилик протистлардан ташқари, ўсимликларнинг филогениясини тузишда фойдаланилади [Troitskii, 2003]. Бироқ, қисқа размерда бўлганлиги учун, ишончлилик ва аниқлиги тегишли ишларда анча паст.

28S рРНК – узунлиги 1000 нуклеотиддан ошиқ. Унинг кетма-кетлиги кўпгина кўпхужайрали ҳайвонларда аниқланган. Унинг иккиламчи тузилишини таққослаш ва шу таққослаш асосида филогениясини қуриш – филогенетик таҳлиллар учун асосий инструментдир. Айрим ҳолларда бу геннинг тўлиқ размери эмас, уни фрагментлари фойдаланилади (400 нуклеотидга яқин С2-С3 соҳалари) [Schmidt, 2006].

18S рРНК – бу геннинг тўлиқ размери 1800 нуклеотидга яқин бўлиб, филогенетик дарахтларда кенг қўлланилади, айрим ҳолда эса турни идентификация ва ажаратишда ишлатилади. Қолаверса, вариабель соҳасининг бўлиши билан у ген яқин турларни ажрата олмаслиги мумкин, умуман олганда кетма-кетлик етарлича консерватив. Кейинги вақтларда филогенетик анализлар учун 18S, ҳамда 28S рРНК генлари ишлатилмоқда. рРНК 18S гени кўпинча инфузорийлар ва бошқа содда ҳайвонлар турларини аниқлаш мақсадида метагеном таҳлилида қўлланилмоқда.

Шунга қарамасдан, рибосомал генлар шак шубҳасиз кўпкопияли, коидадан ҳоли сифатида улардан фақат биркопияли генлар маркерлари сифатида кўрсатишади. Уларнинг фойдаланиши мумкин унинг юқори консерватив туфайлидир, геннинг ҳамма нусхалари бир хил. Хромасомада, генлар, рРНК кодловчи генлар оралиғини тақил қилувчи ички транскриб спейсери дейилади (Internal transcribed spacer, ITS).

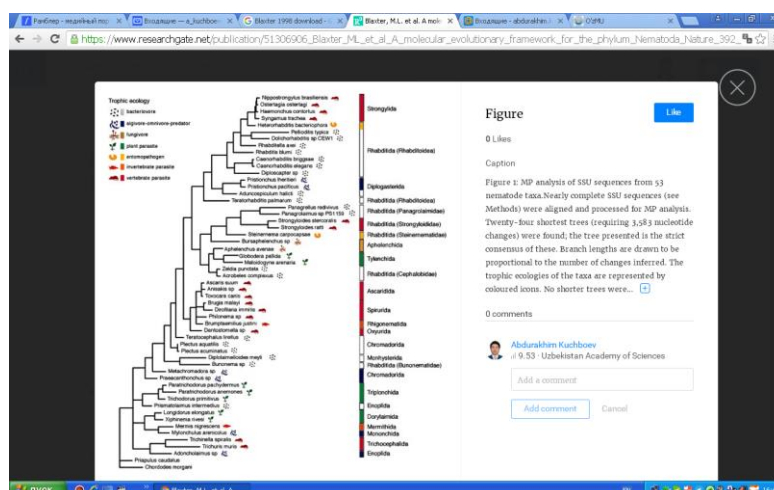
ITS – кодланмайдиган кетма-кетлик, шунинг учун уларда рибосомал ва оксилкодловчи генларга нисбатан полиморфизм ниҳоятда юқори. Уларнинг праймерлари универсал ва ҳар қандай таксономик гуруҳлар тегишли фрагментларини амплификация қилишда фойдаланиш мумкин [Persson, 2000], масалан, сув ўтлари, юқори ўсимликлар ва умуртқасиз ҳайвонлар, ундан ташқари, кўзикоринлар учун ҳам ишлаб чиқилган, қайсики молекуляр штрихкод сифатида қўлланилмоқда.

Шу ўхшаш универсал праймерлар боғлиқлиги, уларнинг кетма-кетлиги рРНК кодловчи тегишли 28, 18 или 5,8 консерватив кетма-кетликлари генларига мос келади. Бу маркерларни камчилиги, биринчи навбатда, бир неча кетма-кетликларни текислашни қийинлиги, чунки, уларнинг узунлиги турли турларда сезиларли даражада фарқ қилади, йўқотилиш ва қўйилишлар бўлиши мумкин. Шу сабабли ҳар доим ҳам улардан фойдаланила олмаслик мумкин, масалан турарни ажратишда, чунки ITS ва рРНК кодловчи генлари кўпнусаҳали, лекин рибосомал генлардан фарқи, битта организм бир неча нусаҳада ITS бўлиши, узунлиги ва йўқотилиш ва қўйилишга эга бўлиши билан фарқланади [Jousson, 2001]. Бироқ, бу ҳамма организмларда ҳам одир

бўлмаслиги мумкин, кўп ҳолларда бу маркердан яқин турларни ажратишда фойдаланиш мумкин бўлади.

1.7. Умуртқасиз ҳайвонлар молекуляр систематикаси ва таксономияси бўйича олиб борилаётган тадқиқотлар.

Стронгилидлар паразит нематода гуруҳлари орасида эволюцион ҳолати жиҳатдан яхши самарали ҳисобланади. Уларнинг кенг қўламдаги хилма-хиллиги XX асрда тадқиқотчиларнинг бу нематодаларни *Strongylida* Railliet et Henry, 1913 отрядига ажратишга олиб келди. Уларнинг эркин яшовчи нематодалар – рабдитидалар билан кўп жиҳатларининг морфологик ўхшашлиги анчадан бери маълум эди. Нематодалар систематикасида молекуляр методларнинг кенг қўлланиши стронгилидларнинг статуси масаласини тиклади, чунки рибосомал кетма-кетликнинг таҳлили натижаларига кўра стронгилидлар рабдитидларнинг бир йўналиши эканлигини кўрсатади (Aleshin et al., 1998; Blaxter et al., 1998; Sudhaus, Fitch, 2001). Стронгилидларнинг тупроқдаги *Heterorhabditidae* (Poinar, 1975) оиласи энтомопатоген нематодалар билан муайян филогенетик боғлиқлиги аниқланган.



Расм. Нуклеотидларнинг SSU асосидаги Нематода синфининг филогенетия гипотезиси.

Стронгилидларнинг кариндошлик алоқалари тўғрисидаги тасаввурлар П.Де Лей ва М.Блакстер (Blaxter, De Ley, 2002) таклиф қилган нематодалар синфи системасида ўз аксини топган. Бу системада стронгилид (даражаси) (*Rhabditida* Chitwood, 1933 отряди таркибидаги *Strongyloidea* Weinland, 1858) катта оила даражасига туширилади. Стронгилид таркибидаги катта оилалар оила даражасига туширилди: *Strongylidae* Baird, 1853; *Trichostrongylidae* Leiper, 1912; *Metastrongylidae* Leiper, 1908 ва *Ancylostomatidae* Looss, 1905. Шу билан бирга бу катта оилага *Heterorhabditidae* Poinar, 1975 оиласи муаллифлар томонидан киритилган. Стронгилидлар даражасининг бундай ўзгаришлари кладистик ва анъанавий ёндошувлар ўртасидаги ўзаро келишилиб, улар *Trichostrongylidae* оиласининг “ички” таксономик структурасини ўзгартирмаган.

Паразитлар молекуляр таксономияси бўйича Ўзбекистондаги тадқиқотлар.

ЎЗР ФА ЎХОГИ Молекуляр биология ва биотехнология лабораториясида турли гуруҳ ҳайвонлар паразит гельминтларнинг турлар таркиби, молекуляр таксономияси, филогенияси ва систематикасини ўрганиш муаммолари билан шуғулланади. Шу жумладан, туёкли ҳайвонлар нематодаларининг морфологияси, молекуляр диагностикаси ва уларнинг сонини назорат қилиш бўйича илмий тадқиқот ишлари ўтказилмоқда. Ҳозирда *Metastrongylus*, *Dictyocaulus*, *Protostrongylus*, *Spiculocaulus* ва *Cystocaulus* авлодларининг 9 тури ва *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Marshallagia*, *Teladorsagia* ва *Setaria* авлодларининг 8 тури бўйича 50 ортиқ рибосомал ДНКси ITS ва 28S соҳасининг нуклеотидлар кетма-кетлиги таҳлил қилинди. Аниқланган нематодалар ичидан 5та тури ҳалқаро Генбанк (NCBI) базасига жойлаштирилди ва у учун янги ҳисобланди (Abramatov et al., 2013; Kuchboev et al., 2015; Амиров и др., 2014, Амиров ва бошқ., 2015).

Биоинформатик таҳлил қилинган ITS соҳасининг нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида ўпка нематодаларини тезкор аниқлаш мақсадида турларга хос бўлган алель праймерлар яратилди. Бу ихтиро учун ЎЗР интеллектуал мулк агентлигига патентлаш учун талабнома берилди. Бу келажақда ветеринария амалиётида паразит нематодаларнинг молекуляр диагностикаси учун ПЗР тизимида фойдаланиш мумкин бўлади.

Ундан ташқари қўй ва қора молларда паразитлик қилувчи ва шу вақтгача олимлар ўртасида кескин мунозарага бахсга сабабчи бўлган гемонх нематодасининг иккита тури устида молекуляр- генетик тадқиқот ўтказилди. Бу усул ёрдамида гемонх турларни рибосомал ДНКсининг ITS-2 ўрганилди ва таҳлил қилинди. Натижада бу турларнинг алоҳида- алоҳида тур эканлигини тасдиқлаш имконини берди (Кучбоев и др., 2012, Abramatoev et al., 2013). Олинган нуклеотидлар кетма-кетлиги Генбанк базасига жойлаштирилди (NCBI).

Иккита протостронгилид нематодаси учун турга хос бўлган праймерлар яратилди ва ихтирони Патентлаш учун буюртма берилди.

Лабораторияда фан доктори, фан номзоди, учта кичик илмий ходимлар фаолият юритади ва учта амалиёт хоналари: молекуляр биология, ламинар бокс, автоклаф ва центрифуга хоналари ҳамда илмий ходимлар учун мўлжалланган иккита хонада илмий-тадқиқот ишлари олиб борилади.

Лаборатория илмий-тадқиқот ишлари олиб бориш учун керак бўлган барча замонавий асбоб-ускуналар ва жиҳозлар билан таъминланган.

Назорат саволлари:

1. Геносистематика нимани ўргатади?
2. Биологик хилма-хиллик терминини аниқланг ва тушунтиринг?
3. Жумбоғли турлар деганда нимани тушунаси?
4. Турлар ичидаги полиморфизм нима?
5. «Эгизак-турлар» терминини фанга ким киритган?
6. ДНК-штрихкодни тушунтириб беринг?
7. Ҳайвонлар молекуляр систематикаси ва филогенияси учун қайси ядро маркерларидан фойдаланилади?
8. Қайси ҳайвонот олами гуруҳлари учун молекуляр систематика яратилган?
9. Ўзбекистонда умуртчасиз ҳайвонлар молекуляр идентификацияси ва таксономияси бўйича қандай ишлар амалга оширилмоқда?

Фойдаланилган адабиётлар:

1. De Ley P., Blaxter M. Systematic position and phylogeny // The biology of nematodes / Ed. by D.L.Lee. L.; N.Y.: Taylor and Francis, 2002. P. 1-30.
2. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes.// Proc. R. Soc. Lond. . - 2003. -V.

2-мавзу: Молекуляр-генетик таҳлиллар учун зоологик намуналарни йиғиш талаблари. Геном ДНКсини ажратиш. Амплификация - ПЗР услубини асосий тушунчаси. ПЗР-амплификация.

РЕЖА:

2.1. Молекуляр-генетик таҳлилларда зоологик намуналарни йиғиш талаблари.

2.2. Стандарт фенол-хлороформ ва коммерцияли реагент тўпламлари ёрдамида умуртқасизлар намунасидан геном ДНКсини ажратиш.

2.3. ПЗР-амплификация ўтқазиш.

2.4. ПЗР учун керакли митохондриал ва ядро маркерларини танлаш.

Таянч иборалар: *деструктив ўзгариш, диктиокауллар, гемонхлар, паробнемалар, контаминация, Гель-электрофорез, УФ-нури, ТАЕ, агароза, бромистый этидий, ДНК тозалаш тўплами, ДНК-маркер.*

2.1. Молекуляр-генетик таҳлилларда зоологик намуналарни йиғиш талаблари.

Зоология кузатув объекти – кўп хужайрали (Animalia) ва бир хужайрали организмлар (протистлар ҳисобланади. Молекуляр- генетик таҳлил учун намуна сифатида кузатилаётган умуртқасиз ҳайвон ҳажмига қараб бутун организмлар (ўлчами камида 1 см), тана қисмлари, тўқима ва ички органлар бўлаклари хизмат қилиши мумкин. Маъқбул намуна ўлчами - 5 мм x 2-3 мм, оғирлиги 0.1 дан 5 г гача. Молекуляр- генетик таҳлил учун зарур бўлган материалларни тўплаш жараёнида керакли намуна ДНК молекуласини деструктив ўзгаришини олдини олиш мақсадида 70°C ли чуқур музлатув ҳолатига туширилиши ёки, 70% ли этанол эритмасида (C₂H₅OH) белгилаб қўйилмоғи зарур. Тутиш жараёнидан кейин организм нобуд бўлса, намунани қайд қилиш, 20-30 дақиқа мобайнида амалга оширилиши зарур. Текширилаётган ҳайвон намуналарни формальдегид эритмаси билан қайд қилиниши, яроқсиз ҳисобланади, чунки қуйидаги бу модда ДНКга жиддий таъсир кўрсатади, таназулни олиб келади ва таҳлил натижаларини қисман ёки тўлиқ бузилишига сабаб бўлади. 70% ли этанол эритмасида қайд қилинган намуналарни музлатгичда сақланиши мақсадга мувофиқ бўлади, агар бундай шароит бўлмаса, хона ҳароритида қуёш нури тушмайдиган жойда сақланиши тавсия қилинади. Сақлаш учун 1-2 мл пробиркалардан (эппендорфлар) фойдаланилади.

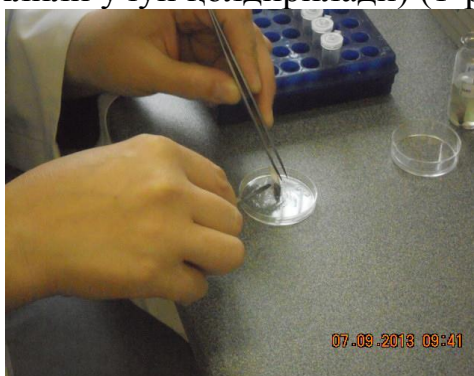
2.2. Стандарт фенол-хлороформ ва коммерцияли реагент тўпламлари ёрдамида умуртқасизлар намунасида геном ДНКсини ажратиш.

ДНК ва РНК ажратишни таъминлашда бир қатор приоритет талабларни ажратиш мумкин:

- биологик материални лизиси;
- селектив экстракция (сорбция);
- катта хажмда тўплаш;
- ПЗР сусайтирувчи компонентлардан ажратиш;
- ДНК ва РНК ажратиш;
- юқори фоизда чиқиши;
- калибровка мумкинлиги ва ижобий назорат;
- контаминациянинг йўқлиги;
- кам вақт сарфланиши;
- автоматизациянинг мумкинлиги.

Эукариот организмлардан нуклеин кислоталарни ажратиш ва фракциялашда традицион ва коммерсион тайёр реагент-тўплам усуллари (наборда ишнинг бажарилиши келтирилган) фойдаланилади.

Масалан, геном ДНКси ҳайвонларнинг ўпка ва ошқозон-ичак тизимида эндопаразитлик қилиб яшовчи нематодалар тўқималаридан ажратилади. Олдиндан 96%ли этил спиртга солинган нематодалар соат ойнасида дистилланган сув билан яхшилаб ювилади ва ҳар бирини алоҳида 100 мкл лизис буфферини солинган эппендорф пробиркасига солинади. Йирик нематодалардан (диктиокаулар, гемонхлар, парабронемалар) ДНКсини ажратишда, уларнинг бош қисми ишлатилгани маъқул (танани бош қисмидан қизилўнгач тугаган жойигача) ва бу бинокуляр лупаси остида, кўз скальпели ёки бритвани лезвияси ёрдамида кесиб олинади (эркак нематодаларнинг дум томони эса морфологик таҳлили учун қолдирилади) (1-расм).

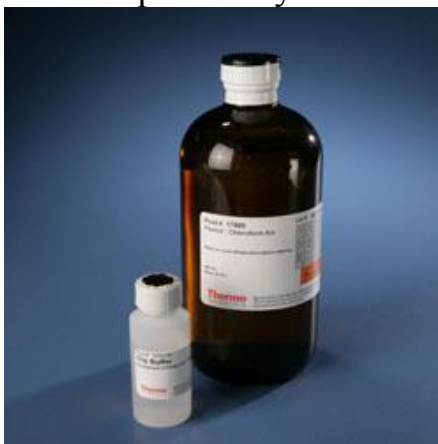


1- расм. ДНК ажратиш учун нематод танасидан препарат таёрлаш.

Фенол – хлороформли услуби (ФХ- услуб).

Бу – нуклеин кислоталарни ажратишнинг классик услубидир. Бу услуб протеиназа К иштирокида детергентлар томонидан биологик материалларнинг парчаланиши ҳамда фенол ва хлороформ ёрдамида нуклеин кислоталарни ажратиш олишни ўз ичига олади (2-расм). Бунинг афзаллиги шундаки, Diatom

DNA Prep (Россия) ва Dneasy Tissue Kit (Германия) реагентлар тўпламига қараганда бу услуб билан анчагина кўп миқдорда ДНК ажратиш олинади. Услубнинг камчиликларига эса унинг давомийлиги, машаққатлилиги, агрессив органик эритувчиларнинг ишлатилиши ва ДНКни оксилдан ҳам, РНКдан ҳам етарли даражада тозаласлигини киритиш мумкин.



2-расм. ДНК экстракцияси учун Фенол-Хлороформ реагенти.

Нематода тўқималаридан нуклеин кислоталарни ФХ – экстракция қилиш усули қуйидаги босқичлардан иборат:

1. Нематода танасидан 0,05 г оғирликдаги тўқимани бўлакчаси олинади.
2. Нематодаларнинг тўқималари, таркибида 40 мМ трис – HCl (pH =8,0), 0,5 мМ ЭДТА, 1^xSSC бўлган буфер эритмасида (тўқима ва буфернинг 100 мкг; 500 мкг нисбатида) гомогенизация қилинади.
3. 0,5% гача SDS ва протеиназа K ни охириги концентрацияси 1 мг/мл бўлгунча қўшилади, аралаштирилади ва 37°C ҳароратда 2-3 соат давомида инкубация қилинади ёки 18 соатга қолдирилади.
4. Пробиркага 5 М натрий ацетат охириги концентрацияси 0,1 М бўлгунга қадар қўшилади ва аралаштирилади. Сўнгра 1:1 нисбатда фенол, тўйинган HCl триси (pH=8,0) қўшилиб, 10-15 дақиқа давомида аралаштирилади.
5. Хлороформни 1:1 нисбатдаги ҳажмда қўшиб, яна 5-10 дақиқа мобайнида аралаштирилади.
6. Олинган аралашмани 4°C ҳароратда 20 дақиқа центрифуга қилинади (бир дақиқа давомида 4000 айланма тезликда).
7. Юқоридаги фракцияни эриган ДНК билан (супернатант) пипетка ёрдамида тортиб олинади.
8. ФХли оксилдан ажратиш жараёни (депротеиназация) ундан бутунлай холос бўлгунга қадар такрорланади.
9. Ажратиш олинган супернатантга 2:1 нисбатдаги ҳажмда хлороформ қўшилиб, 10-15 дақиқа аралаштирилади, сўнгра 15 дақиқа центрифуга қилиниб (бир дақиқа давомида 4000 айланма тезликда) юқорги фазаси олинади.
10. 1 мл ли эриган ДНКга 5 М натрий ацетат охириги концентрацияси 0,2 М бўлгунча қўшилиб, аралаштирилади.
11. Икки ҳажмдаги 96% ли этанол эритмаси қўшилиб, ДНК чўкмага тушгунга қадар бир маромда аралаштирилади.

