

**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**

**ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ
ПЕДАГОГ КАДРЛАРНИ ҚАЙТА ТАЙЁРЛАШ МАЛАКАСИНИ
ОШИРИШ ТАРМОҚ МАРКАЗИ**

БИОТЕХНОЛОГИЯ
йўналиши

“МОЛЕКУЛЯР БИОТЕХНОЛОГИЯ”
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 __ - _____даги __ -сонли буйруғи билан
тасдиқланган ўқув режа ва дастур асосида тайёрланди.**

Тузувчи: **Артикова Р.М** - Тошкент кимё-технология институти доценти
Тақризчилар: **Prof. Dr. Jone Angel Gulias,**
Inmaculada Oribe - “Кимёвий ва биомолекуляр муҳандислик
кафедраси” Де-Кантабрия университети, Сантадор (Испания)

*Ўқув -услугий мажмуа Тошкент кимё-технология институтинг
Кенгашининг 2016 йил __ - _____даги __ -сонли қарори билан тавсия
қилинган.*



May 17, 2016
Tashkent, Uzbekistan

FOREIGN EXPERT CONCLUSION

for educational-methodological complex prepared for "Biotechnology" retraining and professional development courses

This educational-methodological complex was developed in accordance with defined requirements. It consists of theoretical and practical materials, topics for self-study, case study, glossary and the list of literature references.

In the discipline of "Molecular biotechnology" is given molecular – biological revolution, biological systems using in molecular biotechnology. Also Synthesis of DNA, RNA and proteins is given. This module contains the technology of recombinative DNA, chemical synthesis of DNA determination, properties of nucleotides and amplification; optimization of genetic clones expression in procariots system; molecular diagnostics, usage of recombinative microorganisms for obtaining advertitive product, Genetic engineering of plants: methods and application; transgenic animals; protheomics and methabolomics. Modern protheomics in biological system; electrophoresis of proteins; chromatographical analyses; chemical and biological mass-spectrometry. Chemometrics.

In the discipline of "Industrial biotechnology" is given scientific foundation of industrial biotechnology. The sample production of industrial biotechnology; growing and storage term; production of proteins and vitamins; production of enzymes; production of antibiotics; technology obtaining of entopathogen biopreparations; technology of production based on water-plants.

The module "Ecological biotechnology" include the production and role of ecological biotechnology, objects and products of ecological biotechnology, waste processing of agriculture and obtaining of secondary products. Technology of obtain biogas production and biofuel. Cleaning technology of wastewater is given.

These topics were formed by modern textbooks and leading international publications. The topics of self-education are formed on the basis of actual trends in this scientific direction and the themes stipulated by the syllabus:

The case-study topics related to application of theoretical results were included. Glossary includes main terms with comments in both Uzbek and English languages.

Summarizing, the training courses in food technology for academic staff in Uzbekistan can be applied for the retraining and professional development in Uzbekistan and should bring valuable impact on professional development of human resources in Uzbekistan.

Kind regards,

Prof. Dr Jose Angel Irabien Gulas
e-mail.: angel.irabien@unican.es

Prof. Dr Inmaculada Ortiz Uribe

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Universidad de Cantabria, Santander (Spain)

МУНДАРИЖА

I. ИШЧИ ДАСТУР	4
II. МОДУЛНИ ҶЎҚИТИШДА ФОЙДАЛАНИЛАДИГАН ИНТЕРФАОЛ ТАЪЛИМ МЕТОДЛАРИ	10
III. НАЗАРИЙ МАТЕРИАЛЛАР	147
IV. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ МАТЕРИАЛЛАРИ	69
V. КЕЙСЛАР БАНКИ	85
VI. МУСТАҚИЛ ТАЪЛИМ МАВЗУЛАРИ	104
VII. ГЛОССАРИЙ	93
VIII. АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ	122

Ў.ИШЧИ ЎҚУВ ДАСТУРИ

Кириш

Дастур ривожланган мамлакатлардаги хорижий тажрибалар асосида “Кимёвий технологиялари қайта тайёрлаш ва малака ошириш йўналиши бўйича ишлаб чиқилган ўқув режа ва 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. Дастур мазмуни олий таълимнинг норматив-ҳуқуқий асослари ва қонунчилик нормалари, илғор таълим технологиялари ва педагогик маҳорат, таълим жараёнида ахборот-коммуникация технологияларини қўллаш, амалий хорижий тил, тизимли таҳлил ва қарор қабул қилиш асослари, махсус фанлар негизида илмий ва амалий тадқиқотлар, технологик тараққиёт ва ўқув жараёнини ташкил этишнинг замонавий услублари бўйича сўнгги ютуқлар, глобал Интернет тармоғи, мультимедиа тизимлари ва масофадан ўқитиш усулларини ўзлаштириш бўйича янги билим, кўникма ва малакаларини шакллантиришни назарда тутди.

“Молекуляр биотехнология” фани замонавий биотехнологик усуллардан фойдаланиб озиқ-овқат, энергетик ресурс, атроф-муҳит ифлосланишининг олдини олиш билан боғлиқ муаммолари ечимини топиш, ўсимлик ва ҳайвонлар хужайраларидан трансген организмлар, турли стресс омиллар, бактерия, замбуруғ ва вируслар, гербицидларга чидамли ўсимлик шакллари яратиш, хужайраларнинг ин витро тизимида яшаши ва кўпайиш хусусиятлари, регенерацияланиши ва уларнинг тотипотентлигини ўрганиш, ўсимликлар ҳайвонлар хужайралари культурасидан фойдаланиб, дори препаратлар, биологик фаол моддалар, озиқа қўшимчаларлар ва бошқаларни ишлаб чиқаришга асосланган.

Модулнинг мақсади ва вазифалари

Молекуляр биотехнология модулининг мақсади: молекуляр биотехнология фани усуллари ёрдамида микроорганизмлар хужайрасига бошқа организмларни генларини киритиш ва шу генларнинг махсулотларини олиш, ўсимликларнинг атроф муҳитнинг стресс омилларига қарши курашиш қобилиятини ошириш имкониятлари билан таништиришдир.

Молекуляр биотехнология модулининг мақсади: рекомбинант ДНК ва РНКлар олиш, хужайраларадан генларни ажратиш, генлар устида манипуляциялар ўтказиш, уларни бошқа организмларга киритиш орқали янги ирсий хусусиятга эга бўлган генетик структуралар ва организмлар

яратиш, хужайраларни биосинтетик потенциалидан амалий фойдаланиш мумкинлигини асослаб бериш.

Модул бўйича тингловчиларнинг билим, кўникма ва малакаларига кўйиладиган талаблар:

“Молекуляр биотехнология” курси бўйича тингловчилар қуйидаги янги билим, кўникма, малака ҳамда компетенцияларга эга бўлишлари талаб этилади:

Тингловчи:

- геном ва хужайра мухандислигининг вазифалари;
- оксиллар биосинтезининг умумий схемаси;
- генетик код тушунчалари;
- ген мухандислигининг моддий асослари;
- рекомбинант ДНК технологияси;
- ёт генларни ўсимлик хужайрасига киргизиш йўллари;
- хайвон хужайралари трансформатсияси;
- хужайра мухандислиги;
- гибридома технологияси;
- геномни конструкция қилишнинг принциплари *билиши* керак;

Тингловчи:

- ген мухандислигида юқори сифатли векторларнинг хусусиятлари, рестрикция ва лигирлаш;
- керакли хусусиятларга эга бўлган ўсимликлар яратиш, хайвон хужайралари трансфекцияси;
- биотехнологик ишлаб чиқаришда хом ашё ва продуктлар ҳақида;
- тўқималарни ўстирувчи пептид векторлари ва бошқа биологик маҳсулотларнинг янги авлодлари бўйича *кўникмаларига* эга бўлиши;

Тингловчи:

- рекомбинант ДНКлар технологиясини яратиш;
- трансген ўсимликлар ва хайвонлар олиш;
- хужайралар биотехнологияси асосида қурғоқчиликга, шўрхоқликга, турли фитопатогенларга чидамли ўсимликлар олиш;
- *малакаларига* эга бўлиши зарур.

Тингловчи:

- қишлоқ хўжалиги учун биопрепаратлар ишлаб чиқариш технологияларини бошқариш ва назорат қилиш;

- биотехнологик маҳсулотлар ишлаб чиқариш жараёнларидаги мавжуд долзарб масалаларни ечиш учун инновацион технологиялардан фойдаланиш;
- биотехнологик маҳсулотлар ишлаб чиқариш жараёнида экспериментал тадқиқотларни ўтказиш ва олинган натижалар асосида уларга ишлов бериш *компетенцияларига* эга бўлиши лозим.

Модулни ташкил этиш ва ўтказиш бўйича тавсиялар

“Молекуляр биотехнология” 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 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 усулларини қўллаш назарда тутилади.

Модулни ўқув режадаги бошқа фанлар билан боғлиқлиги ва узвийлиги

Молекуляр биотехнология фани қайта тайёрлаш ва малака ошириш йўналишини “Биотехнология” мутахассислиги бўйича киритилган “Саноат биотехнологияси” ва “Муқобил энергия манбалари” фани билан узлуксиз боғлиқ бўлиб, ушбу фанларни ўзлаштиришда назарий асос бўлиб хизмат қилади. “Молекуляр биотехнология” фанини тўлиқ ўзлаштиришда ва амалий вазифаларни бажаришда “Таълимда мультимедиа тизимлари ва масофавий ўқитиш методлари”, “Электрон педагогика асослари ва педагогнинг шахсий, касбий ахборот майдонини лойиҳалаш”, ҳамда “Амалий хорижий тилни ўрганишнинг интенсив усуллари” фанлари ёрдам беради.

Модулни олий таълимдаги ўрни

“Молекуляр биотехнология” фани қайта тайёрлаш ва малака ошириш йўналишини “Биотехнология” мутахассислиги бўйича махсус фанлардан дарс берувчи профессор ўқитувчилар учун муҳим ўринни эгаллайди. Ушбу фан Олий таълим муассасаларида талаба ва педагоглар томонидан ўқув-

илмий ишларини олиб бориш учун асосий назарий ва амалий билимларни беради.

Модул бўйича соатлар тақсимоти

	Модул мавзулари	Тингловчининг ўқув юкلامаси, соат				
		Ҳаммаси	Аудитория ўқув юкلامаси			Мустақил таълим
			назарий	жумладан		
				Амалий машғулот	Кўчма машғулот	
1	ДНК, РНК, оқсил биосинтези	8	2	4	-	2
2	Рекомбинант ДНКлар технологияси.	8	2	4		2
3	Микробиологик тизимларнинг молекуляр биотехнологияси	8	2	4		2
4	ДНКни кимёвий синтезлаш, нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш	4	2		2	
5	Оқсиллар терапияси	6	2	2	2	
	Жами	34	10	14	4	6

Назарий материаллар мазмуни

1-мавзу: ДНК, РНК ва оқсил биосинтези

. ДНК, РНК ва оқсил биосинтези. Трансляция, транскрипция, репликация. Ген, геном ва хужайра муҳандислиги замонавий биомуҳандисликнинг асосий йўналишидир. Ген, геном ва хужайра муҳандислигининг вазифалари.

2 -мавзу: Рекомбинант ДНК лар технологияси.

Рекомбинант ДНК технологияси.. Рестрикция ва лигирлаш, ёт генни векторга кўчириш. Трансформациянинг аҳамияти ва асосий усуллари. Штаммлар олиш. Векторлар ва уларнинг ген муҳандислигидаги аҳамияти. Векторларни конструкция қилиш принциплари. Ген муҳандислигида юқори сифатли векторларнинг хусусиятлари. Ген муҳандислиги ферментлари, уларни классификацияси. Рестриктазалар, лигазалар.

3-мавзу: Микробиологик тизимларнинг молекуляр биотехнологияси

Молекуляр диагностика. Иммунодиагностика усуллари. Фермент иммуносорбент анализи. Моноклонал антителалар

4-мавзу: ДНКни кимёвий синтезлаш, нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш

ДНК кимёвий синтезлаш. ДНКни секвенирлаш усуллари. Генларни синтезлаш. Синтезланган олигонуклеотидларни қўллаш. Фосфорамидитли усул. ДНК ни кимёвий синтезлаш

5-мавзу: Оқсиллар терапияси

Оқсиллар терапияси. кДНК интерферонларини ажратиб олиш. Инсонлар интерферонлари. Инсонларнинг ўсиш гормони. Ген экспрессиясининг оптимизацияси. ДНКза I. Альгинат-лиаза. Инсоннинг кўп клонли антителалари

АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР МАЗМУНИ

1-амалий машғулот:

Хужайра органоидларини ажратиш

Ўсимлик хужайрасидан ядроси, хлоропласт ва митохондрия олишда фойдаланиладиган озика мухитлари таркиби. Уларни тайёрлаш, хужайралардан органоидларни ажратиш жараёнлари ўрганилади.

2-амалий машғулот:

Ўсимлик хужайрасидан нуклеин кислоталарни ажратиш усуллариини ўрганиш

Ўсимлик баргидан ДНК ва РНК ажратиш ва тозалаш. Ажратиб олинган плазмид ДНКсини ген мухандислиги мақсадларида фойдаланиш учун CsCl - градиентида тозалаш жараёнлари ўрганилади.

3-амалий машғулот:

Гель электрофорез ёрдамида оқсиллар спектрини ўрганиш

Чигитдан ажратилган оқсилларн электрофорез усули ёрдамида тозалигини, миқдорини текшириш

4-амалий машғулот:

Протопластар олиш ва уларни қўшилишини ўрганиш

Микроскопик замбуруғлардан ферментатив усулда протопластар олиш ва уларнинг қўшилишини ўрганиш.

Кўчма машғулотлар мавзулари

1. Плазмид ДНКсининг рестрикциион таҳлилини ўрганиш.

2. Ўсимликларнинг суспензияли культура олишни ўрганиш
Илмий текшириш институтларида олиб борилади

ЎҚИТИШ ШАКЛЛАРИ

Мазкур модул бўйича қуйидаги ўқитиш шаклларидан 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 МЕЗОНИ

№	Баҳолаш турлари	Максимал балл	Баллар
1	Кейс топшириқлари	2.5	1.2 балл
2	Мустақил иш топшириқлари		0.5 балл
3	Амалий топшириқлар		0.8 балл

II. МОДУЛНИ ЎҚИТИШДА ФОЙДАЛАНИЛАДИГАН ИНТЕРФАОЛ ТАЪЛИМ МЕТОДЛАРИ

“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 тартибда қўлланилган. Кейсда очиқ ахборотлардан ёки аниқ воқеа-ходисадан вазият сифатида таҳлил учун фойдаланиш мумкин. Кейс ҳаракатлари ўз ичига қуйидагиларни қамраб олади: Ким (Who), Қачон (When), Қаерда (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 йўлларини ишлаб чиқиш	<ul style="list-style-type: none"> ✓ индивидуал ва гуруҳда ишлаш; ✓ муқобил ечим йўлларини 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-лойиха тақдимотини тайёрлаш; ✓ якуний хулоса ва вазият ечимининг амалий аспектларини ёритиш

Кейс. ДНК ни рестрикцион эндонуклеазалар билан кесиш усули ишлаб чиқилди. Ўсимликдан ДНК ажратиб олинди ва рестриктазалар билан ишлов берилди. Лекин электрофорезда текширилганда ДНК умуман йўқ бўлиб кетганлиги аниқланди яъни хатолик келиб чиқди. Ишлаб чиқилган усул ишламади.

Кейсни бажариш босқичлари ва топшириқлар:

- Кейсдаги муаммони келтириб чиқарган асосий сабабларни белгилаш (индивидуал ва кичик гуруҳда).
- ДНКни рестрикция қилиш учун бажариладиган ишлар кетма-кетлигини белгилаш (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 этиш
С	• фикрингизни баёнига сабаб кўрсатиш
М	• кўрсатган сабабингизни исботлаб мисол келтириш
У	• фикрингизни умумлаштириш

- иштирокчиларнинг муносабатлари индивидуал ёки гуруҳий тартибда тақдимот қилинади.

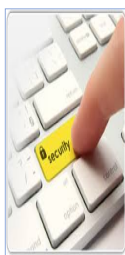
ФСМУ таҳлили қатнашчиларда касбий-назарий билимларни амалий машқлар ва мавжуд тажрибалар асосида тезроқ ва муваффақиятли ўзлаштирилишига асос бўлади.

“Ассесмент” методи

Методнинг мақсади: мазкур метод таълим олувчиларнинг билим даражасини баҳолаш, назорат қилиш, ўзлаштириш кўрсаткичи ва амалий кўникмаларини текширишга йўналтирилган. Мазкур техника орқали таълим олувчиларнинг билиш фаолияти турли йўналишлар (тест, амалий кўникмалар, муаммоли вазиятлар машқи, қиёсий таҳлил, симптомларни аниқлаш) бўйича ташҳис қилинади ва баҳоланади.

Методни амалга ошириш тартиби:

“Ассесмент” лардан маъруза машғулотларида талабаларнинг ёки катнашчиларнинг мавжуд билим даражасини ўрганишда, янги маълумотларни баён қилишда, семинар, амалий машғулотларда эса мавзу ёки маълумотларни ўзлаштириш даражасини баҳолаш, шунингдек, ўз-ўзини баҳолаш мақсадида индивидуал шаклда фойдаланиш тавсия этилади. Шунингдек, ўқитувчининг ижодий ёндашуви ҳамда ўқув мақсадларидан келиб чиқиб, ассесментга қўшимча топшириқларни киритиш мумкин.



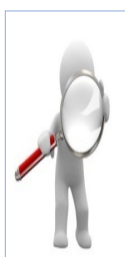
Тест

ДНК-полимераза қандай функцияни бажаради?
А). ДНКни гидролизловчи фермент.
Б). Полинуклеотидларни гидролизловчи фермент.
В). Турли хил ДНКни синтезловчи фермент.
Г). Матриса асосида алоҳида



Қиёсий таҳлил

- ДНК ва РНКнинг фарқини таҳлил қилинг ?



Тушунча таҳлили

- ДНК қисқармасини изоҳланг...



Амалий кўникма

- Ўсимлик хужайраларига генларни киритишга мисол келтиринг

Намуна. Ҳар бир катакдаги тўғри жавоб 5 балл ёки 1-5 балгача баҳоланиши мумкин.

“Инсерт” методи

Методнинг мақсади: Мазкур метод ўқувчиларда янги ахборотлар тизимини қабул қилиш ва билмларни ўзлаштирилишини енгиллаштириш мақсадида қўлланилади, шунингдек, бу метод ўқувчилар учун хотира машқи вазифасини ҳам ўтайди.

Методни амалга ошириш тартиби:

- ўқитувчи машғулотга қадар мавзунинг асосий тушунчалари мазмуни ёритилган инпут-матнни тарқатма ёки тақдимот кўринишида тайёрлайди;
- янги мавзу моҳиятини ёритувчи матн таълим олувчиларга тарқатилади ёки тақдимот кўринишида намоёниш этилади;
- таълим олувчилар индивидуал тарзда матн билан танишиб чиқиб, ўз шахсий қарашларини махсус белгилар орқали ифодалайдилар. Матн билан ишлашда талабалар ёки қатнашчиларга қуйидаги махсус белгилардан фойдаланиш тавсия этилади:

Белгилар	1-матн	2-матн	3-матн
“V” – таниш маълумот.			
“?” – мазкур маълумотни тушунмадим, изоҳ керак.			
“+” бу маълумот мен учун янгилик.			
“– ” бу фикр ёки мазкур маълумотга қаршиман?			

Белгиланган вақт якунлангач, таълим олувчилар учун нотаниш ва тушунарсиз бўлган маълумотлар ўқитувчи томонидан таҳлил қилиниб, изоҳланади, уларнинг моҳияти тўлиқ ёритилади. Саволларга жавоб берилади ва машғулот якунланади.

III. НАЗАРИЙ МАТЕРИАЛЛАР

1-мавзу: ДНК, РНК ва оқсил биосинтези

Режа.

- 1.1. .Нуклеин кислоталарнинг ҳужайрадаги аҳамияти
- 1.2.Нуклеин кислоталарнинг турлари

- 1.3 ДНК биосинтези
- 1.4.РНК биосинтези
- 1.5.Оқсил биосинтези

Таянч иборалар: биотехнология, модификация, РНК, ДНК, информация материал, транскрипция, трансляция, ДНК,РНК.

1.1. Нуклеин кислоталарнинг хужайрадаги аҳамияти

Биотехнологик жараёнлар микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон хужайралари, сунъий озика мухитларида ўстирилаётган хужайра, тўқима ва органларни биосинтетик потенциалидан амалий фойдаланишга асосланади. Ҳозирги вақтда дунёнинг кўплаб мамлакатларида биотехнологиянинг тараққиётига асосий эътибор қаратилмоқда, чунки бошқа технологияларга қараганда, биотехнологик жараёнлар энергия сарфининг камлиги, деярли чиқиндисизлиги, экологик софлиги жиҳатидан бир қатор афзалликларга эга. Бундан ташқари бу технологиялар муайян асбоб-ускуна, техник курилма ва препаратлардан фойдаланишни талаб қилади, шунингдек, иқлим шароитларига қарамасдан кичик ҳажмни эгаллайдиган майдонларда ҳам тадқиқотлар ўтказиш мумкинлиги билан ажралиб туради.¹

Молекуляр биотехнология замонавий биотехнологиянинг асосий йўналишларини белгилаб бердики, ундаги усуллар ўтган асрнинг 80-йилларида кенг ривожланиб фан ва ишлаб чиқаришнинг кўплаб соҳаларида кенг қўлланила бошланди.

Биотехнология фан сифатида замон ва моҳиятига кўра, замонавий ва анъанавий (классик) биотехнологияга бўлинади. Замонавий биотехнология (биомуҳандислик) молекуляр биотехнологияусуллари орқали генетик трансформация (модификация) қилинган ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлардан ишлаб чиқаришни интенсифлаштириш, турли хил мақсадларга мўлжалланган маҳсулотларнинг янги турларини олиш технологияларини яратиш ва улардан фойдаланиш тўғрисидаги фандир. Анъанавий биотехнологияни, оддий, нотрансген ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлардан (табиий ва селекцион йўли билан олинган) фойдаланиб табиий ва сунъий шароитларда қишлоқ хўжалик ва бошқа хил

¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology -Washington 2010. 3-45 p.

маҳсулотларни ишлаб чиқариш, сақлаш ва қайта ишлаш, уларни ташиш усуллари ва технологиялари ҳақидаги фан деб ҳам қараш мумкин.²

Янги, замонавий биотехнологиянинг йирик ютуғи генетик трансформация, ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмларнинг реципиент хужайраларига бегона (табиий ва сунъий яратилган) донор генларни киритиб, янги ёки кучайтирилган белги ва хусусиятларга эга трансген организмлар олишдир.

Мазкур йўналиш ўз мақсад ва имкониятларига кўра, келажақдаги стратегик йўналишлардан бири бўлиб ҳисобланади. Бу ташқи муҳитнинг ноқулай стресс омилларига чидамлилиги юқори маҳсулдор ва сифатли ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмларни яратиш, табиат ва ишлаб чиқаришнинг барча соҳаларидаги экологик вазиятни соғломлаштириш борасидаги мутлақо янги муаммоларни ҳал этиш имконини беради.

Бундай мақсадларга эришиш учун генетик трансформация самарадорлигини оширишда баъзи қийинчиликлар ва энг аввало, генларни идентификация қилиш ва клонлаш, уларнинг банкни яратиш, биологик объектларнинг белги ва хусусиятларини полиген детерминацияси механизмларини мукамал ўрганиш, ишончли вектор тизимларини яратиш ва генлар экспрессиясининг юқори даражада чидамлилигини таъминлаш кабиларни бартараф этиш лозим. Бугунги кунда дунёнинг кўплаб мамлакатлари лабораторияларида тижорат мақсадларида қўлланиладиган мутлақо янги хилдаги трансген ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар яратилган.

1.2.Нуклеин кислоталарнинг турлари

Ҳар бир тирик организмда нуклеин кислоталарнинг ҳар икки тури-рибонуклеин кислота (РНК) ва дезоксирибонуклеин кислота (ДНК) мавжуд. Фақат вируслар буларнинг бир турини, ДНК, ёки РНК ни тутади.Нуклеин кислоталар оқсиллар билан бирга ҳаётнинг моддий асосини ташкил қилади.Улар бир-бири билан ҳар томонлама узвий боғлиқ, аммо уларнинг хужайрадаги ўрни ва функцияси тубдан фарқ қилади:оқсиллар ассосан қурилиш ва хужайранинг ишчи органлари материали, нуклеин кислота эса информацион материал, у организмнинг тузилиши, ўсиши, ривожланишига тегишли ахборатнинг сақланиши,такрорланиши, алмашинуви ва наслдан-наслга ўтишини таъминлайди.³

Генетик жараёнларнинг молекуляр механизми. ДНК биосинтези-генлар репликацияси, яъни организм белгиларининг юзага чиқишидир. Гетерополимер бўлган информацион макромолекулалар генетик информацияни ўзининг бирламчи структураларида сақлайди ва

² Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology -Washington 2010. 3-45 p.

³ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology -Washington 2010. 4-15 p.

ташийди. ДНК молекуласида нуклеотидлар изчил жойлашган бу информация репликация ҳам транскрипцияда амалга ошади.⁴ Генетик информациянинг реализация қилиниши ДНК молекуласида нуклеотидлар тартиби шаклида ёзилган буйруқ (кўрсатма)ни оксил молекуласи синтезида аминокислоталар тартибга айлантиришдан иборат. Информация оқими қуйидаги йўналишда кечади: ДНК → РНК → оксил → ҳужайра → организм

1.3. ДНК биосинтези

ДНК биосинтези ярим консерватив синтез деб аталади, чунки ҳар бир бола ДНК да фақат битта она занжир сақланади. Олинган натижалар репликациянинг консерватив усулини тўла инкор қилади, чунки акс ҳолда, бир бола ДНК си иккала бошланғич занжирни тутиши, бошқаси эса иккита янги синтезланган занжирдан иборат бўлиши керак. Унинг исботи қуйидаги мисолдан осон кўрилади.

Аввало ҳалқали ДНК тутадиган бактерияларда (*E. coli*), сўнгра эукариот ҳужайраларда ҳам радиоактив тимидин билан ўтказилган тажрибалар репликация жараёнида ДНКнинг иккала занжири ҳам ыир вақтда синтезланишини тасдиқлади. Гап шу ердаки, агар *E. coli* ўсаётган муҳитга ³H-тимидин кўшилса у ҳужайрада dTTP га айланиб репликация давомида истеъмол қилинади. Бу тажрибаларни ўтказган Кейрнс ДНК репликациясининг моделини таклиф қилди. Бу моделнинг асосий хусусияти шундан иборатки, ДНК молекуласи репликация бошланишининг нуқтаси деб аталадиган специфик участкага эга. ДНК репликацияси учун фақат ДНК-полимераза ферментининг ўзи етарли эмас. Бугунги кунда ҳам репликация жараёнининг тўла ва аниқ тасвири йўқ, бу жараёнда маълум функцияни бажарадиган йигирмадан ортқ фермент ва оксиллар иштирок этса керак. Репликациянинг ўзи бирин-кетин кечадиган бир қанча босқичлардан иборат. Бу босқичларнинг ҳаммаси жуда катта тезликда, олий даражада аниқ ўтади.

Йигирмадан ортқ репликатив ферментлар ва факторлардан иборат тўла комплекс ДНК-репликаза системаси ёки қисқача реплисома деб аталади. *E. coli* ҳужайраларида маълум даражада бир-биридан фарқ қиладиган учта ДНК-полимераза мавжуд. Улар I, II, III полимеразалар деб белгиланади. I ва III полимеразалар бола занжирининг узайишини таъминлашидан ташқари, экзонуклеазалик активлигига ҳам эга, яъни ДНК молекуласининг ҳар икки учидан ҳам охириги нуклеотидларни ажрата олади. *E. coli*

⁴ Deniz Ekinci "Biotechnology" Croatia, 2015

хужайрасида ДНК занжири элонгациясига асосан III ДНК-полимераза жавоб беради. II ДНК –полимеразанинг функцияси ҳозирча аниқланган эмас. Рибонуклеозид трифосфатлардан 5→3 йўналишидаги боғланиш *примаза* деб аталади. РНК затравка калта бир занжирли РНК бўлиб, унинг 3-учига изчилик билан дезоксирибонуклеотид қолдиқлари бирикади. Энг кейинги вақтда ҳар иккала занжир ҳам калта фрагментлар шаклида синтезланиши исботланди.

1.4. РНК биосинтези

Бажарадиган функциясига қараб, РНК лар асосан уч синфга бўлинади: мессенжер (элчи)-информацион РНК (м-РНК), рибосомол РНК (р-РНК) ва транспорт (танишувчи) РНК (т-РНК). Улар ҳам иккиламчи ва учламчи структурага эга. Вируслар РНК си м-РНК га жуда ўхшаш бўлади. Ичак таёқчасида РНК сининг типлари қуйидаги нисбатда бўлади: м-РНК~2, т-РНК~16% ва р-РНК~82%.

РНК нинг ҳар уч типи ҳам оқсил синтезида иштирок этади, лекин уларнинг ҳар бирининг бу жараёнда махсус, такрорланмас функцияси бор. Эукариот хужайраларда РНК нинг бошқа типлари ҳам топилган, лекин уларнинг функцияси ҳали аниқланган эмас, шунинг учун уларнинг белгилари ҳам йўқ. Уларнинг баъзилари ядрога, бошқалари цитоплазмада учрайди.

1.5. Оқсил биосинтези

Транскрипция жараёни. Генлар транскрипцияси РНК хосил бўлишига олиб келади. РНК нинг ҳамма турлари ҳам ядрога синтезланади. ДНК матрицасида кечадиган ҳамма синтезлар ДНК да ёзилган ахборотга мувофиқ амалга ошади. РНК нинг барча турлари т-РНК, р-РНК ва м-РНК синтезланишида, ДНК асосларнинг тартиби РНК асослари тартибини белгилайди.