12. -20°C хароратда бир сутка давомида совутилади, сўнгра 15 дақиқа давомида 15000 айланма тезликда центрифуга қилинади (0°C гача совугунча).

13. Супернатант олиб ташланади, ДНК чўкмаси 70% ли этанол эритмасида ювилади.

14. Этанол эритмаси тўкиб ташланади, ДНК ҳавода этанол эритмаси учиб кетгун қадар қуритилади ва ионсизлантирилган сувда эритилади.

Олинган ДНК препаратларини концентрацияси спектрофотометрда аниқланади. Ажратилган ДНК концентрацияси 2,0 – 2,3 мкг/мкл ташкил қилади.

Diatom DNA Prep (Россия) реагентлари тўплами ёрдамида ДНК ажратиш услуги.

Бу услуб реагентлар ёки китлар ёрдамида нуклеотидларни экстракция қилиш услубларидан бири ҳисобланади. Бу тўплам ДНКни турли табиий материаллардан ажратиш, шунингдек клиник намуналардан ДНКни тез тозалаб олиш имконини беради. Бу усул ФХ – услубдан жадаллиги (1 та намунага 30 мин. – 1,5 вақт сарфланади), токсик (заҳарли) реагентларнинг ишлатилмаслиги билан ажралиб туради. Таъсир қилиш маҳанизими гуанидинтиоционатли лизис қилувчи реагентнинг ишлатилишига асосланган бўлиб, у ҳужайрани лизисига, ҳужайра солюбилизациясига, шунингдек ҳужайра нуклеазали денатурацияга олиб келади. Лизис қилувчи (парчаловчи) – реагент иштирокида ДНК NucleosTM – сорбент тўпламида фаол сўрилади, сўнгра спиртли эритмада оксил ва тузлардан осон ювилади. Сорбентдан ажратилган ДНКни ПЗР да ишлатиш мумкин.

Тўпламни таркиби: парчаловчи реагент, тузли буфер Nucleos сорбентининг суспензияси, “Экстра Ген” ион алмашинувчи арлашма суспензияси (3-расм).



3 расм. *Diatom DNA Prep 200 тўплами.*

Diatom DNA Prep 200 реагентлар тўплами ёрдамида нематодаларнинг тўқималаридан ДНКни ажратиш услуги қуйидаги босқичларни ўз ичига олади.

1. Қўлланмага биноан буферни ишчи эритмаси тайёрланади.

2. 1,5 мл пробиркага нематода танасидан 0,05 г оғирликдаги тўқима бўлакчаси кесилиб солинади (нематоданинг бош қисми олингани маъқул, чунки дум қисми турларни морфологик жиҳатдан идентификация қилишда

муҳим аҳамиятга эга) ва 800 мкл парчаловчи реагент билан майдаланилади ва кўл ёрдамида 5-10 марта аралаштирилади.

3. Аралашма 5-7 дақиқа 65° С ҳароратли термостатга қўйилади.

4. Пробиркадаги аралашма минутига 5000 айл/мин тезлигида 10 секунд давомида центрифуга қилинади.

5. Супернатант тоза пробиркага олинади, унга олдиндан гомогенизацияланган Nucleos суспензияси 20-40 мкл миқдорда қўшилади.

6. Пробиркани ротатор ёрдамида 10–20 айл/мин ёки кўл ёрдамида аралаштириш керак, сўнг 5000 айл/мин тезлигида 10 сек. центрифуга қилинади ва супернатант олиб ташланади.

7. Чўкмага 400 мкл парчаловчи реагент солиниб, вортекс билан гомоген ҳолатга келгунга қадар жадал аралаштирилади.

8. Аралашмага тузли буфернинг 1 мл ишчи эритмаси қўшилиб, 5-10 марта аралаштирилади, 5000 айл/мин. тезлигида 10 сек центрифуга қилинади, сўнгра супернатант олиб ташланади.

9. 7 – босқич қайта такрорланади.

10. Чўкма 65°С ҳароратда 4-5 дақиқа давомида қуритилади.

11. Шу пробирканинг ўзига “Экстра Ген” суспензияси 50-100 мкл миқдорда қуйилади ва гомоген ҳолатга келгунча аралаштирилади, сўнгра 65°С ҳароратда 5 дақиқа давомида термостатга қўйилади ва яна аралаштирилади.

12. Сўнгра 1 мин мобайнида 10000 айл/мин. тезлигида центрифугаланади.

13. Супернатант тоза пробиркага олинади, -20°С ҳароратда сақланади.

Ажратиб олинган ДНК концентрацияси 0,12-0,17 мкг/мкл ни ташкил қилади.

“Тез” ФХ – услубидан ажратиб олинган ДНК ни кўп ҳолатларда оксил ва углевод қолдиқларидан тозалаш керак. Буни эса Diatom реагентлар тўпламидаги Nucleos суспензияси ёрдамида, услубнинг 5 - босқичидан бошлаб тозалаш мумкин.

Dneasy Tissue Kit (Германия) реагентлар тўплами ёрдамида ДНК ажратиш услуби.

Dneasy Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) реагентлар тўплами афзаллиги жинсий вояга етган нематодаларнинг 10 мг тўқимасидан ташқари, жуда кичик ўлчамдаги нематодаларнинг личинкаси ёки тухумидан геном ДНКсини ажратиш олиш мумкин (4-расм). Бунда нематода тўқимасининг кичик бўлаги ажратиб олинади ёки пипетка билан 1-2 дона личинка ёки тухуми олинади ва 1,5 мл ли “Эпендорф” пробиркасига солинади. Намуналар оғирлиги 10 мг дан ошмаслиги керак.

1. Биологик материалга 180 мкл ATL буфери солинади.

2. 20 мкл протеиназа К қўшилади ва вортексда 15 сек давомида аралаштирилади. Пробиркалар термостатда 55°С ҳароратда биологик материалнинг тўлиқ парчаланишига қадар инкубация қилинади. Намуналарни 1-3 соатга ёки кечасига 18 соатга қолдириш мумкин.

3. 15 сек давомида вортекс қилинади, кейин 200 AL буфери қўшилиб, 15 сек вортексда аралаштирилади, 70°С ҳароратда 10 минут инкубация қилинади.

4. Сўнгра 200 мкл этанол (96-100% ли) кўшиб, вортексда гомоген эритма ҳосил бўлгунча аралаштирилади.

5. Ҳар бир гомоген эҳтиёткорлик билан (Dneasy Mini spin column) филтирли эпиндорф пробиркаларга солиниб, қопқоқлари беркитилиб 1 минут давомида 8000 айл/мин тезликда центрифуга қилинади.

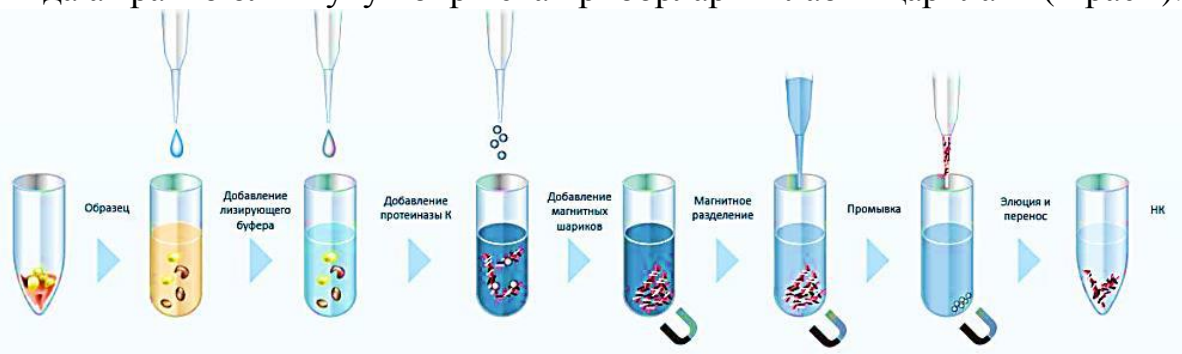
6. Эпиндорфга ўтган тоза суюқликни 2 мл ли пробиркаларга ўтказилиб, устига 500 мкл AW1 солиниб 1 минут давомида 8000 айл/мин тезликда центрифуга қилинади.

7. Тоза суюқликни 2 мл ли филтирли пробиркаларга ўтказилиб, устига 500 мкл AW2 буфер солиниб филтрдан суюқлик тўлиқ ажралгунча 14 000 айл/мин тезликда 3 минут давомида центрифуга қилинади.

8. Филтрли эпиндорфни бошқа 1,5 мл ли ёки 2 мл ли пробиркаларга ўтказилади ва устига 50-100 мкл АЕ буфер ёки дистилланган сув солинади, сўнгра хона хароратида 2 минут инкубация қилинади ва 8000 айл/мин тезликда 1 минут центрифуга қилинади. Буферда эриган ДНК -20°C хароратда сақланади.

9. Элюат олиш жараёнини 8 - босқичга кўра такрорлаш мумкин.

Бундан ташқари, ҳозирги вақтда нуклеин кислоталарни автоматик равишда ажратиш олиш учун бир неча приборлар ишлаб чиқарилаётган (4-расм).



4-расм. MagPure 12s тизими ёрдамида НК автоматик равишда ажратиш олиш босқичлари. НК ажратиш олишда моддаларни ажратишда магнит шариклари ёрдамига асосланган.

ПЗР-амплификацияси методининг асосий тушунчалари.

Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) - *in vitro* амплификация методи бўлиб, унинг ёрдамида қисқа вақт мобайнида муайян сондаги ДНК кетма-кетлигини одатдагидан 1000 мартаба кўпроқ танлаш ёки кўпайтириш мумкин (Mullis, Faloona, 1987). Метод моҳияти – пробиркада муайян ДНК қисмларини қайталанувчи температура циклларида кўп мартаба кўчириш (амплификация). Амплификациянинг ҳар бир циклида юқорида синтезланган фрагментлар яна ДНК-полимераза ферменти ёрдамида кўчирилади ва ДНК фрагментлари ўзига хос кўп мартаба катталашади (Болдырева, 2005).

ПЗР қўлланалиш соҳаси: геном кетма-кетлигини юқори даражали клонлаш (Scharf et al., 1986), митохондрия ва геном ДНК ларини тўғри секвенерлаш (Wong et al., 1987), нуклеотид кетма-кетлиги ўзгарувчанлигини таҳлиллаш ва касаллик кўзгатувчиларни аниқлаш (Kwok et al., 1987).

Полимера занзир реакциясини ўтказиш учун реакция аралашмада турли хил таркиблар бўлиши зарур (Саики и др., 1990):

Икта праймер – суъний йўл билан синтезланган.

Праймернинг нуклеотидлар кетма-кетлигига бўлган талаблар:

1. Ички иккиламчи тузилишнинг бўлмаслиги;
2. Нуклеотидлар таркибининг мувозанатланган бўлиши Г/Ц, А/Т ва ҳамма кетма-кетлик бўйича тўғри тақсимланганлиги;
3. Димер праймерлар бўлмаслиги учун, 3'чи охири орасида комплементарликни бўлмаслиги.

Праймерларнинг оптимал концентрацияси 0.1-0.5 мкМ. Праймерларнинг юқори концентрацияси ўзига хос бўлмаган қиздиришга ёки ўзига хос бўлмаган ПЗР-амплификация маҳсулотлари йиғилишига олиб келиши мумкин.

ДНК-полимераза термостабиллиги (Тaq-полимераза). ДНК-полимеразанинг умумий хусусияти шундаки, 5'x3' йўналишида нуклеин кислоталарнинг матрицааяланган синтезини олиб бориши. Кўпчилик ДНК-полимеразалар хатолик орқали қўшилган нуклеотидларни олиб ташлаш учун мўлжалланган 3'x5' экзонуклеазали фаоллигга эга бўлади. Одатда реакция ўтказиш учун 0.5-0.25 бирликда термостабил полимеразанинг *Thermus aquaticus* ўзи кифоя.

2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат аралашмаси (дНГФ - дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) - Тaq-полимераза ёрдамида иккинчи ДНК занжири синтези учун фойдаланилади. Ностабилинган дОТФ аралашма ДНК полимераза иши аниқлигини камайтиради. дНГФ баланд концентрацияси Mg^{2+} , ионлари концентрациясини камайтиради ва ДНК полимераза фаоллигини пасайтиради.

Буфер – маълум концентрациядаги катион ва анионлар аралашмаси бўлиб, реакция учун оптимал шароит яратади: стабил рН ва эритманинг ион кучи.

Таҳлил қилинаётган намуна – реакция аралашмасига киритиш учун тайёрланган препарат бўлиб, ПЗР-амплификацияси учун нишон ҳисобланган ДНКни ўзида сақлайди.

Mg^{2+} иони - Тaq-полимераза иши учун керакли. Ишчи концентрациялар диапазони: 0,5-5,0 мМ (10 мМ - ДНК-полимеразани 40-50% га сусайтиради Mg^{2+} концентрациясининг ошиши полимера занжир реакциясининг ўзига хослигига ва самарадорлигига кучли тасир кўрсатади: ПЗР- маҳсулотлар чиқишини кўпайтиради, лекин праймерлар гибридланиши хослиги сусаяди. Mg^{2+} оптимал концентрацияси ДНК- матрицаси ва праймерлари нуклеотид кетма-кетлигига боғлиқ. Mg^{2+} дНТФ билан комплекс ҳосил қилади, айнан шу комплекслар Тaq- полимераза учун субстрат ҳисобланади. Mg^{2+} концентрацияси кўтарилиши ДНК эриш температурасини кўтарилишига ва праймерлар гибридланиши аниқлигини пасайишига олиб келади.

Циклик температура режими - ПЗР- амплификациясида таҳлил қилинаётган ДНКдаги қатор ходисалар бўлиб муайян температура параметрлари таминланади. Ҳар бир амплификация цикли 3та босқичдан

иборат (Рыбчин, 2002):

1. *Денатурация*. Реакцион аралашмани 95°C гача қиздирилади, бунинг натижасида икки занжирли ДНК молекуласи ечилиб кетади (ажралиб) ва иккита бир занжирли молекула ҳосил қилади.

2. *Юмшатиш (праймерларнинг қўшилиши, гибридланиши)*. Праймерлар бир занжирли ДНКга қўшилади. Кўзланган специфик соҳа чегарасидаги қарама-қарши ДНК занжирларига мос келадиган кетма-кетликка тўғри ва қарама-қарши праймерлар комплементар бўлиб қўшилади. Ҳар бир жуфт праймер учун ўзининг юмшатиш температураси мавжуд бўлиб, у 50-65°C оралиқда бўлади. Юмшатиш вақти 20-60 сек.

3. *Элонгация (ДНК синтези)*. ДНК занжирининг қарама-қарши йўналишда 5'чи охирдан 3'чи охирга комплементар куриб битирилиши. ДНКнинг янги занжирлари синтези учун 2'- дезоксинуклеозид-5'-трифосфат эритмаси материал бўлиб хизмат қилади. Бу босқичда реакцион аралашмадаги температурани оптимум даражасига олиб чиқилади (72° С). Элонгация давом этиш вақти амплификация қилинаётган ДНК фрагментининг учунлиги ёки ДНК-полимераза ферментининг ишлаш тезлиги билан белгиланади. Элонгация вақти одатда қуйидаги формула ёрдамида аниқланади: $T(\text{элонгация}) = 1 \text{ дақиқа} \times N$ (м.ж.н. ДНК).

Амплификациянинг температура цикли кўп мартаба қайтарилади (25 ва ундан кўп). Ҳар бир циклда синтезланаётган ДНК фрагментлари икки мартаба кўпаяди. Циклик жараён натижаси ДНК фрагментларининг ўзига хос экспоненциал кўпайишидир.

Тугалланаётган қурилиш. Одатда ПЗР- амплификацияси охириги циклидан сўнг қисман синтезланган ПЗР маҳсулотларини тугаллаш учун реакцион аралашмани қўшимча равишда 5-15 дақиқа мобайнида 72°C да инкубация қилинади (Саики и др., 1990).

"Иссиқ старт" ("hot-start") – ПЗР амплификацияси реакциясидаги носпецифик маҳсулотларни ҳосил бўлишини олдини олиш учун ёндашув ҳисобланади. Унинг моҳияти шундан иборатки, пробиркада праймерларни специфик юмшатиш учун керакли шароит бўлмагунга қадар реакцияни бошланмаслиги (Щелкунов, 2004).

ГЦ таркиби ва ўлчамига қараб, праймерлар муайян эриш температурасига эгадирлар. Агар система температураси эриш температурасидан баланд бўлса, праймер ДНК занжирида сақланиб қолиш хусусиятини йўқотади ва денатурацияга учрайди. Оптимал шароит ушланиб турилса, яъни эриш температураси юмшатиш температурасига яқин бўлса, праймер икки занжирли молекула ҳосил қилади. "Иссиқ стартни" амалга ошириш йўлларида бири бирламчи денатурация вақтида термоциклер чуқурчасига (лунка) пробиркани киритиш (Саики и др., 1990).

Бу ҳолатда, агар носпецифик юмшатиш температура циклланишига қадар бўлган бўлса элонгация содир бўлмайди, агар комплекслар қиздирилса ДНК-праймер денатурацияга учрайди, шунинг учун носпецифик маҳсулотлар ҳосил бўлмайди. Кейинчалик, пробиркадаги температура эриш температурасига нисбанат пасаяди ва бу специфик амплификация

маҳсулотлари ҳосил бўлишига олиб келади (Щелкунов, 2004).

Ижобий назорат- реакция аралашма таркибига кирувчи ҳамма компонентлар реакцияни нормал ўтишини таъминланишига ишонч ҳосил қилишга ёрдам беради. Бунинг учун юмшатиш учун праймерлардан иборат ДНК препаратларидан фойдаланилади: масалан, керакли организм ДНК си ёки геномнинг спецефик клонланган қисми.

Контаминация – реакция аралашмага ташқаридан амплификация реакциялари учун нишон бўлиб хизмат қиладиган ва сохта ижобий, салбий натижаларни берадиган ДНК молекуласини тушиб қолиши.

Салбий назорат тажрибанинг хар бир сериясида контаминацияни йўқлигига ишонч ҳосил қилиш учун фойдаланилади. Салбий назорат сифатида бидистиллирланган сувдан фойдаланиш тавсия қилинади.

Реакцион аралашмадаги бегона ДНКни йўқотиш учун реакция аралашмали (ДНК матрицаси йўқ) пробиркани ультрабинафша нурланишга 10 дақиқа мобайнида дучор қилинади.

Реакцион аралашмадаги бегона матрицаларнинг манбаи сифатида бўлиши мумкин:

- Лаборатория ускуналари ва пипеткаларда қолган ДНК қолдиқлари орқали;

- Намуналар орасидаги қарама-қарши контаминация;

- Олдинги ПЗР маҳсулотлари.

Контаминацияни олдини олиш ва сохта салбий натижаларни олдини олиш учун куйидаги қоидаларга риоя қилмоқ зарур:

- ПЗР учун тайёрланаётган матрица, ПЗРни тўғридан-тўғри ўтказётган ва ПЗР ни таҳлил қилаётган иш ўринларини тақсимланг.

- ПЗР учун аралашмани ультрабинафша лампали ламинарланган шкафда ёки изоляцияланган боксда аралаштиринг. ПЗР учун ишлатиладиган микроцентрифугани, қўлқопларни ва бошқа ускуналарни ҳам шу ерда сақланг.

- Фақат ПЗР учун ишлатиладиган пипеткаларни махсус ғовакли фильтри бор қоққоқчаларни ишлатинг.

- ПЗР ни ўтказётганда фақат стерил материаллар ва янги перчаткалардан фойдаланинг.

ПЗР-амплификацияси.