Полинуклеотид занжири фақат рибозонуклеотид трифосфатлардан синтезланади ва бу жараёнда аноргик пирофосфат молекулалари ажралиб чиқади. РНК синтези бир неча босқичда бажарилади: а) инициация (бошланғич), в) полимеризация ва з) ТЕРМИНАЦИЯ (тугаш). Реакциянинг бошланиши учун махсус оқсил – сигма фактор тугаши учун тугатувчи терминатор-кодон иштирок этади. Нусхаси олинандиган шу занжир бўйича полимераза 5 дан 3 га томон йўналиб 3→5 шаклда борадиган РНК занжирини ҳосил қилади. ДНК матрицасида янги синтез қилинган махсулот (РНК молекулалари) *транскрипт* деб аталади.

Бирон бир маълумотни шартли белгилар ёрдамида ифодалаш, одатда, кодлаш ёки код деб аталади. 1961 йилда Крик генетик кодни математик анализ қилди. Оқсил молекуласидаги ҳар бир аминокислотани

ифодаловчи код триплетли бўлиб, у Крик ифодасига кўра кодон деб номланган.

Оқсил молекуласига кирадиган аминокислоталар камида 20 хил бўлганидан кодонлар сони ҳам 20 дан кам бўлиши мумкин эмас. Демак 4 та нуклеотиднинг ўзи ёки иккита нуклеотиддан ҳосил бўладиган $16(4^2)$ комбинация ҳам етарли эмас. Турли тадқиқот ва мулоҳазалардан сўнг код уч нуклеотиддан ибоат триплет табиатга эга эканлиги аниқланди. Албатта бунда ҳосил бўладиган комбинациялар сони $64(4^3)$, кодирланадиган аминокислоталар сонидан анча кўп маълум бўлдики, 20 та аминокислотадан 18 таси биттадан ортиқ (2,3,4 ва 6) кодон билан кодирланар экан.

Оқсилларнинг биосинтези. Оқсиллар биосинтези биохимия тарихида энг муҳим муаммолардан бири бўлиб келган. Бугунги кунда биз бу муаммо ҳақида кўп маълумотларга эгамиз лекин ҳозирча тўпланган ахборот бу соҳада билиши керак бўлган нарсаларнинг озгина қисмини қоплаши мумкин: оқсил синтези биосинтез жараёнлари орасида энг мураккаби бўлса керак, унинг айрим босқичларида полипептид занжир инициацияси, узайиши, тамомланиши ва оқсилларнинг етишишида юзга яқин ферментлар, махсус оқсил факторлар, умуман 200 яқин макромолекулалар иштирок этади. Бу макромолекулаларнинг кўпи рибосомалар уч ўлчовли мураккаб структурасининг ташкилий қисмларидир.

Оқсил синтез м-РНК ни декодирлаш, яъни РНК молекуласида тўрт хил асосларнинг изчил келиши ёзилган ахборотнинг 20 хил аминокислоталарнинг оқсил молекуласида изчил келиш тилига ўтказилишидир. Шунинг учун ҳам бу жараён трансляция (таржима қилиш) дейилади.

Оқсил синтезининг босқичлари. Бу жараён асосан 5 босқичда ўтади. Аминокислоталарнинг АТФ ёрдамида активланиши ва тегишли транспорт РНК га кўчирилиши оқсил биосинтези учун энергетик асос яратади.

Бу икки жарён узлуксиз боғланган бўлиб битта энзим Е-специфик аминоксил-т-РНК –синтеза таъсирида кечади. Френсис Крик бу жараёнда т-РНК адапторлик ролини ўйнашини аниқлади.

Назорат саволлари::

1. Прокариот ва эукариот хужайраларининг тузилишидаги фарқи нимадан иборат?
2. Хужайра компонентларини ажратиб олиш қандай амалга оширилади
3. ДНКнинг специфик физик кимёвий хусусиятлари ҳақида маълумот беринг
4. Нуклеин кислоталарнинг тузилиши ва физик-кимёвий хоссалари
5. ДНКнинг спиралланиши нима учун керак ва нима беради?

6. Нуклеин кислоталарнинг бирламчи структураси қандай хосил бўлади?
7. ДНК ни тузилиши ҳақида маълумот беринг
8. ДНКни функцияси нималардан иборат?
9. Репликация нима?
10. Репликация механизми Транскрипция механизми.
11. Трансляция механизми.
12. ДНК ва РНКларнинг физики-кимёвий хусусиятларидаги фарқ
13. ДНК ва РНК ларнинг структуравий тузилиш даражалари

Фойдаланиладиган адабиётлар :

1. Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology -Washington 2010. 1020 p.
2. Deniz Ekinci “Biotechnology” Croatia, 2015
3. Artikova R.M., Murodova S.S. Qishloq xo‘jalik biotexnologiyasi.Darslik.T.: Fan va texnologiya. 2010.- 276 b.
4. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
5. Мусаев Х.Н., Ахмедова Н.Х. Кимёвий микробиология. Дарслик. –Т. Фан ва технология. 2012.-428 б

2-мавзу: Рекомбинант ДНКлар технологияси

Режа:

- 2.1.Рекомбинант ДНК олишнинг ахамияти
- 2.2.Рестрикцияловчи эндонуклеазалар
- 2.3.Плазмида векторлари
- 2.4.Плазмид вектор рВR322.
- 2.5.Трансформация ва танлаш

Таянч иборалар: *фрагмент, рестриктаза, сайт, комплементар, лигирлаш, ДНК-лигаза, вектор*

2.1.Рекомбинант ДНК олишнинг ахамияти

Рекомбинант ДНКлар технологияси (молекуляр клонлаш ҳам деб аталади) - тажриба муолажалари йиғиндиси бўлиб, бир организм генетик материални (ДНК) бошқа организмга ўтказиш усулидир. Рекомбинант ДНК олиш бўйича

универсал усуллар мавжуд эмас, лекин кўпинча қуйидаги схема асосида олинади (1расм).

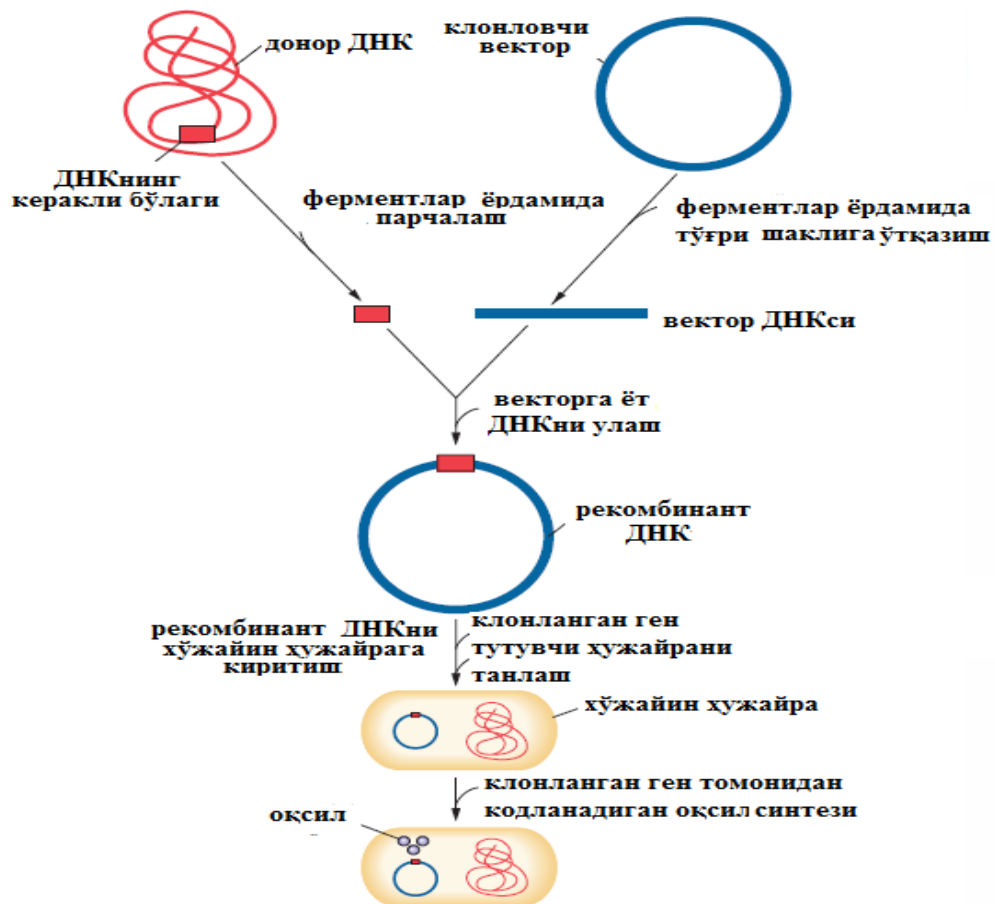
* Керакли генлар олинаниган донор организмдан натив ДНК экстракцияланади, ферментлар ёрдамида гидролизланади ва бошқа ДНК(вектор)га лигаза ферменти ёрдамида бириктирилиб рекомбинант ДНК ҳосил қилинади.¹

* Бу конструкция хўжайин хужайрага киритилади, у ерда репликацияланиб кейинги авлодларга берилади. Бу жараён траансформация дейилади.⁵

- Рекомбинант ДНК тутувчи хужайралар аниқланади ва танлаб олинади.
- Клонланган ген кодлаган специфик оқсил хўжайин хужайрадан ажратилади. Олинади ва бу оқсил ген клонланганлигини далили бўлиб хизмат қилади.

Рекомбинант ДНК яратиш учун асос бўлиб молекуляр биология, нуклеин кислоталар энзимологияси ва бактериал вируслар молекуляр генетикаси, шунингдек бактерияларнинг хромосомалардан ташқари элементлари хизмат қилди. Рекомбинант ДНКни яратиш бу мураккаб жараённинг барча босқичларининг асосий асбоби бўлган ферментлар ёрдамида амалга оширилади. Айниқса икки занжирли ДНК молекуласидан специфик нуклеотид изчилликларни таниб кесадиган рестрикция ферментлари (рестрикцияловчи эндонуклеазалар, рестриктазалар)нинг ўрни беқиёсдир.

⁵ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington 447-58p

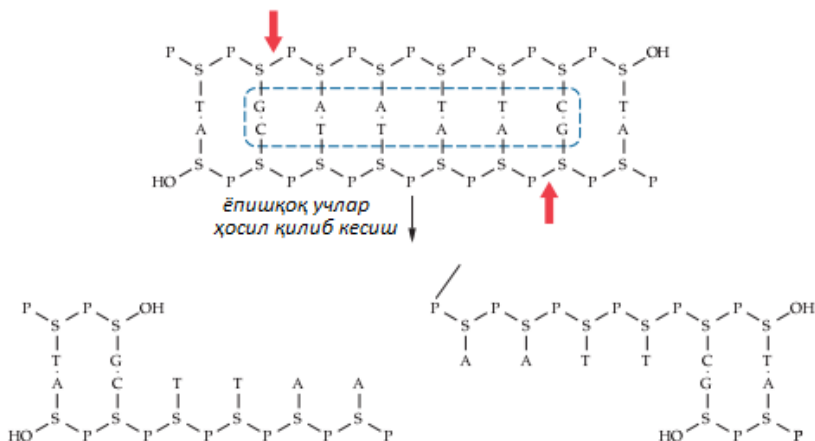


Расм 1. Донор организмдан керакли ДНК ажратиб олинади, ферментатив гидролиз орқали керакли ген ажратилади. Бактерий ёки бошқа хужайра с структураларидан вектор (плазмиду) олинади ва ва кесилади. Векторга ДНК фрагменти ўрнатилади. Олинган конструкция хўжайин хужайрага киритилади ва у ерда насл беради. Клонланган ген кодловчи оқсил аниқланади.

2.2. Рестрикцияловчи эндонуклеазалар

Молекуляр клонлашда донор ва вектор ДНКсини маълум жой (сайт)дан фрагментларнинг дискрет тўпламларини ҳосил қилиши зарур. Агар хромосома ДНКсини кичик диаметрли нинали шприцдан ўтказсак ёки ультратовуш билан ишлов берсак, ухолда биз 0,3 дан 5гача м.н.ж. узунликдаги фрагменлар олишимиз мумкин. Афсуски бу оддий операциялар натижасида иккинчи занжирли ДНК молекуласидаги узилишлар тасодифий ҳолда амалга ошади, чунки ҳар гал ишлов берилганда умуман янги фрагментлар тўплами ҳосил бўлади. Молекуляр клонлашни амалга ошириш бактерияларнинг юқори специфик ферментлари ажратилганидан сўнг амалга ошириш мумкин бўлди. Бу ферментлар икки занжирли ДНК молекуласидаги маълум изчилликлар асосини таниб ДНКнинг иккита занжирида ҳам узиш ҳосил қилади. Бу ферментлар II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалар дейилади.

Биринчи II типдаги рестрикцияловчи эндонуклеазалардан бири *Escherichia coli* бактериясидан ажратилган бу фермент *EcoRI* деб ном олган. Бу фермент ДНКнинг специфик палиндром изчиллик тутувчи олти нуклеотид жуфтдан иборат қисмидаги аденин ва гуанин қолдиқлари орасидан узиш ҳосил қилади яъни ДНК занжирида таниб кесадиган сайт марказидан бир хил масофада зина ҳосил қилиб, симметрик узиш пайдо қилади. Бу бир-бирига комплементар участкалар асосини жуфтлашиши ҳисобига ёки «ёпишқоқ» учлари орқали бирлашиш тенденциясига эга бўлади. (2- расм).



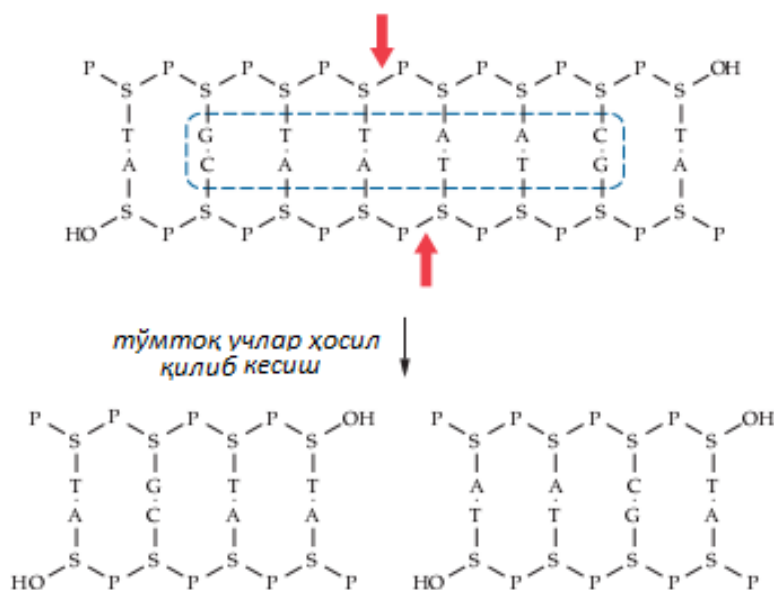
Расм. 2. ДНКнинг қисқа фрагментини II типдаги *EcoRI* рестрикцияловчи эндонуклеаза ёрдамида ёпишқоқ учлар ҳосил қилиб кесил. Стрелкалар ДНК занжирининг кесилиш жойларини кўрсатган.

EcoRI дан ташқари бактериялардан юзлаб II–тип рестрикцияловчи эндонуклеазалар олинган. Рестриктазаларни номлашда фермент ажратиб олинган бактерия турининг латинча номини бош ҳарфлари ва қўшимча белгиларидан фойдаланилади. Чунки бир турдаги бактериялардан бир неча хил рестриктазалар ажратиб олинган бўлиши мумкин. *Escherichia coli-EcoR I*, *EcoR V*, *Haemophilus influenzae –Hinf I*, *Streptomyces albus – Sal I*, *Thermus aquaticus – Taq I*.⁶

II–тип рестрикцияловчи эндонуклеазалар томонидан танилиб ДНК молекуласи парчаланадиган жой узиш сайти деб аталади. Ёпишқоқ учлар ҳосил қилувчи рестриктазалардан ташқари тўмтоқ учлар ҳосил қилувчи рестриктазалар ҳам мавжуд. Уларнинг узиш сайти 4-бта нуклеотиддан иборат бўлиши мумкин. (1-жадвал) Рестрикция сайти

⁶ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington 45 p

ичида тўғри узиш (қайчи сингари шартта икки бўлакка бўлади) ҳосил қилувчи рестриктазалар таъсирида «тўмтоқ» учли ДНК фрагментлари пайдо бўлади, уларни ҳам ДНК-лигаза ферменти ёрдамида бириктириш мумкин. Бундай ҳолларда лигирлаш реакцияси ўзига хос бўлиб, унинг самара даражаси «ёпишқоқ» учларни бириктиришга нисбатан бир оз пастроқ. Аммо «тўмтоқ» учли фрагментлар бириктиришининг «ёпишқоқ» учли фрагментларни бириктиришга нисбатан афзаллиги шундаки, «тўмтоқ» учли бу фрагментлар қайси рестриктаза таъсирида пайдо бўлишидан қатъий назар, турли рестриктазалар томонидан ҳосил бўлган фрагментлар осон бирикади. (3-расм)



Расм.3 ДНКнинг қисқа фрагментини II типдаги HindIII рестрикцияловчи эндонуклеаза ёрдамида тўмтоқ учлар ҳосил қилиб кесиш. HindIII таниб кесадиған изчиллик итрихли чизиқ ёрдамида ажратилған.

II–тип рестрикцияловчи эндонуклеазаларгенларни клонлашдаги асосий ферментлардан ҳисобланади.

ДНК намунасига маълум рестриктаза билан ишлов берилганда узиш сайтларидан кесилиб ,фрагментларнинг бир хил тўплами ҳосил бўлади. Агар бир неча рестрикция ферментлардан фойдаланилса олдин ҳар битта рестриктаза билан ишлов берилади, сўнгра уларнинг комбинацияси билан таъсир этирилиб мазкур ДНКнинг физик картасини тузиш мумкин яъни молекула бўйлаб рестрикция сайтларини аниқлаш мумкин. Ҳосил бўлган фрагментлар ўлчамини гел электрофорез ёрдамида аниқланиб рестрикция сайтларини топиш мумкин.

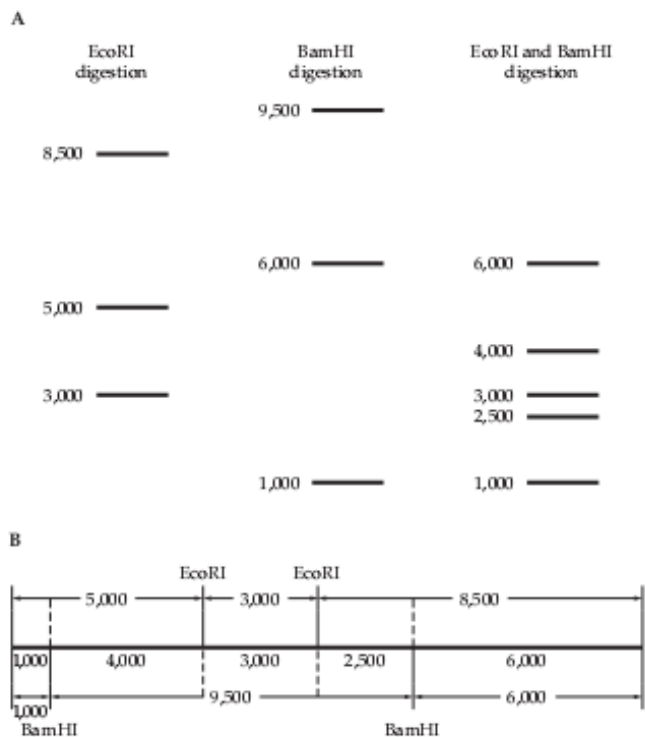
1-жадвал

Баъзи рестриктазаларнинг нуклеотидлар кетма-кетликдаги таниб узадиган изчилликлари

фермент	Узиш сайтлари	ҳосил бўладиган учлари характери
EcoRI	G↓A-A-T-T-C C-T-T-A-A↑G	5'-фосфат гурӯхи учлари
BamHI	G↓G-A-T-C-C C-C-T-A-G↑G	5'-фосфат гурӯхи учлари
PstI	C-T-G-C-A↓G G↑A-C-G-T-C	3'-гидроксил гурӯхи учлари
Sau3AI	↓G-A-T-C C-T-A-G↑	5'-фосфат гурӯхи учлари
PvuII	C-A-G↓C-T-G G-T-C↑G-A-C	тўмтоқ учлар
HpaI	G-T-T↓A-A-C C-A-A↑T-T-G	тўмтоқ учлар
HaeIII	G-G↓C-C C-C↑G-G	тўмтоқ учлар
NotI	G↓C-G-G-C-C-G-C C-G-C-C-G-G-C↑G	5'-фосфат гурӯхи учлари

Рестрикция харитасини тузиш учун алоҳида рестрикциялаш ва аралаш рестрикциялаш натижасида ҳосил бўлган фрагментлар ўлчпмини таққослаш зарур бўлади. Бундай таққослаш натижаси 4Б расмда берилган. Агар ДНК ҳар иккала рестриктазалар (*EcoRI* и *BamHI*) билан гидролиз қилинганда учта фрагмент ҳосил бўлса , демак ДНКнинг бошланғич ДНК фрагментида ҳар бир ишлатилган фермент учн иккитадан сайт мавжуд экан. *EcoRI* гидролизи натижасида ҳосил бўладиган 300 н.ж. ўлчамдаги фрагмент *EcoRI* и *BamH* иккита аралашмаси таъсирида гидролизланманса демак, иккита *EcoRI*-сайбир биридан 300 нуклеотид жуфт ораликда бўлиб, улар орасида *BamHI*-сай мавжуд эмас экан, 850 ва 500 н.ж.узуликдаги *EcoRI*-фрагментларда биттадан *BamHI*-сайтлар мавжудэкан. *BamHI* рестриктазаси натижасида ҳосил бўлган 950 н.ж узунликдаги фрагмент *EcoRI* билан икки каррали ишлов берилганда учта фрагментга (250+300+400 - 950 п.н.) парчаланеди. Демак, иккита *BamHI*-сайтлар *EcoRI* сайтдан қарама қарши томонга 250 ва 400 н.ж масофада жойлашган. *BamHI*- ферменти 850 н.ж. узунликдаги *EcoRI*-фрагментни 250 ва 600 н.ж.узуликдаги фрагментларга

кесади, *EcoRI* учун сайтлардан бири эса *BamHI* сайтидан 250 н.ж масофада жойлашаган, демак 600н.ж ДНК бошланғич молекуласининг қайсидир охирини тутиши керак. Сўнгра, *BamHI* 500н.ж фрагмент *EcoRI*-фрагментни иккита 100 ва 400 н.ж фрагментларга парчалайди, *BamHI*, сайтларидан бири *EcoRI* сайтдан 400 н.ж.билан ажралган, демак 100 н.ж фрагмент бошланғич ДНК молекуласининг иккинчи учини намоён қилади.



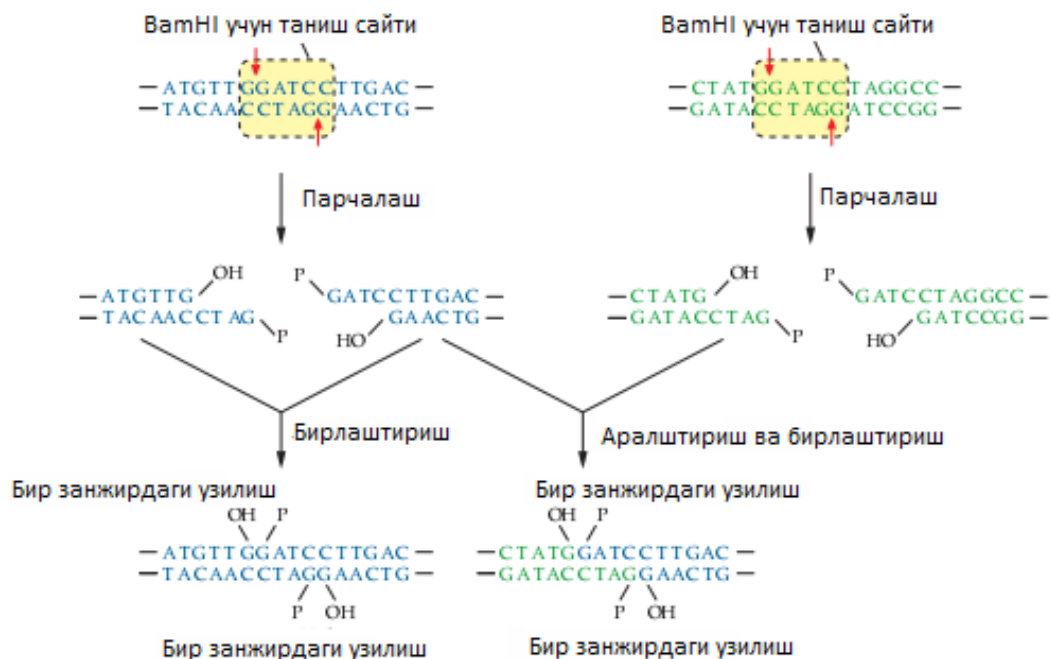
4-расм. Рестрикция сайтларини хариталаш.

А. Кўрсатилган ферментлар ёрдамида ҳосил бўлган ДНК фрагментларни гель-электрофорез натижалари. Тозаланган ДНК EcoRI ва BamHI ферментлари ёрдамида алоҳида-алоҳида , сўнгра уларнинг аралашмаси ёрдамида гидролизланади, гель-электрофорез ўтказилиб, этидий бромид ёрдамида бўялган махсулот ўрганилади. Горизонтал полоскаларнинг чап томонида фрагментлар узунлиги жуфт асосларда берилган.

Б. электрофорез натижалари бўйича тузилган рестрикцион ҳарита. Мос ферментларнинг таниш сайтлари орасидаги сонлар.

4Б расмдаги харитадан ҳар бир гидролизда ҳосил бўладиган рестрикция сайтлари жойлашиши ва фрагментлари ўлчамлари орасидаги мосликни яққол кўриш мумкин.

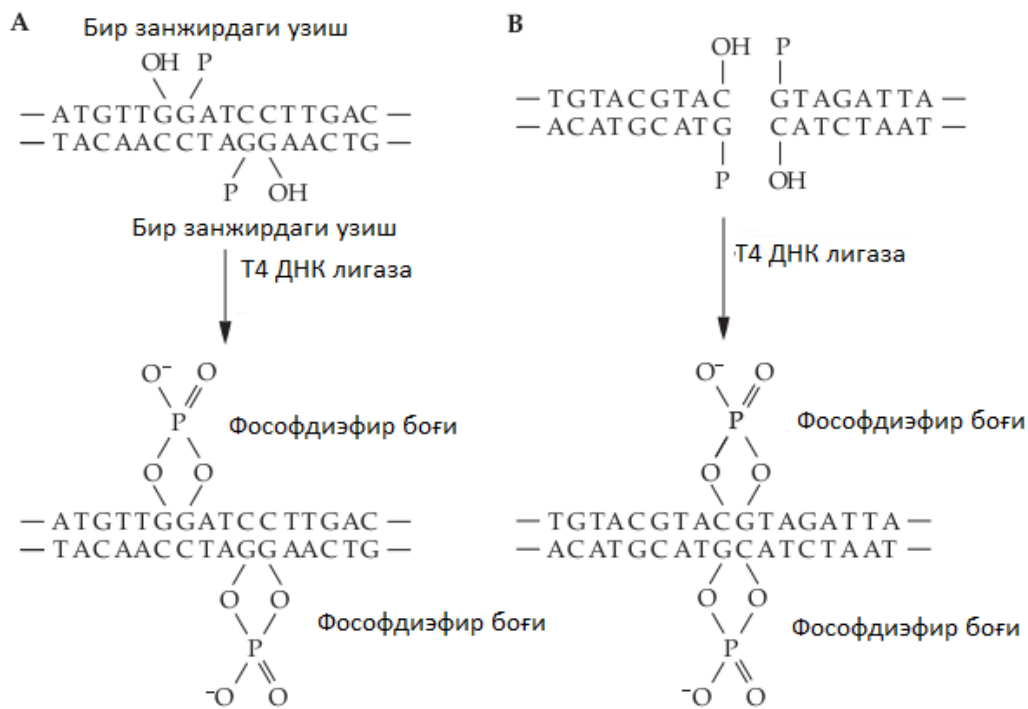
Рестрикцияловчи эндонуклеазаларни қўллашнинг яна бир қўлланилиш соҳаси мавжуд. ДНКнинг иккита ҳар ҳил намунаси ёпишқоқ учлар ҳосил қилувчи бир ҳил рестриктаза билан ишлов бериб аралаштирилганда комплементар жуфтлашишга биноан ёпишқоқ учлар жуфтлашиб, генларнинг янги комбинациясини- рекомбинант гДНКларни ҳосил қилади. (5расм).



5-расм, ДНКнинг турли намуналарини BamHI, рестрикцияловчи эндонуклеазалар ёрдамида парчаланганда ҳосил бўлган ёпишқоқ учларни бирлаштириш. Расмда кўрсатилган тўртта фрагмент бир-бирлари билан бирлашиб олтига турли ДНК молекуласини ҳосил қилиши мумкин. Ёпишқоқ учларнинг тўртта асослари ҳосил водород боғлари орқали фрагментлар бири-бирига боғланади, бу боғлар етарли даражада мустахкам бўлганлиги учун молекулалар эритмада узоқ вақт тургун ҳолатда қолади.