18S рРНК гени фрагменти амплификацияси эукариот праймерлари (James et al., 2006) стандарт усул ёрдамида ўтказилади (Sambrook et al., 2001).

2.3. ПЗР-амплификациясини ўтказиш.

1. Ишни бошлашдан аввал реакциянинг ДНК- полимеразадан ташқари ҳамма компонентларини эритиб олинг ва бир қанча вақтга музга жойлаштириб туринг. 0,2 мл пробиркани музга жойлаштиринг, 34,8 мкл бидистиллирланган сув, 5 мкл 10X Тақ-буфер, 5 мкл 2,5 мМ MgCl₂, 1 мкл 2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат, 2 мкл ДНК матрицаси, 0,2 мкл Тақ-

полимеразаси қўшинг, якуний хажм 50 мкм ни ташкил этади.

2. 0,2 мл пробиркадаги реакция аралашмасини вортексда аралаштиринг ва микроцентрифугада 15 сек мобайнида томчиларни чўкинди холатида келтиринг.

3. Термоциклер дастурини ўрнатинг.

4. Термоциклер лункасида пробиркадаги реакция аралашмасини жойлаштиринг ва термоциклер қопқоғини маҳкам ёпинг.

5. ПЗР-амплификацияси тугаллангандан сўнг намуналарни агароза гелдаги электрофорез методи ёрдамида таҳлил қилиш мумкин. Амплификацияланган намунани -20°C сақлаш зарур.

Жадвал 1.

2.4. ПЗР учун мўлжалланган реакция аралашмаси таркиби, ПЗР режими.

Реакция компонентлари	Хажм, мкл
10X Таq-буфер	5
2,5 мМ MgCl ₂	5
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат	1
20 мкМ тўғри праймер *	1
20 мкМ тескари праймер *	1
ДНК матрицаси	2
Таq-полимераза 5 ед/мкл	0,2
Бидистиллирланган H ₂ O	34,8
Реакциянинг якуний хажми	50

*праймернинг номланиши ва кетма-кетлиги 2 жадвалда кўрсатилган.

Жадвал 2.

18S рРНК гени фрагменти амплификацияси учун специфик праймерлар.

Праймер номланиши	Нуклеотид кетма-кетлиги 5' → 3'
Универсал эукариот тўғри праймери 18S-SR1R(1F)	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT
Универсал эукариот тескари праймери 18S- SR1(578R)	ATTACCGCGGCTGCT

18S рРНК гени фрагменти амплификацияси режими

Температура	Вақт	Босқичлар таснифи
95° С	5 мин	Дастлабки қиздириш
95° С	30 сек	денатурация
60° С	30 сек	юмшатиш
72° С	1,5 мин	синтез
72° С	2 мин	Якуний синтез
10° С		Сақлаш

}
35 цикл

Назорат саволлари:

1. Молекуля-генетик таҳлиллари учун зоологик материллар йиғишга қандай талаблар қўйилади?
2. ДНК экстракция учун қандай детергентлардан фойдаланилади ва унинг йўриқномаси?
3. Нима учун фенол и хлороформдан фойдаланилади?
4. Сорбция усулидан фойдаланишда нуклеин кислоталарнинг ажратиш ва тозалашдаги асосий босқичлари қандай?
5. Қайси мақсадларда тузли буфер ишлатилади?
6. ПЗР асосий принциплари қанақа?
7. ПЗР цикли қайси этаплардан иборат?
8. Реакция аралашмаси қайси компонентлардан иборат бўлади?
9. ПЗР қўйишда қайси мақсада қанақа назорат қўйилади?
10. ПЗР-лабораторияси қандай тузилади?
11. ПЗР усулини қанақа амалий аҳамияти бор?

Фойдаланилган адабиётлар:

1. McPherson M.J., Moller S.G. PCR. The Basics 2nd edition: Taylor & Francis Group, 2006. - 305 p.
2. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

3-мавзу: Агароза гелида электрофорез усулини асосий тушунчаси. Рибосомал ва митохондриял ДНК тозалаш.

РЕЖА:

3.1. Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтқазииш. ДНК концентрациясини ўлчаиш.

3.2. Агароза гелидан ДНК ажратиши учун ишлатиладиган ДНК тозалаш тўплами (Цитокин).

Таянч иборалари: *Гель-электрофорез, УФ-нури, ТАЕ, агароза, бромистый этидий, ДНК тозалаш тўплами, ДНК-маркер.*

ДНК электрофорези - аналитик метод бўлиб, ажратиш, тенглаштириш ва ДНК қисмларини тозалаш учун фойдаланилади. ДНК электрофорези горизонтал йўналишда амалга оширилиди (Остерман, 1996).

ДНК молекуласи шакарфосфат қолдиғи манфий зарядланган, шунинг учун ДНК занжиридаги манфий зарядланган катоддан электрод майдон кучи остида мусбат зарядланган анод томонга ҳаракатланади, Узунроқ бўлган молекулалар секинроқ кўчади, чунки гелда ушланиб қолади, қисқароқ молекулалар тезроқ ҳаракат қилади (Маниатис, 1984).

Натижаларни визуаллаш мақсадида эриган агарозага бромли этидий киритилади (Dretzen et. al., 1991).

Олинган ДНК қисмлари ўлчамлари таҳлили учун чизиқли ДНК маркеридан фойдаланилади.

Электрод майдон кучланиши катта аҳамиятга эга, шу сабабли тақсимланиш самарадорлиги пасайиши кузатилади. ДНК қисмларини ажратишда энг максимал самарадорликка эришиш мақсадида, кучланиш 1 сантиметр гелда 5 вольтдан ошмаслиги зарур (Girvitz et.al., 1990).

Гельнинг таркибига қуйидагилар киради: 1X ТАЕ (рН 8,1), агароза, бромли этидий. Гельнинг фоиз улушига қараб ҳар хил таркибий қисмлар кўшилади. Гельнинг фоиз улуши ДНК қисмлари тарқалиш узунлиги орқали танланади (4 жадвал). 18S рРНК ген таҳлили учун (узунлиги тахминан 600 ж.н.) 2% ли агароз гели оптимал ҳисобланади.

Гельда агароза концентрациясининг нисбати ва таҳлил қилинаётган ДНК фрагментининг оптимал размери.

Гелдаги агарозанинг миқдори (%)	ДНК қисмлари ўлчами (минг ж.н, Кб)
0,3	50-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

3.1. Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтказиш.

1. Гельни электрофорез ванначасига қуйишдан аввал намуналарни киритиш учун оргойнадан тароқчаларни ўрнатиб чуқурчалар (лунка) ясаб олинг. Тароқчаларнинг пастки тишчалари умумий ҳажми 50 мл бўлган гелнинг асосидан 2 мм оралиғида жойлашсин (умумий ҳажми 150 мл бўлган гелнинг асосидан 1мм оралиғида жойлашсин) (4-5 расмлар).

2. 50мл 2%ли агароза гелини тайёрлаш учун 50 мл 1X ТАЕ ва 1 г агароза қўшилади. 1X ТАЕ бошланғич концентрацияси 50X ТАЕ эритмасидан тайёрланади. (Трис, 0,5М ЭДТА рН 8,0, музлатилган уксус кислотаси).

3. Агароза тутқичини 1X ТАЕ эритмаси ёрдамида қайнаш даражасида шундай қиздириш ки, эритма гомоген ҳолатига келсин, яни агарозанинг эримаган зарраларини бўлмасин.

4. Бу жараёндан сўнг 50°C даражасида совутинг ва 0,5 мкл бромли этидий қўшинг.

5. Ҳамма гел ҳажмини электрофорез ванначасига қуйинг. Гель совугандан сўнг (30-45 дақиқа хона ҳароратида), асталик билан тароқчаларни олиб ташланг ва электрофорез ванначасига 1X ТАЕ буферини гел тўлик қопланмагунга қадар қуйинг.

6. Намуналарни 6X Loading Dye буфери (таркиби: 4% ли тўқ сариқ G, 0.03% ли бромфенол, 0.03% ксилен- цианол FF, 15% Фиколла 400, 10 мМ трис-НСl рН 7,5 и 50 мМ ЭДТА рН 8,0) билан шундай аралаштиринки, намунадаги якуний концентрация 1X бўлсин ва микропипетка ёрдамида гелдаги чуқурчаларга (лунка) қуйинг.

7. Олинган ДНК қисмлари ҳажмини таҳлил қилиш учун чуқурчаларнинг (лунка) бирига 2,5 мкл ли ДНК-маркерини *DirectLoa^{drM} Wide Range DNA Marker* қўшинг.

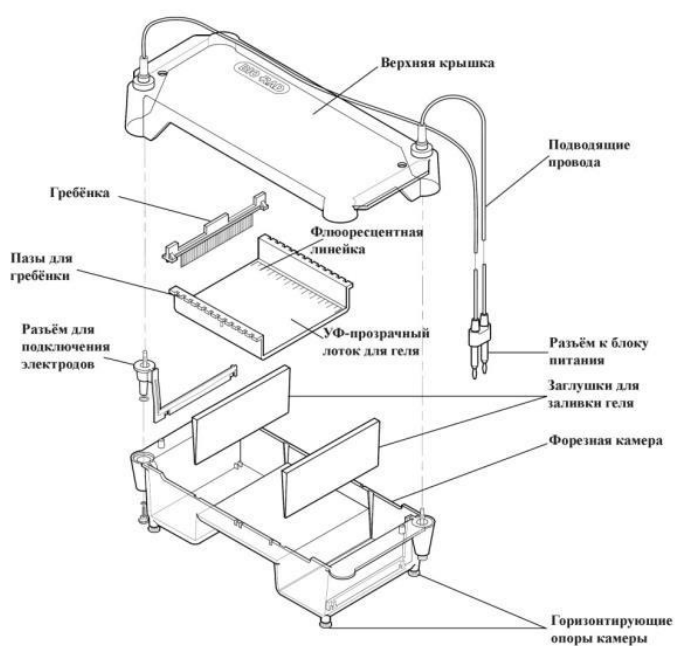
8. ДНК ажратишни учун кучланиш 1 сантиметр гелда 5 вольтдан

ошмаслиги зарур.

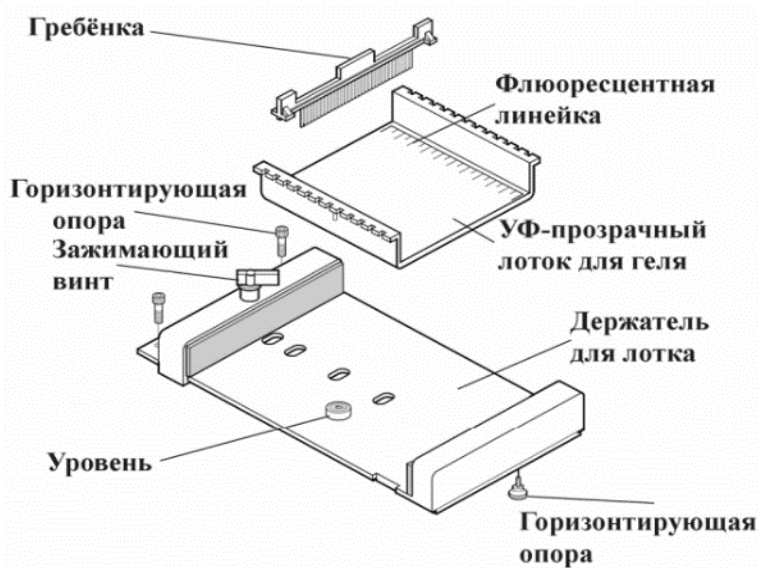
9. Электрофорез якунлангандан сўнг гелни ультрабинафша ва трансиллюминатор нурларида кўринг ва расмга олинг, натижаларни қайд қилинг.

Диққат! *Кўз тўр пардасининг ультрафиолет нурлари шикастламаслиги учун ДНК зонасини текширишда трансиллюминаторнинг комплект шишалари орқали ёки махсус химоя очкилари ёрдамида амалга оширилади.*

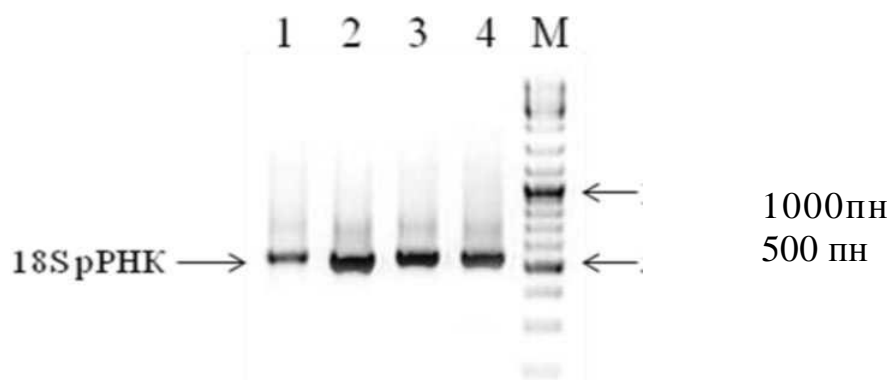
10. 6-расмда ҳамма намунадаги генларнинг 18S рРНК қисмида ДНК амплификациясини курсатувчи ПЗР махсулотлари таҳлили мисол тариқасида келтирилган. Геннинг 18S рРНК қисми амплификацияланган нуклеотидлар кетма-кетлиги узундиги тахминан 500 п.н ташкил қилади.



4 - расм. Агароза гелида горизонтал электрофорез ўтказиш ускуналарини элементлари.



5 - расм. Гель қуйиш учун лоток ва таглик.



6-расм. 4та намунадаги генларнинг 18S рРНК қисмида ДНК амплификациясини курсатувчи ПЗР –амплификацияси.

11. Керакли ПЗР фрагментини скальпель ёрдамида гелдан кесиб олинг, 1.5 мл ли центрифугаланган пробиркага жойлаштиринг ва тарозида ўлчаб олинг. ПЗР фрагментларини ишлаб чиқарувчи томонидан тавсия қилинган турли хил методикалар ёрдамида ажратиб олиш мумкин.

12. 5-жадвалда ПЗР- амплификацияси таҳлили жараёнида келиб чиқиши мумкин бўлган муаммолар ва уларнинг ечими кўрсатилган.

Жадвал 5.

Келиб чиқиши мумкин бўлган муаммолар ва уларнинг ечими

Муаммо	Эҳтимоли бор сабаб	Мумкин бўлган муаммо ечими
ДНК гелда бўялган йўлчадек кўринади.	Махсулот деградация қилинади.	Нуклеазалар ёрдамида ифлосланиш марказини топинг, материал узоқ вақт сақланмаганлигига ишонч ҳосил қилинг,
	Амплификацияни ўзига хос бўлмагани.	Ўзига хос бўлган праймерлар танлаб олинг ёки янада оптимал реакция шароитини танланг
	ДНК матрицаси ортиқчаси	Камроқ миқдорда ДНК матрицасини олинг.
Гельдаги ўзига хос бўлмаган чизикчалар	Амплификацияни ўзига хос бўлмагани	Ўзига хос бўлган праймерлар танлаб олинг ёки янада оптимал реакция шароитини танланг
	ДНК матрицаси ортиқчаси	Камроқ миқдорда ДНК матрицасини олинг
ПЗР- амплификацияси махсулотдаги чизикчалар, озгина ёки йўқлиги бўлиши	Хира бўялган гел	Агарозага кўпроқ миқдорда бромли этидий кўшинг
	ДНК матрицасини намунада йўқлиги	ДНК матрицасини кўшинг
	Праймерлар инқирозга учраган праймеры	Янги праймерлар синтез қилинг
	Праймерлар ДНК матрицада юшмаслиги	Ўзига хос бўлган праймерлар танлаб олинг

	ПЗР ўтказиш учун нотўғри шароит	Янада оптимал реакция шароитини танланг
	Амплификатор бузулганлиги	ПЗР ни бошқа амплификаторда ўтқизинг

3.2. Агароза гелидан ДНК ажратиш учун ишлатиладиган ДНК тозалаш тўплами (Цитокин).

ПЗР натижасидан олинган ДНК ларни тозалаш учун 0,8 % 100 мл ли агароза гель тайёрланади. Электрофорездан қолган 21 мкл ПЗР маҳсулотларини 4 мкл краска билан аралаштириб, ҳар бир наъмуна аралашмаларини гель катакчаларига солиниб, 100 Вт кучланиш билан 1–1,5 соат электрофорез камерасида юргизилади.

Электрофорез камерасидан гелни олиб, трансиллюминаторда химоя кўзойнагини таққан ҳолда, гелдаги ДНК нуқталарини (пик) бир марталик лезвия ёрдамида кесиб олинади. Кесилган гель бўлақларини 1,5 мл-ли эппендорф идишларига солинади. Шунини алоҳида эътиборга олиш керакки эппендорф идишларини тарозида тортиш ва ҳар бир эппендорфни тартиб бўйича рақамлаш керак.

ПЗР маҳсулотларини гелдан тозалашда “Цитокин” фирмасида ишлаб чиқарилган тўпламлардан фойдаланилди.

1. Эппендорфдаги гелни эритиш учун гель оғирлигига тенг 10 мг бўлса 10 мкл боғловчи аралашма солинди.

2. Термостатга 65 °С га 15 дақиқа гель эригунча сақланди.

3. Термостатдан эппендорфни олиб хона хароратида 1 дақиқа сақланади ва вортекс қилинади ва 16000 айл/тез центрифуга қилинди.

4. Центрифугадан эппендорфларни олиб янги филтрли эппендорфларга пробирка ичидаги аралашма солинади ва ювувчи аралашмадан 700 мкл солинади, 1 дақиқа 16000 айл/тез центрифуга қилинади.

5. Эппендорф ичидаги аралашма олиб ташланади ва 500 мкл ювувчи аралашма солиниб, 5 дақиқа 16000 айл/тез центрифуга қилинди.

6. Эппендорфдаги филтрли калонка бошқа янги 1,5 мл-ли эппендорфга ўтказилади ва 50 мкл элюат аралашмаси ёки тозаланган сув солинди, 1 дақиқа хона хароратида сақланди, сўнг 1 дақиқа 16000 айл/тез центрифуга қилинди.

7. Эппендорфлардан филтрли калонкаларни олиб ташланади, эппендорфни остки қисмига тушган гелдан тозаланган маҳсулотни -20°С совутгичга олиб қўйилади.

Гелдан тозаланган ПЗР маҳсулотларини сиквенирлаш учун нуклеотидларини ўқитиш учун ЦКП «Геном» («Генотех») фирмасига берилди.

ПЗР маҳсулотларини сиквенирлашга беришда ПЗР маҳсулотларини концентрацияси аниқланади ва шу концентрацияга қараб ДНК 1 мл эппендорфларга солиниб, устига ПЗРда қўйилган праймерлардан фақат.

Назорат саволлари:

1. Электрофорез усули асосида қанақа принцип ётади?
2. 100 мл 2.0 %-ли агароза гели тайёрлаш учун қанча оғирликдаги агароза керак бўлади
3. ДНК фрагменти размери 350 ва 150 ж.н ажратиш учун қандай концентрацияли агароза керак бўлади?
4. Электрофорез ўтказилганда ДНК молекулалари нимага ва қайси томонга ҳарактланади?
5. Электрофорез жараёнида агароза гелида ДНК молекулалари тезлиги қандай омилларга боғлиқ?
6. Нима учун гелда ҳосил бўлган пуфакчадан қочиш керак?
7. Гелдаги ДНК кўриниши (визуализация) нима ҳисобидан амлага ошади?
8. Электрофорез жараёнида гелдаги ДНК молекулалари ҳаракатини қандай қилиб назорат қилиш мумкин?
9. Электрофорезнинг қайси босқичида перчатка билан ишлаш керак ва нега?

Фойдаланилган адабиёт:

Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook.-4thed.by Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York, 2012.

4-мавзу. секвенирлаш – днкнинг бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш. нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида организмларни идентификация қилиш.

РЕЖА:

4.1. ПЗР-амплификациянинг асимметрик реакциясини флуоресцент нишонли нуклеотидлар ёрдамида ташкил этиш (секвенирлаш реакцияси).

4.2. ПЗР-амплификация реакциясидаги асимметрик фрагментларни тозалаш.

4.3. Blastn программаси ёрдамида кўплаб текислаш ишларини олиб бориш.

Таянч иборалар: Секвенирлаш, NCBI, Blast, BioEdit, ClustalW2, Clustal Omega программалари.

4.1. ПЗР-амплификациянинг асимметрик реакциясини флуоресцент нишонли нуклеотидлар ёрдамида ташкил этиш (секвенирлаш реакцияси).

Автоматик ДНК секвенирлаш принципи аниқ вақт тартибида флуоресцентланган маҳсулотларни электрофоретик ажратиш, ўзига хос терминация секвенирлаш реакциялари ва уларнинг детекциясини ўз ичига олади (Inoue et al., 1998). Детекция гелнинг пастки қисмида, ДНК қисмларининг лазер нури ёрдамида бўёқ молекулалари кўзғалиши натижасида амалга оширилади. Ажратиш махсус мослама, автоматик ДНК секвенатори ёрдамида амалга оширилади. Биринчи автоматик ДНК секвенатори 1987 йил Applied Biosystems фирмаси томонидан ишлаб чиқилган.

Автоматик ДНК секвенатори махсус компьютер дастурлари ёрдамида бошқарилади. Масалан, Applied Biosystems фирмаси мосламаси йиғиш дастури ва маълумот таҳлили билан бирга қўшилади. Электрофоретик бўлиниш тугаллангандан сўнг, Data Collection дастури ёрдамида олдиндан йиғилган маълумотлар ўзига хос дастур ёрдамида таҳлилга юборилади. Бунда у ёки бу нуклеотидлар асосидаги терминантланган ДНКнинг тегишли фрагментларининг нисбий баландик чўққиси аниқланади ва бузилганлари олиб ташланади (Alphey, 1997).

Автоматик ДНК секвенирлашидаги флуоресцентланган маҳсулотларни ажратиш терминантланган секвенирлаш реакцияларида, электрофорездан ташқари капилляр-гель электрофорези кенг қўлланилади (Sambrook et al., 2001). Унга юқори сезувчанлик, капиллярнинг жуда кичкина ички диаметри натижаси ҳисобланаган юқори бўлинув тезлиги, каби хусусиятлари мос келади. Дастлабки ишларда капилляр электрофорезини амалга ошириш учун оддий полиакриламид гели хизмат қилган (Lario et al., 1997). Бироқ унинг

ўзгарувчанлиги, ҳаво пуфакчаларининг ҳосил бўлиши каби камчиликлари методнинг унумдорлигини кўринар даражада пасайтирарди. Чизикли полиакриламид усулидан фойдаланиш қуйидаги муаммоларнинг ечими бўлди ва бу методнинг самарадорлигини оширишга хизмат қилди. (Inoue et al., 1998).

Флуорцентланган терминантланган нуклеотидлар ёрдамида ПЗР амплификацияси ассиметрик реакцияларини ташкил қилиш (секвенирлаш реакцияси) (2 мавзуга қаранг).

Секвенирлаш реакциясидаги ПЗР босқичлари учун мўлжалланган реакциялар аралашмаси компонентлари 6-жадвалда кўрсатилган. Секвенирлаш реакциясидаги ПЗР босқичлари учун мўлжалланган термоциклер тартиби 14-жадвалда кўрсатилган. ДНК секвенирлаш M13/pUC(-20) каби стандарт праймерлар ёрдамида ёки ABI Prism 310 Genetic Analyzer автомат секвенатори ёрдамида ўтқизилади. Праймерларни Синтол (Россия) корхонаси синтезлаган.

Жадвал 6.

Секвенирлаш реакциясидаги ПЗР босқичлари учун мўлжалланган реакциялар аралашмаси таркиби.

Реакция компонентлари	Ҳажми, мкл
2,5X Ready Reaction Premix	0,5
TMS Buffer 5X	3,75
3,3 мкМ Праймер	1
ДНК	1
Бидистиллирланган сув	13,75
Реакциянинг якуний ҳажми	20

Жадвал 7.

Секвенирлаш реакциясини ўтказишда температуралар даври тартиби.

Температура	Вақт	Босқичлар таснифи
96° С	1 мин	дастлабки қиздириш
96° С	10 сек	денатурация
55° С	50 сек	юмшатиш
60° С	4 мин	синтез
10° С		сақлаш

} 35 давр

ДНК- Секвенирлашда праймерларнинг нуклеотид кетма-кетлигини

Праймернинг номланиши	нуклеотид кетма-кетлигини 5'→3'
Секвенирлаш учун праймернинг T7 промотор қисми	ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ
Секвенирлаш учун тўғри праймер M13/pUC (-20)	GTAAAACGACGGCCAGTG

4.2. ПЗР амплификацияси ассиметрик реакциялари фрагментларини тозалаш.

1. ПЗР-фрагментлари сақланган пробиркага 2 мкл 125 мМ ЭДТА, 2 мкл 3М натрий ацетат ва 70 мкл 95% этанол қўшинг.
2. Аралашмани хона шароитида 15 дақиқа мобайнида инкубация қилинг сўнгра аралашмани вортексда аралаштиринг.
3. Аралашмани 30 дақиқа мобайнида 20°C да инкубация қилинг.
4. 20 дақиқа мобайнида 13.3 минг дак/ай центрифугаланг.
5. Кераксиз суюқликли микропипетка ёрдамида асталик билан олиб ташланг.
6. Чўкиндига 100 мкл 70 % ли этанол ва 5 дақиқа мобайнида 13.3 минг дак/ай центрифугаланг.
7. Кераксиз суюқликли олиб ташланг ва пробиркаларни 37°C термостатда очик ҳолда қуритинг.
8. Кераксиз суюқлик буғлангандан сўнг 20 мкл Ni- Di формамида қўшинг.
9. Аралашмани 20 сек давомида вортексда аралаштиринг.
10. Пробиркадаги аралашмани термоцеклерга жойлаштиринг.
 - 2 дақиқа мобайнида 95° С гача қиздириг;
 - Сақлаш учун 4° С гача совутинг.
11. Пробалар жойлашган пробиркаларни термоциклердан чиқаргандан сўнг, қисқа вақт мобайнида (20 сек) центрифугалаб, томчиларни йўқотиб олинг ва пробани маҳсус секвенерлаш учун мўлжалланган пробиркага жойлаштиринг.
12. Секвенерлаш натижаларига BioEdit дастурлаш пакети ёрдамида ишлов берилади. Секвенланган хроматограмма таҳлили учун Chromas дастуридан фойдаланилади. Мисол тариқасида 5-расмда BioEdit дастурлаш пакети ёрдамида секвенланган хроматограмма таҳлили курсатилган. 18S рРНК гени қисмидаги бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлигини (узунлиги 417 п.н.):



5 расм. BioEdit дастури ёрдамида секвенс хроматограммаси намунаси.

Бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлиги таҳлили асосида организмни идентификациялаш.

Организмларнинг идентификациялаш одатда нуклеотидлар кетма-кетлиги таҳлили асосида, BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) кўп маротабалик тўғирлаш дастури ёрдамида маълумотлар базасида GenBank/EMBL/DBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ўтказилади.

BLAST (ингл. *Basic Local Alignment Search Tool*) - *бирламчи нуклеотидлар ва оқсиллар кетма-кетлигини солиштиришга ёрдам берувчи алгоритм*. BLAST алгоритми асосидаги компютер дастурлари бирламчи структураси (кетма-кетлиги) ёки маълумотлар базасидаги фрагменти маълум бўлган оқсил ёки нуклеин кислоталар гомологларини излаб топишга имконият яратади (Altschul et al., 1990).

BLAST сериясидаги дастурлар. Биологик кетма-кетликни таҳлил қилиш учун 3 та асосий ёндашув мавжуддир:

Нуклеотидлар кетма-кетлиги таҳлили. ДНК ёки РНК нуклеотидлари кетма-кетлиги билан ишлашга ёрдам берувчи алгоритмлар тўплами. Blastn («Nucleotide BLAST») дастури турли хил маълумотлар базасига эга бўлган нуклеотидлар кетма-кетлигини солиштириш ва гомологик кетма-кетликни излаб топишга ёрдам беради. Blastn ёрдамида таҳлил бошқа алгоритмларга нисбатан кўп вақтни олади, лекин паст гомологли кетма-кетликларни

солиштириш имконини беради. Megablast 95% гача яқин қариндош нуклеотидлар кетма-кетлигини солиштиришга мўлжалланган. Дастур кўп нуклеотид кетма-кетликларни ягона кетма-кетликка йиғади ва BLAST база маълумотларини қидира бошлайди. Кейин megablast индивидуал кетма-кетликни солиштириш ва статистик ишлов бериш учун олинган маълумотларга ишлов бера бошлайди. Discontiguous megablast дастури нуклеотидлар кетма-кетлигини бази бир мос келмасликка этиборга ва олмасликка йўл қўяди, у фарқланувчи лекин кетма-кетликни таққослаш учун мўлжалланган.

Оқсил кетма-кетлиги таҳлили. Аминокислоталар кетма-кетлиги билан ишлашга ёрдам берувчи алгоритмлар тўплами. Стандарт Blastp («Protein BLAST») дастури турли хил маълумотлар базасига эга бўлган аминокислоталар кетма-кетлигини солиштириш ва гомологик кетма-кетликни излаб топишга ёрдам беради. Бошқа дастурлар сингари Blastp дастури маҳаллий гомологик қисмларни топади. Қуйидаги алгоритм ёрдамида дастури турли хил маълумотлар базасига эга бўлган аминокислоталар кетма-кетлигини солиштириш ва гомологик кетма-кетликни излаб топиш мумкин. psi-blast («Position-Specific Iterated BLAST») алгоритми оқсиллар кетма-кетлиги таҳлилида янада сезгир алгоритм бўлиб, уни оқсилларнинг узоқ қариндошлари ёки оқсилларнинг янги оила аъзоларини топиш учун фойдаси бўлади. Қуйидаги алгоритмдан Blastp стандарт алгоритми кетма-кетликни топа олмаганда ёки гипотетик оқсилларга алоқа юборганда, муайян кетма-кетлик билан ўхшашлик топилганда фойдаланилади. Phi-blast («Pattern-Hit Initiated BLAST») фойдаланувчи берган шаблонни ўзида сақлаши ва бир вақтда фойдаланувчи берган сўров билан гомологик ўхшаш бўлган оқсиллар кетма-кетлигини қидириш учун мўлжалланган. Cdart («Protein homology by domain architecture») алгоритми оқсиллар таркибини ўрганеди. У ҳамма оқсиллар таркибини theprotein nr маълумотлар базасида таҳлил қилади ва қидирув олиб боради.

Трансляция қилинган кетма-кетликларни таҳлил қилиш. Махсус дастур бўлиб, нуклеотид кетма-кетликни аминокислота кетма-кетлигига трансляция қилишга имкон беради. Blastx («Translated query vs protein database») олдин нуклеотид кетма-кетликни аминокислота кетма-кетлигига трансляция қилади, кейин оқсиллар гомологик кетма-кетликни маълумотлар базасида излаб топишга ёрдам беради. Blastx ўқиш учун нуклеотид кетма-кетликларни ҳамма бта хошиясини трансляция ва таҳлил қилади. Шундай қилиб, алгоритм de novo секвенирланган нуклеотид кетма-кетликни ва EST-

кетма-кетликни («Expressed Sequence Tags») таҳлил қилади. Бу алгоритм бошқа нуклеотид Blast га нисбатан янада сезгир алгоритм ҳисобланади, чунки солиштирув оқсил кетма-кетлиги даражасида олиб борилади. Бошқа тарафдан, tblastn («Protein query vs translated database») алгоритми аксинча оқсиллар кетма-кетлигини изохли бўлмаган нуклеотидлар кетма-кетлигида қидиришга ёрдам беради. Ва нихоят, tblastx («Translated query vs translated database») алгоритми, янги генларни нуклеотид кетма-кетликда идентификация қилишга фойдали ҳисобланади.

4.3. Blastn программаси ёрдамида кўплаб текислаш ишларини олиб бориш.

BLAST алгоритмлари ёрдамида, нуклеотид кетма-кетлиги турли хил организмлар геноми маълумотлари базасида таҳлил ўтказиш мумкин: умуртқалилар (одам, сичқон, макака ва бошқалар), умуртқасизлар (дрозофила, *Caenorhabditis elegans* ва бошқалар), ўсимликлар (арабидопсис, маккажўхори ва бошқалар), замбуруғлар (аспаргилл) ва вирусларда.

BLAST ишлаш принципи. BLAST сериясидаги дастурлар маълум қисмлардаги кетма-кетликни солиштириш учун маҳаллий тўғирлаш олиб боради. Нуклеотид ёки аминокислоталар кеима-кетлиги BLAST серверига келгандан сўнг, BLAST ҳамма қисмлар (оқсиллар учун бу 3 аминокислотадан иборат кетма-кетлик қисми, нуклеин кислоталар 11 нуклеотидлардан иборат) ва ўхшаш қисмлар жадвалини тузади. Кейин маълумотлар базасида қидирув амалга оширилади ва гомологлар топилганда уларнинг ўлчам қисмлари узайтирилади (4 ва ундан ортиқ аминокислота, 12 ва ундан ортиқ нуклеотидлар) аввал ораликсиз, кейин орликлардан фойдаланилган ҳолда. Ҳамма мумкин бўлган ўлчам қисмлари узайтирилгандан сўнг, маълумотлар базасидаги янада гомологик кетма-кетлик жуфт тўғирланади ва олинган маълумот SeqAlign структурасида қайд қилинади.

Ўрганилаётган кетма-кетлик ва BLAST маълумотлар базасидаги кетма-кетлик ўхшашлиги даражаси ва ахамиятини аниқлаш мақсадида Max ident (максимал ўхшашлик), Query coverage (сўров қамрови майдони) ва E қиймат (expected value, E-value) (кутилган қиймат) дан фойдаланилади.

Blastn дастури ёрдамида кўп мартабалик тўғирлашни ўтказиш

1. BLAST дастури саҳифасига киринг:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

BLAST асосий саҳифаси очилишида тепа қисмда 4 та иловали асосий меню бор:

- Home – уй саҳифасиги қайтиш учун илова.
- Recent Results – 36 соат ичида қилинган қидирув натижаларини очиш учун илова.
- Saved Strategies – сизнинг шахсий саҳифангизда «My NCBI» қидирув натижасидан сўнг сақланган илова.
- Help - BLAST дастурида хужжатлар билан ишлаш учун каталогга ўтиш иловаси.

2. Асосий менюда Basic Blast графасидаги «nucleotide Blast» дастурини танланг.

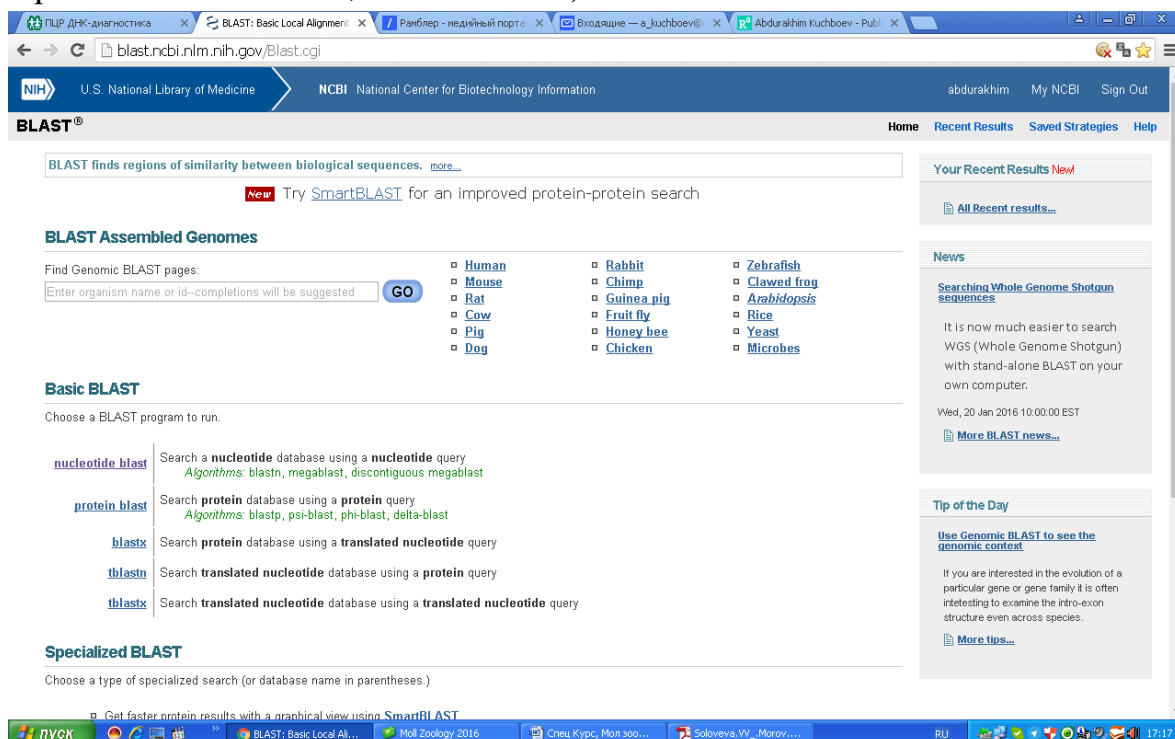
3. Кетма-кетликни киритиш ойнасига FASTA форматида Enter Query Sequence киритинг. Намуна натижасида 18S рРНК қисми нуклеотид кетма-кетлигини танлаймиз.

4. Choose Search Set → Others → Nucleotide collection (nr/nt) параметрини танланг.

5. Program Selection графасида somewhat similar sequences излаш алгоритминини танланг.

6. BLAST тугмасини босинг.

Ўтказилган таҳлилга биноан, фойдаланилаётган 18S рРНК гени кетма-кетлиги асосидаги таҳлил натижаларига кўра бу *Pseudonapaeus sogdiana* (ген 18S рРНК, KU760758) деб идентификация қилиш мумкин, лекин 98 % ўхшашлик асосида (максимал идиентификация -98 %, сўровни амалга ошириш области – 90%, E value - 0.0)

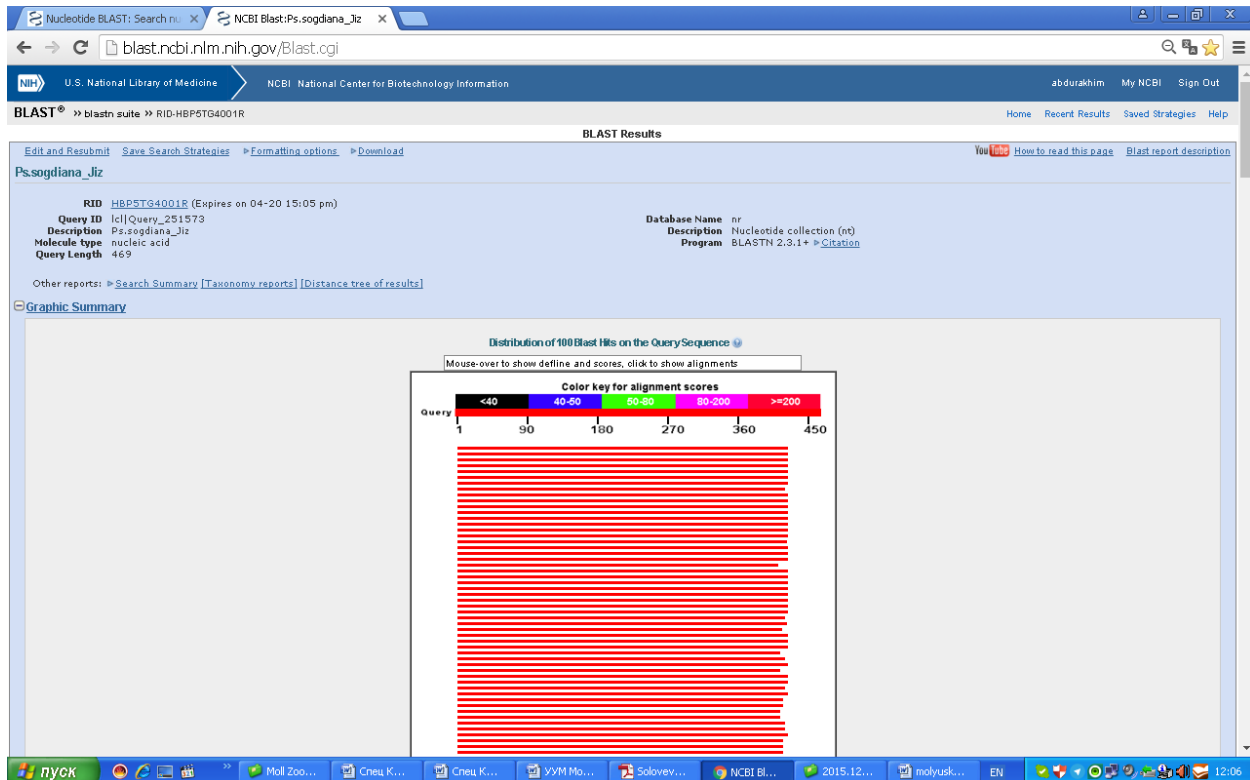


BLAST асосий ойнаси.