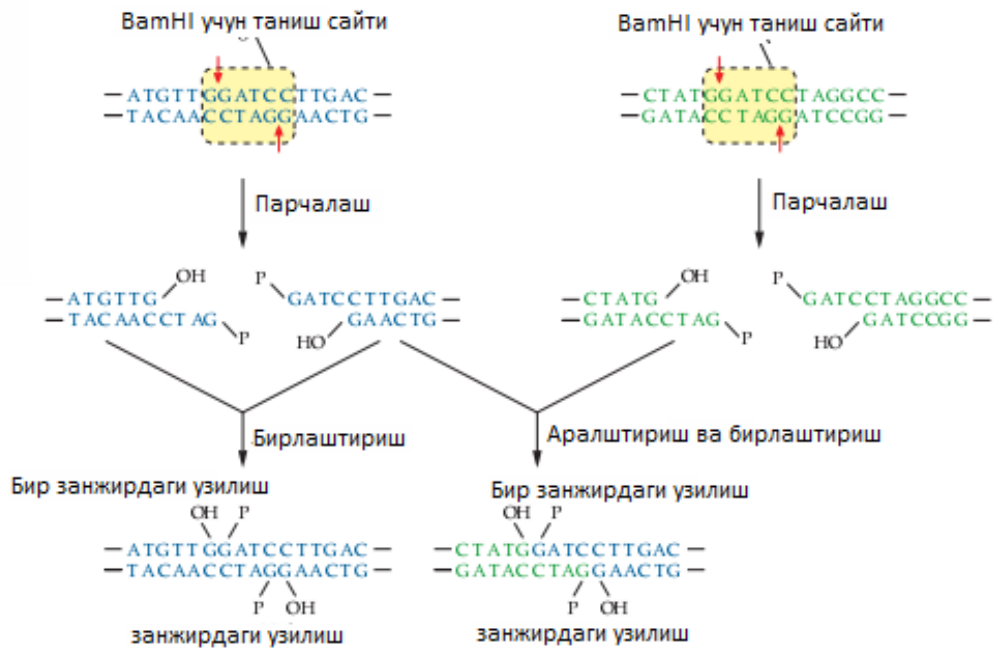
Молекуляр клонлаш учун рестрикция ферментларининг ўзи кифоя қилмайди. Биринчидан, иккита бирлашган фрагментларни ушлаб туриш учун ёпишқоқ учларнинг водород боғлари ёрдамида бирикиши унчалик етарли эмас, бу ерда яна лигаза ферменти ҳам зарур бўлади. ДНК лигаза кўшни нуклеотидлар орасидаги фосфодиэфир боғларини тиклаш орқали ДНК бўлақларини боғлаш каби битта асосий вазифани бажаради. Бу жараён лигирлаш деб аталади. Ген муҳандислигида кўпинча лигирлаш учун T4 фагининг ДНК-лигазасидан фойдаланилади. T4 лигаза ёрдамида ДНК нинг ҳар қандай бўлаги “ёпишқоқ учли” ёки “тўмтоқ учли” қисмлари бириктирилади. Бу энг кўп қўлланиладиган ферментлардан биридир.⁷

⁷ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington 47-68 p



6-расм. T4 ДНК-лигаза икки занжирли ДНКнинг узилган жойида 5'-фосфат ва 3'-гидроксил гурухлар орасида фосфодиэфир боғлар ҳосил қилади. T4. A. Ёпишқоқ учларни бириктириш, B. Тўмтоқ учларни бириктириш.

Иккинчидан, агар, улар хўжайин хужайрада репликацияланмаса турли молекулаларни бирлаштириш бефойда. Шундай қилиб, агар рекомбинант ДНКнинг бир қиси ўзида клонланиши зарур бўлган генни тутса, иккинчи қисми эса репликацияланиши учун зарур бўлган қисмини тутиши зарур. Бу муаммони ҳал қилиш учун клонловчи векторлардан фойдаланилади. Учинчидан, рестрикция натижасида ДНК турли туман фрагментлар аралашмасини ҳосил қилади, уларни вектор билан бирлаштирилгандан сўнгкўплаб турли комбинациялар ҳосил бўлади. Энди керакли изчиллик тутувчи реципиент хужайрани топиш зарур бўлади. Бунинг учун турли скрининг системалардан фойдаланилади.



7-расм. BamHI, рестрикцияловчи эндонуклеазаси таъсирида турли намуналарда ҳосил бўладиган ёпишқоқ учларни бириктириши.

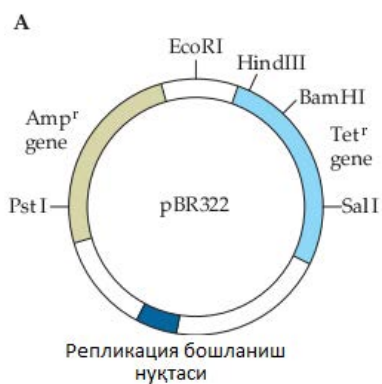
2.3.Плазмида векторлари

Плазмидлар автоном ҳолда репликацияланувчи хромосомадан ташқари икки занжирли халқасимон ДНК. Плазмидлар деярли барча бактерияларда мавжуд. Баъзи бирлари ўзининг бир ҳужайрадан бошқасига кўчиришини таъминлаш ахборотини (F-плазмидлар) тутади, бошқалари антибиотикларга чидамлилиқ генини (R-плазмидлар) тутади ёки ноананавий метоболитлар утилизациясига жавобгар специфик генлар тўпламини тутади. Плазмидлар ўлчами 1дан 500 м.н.ж. бўлиши мумкин. Уларнинг ҳар бири репликация сайтини (*ori*) тутади, уларсиз ҳужайрада плазмидларнинг репликацияси амалга ошмайди.

Баъзи плазмидлар ҳужайрада 10-100 нусхада бўлиши мумкин.. улар юқоринусхали дейилади. Баъзилари камнусхали бўлиб ҳужайрада 1-4 нусхада бўлиши мумкин. Умумий ҳужайра ДНКсининг 0,1-5,0%ни плазмидлар ташкил этиши мумкин. Турли гуруҳларга тегишли плазмидлар нусхасидан қатъий назар битта ҳужайрада мавжуд бўлиши мумкин. Баъзи микроорганизмларда битта ҳужайрада 8-10 турли плазмидлар аниқланган, уларнинг ҳар бири ўзининг функциясини бажаради.

Клонланган ДНКни кўчириш учун автоном ҳолда репликацияланувчи плазмидлар вектор сифатида фойдаланиш учун барча зарурий хусусиятларга эга. Аммо кўпинча табиий плазмидларда “юқори сифатли” векторга ҳос баъзи хусусиятлар мавжуд бўлмайди. Бундай муҳим хусусиятларга

куйидагилар киради: 1) унчалик катта бўлмаган ўлчам, *E. coli* экзоген ДНКни кўчириш самараси плазмидлар узунлиги 15 м.н.ж.дан кўп бўлганда пасаяди. 2) керакли ген ўрнатиладиган ягона рестрикция сайтнинг бўлиши; 3) Рекомбинант ДНК тутувчи реципиент хужайраларни аниқлаш учун битта ёки бир нечта селектив генетик маркерларнинг бўлиши. Шунинг учун плазмид векторларини ген инженерлиги ёрдамида яратиш зарур бўлади.



B



7-расм. А. pBR322 плазмидининг генетик харитаси. Тетрациклинга (Tet^r) ва ампициллинга (Amp^r) чидамлилик ҳосил қилувчи ген *HindIII*, *SalI*, *BamHI* и *PstI* учун ягона сайтлар тутади. *EcoRI*-сайт бу генлардан ташқарида жойлашган. Векторнинг узунлиги — 4361 ж. н. Б. pBR322 плазмидининг электрон микроскопдаги кўриниши.

2.4. Плазмид вектор pBR322

Ўтган асрнинг 80 йилларида плазмид вектор pBR322 энг машхур универсал векторлардан бири эди. Одатда плазмид вектор p (ингл., plasmid) харфи билан белгиланади ва векторни таърифлашга, уни яратиш тарихига оид тегишли бўлган бир нечта харфлар билан белгилади. pBR322 плазмидини белгилашда BR харфлари бу плазмидани конструкциясини яратган муаллифлар Ф. Боливар ва Р. Родригес шарафига, 322 сони эса уларнинг тадқиқот баённомалари рақамига қўйилган. pBR322 плазмиди

узунлиги — 4361 ж. н. У иккита антибиотикга чидамли ген тутади (7-расм), ампициллинга (Amp^r) ва тетрациклинга (Tet^r), шунингдек Tet^r а генида *BamHI*, *HindIII* ва *SalI* учун ягона сайтлар^r, Amp^r гени учун битта *PstI*-сайт, кодловчи изчилликлардан ташқарида блган *EcoRI* учун битта сайт тутади, ва

фақат *E. coli*да репликацияланишини амалга ошириши учун репликация бошланиш сигналини тутати. Плазмидлар кўп сонли нусха ҳосил қилиб репликацияланади.

Клонловчи вектор pBR322 қандай ишлайди. Агар тозаланган халқасимон pBR322 плазмидига ёки бу антибиотикга чидамлик генида жойлашган сайтга фақат бир жойидан кесувчи рестриктаза билан ишлов берилса ёпишқоқ учли тўхри чизик шаклидаги ДНК молекуласи ҳосил бўлади. Бундай молекулалар юқоридаги каби рестриктаза билан ишлов берилган, зарур ген тутвчи донор ДНК билан аралаштирилади. Бу иккала ДНКнинг ёпишқоқ учлари ўзаро бир-бирига комплементар бўлганлиги учун улар бирлашиб дурагай молекулалар ҳосил қилади.

Сўнгра аралашм Т4 фагнинг ДНК-лигаза ферменти билан ишлов берилади, натижада турли комбинациядаги фрагментлар ҳосил бўлади, базан донор ДНК, ёки керакли ген фрагментлари ўзаро бирлашади. Бу ҳолат юзага келмаслиги учун рестрикцияланган плазмид ДНКси тўғри чизик шаклидаги молекуланинг 5'-фосфат гуруҳини йўқотиш учун ишқорий фосфатаза билан ишлов берилади. Бунда ДНК лигаза фосфат гуруҳи бўлмаган учларни ДНК лигаза бирлаштира олмайди. Что касается собственно рекомби-нантных молекул ДНК, то хотя в них и имеются два одноцепочечных разрыва, ее фрагменты удерживаются вместе двумя фосфодиэфирными связями, образовавшимися с помощью ДНК-лигазы между дефосфорилированной плазмидной ДНК и рестрицированной донорной ДНК. Репликациядан сўнг трансформацияланган хужайрада бир занжирдаги узилиш хўжайин хужайра лигирлаш тизими орқали баргараф этилади.

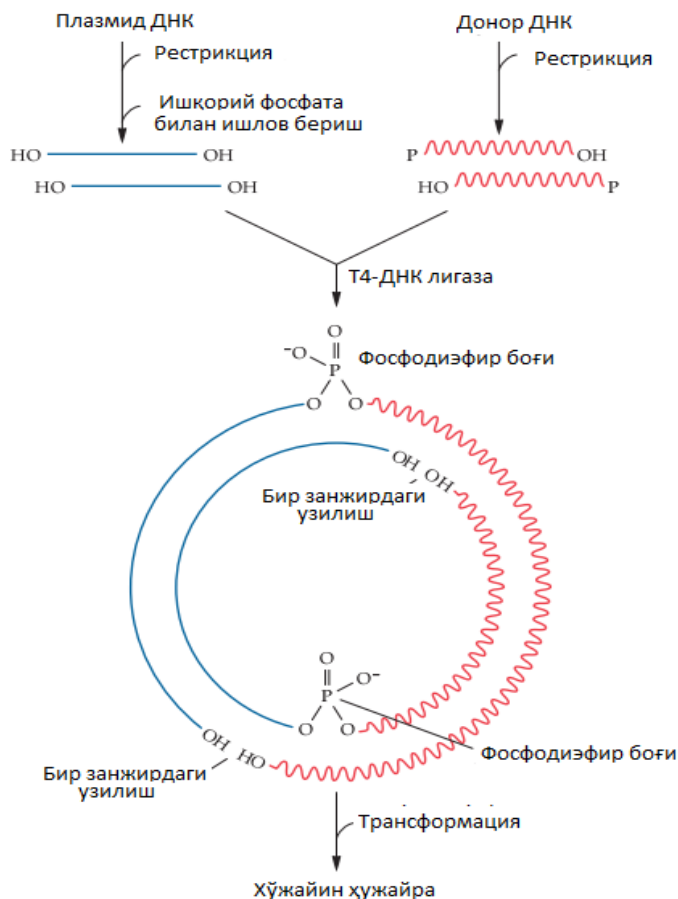
2.5. Трансформация ва танлаш

Энди рекомбинант ДНКни хўжайин хужайрага киритиш зарур. Бу жараён трансформация деб аталади. Бунинг амалга ошириш учун маҳсус ишлаб чиқилган усуллар, масалан хужайраларга юқори ҳарорат таъсир этирилади ва кальций хлор ($CaCl_2$) билан ишлов берилади. Аммо трансформация самараси пастлигича қолмоқда, одатда мингта хужайрадан биттадан ортиқ хужайра трансформацияланмайди. Шундай қилиб, кўпчилик хужайралар трансформациядан сўнг рекомбинант ДНК тутмайди. Улардан баъзилар ишқорий фосфатаза таъсирига берилмаган ўзаро бирлашган халқасимон плазмид ДНКсини, баъзиларида плазмидабўлмаган ДНК ва баъзи бирларигина ёт ДНК фрагменти киритилган плазмид тутати.

Олдин айтиб ўтганимиздек, репликация бошланиш нуқтаси бўлмаган хромосомадан ташқари ДНК бактерия хужайрасида репликациялана олмайди. Шундай қилиб, Экзоген ДНКнинг хужайрага киргани бу хўжайин хужайра томонидан қўллаб-қувватланади дегани эмас.

Рекомбинант ДНКнинг сақланиши учун хўжайин хужайрада рестриктазаларни ситезига жавобгар генлар бўлмаслиги керак,, акс ҳолда уни деградациялайди, бунинг учун хужайра RecA^- (бундай хужайралар умумий рекомбинацияга қодир бўлмайди, демак, экзоген ДНК гомологик рекомбинация натижасида модификацияланмайди).

Сўнгра рекомбинант ДНК тутвчи хужайралар аниқланади. Идентификациялаш усули иложи борича содда оддий бўлиши зарур, чунки кўп сонли хужайраларни текшириш зарур бўлади. *VamHI* сайтига ёт ген ўрнатиладиган pBR322 тизимида идентификациялаш икки босқичда олиб борилади.



8-расм. Ёт ДНК бўлагини плазмидага ўрнатиш. Рестриктаза ва ишқорий фосфата билан ишлов берилган плазмид ДНКси рестрикцияланган донор ДНКси билан аралаштирилади ва ДНК лигаза қўшилади.