7 расм. Нуклеотидлар кетма-кетлиги таҳлили BLAST ойнаси.

8, 9 и 10 расмларда натижалар таҳлили келтирилган.



8 расм. BLAST дастури иши график натижалари.

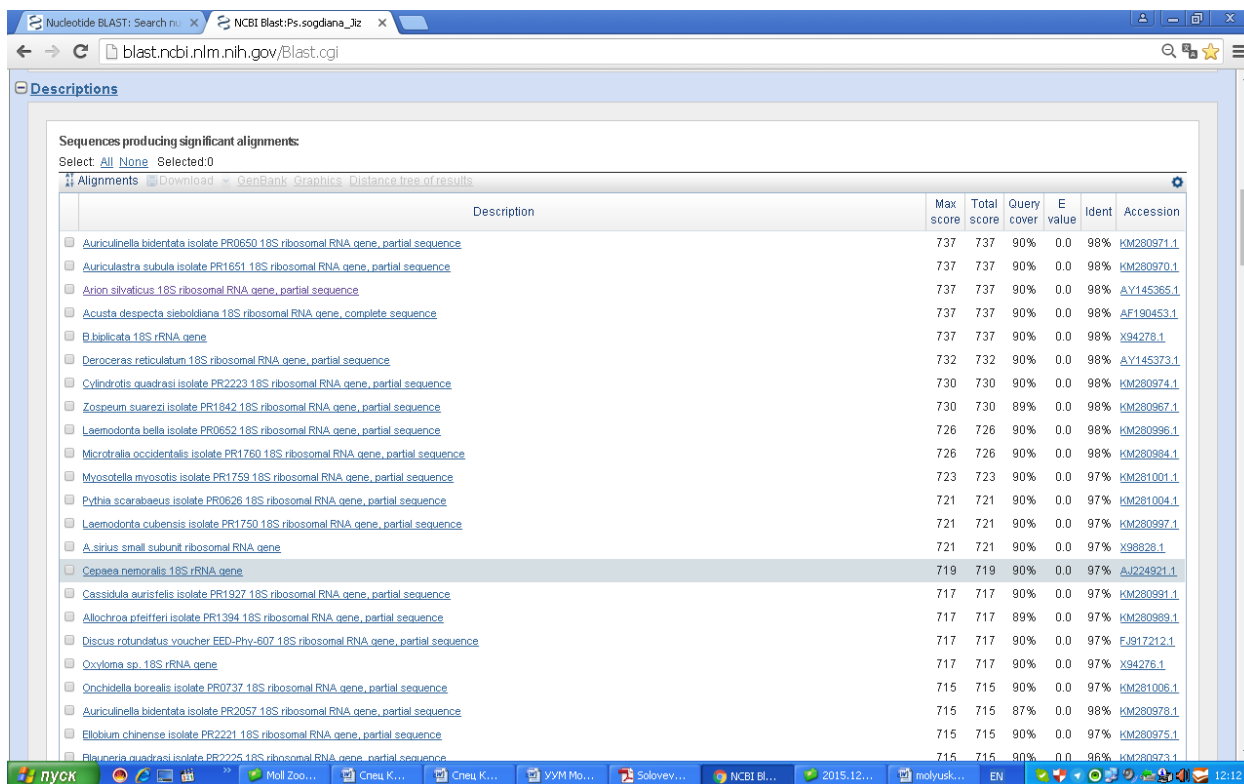
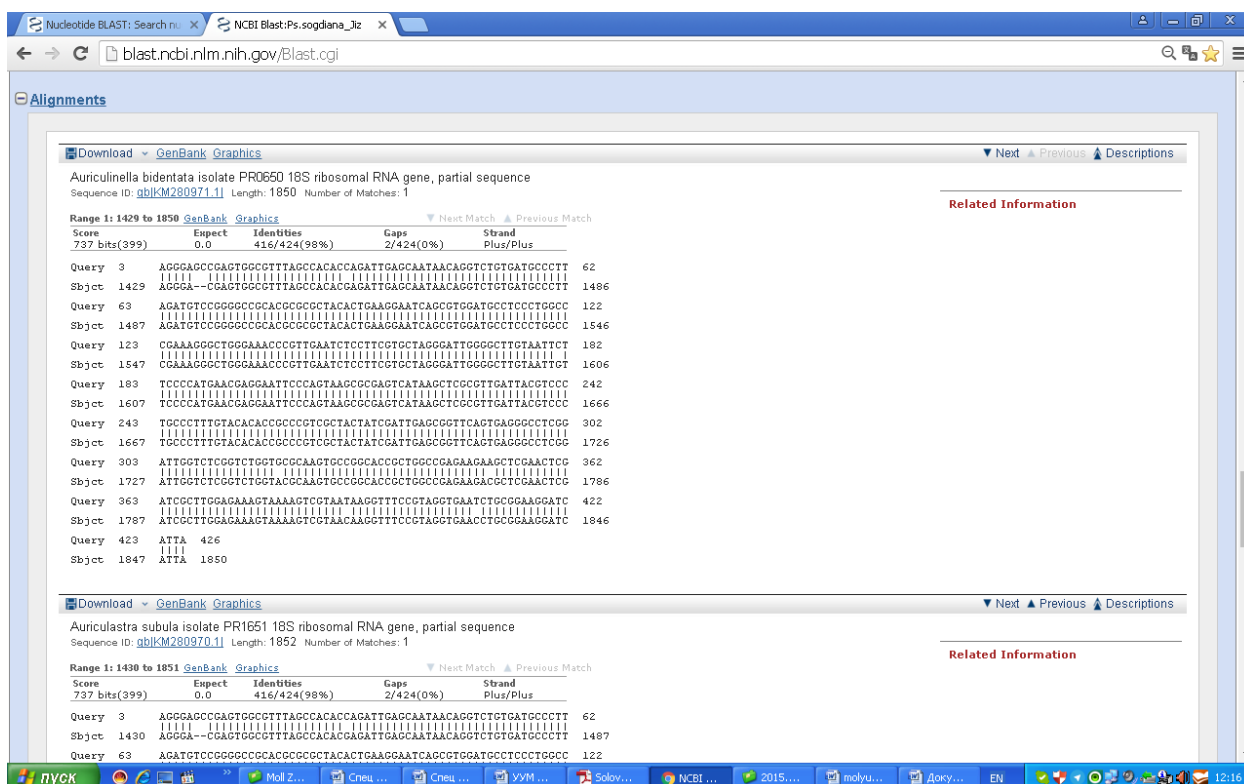


Рис. 9. BLAST дастури матн шаклидаги натижалари.



10 расм. Ўрганилаётган нуклеотидлар кетма кетлиги ва малумотлар базасидаги кетма-кетликнинг жуфт тўғирланиши.

Тақосланаётган кетма-кетликнинг тўлиқсиз гомологияси ҳам натижа бўлиши мумкин: 1) GeneBank депонировать қилинган кетма-кетликлар хато бўлиши мумкин (Sbjct); 2) тур ичидаги ўзгарувчанлик.

Назорат саволлари:

1. Сэнжер усули асосидаги секвенирлашда қандай принцип ётади?
2. Секвенирлаш ўтказишда занжирнинг узишда қандай компонентлар керак?
3. ПЗР-амплификацияси ассиметрик реакциясида фрагментларни тозалашни тушунтиринг?
4. Blastn программаси ёрдамида кўплаб тўғрилашлар қандай ўтказилади?
5. BLAST ёрдамида бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлигини қандай таҳлил қилинади?
6. BLAST билаш ишлашни принципларини кўрсатинг?

Фофдаланилган адабиёт:

1. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

5- мавзу. Филогенетик дарахтни тузиш. Нуклеотидлар кетма-кетлигини генбанк (ncbi) базасига жойлаштириш днк – диагностика (пзр усули).

РЕЖА:

5.1. Таҳлил учун олинган кетма-кетликларни тузиш;

5.2. Clustal Omega дастури ёрдамида нуклеотидлар кетма-кетлигини кўп маротабали тўғирлаш;

5.3. Филогенетик дарахтни тузишда MEGA-5 программасида кўпроқ ҳақиқатга ўхшашлик усули (maximal likelihood), максимал иқтисод (maximal parsimony), чамалаб кўрилган ўртача жуфтлик (UPGMA) ва яқин қўшиллар (Neighbor-joining) дастурлари орқали текшириш;

5.4. Олинган нуклеотидлар кетма-кетлигини ҳалқаро Генбанк (NCBI) жойлаштириш;

Таянч иб1оралар: Молекуляр филогенетика, Филогенетик дарахт, fasta format, MEGA-5, Генбанк.

Филогенетик дарахтни тузиш учун олдин таҳлил учун керакли кетма-кетликни аниқлаб олиш сўнгра, уларни кўп маротабали тўғирлаш зарур. Кейин, махсус дастур ёрдамида дарахт тузилади ва натижалар график кўринишида кўрсатилади.

Филогенетик дарахтни тузиш учун FASTA форматида нуклеотидлар кетма-кетлиги тузилади.

Кетма- кетликни танлашда керак бўлади:

- 1) Унчалик катта бўлмаган танламада тўхташ (< 50 кетма-кетлик)
- 2) Фрагментларга, ксенологларга, рекомбинант кетма-кетлик, тандем қайталанишларга (кетма-кетликларни кўплаб қайталаниши) йўл қўймаслик керак.

5.1. Таҳлил учун олинган кетма-кетликларни тузиш.

1. Алоҳида матнли файлга (Microsoft Word) филогенетик дарахт тузиш учун хизмат қилувчи организмларнинг (FASTA форматида), кетма-кетлигини киритинг.

2. Кетма-кетликни рақамланг. Бошқа матнли файлга организм номларига мос келувчи рақамлар кетма-кетлигини ёзиб чиқинг (11-12расм).

№	Намунанинг бирламчи нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш
№1	gb KF811493.1 Protostrongylus rufescens isolate AK17 L3 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№2	gb KF811491.1 Protostrongylus hobmaieri isolate AK8 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№3	gb KF811488.1 Spiculocaulus leuckarti isolate AK14a 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№4	dbj AB478249.1 Protostrongylus shiozawai genes for ITS2, 28S rRNA, partial sequence
№5	gb EU018481.1 Cystocaulus ocreatus isolate 161 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

11-расм. Microsoft Word матнли файлида организмлар номланиши.

5.2. Clustal Omega дастури ёрдамида нуклеотидлар кетма- кетлигини аниқлаб олиш сўнгра уларни кўп маротабали тўғирлаш.

Clustal Omega дастури ёрдамида нуклеотид кислоталар ва оксиллар кетма- кетлигини аниқлаб олиш, сўнгра уларни кўп маротабали тўғирлашга мўлжалланган.

Clustal Omega гуруҳли сатр ёки он-лайн тарзда ишлайди.

1. Кўп маротабали тўғирлаш учун Clustal Omega саҳифасига кириш: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

2. Clustal Omega бош саҳифасида тўрт иловали меню бор (13 расм):

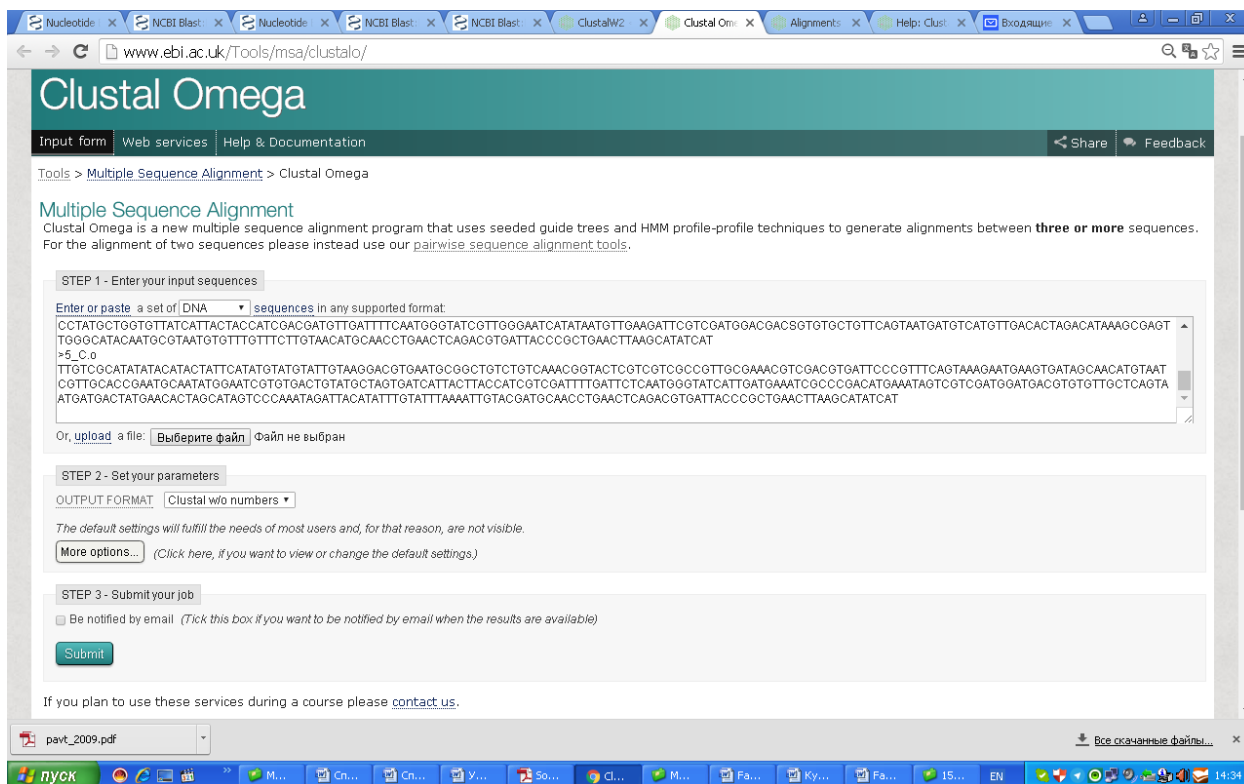
- Step 1 (Қадам 1) – илова кетма-кетликда FASTA форматида Microsoft Word документида таҳлил қилинаётган нуклеотидлар кетма-кетлигини киритувчи ойнани ўзида сақлайди. Графада Enter or paste да DNA танлаймиз.

- Step 2 (Қадам 2) – илова (Pairwise Alignment Options) жуфт тўғирлаш вариантларини ўзида сақлайди: секинроқ (Slow) ёки тезроқ (Fast). Параметрларни ўзгартирмаймиз (Slow);

- Step 3 (Қадам 3) - илова кўплаб тўғирлаш вариантларини ўзида сақлайди (Multiple Sequence Alignment Options): киритиш форматини аниқлаймиз PHYLIP;

- Step 4 (Қадам 4) – натижаларни элеткрон манзил орқали юбориш учун ойна (ўзингизнинг электрон манзилни графада EMAIL кўрсатинг).

3. Тўғирлашни ишга солиш учун SUBMIT тугмасини босинг. Тўғирлаш натижаларини бир неча дақиқадан сўнг электрон манзилга юборилади (14-расм).



13 расм. Нуклеотидлар кетма-кетлиги тахлили учун тўғирлаш параметрлари Clustal Omega ойнаси.

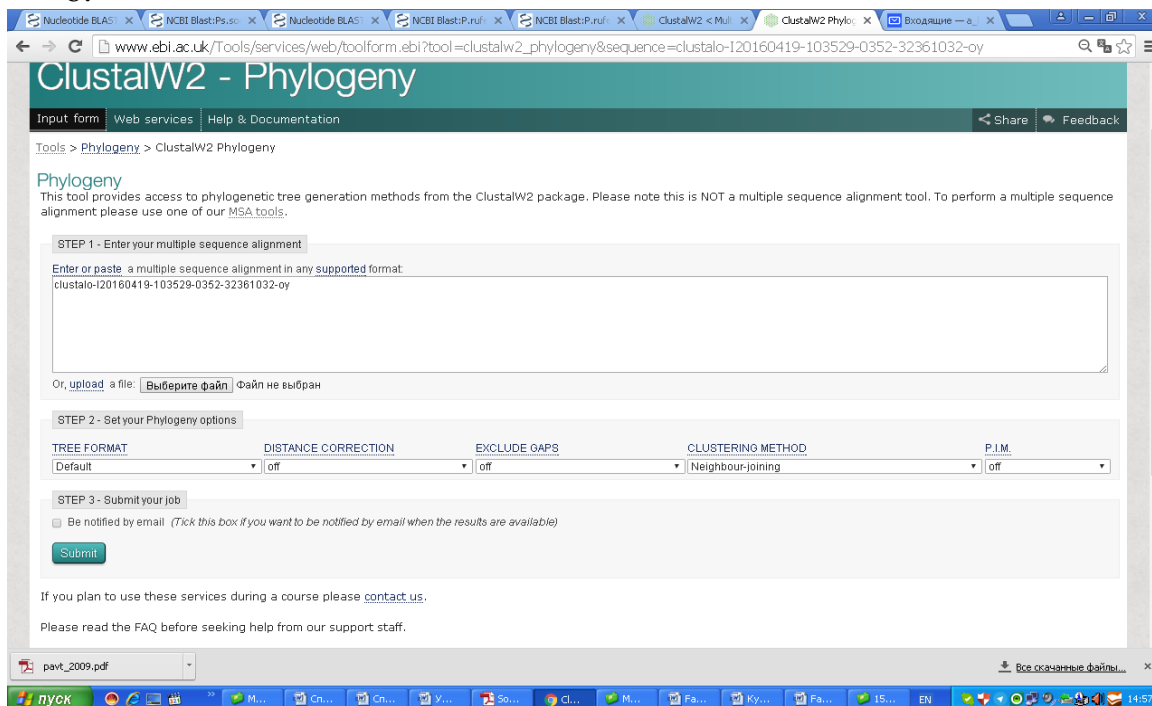


14 расм. Clustal Omega дастури ёрдамида тўғирланиш натижаси.