Олдин хужайралар трансформациядан сўнг ампицилин тутувчи озика мухитига экилади. Бундай шароитда фақатгина интакт Amp^r ген тутувчи ёки интакт плазмидалар таркибида, ёки гибрид плазмидлар таркибидаги хужайраларгина ўсиши мумкин. *VamHI* сайти нетрансформированные клетки чувствительны к ампициллину. Сайт *VamHI* pBR322 плазмидида Tet^r генида жойлашган (7-расм ; бу генга ўрнатилган ДНК фрагменти кодловчи изчилликни узади ва тетрациклинга чидамлик хксксияти йўқолади. Шундай қилиб, гибрид плазмидани тутвчи хужайра ампицилинга чидамли,

аммо тетрациклинга сезгир бўлади. Интакт рBR322 плазмидалар кирган хужайралар эса Tet^r генини тутади ва ҳам ампицилинга, ҳам тетрациклинга чидамли бўлади.

Иккинчи босқичда бу иккала вариантни ажратиш амалга оширилади. Ампицилин тутувчи озиқа мухитида ўсган хужайралар қайта мухрлаш усули орқали тетрациклин тутувчи озиқа мухитига ўтказилади. Тетрациклин тутувчи ликобчаларда ҳосил бўлган колониялар рBR322 плазмидасини тутади, юқорида айтиб ўтганимиздек улар ҳам ампициллинга ҳам тетрациклинга чидамлидир. Тетрациклин тутувчи Петри ликобчасида ўсмаган хужайралар бу антибиотикга сезгир, демак улар гибрид рBR322плазмидасини тутади. Ампициллинли озиқа мухитида ўсган колониялар орасидан тетрациклинга сезгир бўлганлари ажратилади ва ҳар бир колониядан индивидуал хужайра клонлари олинади ёки барча ампицилинга чидамли ва тетрациклинга сезгир колониялар бирлаштирилиб биргаликда ўстирилади. Сўнгра қўшимча скрининг ўтказиб, ампицилинга чидамли ва тетрациклинга сезгир махсус қўшимча ген киритилган гибрид рBR322 плазмид тутувчи хужайраларни идентификация (танлаш) қилиш мумкин.

Назорат саволлари:

1. Ген-кўчиришнинг учта манбаи Бегона генларни хужайрага трансформациялашнинг ген мухандислигидаги аҳмияти
2. Вектор конструкцияни хужайрага киритиш қандай амалга оширилади?
3. Бинар векторларининг коинтегротив векторларга нисбатан афзаллиги нимада?
4. Генлар изчиллигини идентификация қилиш ва ажратиш ҳақида маълумот беринг
5. ДНК бўлақларини қирқиш ва рестрикцион хариталарни тузиш қандай амалга оширилади?
6. Вектор молекуласи учун қўйилган талаблар
7. Геном ДНКси фрагментларини олиш усуллари
8. Геномни алоҳида қисмларга ажратиш ҳақида тушунча беринг ДНК бўлақларини қирқиш ва рестрикцион хариталарни тузиш (физикавий хариталаш) қандай амалга оширилади?
9. Геном клонларини кўпайтириш қандай амалга оширилади?
10. Микроблар трансформацияси ҳақида маълумот беринг

Фойдаланиладиган адабиётлар :

1. Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology/ Washington 2010. 1020 p

2. Artikova R.M., Murodova S.S. Qishloq xo‘jalik biotexnologiyasi. Darslik. T.: Fan va texnologiya. 2010.- 276 b.
3. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
4. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.: Tafakkur bo‘stoni. 2013.-223b
5. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик -Т.: Таълим, 2009. -528 б.

3-мавзу: Микробиологик тизимларнинг молекуляр биотехнологияси

Режа:

- 3.1. Молекуляр диагностика
- 3.2. Иммунодиагностика усуллари.
- 3.3. Фермент иммуносорбент анализи.
- 3.4. Моноклонал антителалар

Таянч иборалар: *трансген, дурагай, рекомбинант, трансмиссив, генетик модификация, синтез.*

Микробиологик тизимларнинг молекуляр биотехнологияси.

Рекомбинант ДНК ларнинг технологияси ривожланиши билан кўплаб микроорганизмларнинг фойдали хусусиятларидан унумли фойдаланиш имкониятлари туғилди. Замонавий генетик услублар ёрдамида биологлар бактерияларни оқсил препаратларини ишлаб чиқарувчи ”биологик фабрика”ларга айлантиришни ўрганишди, жумладан рестрикцияловчи эндонуклеазалар турли кимёвий бирикмалар аминокислота антибиотик ва бошқалар. Ўзига хос хусусиятга эга бўлган генларнинг бактериал хужайраларини (тўқималарни) клон қилиш натижасида турли ғаройиб метобалитлар олиш биосинтезининг янги усуллари кашф этилди.

Клон қилинган касаллик кўзгатувчи микроорганизм генларидан инсон ва уй жониворларининг касалликларини диагностика қилувчи зондлар сифатида қўлланилади, изолатция қилинган генлардан эса хавфсиз ва фойда берувчи вакциналар тайёрланади.

Ген муҳандислиги услублари ёрдамида аниқ турдаги бактериаларнинг табиий қобиятларини кучайтириш мумкин. Бу табиий қобиятлар баъзи

биологик жараёнларни амалга оширишда ёрдам беради. Масалан, атроф муҳитни ифлослантирувчи захарли чиқиндиларни унумли йўқ қилувчи кишлоқ хўжалик ўсимликларини ўстирувчи, целлюлозани паст молекуляр углерод брикмалари даражасигача эритувчи, зарар етказувчи хашоратларга қарши курашувчи бактериаларнинг штамлари олинди.

Кўпинча катта ҳажмдаги микроорганизмларни етиштириш зерикарли жараён деб ҳисобланилади. Бироқ рекомбинант оқсилларни саноат ҳажмида муваффақиятли амалга ошириш учун кўпгина параметр (ўлчам)ларни назоратга олиш зарур. Бу ўлчамларни синтез қилувчи микроорганизмлар ва олинадиган маҳсулотнинг софлигига тасир кўрсатади.

Молекуляр диагностика

Замонавий тиббиёт ва кишлоқ ¹хўжалигининг муваффақияти ўзига ҳос хусусиятларига эга бўлган вирус, бактерия, замбурут, паразит микроорганизм, инсон ва жониворлар организми ўсимлик, сув ёки тупроқда учрайдиган оқсил ва паст молекуляр бирикмаларни излаб топиш билан боғлиқдир. Масалан, агар барча юқумли кассалликларни қўзгатувчи потоген микроорганизмларни вақтида ва аниқ идентификация қилинса, у ҳолда бу касалликларини олдини олиш ва даволаш анча енгил кечади. Кўпгина диагностик муолажаларни олиб бориш учун аввалом бор потенциал патоген микроорганизмларнинг турини ўстириш ва шундан сўнг унинг физиологик хусусиятлари спектрини таҳлил қилиш зарур. Бундай тестлар анча унумли ва юқори хусусиятга эга бўлишига қарамай улар кўп вақт ва маблағ сарф қилинишини талаб этади. Бу бактериялар паразитик микроорганизмларни идентификация қилишга ҳам таалуқли. Паразитик микроорганизмлар томонидан келиб чиққан юқумли касалликлар диагностикасини таққослаш усулларида бири:

Бундан ташқари ўсимликларда мавжуд бўлган ёки умуман бўлмаган потоген микроорганизмларни аниқлаш имконияти чегараланганлиги. Наъмуна сифатида шимолий америка ва европада кенг тарқалган ва жинсий алоқа орқали юқадиган хламидиоз касаллигини чақирувчи облигат хужайра ичидаги паразитларни келтириш мумкин.

Бунда қалбаки салбий натижаларни олинади, яни микроорганизмларнинг йўқлиги ҳақидаги диагностикада ҳатоликга **йўл** кўйилади натижада керакли даво қилинмайди. Агар микроорганизмларнинг мавжудлигини аниқлаш учун уни бир турда ўстириш лозим бўлса уҳолда барча аниқ бўлган потоген микроорганизмлари идентификация қилиш жараёни анча вақтни эгаллайди. Шу сабабли бу чегараларни бартараф этиш

учун молекуляр диагностика усуллари ишлаб чиқилган. Бу усулларга асос бўлиб иммунологик ёки ўзига хос хусусиятларга эга бўлган ДНКни топиш усуллари хизмат қилади.

Иммунодиагностика усуллари

Кўпгина иммунологик детекция тизимлари содда бўлишига қарамай, ўта юқори сезгирликга ва ўзига хос хусусиятга эга. Улар дори препаратларини тестдан ўтказишда, турли анкологик касалликларга боҳо беришда ва уни назорат (мониторинг) қилишда ўзига хос бўлган хусусиятга эга метаболитларни аниқлашда, потоген микроорганизмларни идентификация қилишда кенг қўлланилади. Бироқ улар ўзининг чегарасига эга. Агар изланаётган (мишен) молекула сифатида оқсил хизмат қилса, у ҳолда унинг генларини детерминатцияловчи экспрессия билан танинлаш лозим негаки шу ҳолдагина бу генларда маскировка ёки антителлар билан боғловчи сайтнинг блокировкаси кузатилмайди.

Касаллик кўзгатувчи инфекцияларнинг диагностикаси анъанага кўра потоген микроорганизмлар тавсифи мажмуасига ёки ажойиб хусусиятга таянади. Клиник микробиологлар айнан ана шу биологик тавсифни минимал мажмуасини қидиришади, негаки мана шу мажмуа (набор) ёрдамида потоген микроорганизмларни гарантиявий топиб идентификация қилиш мумкин. Масалан, баъзи касал кўзгатувчилар ўзларидан биокимёвий бирикмалар

¹ Bernard R. Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington 331-356 p

ажратиб чиқарадилар айнан ана шу бирикмаларни биологик намуналарда топиш зарур. Кўпинча шу каби маркер молекулани юқори хусусиятга эга бўлган биокимёвий анализ ёрдамида аниқлаш мумкин. Бироқ бундай ёндашув потоген микроорганизмларнинг индивидуал детекция тизимини келтириб чиқаради энг самарали ёндашув бу кимёвий табиатидан қатъий назар исталган маркер молекуласини топувчи универсал усулдир. Айнан бундай усул бўлиб антиген –антител мажмуаси (комплекс)ни идентификация қилувчи усул хизмат қилади.

Фермент иммуносорбент анализи

Ҳозирда антителани изланаётган антиген билан боғлиқлигини аниқловчи бир қатор ёндашувлар мавжуд. Булардан бири диагностикада кўп қўлланиладиган фермент иммуносорбент анализи. Муолажа қуйидаги босқичларни ўз ичига олган.

1. Ўзига хос хусусиятга эга бўлган молекула ёки микроорганизм наъмунасини қаттиқ асосга ,масалан одатда 96 та тешикчаси болган микротитровал идишча маҳкамлашади. Маҳкамланган наъмунага ўзига хос хусусиятли маркерли молекула(1-антитела)қўшилади.кийин 1-антителага боғлиқ бўлмаган молекулалар тешикчадан ювиб юборилади.

2. 1- антитела билан боғлиқ бўлган ўзига хос хусусиятли 2-антителла қошилади.бирок бу ҳолда маркер молекула билан ўзаро таъсир кўрсатмайдиган бўлиши шарт.(9.1В расм).бу антителага фермент (масалан ишқорли фасфатаза ,периоксидаза ёки уреаза)бириктирилган бўлиб у бўялмаган субстратни бўялган маҳсулотга айлантириш учун катализатор вазифасини бажаради.Иккинчи антителла –ферментни боғланмаган конюгата молекуласини ёқ қилиш мақсадида тешикча ювилади.

3. Бўялмаган субстрат қўшилади.

4. Бўялган маҳсулотга сифатли ёки сон жиҳатидан тавсиф берилади.

Агар 1-антителла изланаётган наъмуна билан боғланмаса у ҳолда уни биринчи ювишдаёқ ажратиб олинади, .бу ҳолда 2- антитела –фермент конюганти ҳеч нарса билан боғлана олмайди.шу сабабли уни 2-ювишда ажратиб олишади. Ва намуна бўялмаганича қолади.Агар изланилаётган молекула боғланиш содир бўлса , у ҳолда 2- антитело 1- антителога бирикади ва конъюгирли фермент янги рўйхатга олинадиган маҳсулатни катализ қилади.

ЕЛИСА ни асосий мақсади 1- антителони мўлжал билан ўзига хос хусусият ёрдамида боғлашдир.Агар мўлжал ўзида оксил ксб қилса,у ҳолда уни тозаланган препаратини одатда антителла олиш учун фойдаланади. Бу антителалар ёрдамида эса берилган мўлжални ажратиб олишади.Иммунитетланган жонивир одатда уй қуёни нинг қонидаги сивороткада хосил бўладиган антителалар мўлжал-молекуласидаги турли антиген детерминант (эпитопа) лар билан боғланади бундай антителаларнинг аралашмасини поликлонал препарат деб аташади. Баъзи диагностис усулларида поликлонал антетелаларни қўллаш 2 та камчиликка эга;1-поликлонал препаратда мавжуд бўлган алоҳида антителалар 1 партиядан 2 партияга ўтиши мумкин.2-агар 2та бир ҳил мўлжални ажратиш яни потоген ва нопотогенажратиш керак бўлса у ҳолда поликлонал потогенлардан фойдаланиш мумкин эмас.,негаки уларнинг шаклари фақатгина ёлғиз детерминант билан фарқ қилади бирок,ҳозирда бу муаммоларни ечими топилган жумладан ҳозирги пайтда бир антиген

детерминантида ишлаб чиқилган моноклонал антитела препаратларини олиши ёлга қойилган.

Моноклонал антителалар

Эволюция (ривожланиш) жараёнида сут эмизувчиларда организмни захарли моддалар ва юқумли агентлардан ҳимоя қилувчи мураккаб тўқима тизими шаклланган. Ҳимоя таъсирининг ўзига хос хусусиятга эга бўлган оксил(антителалар)tizими томонида ишлаб чиқариладиган индуктсияланган лимфа тўқималаридир. Улар иммун тизимидаги бошқа оксиллар ёрдамида ёт (бегона) моддалар билан бирикиб захарли моддаларнинг таъсирини йўқотади. Бунга комплмент тизими ҳам киради. Иммунологик мақсадга жавобан ҳар бир антителла чиқарувчи тўқима синтездан ўтиб, бир турдаги антитела чиқаради. Бу антителалар юқори хусусиятга эга бўлиб антиген молекулаларини алоҳида қисмларини танийди. (эпитоп, антиген детерминант қисмларини). Антигенни молекуласида одатда бир неча ҳар хил эпитопантителалар мавжуд бўлганлиги сабабли уларга қарши иммун тизими томонидан алоҳида тўқималар ишлаб чиқилади. Бундай антителаларнинг ҳар бири берилган антиген билан ўзаро киришганлиги сабабли поликлонал деб аталади. Ҳозирги асрнинг бошларида ҳали поликлонал антителалар ҳақидаги маълумотлар етарли даражада бўлмаса ҳам уларнинг ўзига хос хусусиятлари ёрдамида инфекциялар билан курашишган. Кейинроқ эса антителалардан клиник наъмуналаридаги захарли брикмаларни аниқлаш учун диагностик курол сифатида фойдаланишган. Афсуски поликлонал антитела препаратларининг самарадорлиги бир партиядан иккинчисига ўтиши мумкин. негаки 1-шароитда иммунизатсия пайтида антитела ишлаб чиқарувчи тўқималар брикган антителаларнинг детеррминантлари билан тўйинади. (стимулируется), 2- шароитда эса иммун тизими бошқа эпитопнинг худди шу антигенига фаол жавоб беради. Бу турли препаратларнинг антигенларини кучсизлантириши қобилиятига таъсир корсатиши мумкин. негаки айрим эпитоплар турли қобилиятга эга. бундан келиб чиқган ҳолда берилган партиядagi поликлонал антителалар асосий эпитопларга қарши йўналтирилган кам миқдордаги молекулаларга эга бўлади, натижада олдингисига қараганда кам таъсир корсатади. Шундан хуласа чиқарамизки диагностик курол ёки терапия қолланмаси компонентлари сифатида хужайраларнинг шундай тизимини яратиш кераки убир шароитда осиб озидан бир турдаги антитела ишлаб чиқарсин. Бу бир турдаги антитела ўзига хос хусусиятга эга бўлган антиген-мўлжалга ўхшаш –моноклонал антитела бўлсин. Шу каби хужайра тизими ўхшаш антитела молекулаларининг туганмас манбайи бўлиши мумкин эди. Афсуски антителаларни синтез қилувчи Блимфоситлари ўсимликда ишлаб чиқилмайди. Берилган

муаммонинг ечими гибрид тўқималарини яратишдадир. Генетик асосни Б-тўқимадан ололса у антитела ишлаб чиқариши мумкун бўларди. Баъзи пайтда Б-лимфоситлар қайта шаклланиб саратон тўқималарига айланади ва кўпгина хусусиятларини сақлаб қолган холда ўсимликда ўсиш қобилиятига эга бўлиши мумкунлиги маълум. ¹

Назорат саволлари:

1. Инсон ва уй жониворларининг касалликларини диагностика қилувчи зондлар сифатида нималардан фойдаланилади?
2. Молекуляр диагностика усули қандай амалга оширилади?
3. Диагностик муолажаларни олиб бориш учун қандай муолижалар амалга оширилади?
4. Иммунодиагностика усуллари ҳақида маълумот беринг
5. Касаллик қозғатувчи инфекцияларнинг диагностикаси қандай амалга оширилади?
6. Фермент иммуносорбент анализи ҳақида маълумот беринг?
7. Ҳозирда антителани изланаётган антиген билан боғлиқлигини аниқловчи қандай ёндашувлар мавжуд?
8. . Фермент иммуносорбент анализи қандай муолажаларни ўз ичига олади?
9. Моноклонал антителалар қандай мақсадларда фойдаланилади?
10. Поликлонал антитела препаратлар қандай мақсадларда фойдаланилади?

Фойдаланиладиган адабиётлар :

1. Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology/ Washington 2010. 1020 p
2. Artikova R.M., Murodova S.S. Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi.Darslik.T.: Fan va texnologiya. 2010.- 276 b.
3. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
4. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo'stoni.2013.-223b
5. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик -Т.: Таълим, 2009. -528 б.

¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington 331-378 p

4-мавзу: ДНКни кимёвий синтезлаш, нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш

Режа:

- 4.1. ДНК кимёвий синтезлаш
- 4.2. ДНКни секвенирлаш усуллари.
- 4.3. Генларни синтезлаш
- 4.4. Синтезланган олигонуклеотидларни қўллаш
- 4.5. Фосфорамидитли усул
- 4.6. ДНК ни кимёвий синтезлаш

Таянч иборалар: *гибридизация, рекомбинант ДНК, ген, реципиент, биобаллистика, ген, геном.*

Фаннинг ҳар қандай соҳасида технологик ўсиш унинг келгусидаги ривожланишини таъминлайди. Янги технологияларнинг пайдо бўлиши билан янги тажрибалар ўтказиш имконияти пайдо бўлади ва эскиларини ўтказиш осонлашади. Молекуляр биотехнологиянинг фан сифатидаги ривожланиши

бир қатор технологик ишланмаларга боғлиқ бўлди: ҳозирги кунда уларнинг кўпидан йирик тадқиқотчилик марказларида ва унча катта бўлмаган илмий жамоаларда фойдаланилади. Эндиликда ДНК битта молекуласини кимёвий синтезлаш, бошқасининг нуклеотид кетма кетлигини аниқлаш, учинчисини полимераз занжир реакцияси ёрдамида амплификациялаш унчалик катта меҳнатни талаб қилмайди. Буларнинг барчасига ДНК нинг ўзи ва уни репликациялаш механизмларини асосий тадқиқ қилиш жараёнида олинган маълумотлар туфайли имкон туғилди. Ушбу экспериментал ёндашувлар молекуляр клонлаш - ДНК дан керакли фрагментларни ажратиб олиш, уларни тавсифлаш ва улар билан турли манипуляциялар ўтказиш имконини берувчи муолажаларнинг ажралмас қисми бўлиб қолди.¹

ДНК ни кимёвий синтезлаш

Бир буйракли ДНК ферментларини кимёвий синтезлашнинг тез ва унча қиммат бўлмаган усуллари ишлаб чиқилгандан сўнг молекуляр клонлаш ва ДНК ни тавсифлаш методологияси бир мунча ўзгарди. Кимёвий синтезланган олигонуклеотидлардан бир бош генлар ёки уларнинг фрагментларини тузиш, ДНК махсус фрагментларини амплификациялаш, ажратиб қўйилган ДНКларни йўналтириб мутация қилиш, шунингдек гибридлашда зонд сифатида ва клонлашни осонлаштирувчи линкерлар сифатида фойдаланиш имкони туғилди.

ДНКни (ДНК синтезаторлар) автоматик кимёвий синтезлаш учун ускуналар пайдо бўлгандан сўнг <50 звено узунликдаги бир занжирли олигонуклеотидларни олиш бир оз мураккаб ишга айланди. Ҳар қандай ДНК синтезаторнинг асосий компоненти клапан ва насослар тизими ҳисобланади. Улар ёрдамида реакцияга киришувчи қорихмага ўрнатилган дастур бўйича нуклеотидлар ва реагентлар юборилади ва улар ўсаётган занжирга зарур мономер бирликларнинг бирикиши имконини яратади. Биологик синтездан фарқли ўлароқ ДНК ни кимёвий синтезлаш жараёнида ҳар бир янги нуклеотидни занжирнинг 5' гидроксилли охирига бириктириш мумкин. Барча реакциялар кетма кет битта реакцион колонкада амалга оширилади, уларнинг ҳар бирининг давомийлиги ва ювиш вақти эса компьютер ёрдамида назорат қилинади.

Фосфорамидитли усул

Ҳозирга вақтда бу ДНКни кимёвий синтезлашда энг кенг тарқалган усулдир. Модификацияланган дезоксирибонуклеозидлар унда бирламчи қурилиш блоклари ҳисобланади. Модификациялаш бензол гуруҳидаги дезоксиаденозин ва дезоксицитидинни амин гуруҳларига бириктириш, амин гуруҳига эса изобутирал дезоксигуанозинни бириктиришдан иборатдир.

Амин гуруҳи бўлмаган тимидин модификацияланмайди. Бундай модификация занжир ўсишида нуклеозидларни кераксиз таъсирлардан ҳимоя қилиш учун зарур.

ДНК кимёвий синтезлаш, нуклеотид кетма кетлигини аниқлаш ва амплификациялаш

Синтез қаттиқ фазада(ДНКнинг ўсувчи занжири қаттиқ ташувчида котади) амалга оширилади, бу эса барча реакцияларни битта сиғимда амалга ошириш, ҳар бир босқичдан сўнг кераксиз реагентларни ювиб ташлаш ва янгиларини реакциянинг тўлиқ бажарилишини таъминловчи миқдорда қўшиш имконини беради.

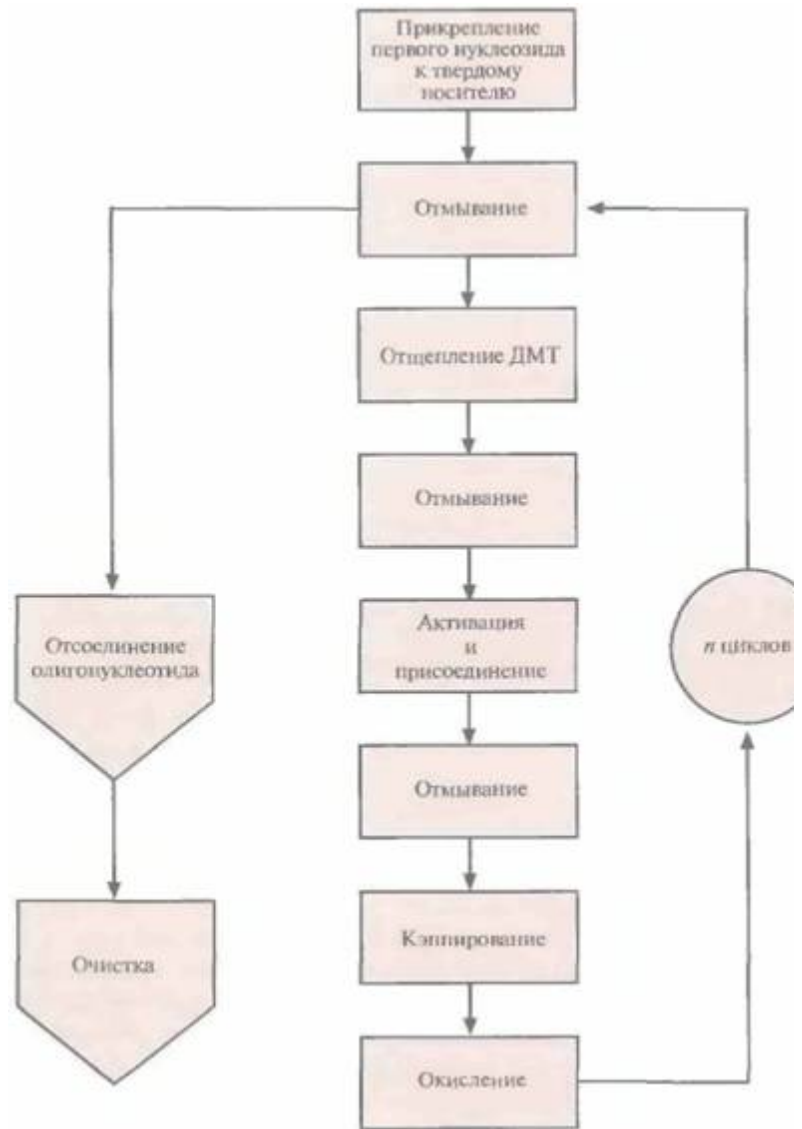
Кўп босқичли синтезлаш босқичлари 5.1 расмда келтирилган. Биринчи нуклеозид (азотли асос + шакар) қаттиқ инерт ташувчига қотирилади, одатда улар бир хил ўлчамдаги тешикчалари бўлган шиша шарчалардир.

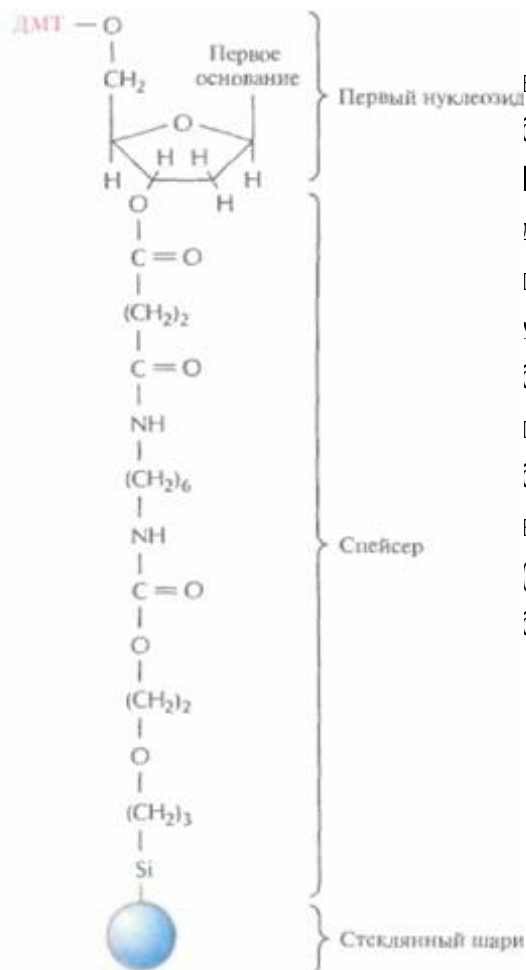
¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington

Синтезланаётган занжирнинг 3'- учли нуклеотиди бўладиган биринчи нуклеозиднинг 3'- гидроксилли гуруҳи ташувчи билан ковалент боғланган спейсерли молекулага бириктирилади. Биринчи нуклеотиднинг 5' гидроксилли гуруҳини иккинчи нуклеотиднинг реакцияга киришувчи қоришмасига қўшишдан аввал нотўғри ўзаро таъсирини олдини олиш учун уни диметокситритилли (ДМТ) гуруҳ ёрдамида ҳимоя қилинади (5.2 расм.) Бундай гуруҳ ўсувчи занжирга бириктирилаётган ҳар бир нуклеотид таркибида мавжуд, бундан ташқари у 3' фосфитли гуруҳга бириктирилган диизопропиламинли гуруҳни ташийди, у эса ўз навбатида металл қолдиқ билан ҳимояланган. (5.3 расм).

5.1

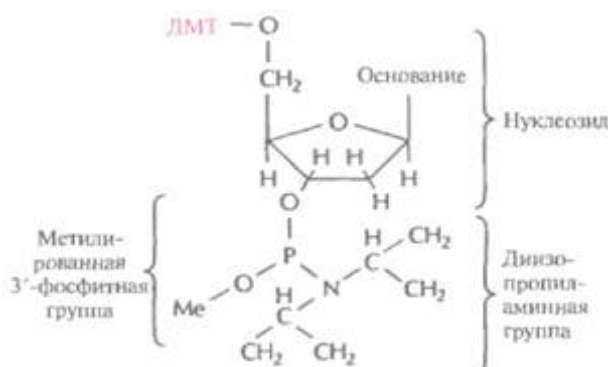
расм. Олигонуклеотидни кимёвий синтезлаш. n циклларида сўнг $n + 1$ нуклеотиддан ДНКнинг бир занжирли фрагменти ҳосил бўлади.





5.2 расм. ДНК занжирини кимёвий синтезлаш бошланадиган комплекс. Биринчи нуклеозид дезоксирибозасининг 5' гидроксилли гурухига диметокситритил (ДМТ) гурухи бириктирилган, 3'-гидроксилли гурухга эса спейсерли молекула бириктирилган. Охиргиси ўз навбатида қаттиқ ташувчи (тешикчали шиша шарча) билан боғланган.

Бундай молекуляр конфигурация фосфориамидит дейилади.