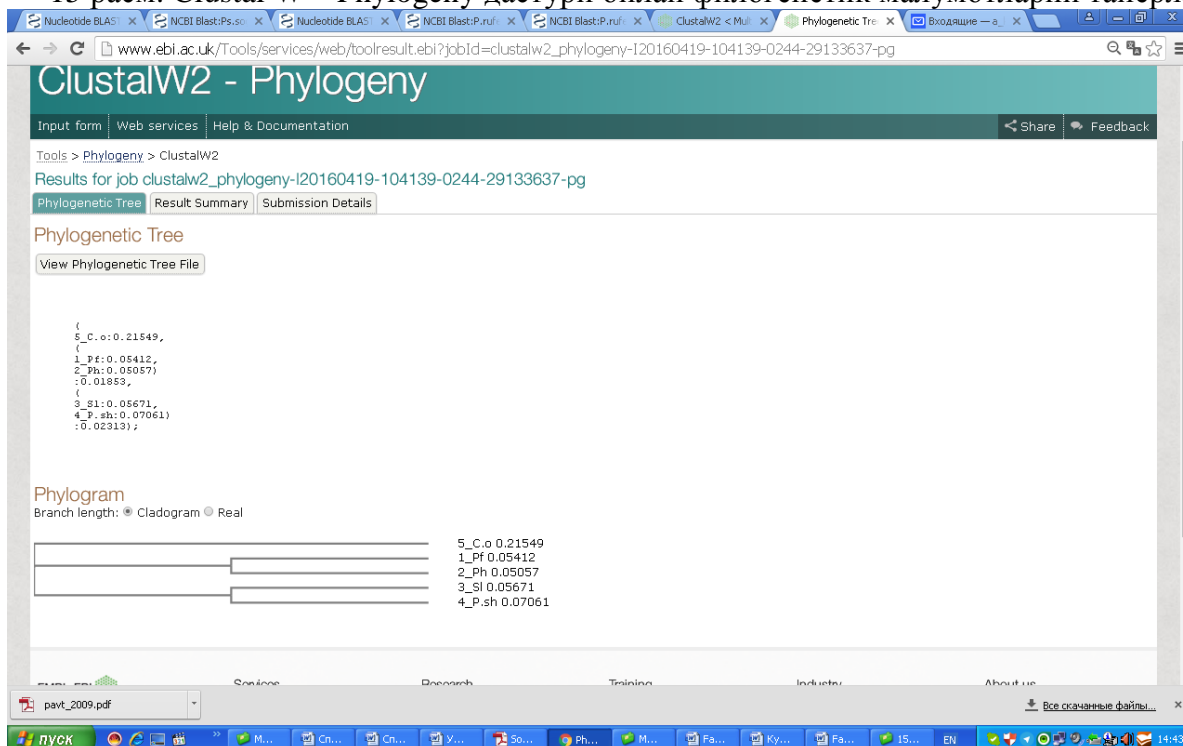
Clustaw2_phylogeny дастури ёрдамида **филогенетик дарахтни тузиш**.
 Step 5 (Қадам 5) – Alignments ойнасини ўнг тарафда филогения тузиш учун илова сакланади. (Send to ClustaW2_Phylogeny)
 4. Send to ClustaW2_Phylogeny тугмасини босинг, бошқа ойнада филогения тузиш учун кетма- кетлик очилади (15-расм).

5. Бошқа ойнада Submit тугмасини босинг, бир неча дақиқа мобайнида файллар ва филограммалар бирдан филогенетик дарахт очилади (16-расм).

6.



15 расм. Clustal W – Phylogeny дастури билан филогенетик малумотларни тайёрлаш.



16-расм. Clustal W – Phylogeny ёрдамида филогения тузиш.

5.3. Филогенетик дарахтни тузишда MEGA-5 программасида кўпроқ ҳақиқатга ўхшашлик усули (maximal likelihood), максимал иқтисод (maximal parsimony), чамалаб кўрилган ўртача жуфтлик (UPGMA) ва яқин қўшнилар (Neighbor-joining) дастурлари орқали текшириш.

MEGA 5 дастури ёрдамида филогенетик дарахтни тузиш.

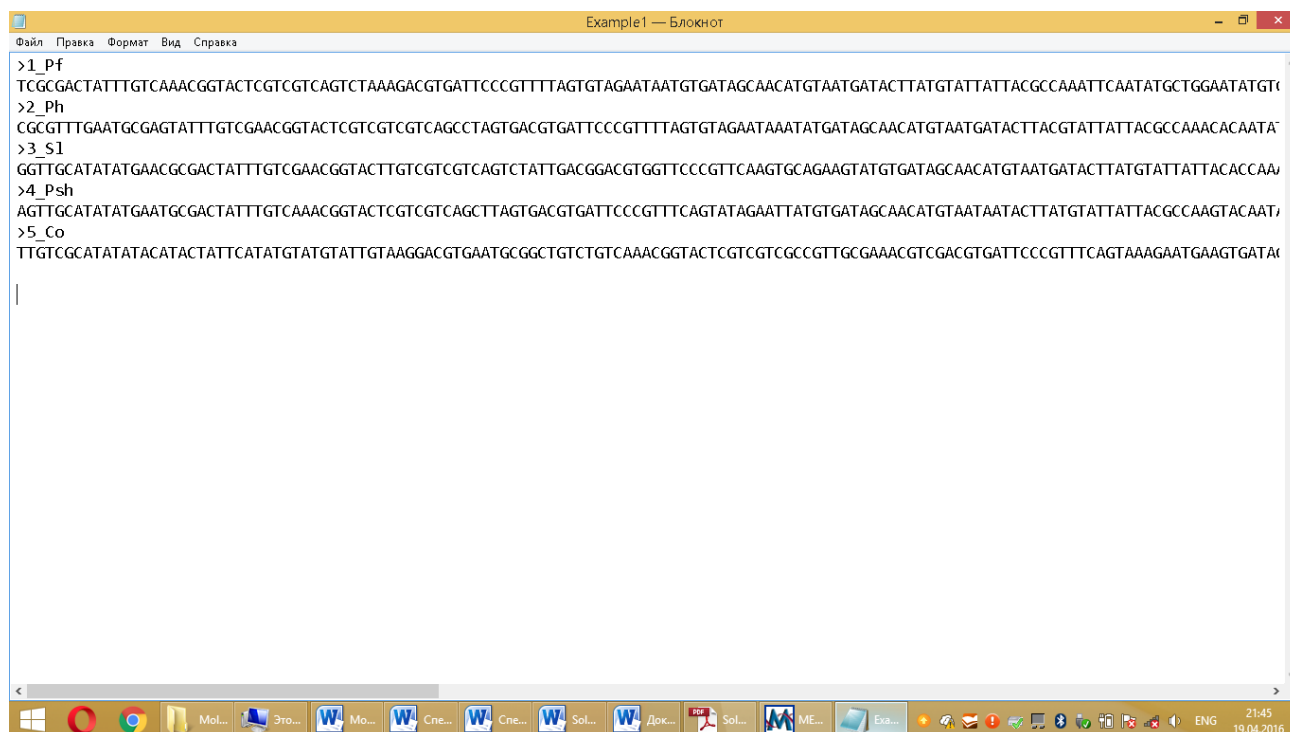
Филогенетик дарахтни тузиш учун MEGA 5 дастуридан фойдаланамиз. Дастурни ишлаб чиқарувчи корхона саҳифасидан бепул кўчириб олишимиз мумкин. Дастур тузилаётган дарахтнинг статистик аҳамиятини баҳолайди ва бутстреп-тахлил имкониятини беради. Максимал тежамлаш методи ёрдамида минимал сондаги мутацияланган дарахт танланади.

1. Матнли файл тузамиз ва унга кўп маротабали тўғирланган 5та кетма-кетлик маълумотларни кўчирамиз (17-расм). Файлини номлаймиз, масалан Example1.txt.

2. MEGA 5.2 дастурини ишга туширамиз. Дастурнинг кириш параметрлари пайдо бўлади (17 –расм): Align → Enter → Edit Built Alignment → Geartev a new alignment OK → DNA → Aligin Explorer → Edit → Paste → Alignment by ClustarW → Data → Export Alignment → Mega format → файлга ном берамиз.

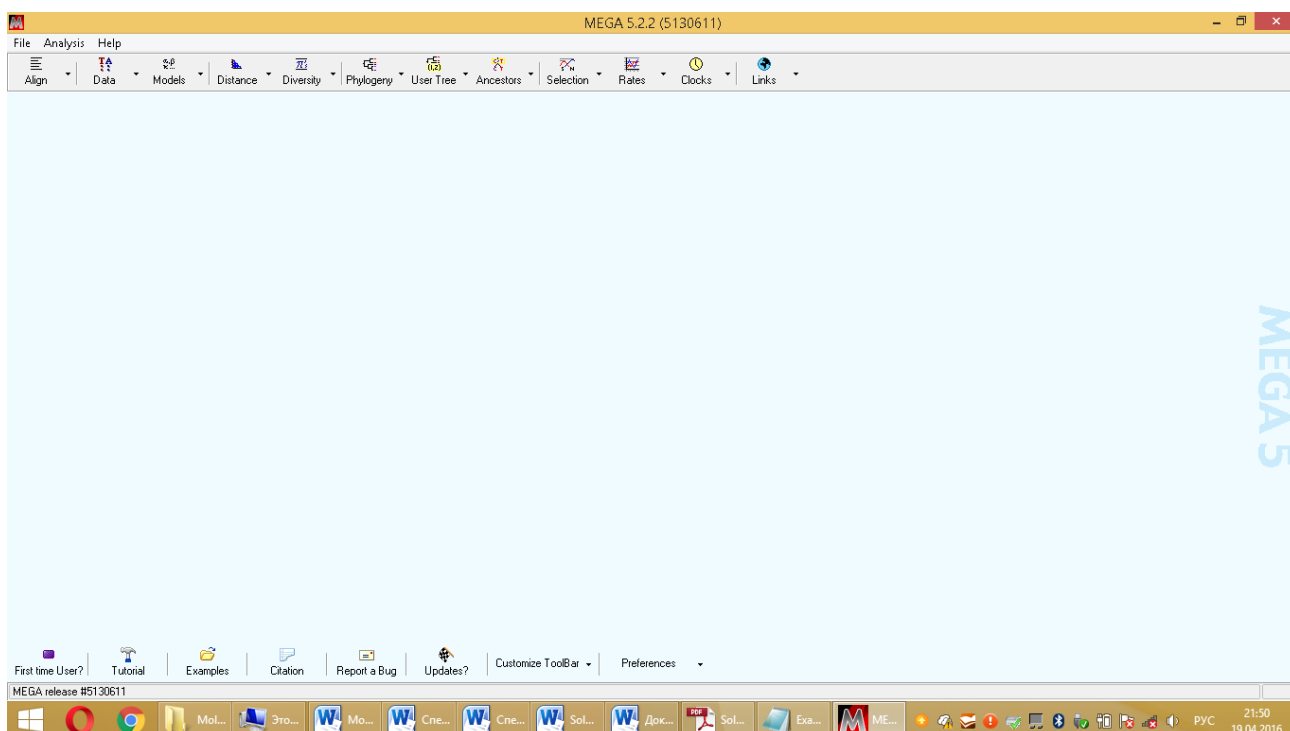
3. Максимал тежаш методи билан ишловчи Mega 5 дастурини ишга туширамиз.

4. Файлга Example2 номини берамиз ва Enter ни босамиз (18 расм).

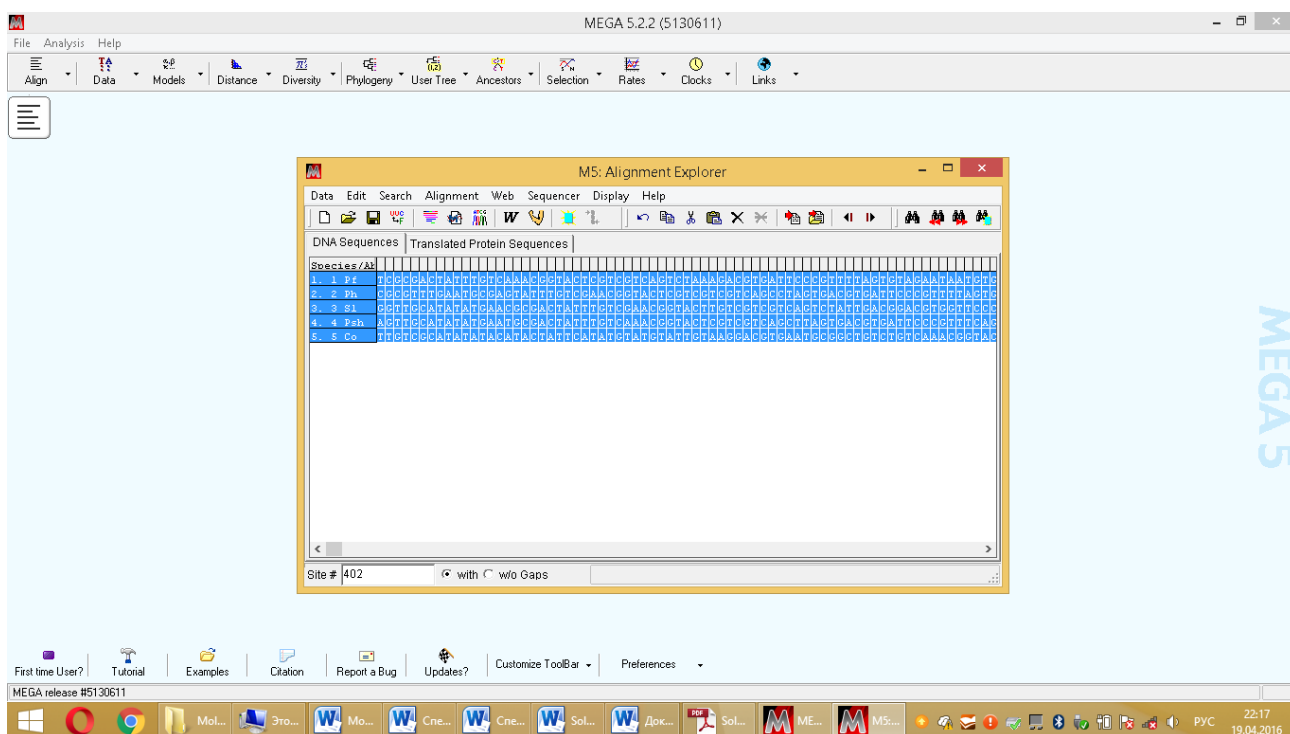


17-расм. Кетма-кетликларни кўпмаротабали текислашдаги текст файл (txt).

5.4. Олинган нуклеотидлар кетма-кетлигини ҳалқаро Генбанк (NCBI) жойлаштириш.



18 расм. MEGA 5 программасини таҳлили чиқиш параметрлари.



19-расм. Мега форматда маълумотларни текислаш ва ўзгартириш.

Натижада маълумотлар mega формат файлида сақланади ва уни масалан Example2 деб номлаш мумкин.

5. Example2 файли ёрдамида максимал тежамлаш усули билан дарахт қилиш учун Mega 5 программасини ишга туширамиз.

6. Example2 файлини киритамиз ва Enter босамиз. Таҳлилни чиқиш параметрлари пайдо бўлади (20-расм).

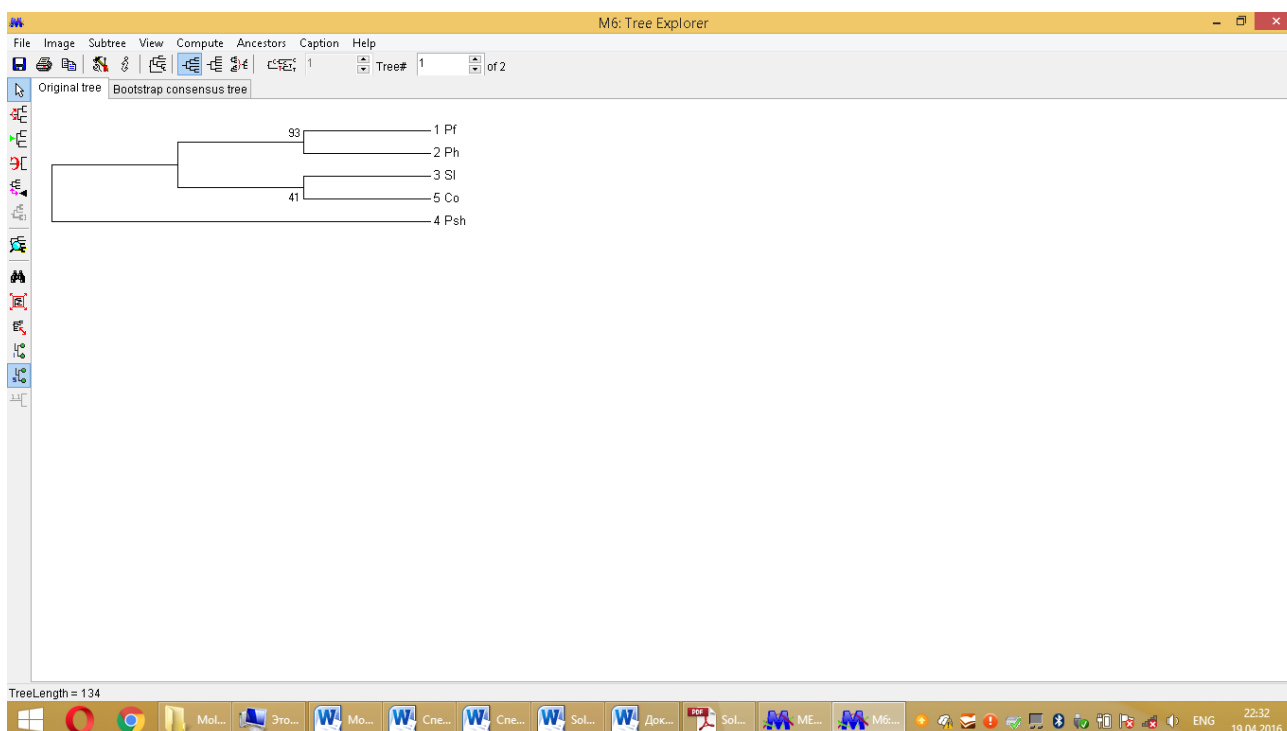


Рис. 20. Дастур таҳлилни чиқиш параметри.

Ҳар бир дарахтни тугунида бутстреп-мадад қийматлари ёзилади, масалан 93 жавоб (реплик). Бу сон дарахтларда қанча тугунлар (авлод) мавжудлигини характерлайди. Қиймат 93га қанча яқин бўлса, шохланишни ишончилиги шунча юқори бўлади.

Назорат саволлари:

1. Филогенетик дарахт дегани нима ўзи?
2. Филогенетик дарахт нима учун керак?
3. Қандай дарахтлар бўлади?
4. Дарахт учун кетма-кетлик қандай қилиб танлаб олинади?
5. Объектлар ўртасидаги масофани қандай тушунса бўлади?
6. Дарахтларни қайси on-line программаларда тузиш мумкин?
7. Олинган дарахтларни қандай қилиб чиройли тақдим этиш мумкин?

Фойдаланилган адабиёт:

Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

IV. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР МАТЕРИАЛЛАРИ

1-амалий машғулот:

Умуртқасиз ҳайвонлар тўқимасида геном ДНКсини стандарт ва Diatom DNA тўпламидан фойдаланган ҳолда ажратиш.

Diatom DNA Prep (Россия) реагентлари тўплами ёрдамида ДНК ажратиш услуги. Бу тўплам ДНКни турли табиий материаллардан ажратиш, шунингдек клиник намуналардан ДНКни тез тозалаб олиш имконини беради. Бу усул ФХ – услубдан жадаллиги (1 та намунага 30 мин. – 1,5 вақт сарфланади), токсик (заҳарли) реагентларнинг ишлатилмаслиги билан ажралиб туради. Таъсир қилиш маҳанизими гуанидинтиоционатли лизис қилувчи реагентнинг ишлатилишига асосланган бўлиб, у хужайрани лизисига, хужайра солюбилизациясига, шунингдек хужайра нуклеазали денатурацияга олиб келади. Лизис қилувчи (парчаловчи) – реагент иштирокида ДНК NucleosTM – сорбент тўпламида фаол сўрилади, сўнгра спиртли эритмада оксил ва тузлардан осон ювилади. Сорбентдан ажратилган ДНКни ПЗР да ишлатиш мумкин. Тўплами таркиби: парчаловчи реагент, тузли буфер Nucleos сорбентининг суспензияси, “Экстра Ген” ион алмашувчи арлашма суспензияси. Diatom DNA Prep 200 реагентлар тўплами ёрдамида нематодаларнинг тўқималаридан ДНКни ажратиш услуги куйидаги босқичларни ўз ичига олади. Бу тўплам йўриқномасида кўрсатилган.

2-амалий машғулот:

ПЗР реакциясини ўтказиш.

ПЗР қўйиш учун ажратилган ДНК намуналарга етарли (0,5 мкл) эппендорф ва шу эппендорфларга мос штативлардан фойдаланилди. Реакция аралашмасини тайёрлашда «Евроген» фирмасида ишлаб чиқарилган эритмалардан фойдаланилди. Бу реактивлар Сув (тозаланган), 10x буфер, dNTP эритмаси, 50x TAG-полимераза ҳамда шу фирмада ишлаб чиқарилган нематодалар учун мос праймерлардан фойдаланилди. Шу материаллар асосида ПЗР учун аралашма (Master-mix) тайёрланади. Аралашма тайёрлашда 10 мкл ва 200 мкл пипеткалардан фойдаланилди.

3-амалий машғулот:

Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтказиш.

ПЗР маҳсулотларида ДНКнинг мавжудлигини электрофорез қилиш усули орқали аниқлаш мумкин. 1% агароза гель тайёрлашда 1 г агарозани 250 мл колбага солинди ва устига 100 мл ТАЕ (Tris-acetate, edita) аралашмаси солиб қўл билан агароза эригунча аралаштирилди. Микроволновка печкаси ёрдамида 2-3 дақиқа қайнатилди ва аралашманинг ҳарорати 45-50°C етгунча хона температурасида совутилди. Сўнг 3 мкл этидий бромисти аралашмаси солинди. Тайёр бўлган аралашмани 10 ёки 15та катакчадан иборат гребёнкага солинди ва гель қотгунча сақланди. Гель қотганга қадар 25 мкл ли ПЗР

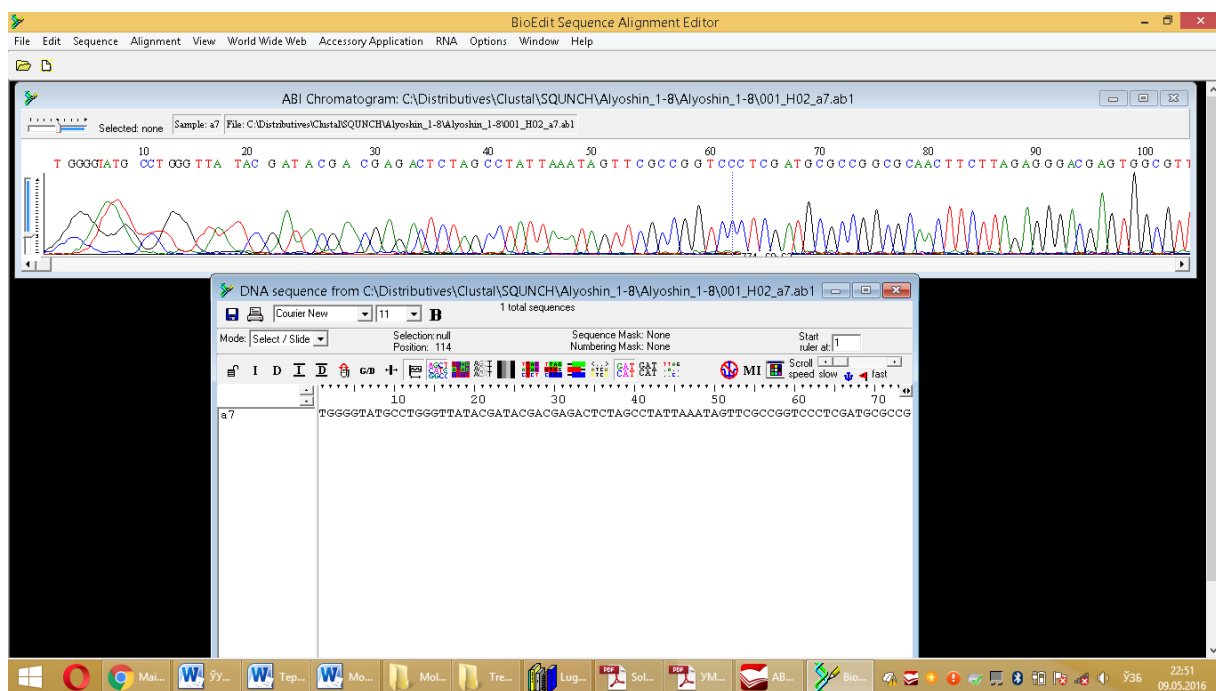
маҳсулотларидан 4 мклдан олиб 1 мкл бўёқ билан аралаштирилади. Қотган гель ТАЕ аралашмаси билан тўлдирилган камерага солинди ва гель катакчаларини хар бирига ПЗР аралашмаси солинди ҳамда катакчани охиргисига маркиёр («DNA Ladder» – бу 1000 bp Ladder фирмаси “Fermentas” ДНК ни неча жуфт нуклеотид ўқитилганини билдиради). Камерада 45 дақиқа 80- 100 вольт, 100 миллиампер кучланиш билан ДНК хайдалди. Электрофорез тугагандан сўнг камерадан гелни эҳтиёткорлик билан олиб, трансиллюминаторда кўз билан кўриб текширилди ва расмга олинди.

4-амалий машғулот:

ClustalW, Bioedit программалари ёрдамида нуклеотидлар кетма-кетлигини текислаш ишларини олиб бориш.

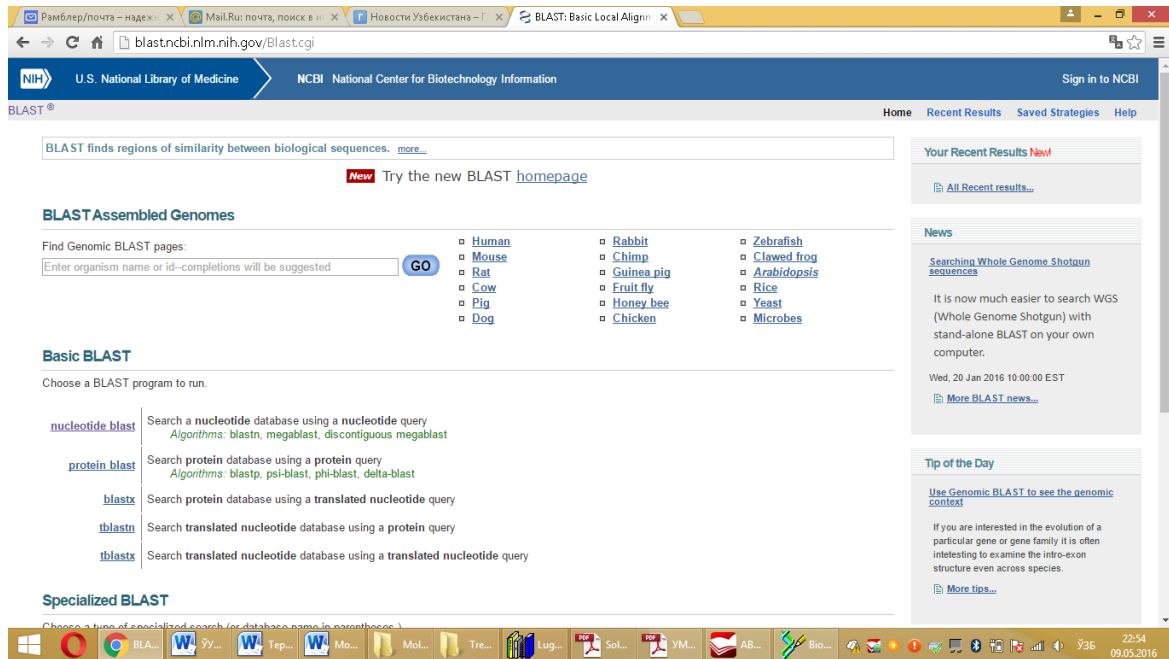
Сиквенсдан келган маълумотларни текислашда «Chromas version 1.45» (McCarthy, 1996 – 1998), «Clustal X version 1.81» (Thompson, Gibson, 2000), «Gendoc version 2. 5. 000» (Nicholas, 1999), «ForCon version 1.0 for Windows» (Raes, Van de Peer, 1996), PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998) биоинформатик дастурлардан фойдаланилади.

BioEdit – кетма-кетликларни тўғриловчи биологик таҳрир бўлиб, Windows 95/98 / NT / 2000 / XP / 7 ёзилган. Иш столи компютерида интуитив интерфейс билан бир қанча документларни қулай функциялари билан кетма-кетликларни тўғрилаш ва манипуляция қилиш каби функцияларни бажариш учун нисбатан осондир. Кетма-кетликлар вариантлари ва бир неча манипуляциялар, ташқи манбаларни дастур лойиҳаларини жараёнини енгилаштиришда, кетма-кетликларга кириш ва манипуляциялашда нуқта ва кнопкаларга тегиш каби оддий операцияларни бажариш имконини беради.



5-амалий машғулот: BLAST (NCBI) - ишлаш.

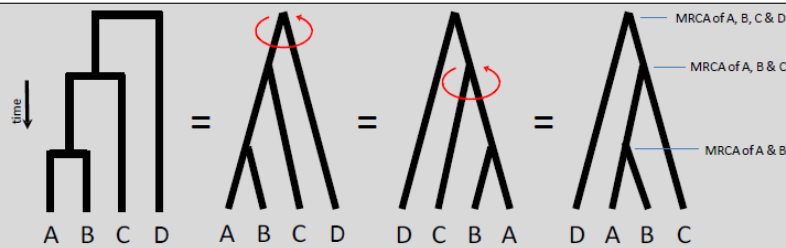
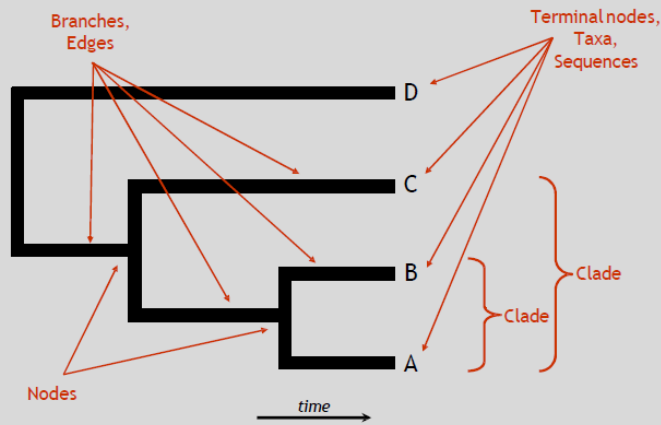
Объект ДНКсининг бу соҳаси кетма-кетлиги маълум бўлгач, уни маълумотлар базаси (NCBI) билан солиштирилади, қайсики объектнинг бу кетма-кетлиги бошқа барча турлар солиштирилади ва ўрганилаётган тур тезда аниқланади. Агарда кетма-кетлик базадаги мавжуд бирор бир тўғри келмаса, демак бу янги тур, яъни номаълум тур топилганидан дарак беради. Хайвонларнинг шундай соҳаси ўрганиш мақсадида митохондриял ёки ядро геннинг фрагментлари танланди.



6-амалий машғулот: Филогенетик дарахт тузиш (MEGA-5).

Филогенетик таҳлил - BLAST ёки MSA учун аниқ бўлмаган кетма-кетликлар ўртасидаги муносабатларни аниқ кўрсата оладиган шохланган диаграммаларни ярата олади. Филогенетик дарахт, шубҳасиз, эволюциянинг ўзаро алоқаларини ва дивергенция модулига мўлжалланган эволюцион ва қиёсий тадқиқотларни учун фойдали ҳамда молекуляр ва биохимик тадқиқотларда ген ёки оқсил функциялари тўғрисида гипотезанинг генерациясида муҳим ҳисобланади. Филогения катта соҳа ҳисобланиб, ўз-ўзидан бутун бир курсни эгаллайди. Мақсад фақат филогенетик дарахт тузишдан ташқари, балки “қирқиш ва кўйиш” пиринциплари тушуниш ва билиш керак бўлади.

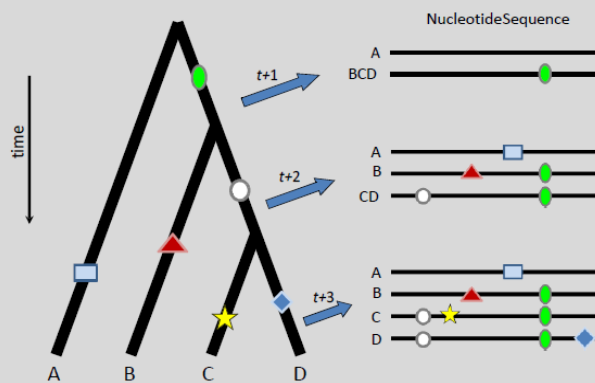
В. 1 Филогенетическое дерево



MRCA = most recent common ancestor

Филогенетические деревья могут быть представлены в различных формах и ориентациях. Важно, что единственный способ определить эволюционное расстояние между двумя последовательностями – это определить, как далеко назад во времени вы должны пойти прежде, чем найти общий предок. Так, на дереве справа, хотя последовательность A ближе к D, чем к C физически на странице, на самом деле A более тесно связана с C, так как они имеют больше общих предков. Эволюционные отношения между A-D также могут быть представлены с использованием формата Newick следующим образом $((A, B), C), D$: вложенность в круглые скобки соответствует разделению на деревьях выше.

В. 2. Рост филогенетического дерева



В ходе эволюции организмы изменяются, накапливают мутации (цветные фигуры). Эти мутации будут передаваться в потомстве всем дочерним линиям. Мутация, которая происходит очень рано в истории группы, например, зеленый овал, которая произошла у предка последовательностей B, C & D, будет найдена во всех трех линиях потомков. Мутация, что происходит позже (например, синий квадрат), вероятно, можно найти в меньшем количестве линий. Положение мутаций на нуклеотидных последовательностях совершенно произвольно и предназначено только, чтобы показать, как много уникальных последовательностей есть в каждый момент времени, распределение мутации среди этих последовательностей

V. КЕЙСЛАР БАНКИ

КЕЙС-1

Биохилма-хиллик нималигини изоҳланг?

Биохилма-хиллик бу – “биологик хилма-хиллик” атамасининг қисқартма шакли бўлиб, Ер шаридаги ҳаётнинг хилма-хиллигини англатади. Айрим ҳолларда бунинг учун “ҳаёт тизими” атамаси ҳам қўлланилади. Аммо биохилма-хиллик жуда мураккаб тузилма бўлиб, учта таркибий қисмдан ташкил топган:

1. Генлар
2. Биологик турлар
3. Экосистема

Ген бу – организм белгиларини ўзида мужассамлаштирган ва хужайра ядросида жойлашган ДНК нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида ёзилган маълумотлар йиғиндиси ҳисобланади. Генлар кўзнинг кўк ёки қора бўлишини, оёқларнинг йирик ёки кичик бўлишини бошқаради. Генларнинг индивидуал ўзгариши ҳар биримизни уникал бўлишимизни таъминлайди.

Биологик турлар. Тур бу – маълум ҳудудда тарқалган, айрим белги хусусиятлари билан алоҳидалашган аммо чатишиб насл бера оладиган индивидлар йиғиндиси ҳисобланади. Бу ҳақда биз ўйламаслигимиз мумкин, аммо ҳа куни бизга турли-туман турларга дуч келамиз. Турлар хима-хиллиги биохилма-хилликнинг энг ажойиб формаларидан бир ихисобланади. Бизнинг сайёрамиз миллион турларни ўзида мужассамлаштирган бўлиб, ҳали уларнинг кўпчилиги ўрганилмаган. Бугунги кунда 375 000 дан ортиқ гулли ўсимликлар ва 15 000 тур сутэмизувчи ва қушларгина бизга маълум.

Экосистема бу – маълум бир табиий шароитда ҳаёт кечирувчи ва тирик ва нотирик омиллар мажмуаси ҳисобланади. Экологлар турлар хима-хиллигини табиий шароитларда ўрганади. Ер шарида жудда кўп ва хилма-хил экосистемалар мавжуд. Улардан айримлари бизга маълум, масалан, ўрмон, тоғ ёки денгиз қабилар.

КЕЙС-2

Қачон, қаерда ва нима учун биохилма-хиллик тўғрисидаги Конвенция қабул қилинган?

Биологик хилма-хиллик тўғрисидаги Конвенция “Ер планетаси” даражасида 1992 йилда Рио-де-Жанейрода (Бразилия) имзоланган бўлиб, 1993 йил 29 декабрда кучга кирган. Бу биринчи биохилма-хилликни сақлашга қаратилган глобал келишув бўлиб, генетик ресурсларни сақлашга жуда катта ёрдам берган.

Биологик хилма-хилликни сақлаш Конвенцияси секретарияти Монреалда (Канада) жойлашган бўлиб, Конвенция мақсадларини амлага оширишга мўлжалланган.

КЕЙС-3

Биохилмахилликни аниқлашда қандай атамалар ишлатилади?

Биологик хилма-хиллик, Биологик ресурслар, Биотехнология, генетик ресурслар келиб чиққан мамлакат, хонакилаштирилган ёки маданийлаштирилган турлар, экосистема, ex-situ сақлаш, Генетик материал, Генетик ресурслар, яшаш жойи, in-situ шароитлари, in-situ сақлаш, муҳофаза остидаги минтақа.

КЕЙС-4

Ўзбекистонда биологик хилма-хиллик ҳақидаги Конвенция қачон ва ким томонидан имзоланган?

Ўз барқарор ривожланиши учун биологик хилма-хилликни сақлашнинг муҳимлигини тан олган Ўзбекистон 1995 йилда биологик хилма-хиллик ҳақидаги Халқаро конвенцияга қўшилди. Биологик хилма-хилликни сақлашнинг Миллий стратегияси ва режаси Вазирлар Маҳкамасининг Раиси Ислон Абдуғаниевич Каримов томонидан тасдиқланди (1 апрел 1998 й. Фармон № 139).

КЕЙС-5

Геномика ва геносистематика

Геномика ўзининг асосида геносистематика деб аталади. Буларнинг фарқи организмлар геномини ўрганишдаги ёндашувда ўз аксини топади. Ҳозирги пайтда геносистематика асосан ДНК бўлақларининг нуклеотид кетма-кетлигини (масалан, генларни) ўрганеди ва шу асосда организмларнинг қариндошлиги ҳақида хулоса чиқарилади. Геномика эса ядро ва хужайра органеллаларини бутун геномларини тадқиқ қилади ва уларни солиштиради.

Қайси маркер организмлар эволюциясини ўрганиш учун муҳим қурол ҳисобланади?

1980 йилларда эволюциянинг муҳим молекуляр маркери – рибосомал РНК таклиф қилинди. Ҳозирги пайтда барча ишлатилаётган маркерлар ичида (гемоглобин, цитохром с ва бошқ.) айнан рРНК филогенетик тадқиқотларнинг оммавий қуроли ҳисобланади. Бунинг бир қанча сабаблари бор:

1. Рибосомал РНК ер юзидаги ҳаётнинг барча хужайравий шаклларида учрайди ва уларнинг барчасида бир хил функцияларни бажаради.

2. Рибосомал РНК етарлича консервативдир.

3. Молекуласида ўзгарувчанлиги турлича бўлган участкаларнинг мавжудлиги туфайли рРНК турли таксономик даражада эволюцион қариндошликни аниқлаш учун ишлатилиши мумкин.

4. Генларнинг PCR амплификацияси технологиясининг ривожланиши ва уларнинг нуклеотид кетма-кетлигини тезда аниқлашнинг имконияти турли организмларда рНК нинг тузилиши ҳақида катта маълумотлар базасини олиш имконини беради.

5. рРНК молекуласи барқарор иккиламчи структурага эга бўлиб, у анча яхши ўрганилган. Иккиламчи структура прокариотларнинг 5S ва 16S молекулаларини учун ва эукариотларнинг 5.8S и 18S учун яхши ўрганилган.

КЕЙС-6

Молекуляр биология ва унинг асосий кашфиётлари ?

Молекуляр биология – ирсий ахборотни сақлаш, кўпайтириш, узатиш ва амалга ошириш механизмлари, биополимерлар – нуклеин кислоталар ва оксилларнинг структураси ва функцияси ҳақидаги фандир.

Асосий кашфиётлар.

1944й.	<i>ДНК нинг генетик ролини исботлаш.</i> Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод, Маклин Мак-Карти
1953й.	<i>ДНК структурасининг аниқланиши.</i> Джеймс Уотсон, Френсис Крик
1961й.	<i>Ферментлар синтезининг генетик регуляциясини кашф этилиши.</i> Андре Львов, Франсуа Жакоб, Жак Моно
1962й.	<i>Генетик Коднинг очилиши.</i> Маршалл Нирнберг, Генрих Маттеи, Северо Очоа
1967й.	<i>Биологик фаол ДНК ни in vitro синтези.</i> Артур Корнберг (молекуляр биологиянинг норасмий лидери)
	<i>Геннинг кимёвий синтези.</i> Гобинд Корана
1970й.	<i>Тескари транскриптаза ферментининг кашф қилишини ва тескари транскрипция ҳодисаси.</i> Говард Темин, Дэвид Балтимор, Ренато Дульбеко
1974й.	<i>Рестриктазнинг очилиши.</i> Гамильтон Смит, Даниэль Натанс, Вернер Арбер
1978г.	<i>сплайсингни кашф қилиниши.</i> Филипп Шарп
1982г.	<i>Автосплайсингни кашф қилиниши.</i> Томас Чек

КЕЙС-7

Рибосома структураси.

Рибосомалар – мембраналари бўлмаган энг майда хужайра органеллалари бўлишига қарамасдан улар мураккаб тузилишга эга. E.coli хужайрасида тахминан 10^3 - 5×10^3 рибосома мавжуд. Прокариотик рибосомаларнинг чизиқли ўлчамлари 210×290 Å. Эукариотларда эса 220×320 Å.

Рибосомаларнинг 4 та синфи мавжуд:

1. Прокариотик 70S
2. Эукариотик 80S
3. Митохондрияларнинг рибосомалари (55S – хайвонларда, 75S-замбуруғларда).
4. Рибосомаларнинг хромосомалари (70S – юксак ўсимликларда).

Изоҳ: S – седиментация коэффиценти ёки Сведберг константаси. Турли молекулалар ёки уларнинг бўлақларини центрифугалаш вақтида молекулаларнинг чўкиш тезлиги.

VI. МУСТАҚИЛ ТАЪЛИМ МАВЗУЛАРИ

Мустақил ишни ташкил этишнинг шакли ва мазмуни.

Тингловчи мустақил ишни муайян модулни хусусиятларини ҳисобга олган ҳолда қуйидаги шакллардан фойдаланиб тайёрлаши тавсия этилади:

- меъёрий хужжатлардан, ўқув ва илмий адабиётлардан фойдаланиш асосида модул мавзуларини ўрганиш;
- тарқатма материаллар бўйича маърузалар қисмини ўзлаштириш;
- автоматлаштирилган ўргатувчи ва назорат қилувчи дастурлар билан ишлаш;
- махсус адабиётлар бўйича модул бўлимлари ёки мавзулари устида ишлаш;
- тингловчининг касбий фаолияти билан боғлиқ бўлган модул бўлимлари ва мавзуларни чуқур ўрганиш.

Мустақил таълим мавзулари:

1. Геномика ва геносистематика.
2. Турлар ичидаги генетик полиморфизм.
3. Умуртқасизлар полиморфизми гипотезаси.
4. «ДНК-штрихкод» усули ва биохлама-хиликни аниёлашдаги роли.
5. Умуртқасизлар молекуляр систематикаси ва таксономия соҳасидаги ҳозирги тадқиқотлар.
6. ПЗР усули принциплари.
7. Электрофорез усули принциплари.
8. BLAST ишлаш принциплари.
9. Филогенетик дарахт ва унинг хиллари.
10. Ўзбекистондаги молекуляр зоология соҳасидаги ишлар.

VII. ГЛОССАРИЙ

Термин	Ўзбек тилида	Инглиз тилида
<p>Ген банки (геном кутубхонаси)</p>	<p>ДНК клонланувчи молекуласининг тўплами бўлиб, геном ҳар бир кетма-кетлигининг биттадан кам бўлмаган нусхасини сақлайди.</p>	<p>is a collection of cloned DNA molecules comprising at least one instance of each genome sequence.</p>
<p>Биологик систематика</p>	<p>тирик организмлар таснифи тамойилларини ишлаб чиқувчи фан бўлиб бу тамойилларни тизимни куриш учун амалий илова сифатида ишлатади. Тасниф деганда барча мавжуд бўлган ва қирилиб кетган организмларни тизимда жойлаштириш ва таърифлаш тушунилади</p>	<p>scientific discipline, which includes the principles of the development of the problem of classifying living organisms and the practical application of these principles to the construction of the system. Under the classification is defined here as the description and location of the system all existing and extinct organisms.</p>
<p>Вектор</p>	<p>(генетикада) – нуклеин кислотаси молекуласи, кўпинча ДНК бўлиб, у генетик инжеренияда генетик материални бошқа ҳужайрага ўтказиш учун фойдаланилади</p>	<p>nucleic acid molecule, often DNA used in genetic engineering to transfer the genetic material of another cell.</p>
<p>Ички транскрипциял анувчи спейсер (қисқ. ITS).</p>	<p>Рибосома ДНК транскрипцион бирликларининг алоҳида компонентларини кодламайдиган участкаларидир. Бу участкалар рРНК генларига нисбатан юқори полиморфизм билан ажралиб туради ва шунинг учун худди генлараро спейсерлар каби рибосома ДНК локусларининг генетик маркерлари сифатида ишлатилади.</p>	<p>(Abbr. ITS). Noncoding regions separating the individual components of the ribosomal DNA transcription unit. These regions are characterized by a high polymorphism compared to rRNA genes, and therefore, as intergenic spacers are used as genetic markers of ribosomal DNA loci.</p>

<p>Геном</p>	<p>муайян тур организмнинг хужайра хромосомаларини гаплоид тўпламида жойлашган ирсий материал йиғиндисидир.</p>	<p>a set of hereditary material contained in a haploid set of chromosomes of cells of this type of organisms. Treasure (from the Greek - "branch", "branch"; English clade.) - A group of organisms that are descended from a single common ancestor, and all descendants of that ancestor. The term is used in phylogenetics. Any treasure is regarded as a monophyletic group of organisms and can be represented by a cladogram (chart occurring organisms in the form of a tree, "pedigree").</p>
<p>Делеция</p>	<p>(лотинча deletio – йўқ қилиш) - хромосома қайта қурилиши бўлиб, бунда хромосома участкасининг йўқотилиши юз беради. Делеция хромосома узилишининг оқибати ёки нотекис кроссинговер натижаси бўлиши мумкин.</p>	<p>(From the Latin deletio - Destruction) - chromosomal rearrangements, in which there is loss of chromosome region. Deletion may be due to rupture of the chromosomes or the result of unequal crossing-over.</p>
<p>Кладистика</p>	<p>(қадимги юнончада kládos - тармоқ) – филогенетик систематиканинг йўналишидир. Кладистик амалиётнинг ўзига хос жиҳати кладистик таҳлил (таксонлар ўртасидаги қариндошлик алоқаларни реконструкция қилишда аргументациянинг қатъий схемаси), монофилияни тушуниш ва лойиҳалаштирилган филогения билан иерархик классификация ўртасидаги бир хил ўхшашликни талаб қилиш ҳисобланади.</p>	<p>(From the ancient Greek (kládos) -. Branch) - the direction of phylogenetic systematics. Features cladistic practice to use so-called cladistic analysis (rigorous argumentation schemes in the reconstruction of the familial relationship between taxa), the strict sense of monophyly and demand one-to-one correspondence between the reconstructed phylogeny and hierarchical classification.</p>

Кладистик таҳлил	хозирги пайтда қабул қилинган биологик классификациянинг асоси бўлиб, тирик организмлар ўртасидаги муносабатларни ҳисобга олади.	the basis for most currently accepted biological classifications built taking into account the familial relationship between living organisms.
Кладограмма	(инглизча cladogram) – замонавий биологик систематикадага асосий тушунча – дарахтсимон граф бўлиб, таксонлар ўртасидаги сингиллик муносабатларини акс эттиради.	(English cladogram.) - One of the basic concepts in modern biological systematics - tree graph showing the relationship of nursing relationship between taxa.
ДНК ни клонлаш	(генларни клонлаш) – берилган кетма-кетликдаги ДНК ни ажратиш жараёни бўлиб, in vitro да унинг кўпчилик нусхаларини олиш учун ишлатилади. ДНК ни клонлаш кўпинча генларни сақловчи бўлақларни амплификациялаш учун қўлланилади.	the process of allocating a given DNA sequence and production of many copies of it in vitro. DNA Cloning often used to amplify fragments containing the genes, and any other sequences - for example, promoters, coding sequences, and chemically synthesized oligonucleotides of random DNA segments.
Конспецификлик	биологик соҳа тушунчасидир. Икки ёки ундан ортиқ организмлар, популяциялар ёки таксонлар битта биологик турга тегишли бўлса улар конспецифик ҳисобланади.	this concept in the field of biology. Two or more individual organisms, populations or taxa are conspecific if they belong to the same biological species.
Лигирлаш	молекуляр биологияда ишлатилувчи атама бўлиб, нуклеин кислота иккита молекуласининг ДНК-лигаза ферменти ёрдамида бирикишини англатади	a term used in molecular biology, which means the connection of two nucleic acid molecules with a DNA ligase enzyme.
Молекуляр филогенетика	полимер макромолекулалар – ДНК, РНК ва оксилларнинг структурасини ўрганиш асосида тирик организмлар ўртасидаги қариндошлик алоқаларини қарор топтирувчи усул.	way to establish kinship between living organisms based on the study of the structure of polymer macromolecules - DNA, RNA and proteins. The result of a molecular

	Молекуляр-филогенетик таҳлилнинг натижаси тирик организмлар филогенетик шажарасини тузиш ҳисобланади.	phylogenetic analysis is the construction of a phylogenetic tree of living organisms.
Монофилия	(қадимги юнончада “битта” ва “оилавий авлод”) – таксонларни битта ягона умумий аجدоддан келиб чиқишидир. Замонавий тасаввурларга асосан, монофилетик ва биологик систематикада тахминий яқин аجدоднинг барча маълум бўлган авлодларни ўз ичига олади. Монофилияни баъзан голофилия деб ҳам аташади.	(Ancient Greek - "One", and - "family clan") - the origin of the taxa from a common ancestor. According to modern concepts, monophyletic in biological taxonomy is a group that includes all known descendants of the nearest ancestor of the hypothetical, the total only for the members of this group and for anyone else. Sometimes monophyly in the sense accepted definition called golofiliey (see. Below).
Парафилия	(қадимги юнончадан –ёнида ва оилавий авлод) – монофилия тушунчасига филогенетик систематика доирасида янада кучлироқ қатъийлик бериш натижасида пайдо бўлган тушунчадир. Парафилетик гуруҳлар деб тахминий умумий аجدоднинг авлодларини фақат бир қисмини ўз ичига олувчи гуруҳларга айтилади.	(Ancient Greek and -series - Family clan.) - A concept which has arisen as a result of giving greater rigor the concept of monophyly within phylogenetic systematics. Paraphyletic groups are called groups, including only a part of the descendants of the hypothetical common ancestor (more formal definition reads: paraphyletic group is obtained from a monophyletic by withdrawing from the last one terminal group).
Полимеразали занжир реакцияси (ПЦР)	молекуляр биологиянинг тадқиқот методи бўлиб, биологик материалда (намунада) нуклеин кислота (ДНК) фрагментларини сезиларли даражада катталаштиришга имкон	experimental method in molecular biology, which allows to achieve a significant increase in low concentrations of specific nucleic acid fragments (DNA) in the biological

	берувчи усулдир.	material (sample).
Рестриктион фрагментлар узунлигининг полиморфизми (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)	бу геном ДНК сини рестрикция эндонуклеазаси ёрдамида кесиб, ҳосил бўлган фрагментларни (рестриктларни) гел-электрофорез (ДНК электрофорез) йўли билан тадқиқ қилувчи усулдир	(RFLP, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) - is a method of investigation of genomic DNA by cutting the DNA with restriction enzymes and further analysis of the resulting fragments (restriction fragments) size by gel electrophoresis (electrophoresis of DNA).
Полифилия	(қадимги юнончада кўп сонли ва –оилавий авлод) – таксонни турли хил авлодлардан келиб чиқишидир. Биологик систематикада полифилетик деб уни ташкил қилувчи кенжа гуруҳларни мазкур гуруҳга кирмайдиган бошқа гуруҳлар билан нисбатан яқин қариндошлиги исботланган гуруҳга айтилади. Уни одатда конвергент ёки параллел ҳолда пайдо бўлган юзаки ўхшашлик асосида ажратишади	(Ancient Greek - . And many, and - family clan) - the origin of taxa from different ancestors. Polyphyletic in biological taxonomy is a group for which is not contested a close relationship of its constituent sub-groups with other groups, are not included in this. Her selection is usually based on a superficial similarity that arose convergent or parallel.
Популяция	бу конспесирик индивидлар гуруҳи бўлиб, у демографик, генетик ёки макон жихатидан бошқа индивидлар гуруҳидан ажралиб туради.	a group of conspecific individuals that demographically, genetically or spatially separated from other groups of individuals.
Праймер	бу ДНК молекуласидаги қисқа РНК- сақловчи фрагмент бўлиб, репликацияни инициацияси учун муҳимдир.	it is a short RNA - containing fragment in the DNA molecule required for replication initiation.
Рестрикция	маҳсус фермент (рестриктаза) томонидан амалга оширилувчи ДНК занжирининг бўлинишидир.	section of the DNA chain, implemented a special enzyme (restriction enzyme).

<p>Рибосомал ДНК</p>	<p>рибосомал РНК ни кодловчи локус. Одатда бу катта ва мураккаб тузилишга эга локус бўлиб, бири-биридан генлараро спейсерлар билан ажралган катта микдордаги такрорланувчи бирликлардан иборат. Такрорланувчи бирлик ҳар битта индивидуал ва рибосомал РНК ларнинг биттадан нусхасини сақлайди.</p>	<p>The locus encoding ribosomal RNA. Usually it is large and difficult to organize locus, consisting of a large number of repeating units, separated by intergenic spacer. Repeat unit comprises a single copy of each individual gene of ribosomal RNA, which is located between the sequences of internal transcribed spacers.</p>
<p>Таксон</p>	<p>(лотинчадан taxa; қадимги юнончадан “тартиб”, “тузилма”) – умумий хосса ва белгилар асосида бирлашувчи дискрет объектлардан ташкил топган классификациядаги гуруҳдир.</p>	<p>(Latin taxon, plural taxa; from the ancient Greek "order, arrangement, organization..." - A group classification, consisting of discrete objects, united on the basis of common properties and attributes.</p>
<p>Таксономия</p>	<p>(қадимги юнончадан тузум, тартиб ва қонун) – таснифлаш (классификация) ва тизимлаш (систематизация) нинг тамойиллари ва амалиёти ҳақидаги таълимот.</p>	<p>(From the ancient Greek - BUD, order, and -. The law) - the teaching of the principles and practice of classification and systematization.</p>
<p>Филогения</p>	<p>биологиянинг бир қисми бўлиб, организмларни бири-биридан келиб чиқиш муаммоларини ўрганади.</p>	<p>part of biology, considering the origin of organisms from one another.</p>
<p>ДНК электрофорез</p>	<p>аналитик усул бўлиб, ДНК фрагментларини ўлчами (узунлиги) ва шаклига қараб ажратишда ишлатилади. Намуналарга берилган электр майдонининг кучи ДНК фрагментларини гел бўйлаб кўчишга мажбур қилади. ДНК молекуласининг шакар-фосфат асоси манфий зарядлангани учун ДНК</p>	<p>is an analytical method used to separate DNA fragments by size (length) and shape (in case of DNA secondary structure forms, such as pins). The forces of the electric field applied to the samples, DNA fragments are forced to migrate through the gel. Sugar-phosphate backbone of DNA is negatively charged and</p>

	<p>занжирлари манфий зарядланган катоддан мусбат зарядланган анодга томон ҳаракатланади.</p> <p>Нисбатан узунроқ молекулалар секинроқ кўчади, негаки улар гелда ушланиб қолади. Калта молекулалар эса тезроқ ҳаракатланади.</p>	<p>therefore the DNA strand moving from the cathode, negatively charged, the positive anode. Longer molecules migrate more slowly as delayed gel, shorter molecules move faster.</p>
--	---	--

VIII. АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

1. Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation // Trends Ecol. Evol. -2007. - V. 22. -No.3. -P. 148-155.
2. Bisby F. A. The quiet revolution: biodiversity informatics and the Internet// Science. -2000. - № 289. -P.2309-2312.
3. De Ley P., Blaxter M. Systematic position and phylogeny // The biology of nematodes / Ed. by D.L.Lee. L.; N.Y.: Taylor and Francis, 2002. P. 1-30.
4. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
5. Joan D. Ferraris, Stephen R. Palumbi Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols 1st Edition London: Imperial College Press, 2014, English
6. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes.// Proc. R. Soc. Lond. . - 2003. -V. 270. -P. 313-321.
7. Hebert P. D. N., Gregory T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy// Syst. Biol. - 2005. -V. 54. -P. 852-859.
8. Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004a. -V.101. -P. 14812-14817.
9. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemplak T. S., and Francis C. M. Identification of birds through DNA barcodes// PLoS Biology. - 2004b. -V.2. - P.1657-1663.
10. Kuchboev A.E., Krucken J., Ruziev B.H., von Samson-Himmelstjerna G. Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan// Parasitology Research 2015, 114 (4). - P 1355-1364.
11. Leffler E. M., Bullaughey K., Matute D., Meyer W. K., Segurel L, Venkat A., Andolfatto P., Przeworski. Revisiting an Old Riddle: What Determines Genetic Diversity Levels within Species? // Plos. Biology. -2012. -V. 10. - Issue. 9. -P. 1-13.
12. McPherson M.J., Moller S.G. PCR. The Basics 2nd edition: Taylor & Francis Group, 2006. - 305 p.
13. Nygren A., Norlinder E., Panova , M., Pleijel F. Colour polymorphism in the polychaete *Harmothoe imbricate* (Linnaeus,1767) // Marine Biology Research. - 2011. -V. 7. -P. 54-62.
14. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.
15. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P. A plea for DNA taxonomy// Trends Ecol. Evol. - 2003. -V. 18. -P. 70-74.
16. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P. DNA points the way ahead in taxonomy—in assessing new approaches, it's time for DNA's unique contribution to take a central role// Nature. - 2002. -V. 418. -P. 479.

17. Watts, D. Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer / D. Watts, J.R. MacBeath // Methods Mol. Biol. - 2001. - V.167. - P.153-170.2001. - 1626 p.

18. Woodruff D.S. Declines of biomes and biotas and the future of evolution// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2001. -V. 93. -P 5471-5476.

19. Abramatorov M.B., Amirov O.O., Kuchboev A.E., Khalilov I.M., Abdurakhmanov I.Y. Morphological and Molecular characterization of species *Haemonchus contortus* and *H. placei* (Nematoda: Trichostrongylidae) from Uzbekistan by sequences of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA// Sci Parasitol., Cluj-Napoca, Romania, 2013.14 (4): 1-7.

20. Банникова А.А. Молекулярная филогенетика и современная систематика млекопитающих// Журнал общей биологии. - 2004. - Т.65. - N4. - С.278-305.

21. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун хайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. - №4. - 24-26 б.

Интернет сайтлар:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<http://www.barcodeoflife.org/>