5.3. расм. Фосфориамидитнинг гузилмавий формуласи. Барча гўрт асос- А, Т, G и С нинг келтириб чиқарувчилари ДНКни кимёвий синтезлаш учун ишлатилади. ДМТ — диметокситритил, Me — метал гурухи.

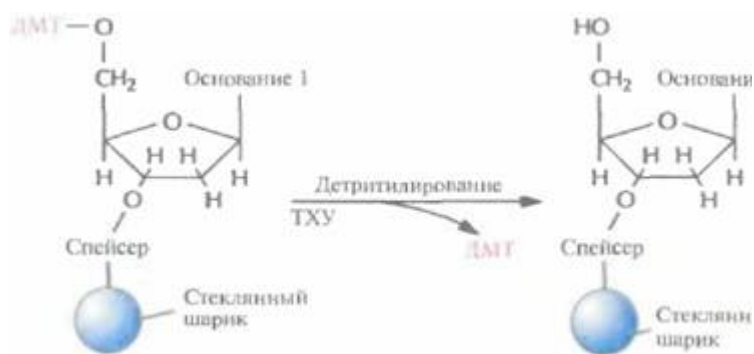
¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology – Washington

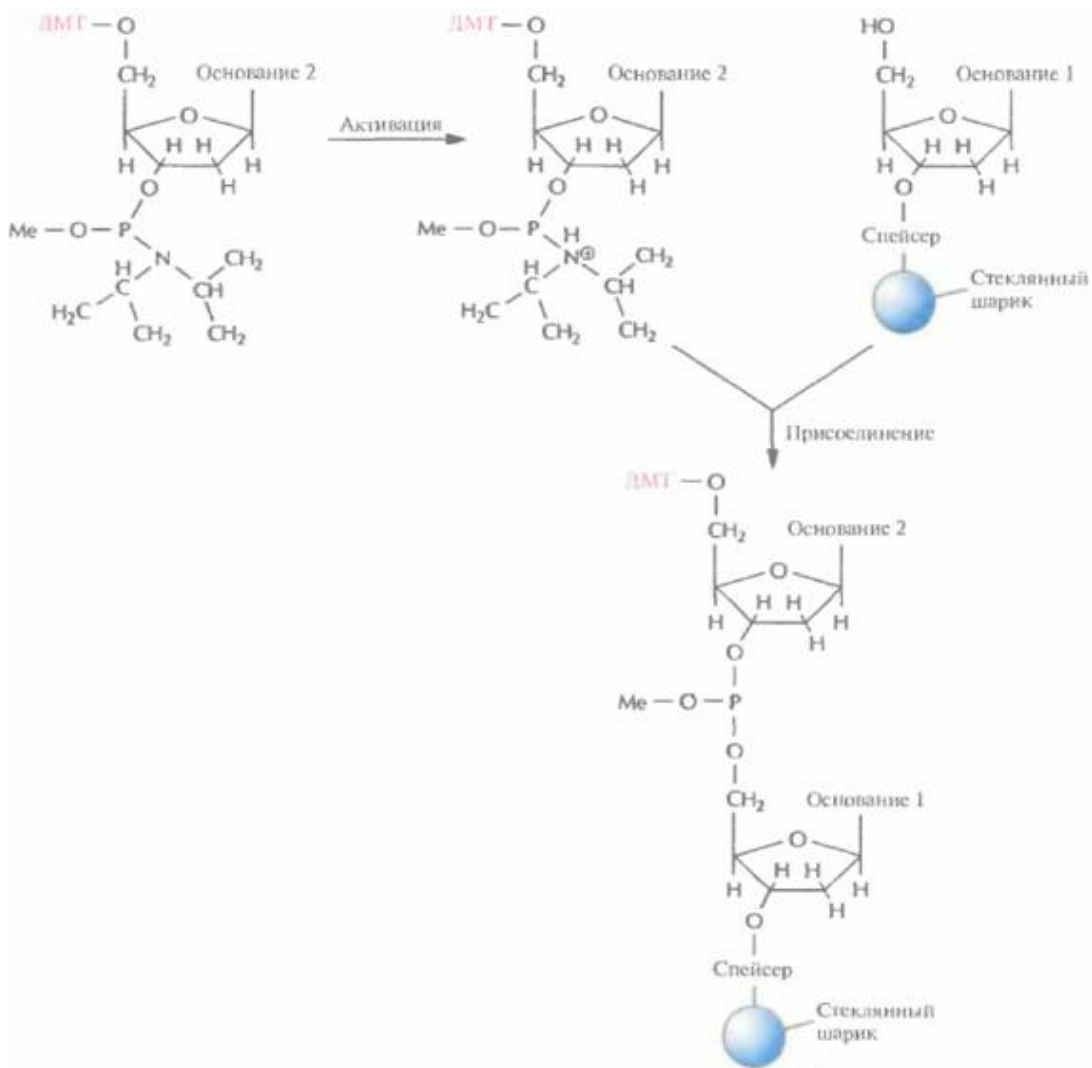
Биринчи нуклеозид шиша шарчага бириккандан сўнг цикл бошланади. Шундан сўнг колонка сув ва бошқа нуклеофилли моддаларни чиқариб ташлаш мақсадида бирор сувсиз реагент (масалан, ацетонитрил) билан яхшилаб ювилади ва у орқали ацетонитрилни чиқариш учун пуфланади. Кейин реакцияга киришиш хусусиятига эга бўлган 5'-гидроксилли гуруҳни бириккан нуклеотиддан бўшатиб олиш учун учхлорсирка (ТХУ УХС) кислотаси ёрдамида 5'-ДМТ (детритиллаш) ажратиб олинади (5.4 расм). Колонка ТХУ УХУни йўқотиш учун яна ацетонитрил билан ювилади, ҳамда ацетонитрилни бартараф этиш учун аргон билан пуфланади. Жараён шундай дастурланганки, иккинчи босқичда колонкага бир вақтнинг ўзида кейинги нуклеозид (фосфорамидит кўринишида) ва тетразол (фаоллаштириш ва бириктириш) юборилади. Тетразол фосфорамидитни фаоллаштиради, шунинг учун 3'- фосфитли гуруҳ биринчи нуклеозиднинг 5'-гидроксилли гуруҳи билан ковалент боғланади. (5.5 расм). Киришмаган фосфорамидит ва тетразол аргон пуфлаш йўли билан чиқариб ташланади.

Биринчи босқич тугагач, ташувчига бириктирилган нуклеозидларнинг ҳаиаси ҳаи фосфорамидитбилан боғланган бўлмаслиги сабабли уларнинг иккинчи босқичда кўшилган нуклеозид билан ўзаро таъсирини бартараф этиш зарур. Бунинг учун таъсир этмаган 5' - гидроксилли гуруҳ сиркали ангидрид ва диметиламинопиридин ёрдамида ацетилланади (кэппирование) (5.6 расм). Агар бу иш амалга оширилмаса, бир неча босқичдан сўнг синтезланаётган олигонуклеотидлар узунлиги ва нуклеотид кетма кетлиги бўйича фарқланади.

5.4 расм.

Детритиллаш —5'-
диметокситритилли (ДМТ
) гуруҳни учхлорсирка
(ТХУ УХС) кислотаси
ёрдамида ажратиб олиш





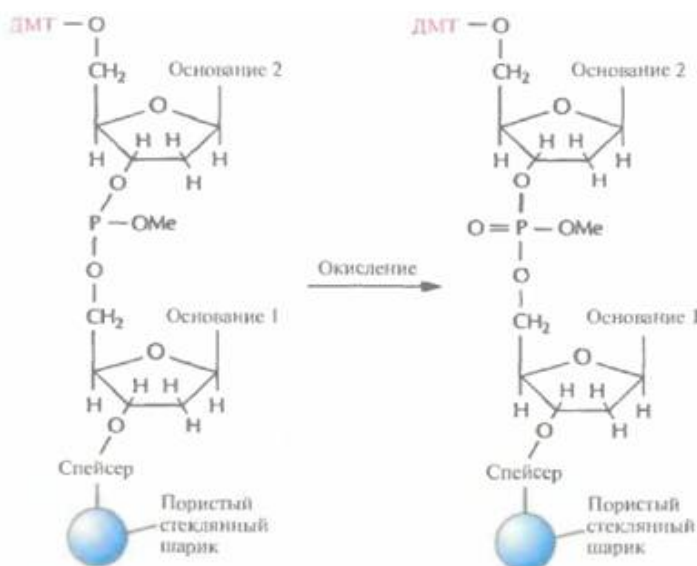
5.5 расм. Фаоллаштириш ва бириктириш, Фаоллашган фосфорамидитнинг 3'-фосфитли гуруҳи шиша шарчага бириктирилган детритилланган нуклеозиднинг 5' гидроксилли гуруҳи билан ковалент боҳлиқлик ҳосил қилади, ДМТ — диметокситритилли гуруҳ, Ме - метилли гуруҳ.



5.6 расм. Кэппирлаш. Детритилланган нуклеозидларнинг биринчи циклда таъсирга киришмаган 5'- гидроксилли гуруҳини кейинги циклда иштирокини олдини олиш учун ацетилланади

Шунинг учун фосфиттриэфир йод аралашмаси ёрдамида барқарор бешвалентли фосфаттриэфир ҳосил бўлгунга қадар оксидланади (5.7 расм). Сўнг колонка ювилади ва бутун цикл такрорланади (детритиллаш, фаоллаштириш ва бириктириш, кэппирлаш, оксидлаш; 5.1 расм). Тасвирланган барча операциялар ўсаётган занжирга дастур асосида охириги нуклеозид бирикмагунга қадар бажарилади. Синтезланган олигонуклеотидлар шиша шарчалар билан боғланган; ҳар бир фосфаттриэфир метилли гуруҳни ташийди; ҳар бир гуанин, цитозин ва аденин таркибида ҳимояланган амингуруҳи бор, сўнгги нуклеотиднинг 5'-учида ДМТ гуруҳ жойлашган.

Метилли гуруҳлар бевосита реакция колонкасида кимёвий қайта ишлаш йўли билан чиқариб юборилади. Сўнг олигонуклеотидларни 3'- гидроксилли учи билан бирга спейсер молекуласидан ажратилади ва уларни колонкадан элюирланади; кейин бирин кетин бензоилли, изобутирилли ва ДМТ гуруҳлар чиқариб ташланади. Занжирнинг 5'- учи ферментатив (полинуклеотидкиназа Т4+АТР) ёки кимёвий усул билан фосфорилланади.



5.7 расм. Оксидлаш. Фосфиттриэфир бешвалентли фосфаттриэфир даражасигача оксидланади,

Бу эса фосфодиэфир боғлиқлигининг барқарорлигига олиб келади ва уни кислота ҳамда ишқорлар таъсирига чидамлироқ қилади. ДМТ - диметокситритилли гуруҳ, Me — метилли гуруҳ.

Ушбу реакцияни олигонуклеотид ҳали ташувчиси билан боғлиқ бўлганда, лекин детритиллашдан сўнг ҳам ўтказиш мумкин.

Маҳсулотнинг чиқиши юқори бўлиши учун нуклеотидларнинг ҳар босқичда бирикиш самарадорлиги 98%дан паст бўлмаслиги зарур, самарадорлик спектрометрик усуллар билан, чиқариб ташланаётган тритилли

гуруҳлар сонини аниқлаб назорат қилинади. Агар, масалан 20 аъзоли олигонуклеотидни синтезлаш вақтида ҳар бир цикл самарадорлиги 99%га тенг бўлса, 82% (яъни $0,99^{20} \cdot 100$) олигонуклеотидлар айнан шундай узунликка эга бўлади. Агар 60 аъзоли олигонуклеотид синтезланаётган бўлса, шундай самарадорликда олигонуклеотидларнинг фақат 55% 60 тадан нуклеотид сақлайди. Агар циклнинг ўртача самарадорлиги 98% дан ошмаса, келтирилган узунликдаги олигонуклеотидларнинг улуши анча паст бўлади (5.1 жадвал). Тижорат ДНК синтезловчиларини тайёрлаб берувчи фирмалар одатда бирикиш самарадорлигининг ўртача 98% лигини кафолатлайди. Лекин бунинг учун жуда юқори даражадаги тозалikka эга бўлган реагентлар ва химикатлардан фойдаланиш керак, буни эса ҳар доим ҳам иложи бўлмайди. Реал бирикиш самарадорлиги одатда 95% бўлади, лекин баъзида 99% самарадорликка ҳам эришиш мумкин. Белгиланган узунликдаги олигонуклеотидларни олиш учун кимёвий синтезлашнинг кўпгина бирламчи маҳсулотларини юқори самарадорликка эга бўлган суюқ хроматография билан юқори босим остида йўналтирилган фаза билан, ёки полиакриламидли гелда электрофарез билан тозалаш зарур. “омадсиз” кетма кетликлар олинмоқчи бўлган олигонуклеотиддан калтароқ бўлганлиги сабабли буни амалга ошириш унчалик қийин эмас.¹

5.1. жадвал. Цикл ўртача самарадорлигининг турли хил белгиларида берилган узунликдаги (n) олигонуклеотидларнинг ўрта чиқиши

Самарадорлик, %	Ўрта чиқиш, %				
	n = 20	n = 40	n = 60	n = 80	n = 100
90	12	1,5	0,18	0,02	0,003
95	36	13	4,6	1,7	0,6
98	67	45	30	20	13
99	82	67	55	45	37
99,5	90	82	74	67	61

Синтезланган олигонуклеотидларни қўллаш

Кимёвий усуллар билан синтезланган олигонуклеотидлар молекуляр биотехнологияда кенг қўлланади. Улар ДНК гибридлашда зонд сифатида, клонлаш тажрибаларида ДНК турли молекулаларини бирлаштирувчи

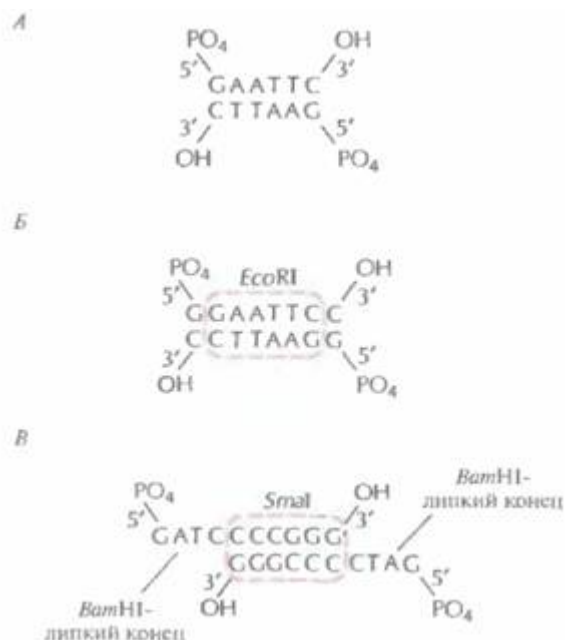
линкерлар, ДНКни секвенирлашда праймер сифатида, ёки клонлаштирилган ўлжа генларнинг махсус мутагенезини амалга оширишда фойдаланилади.

1. Махсус олигонуклеотидли зондларнинг (узунлиги 20 40 звено) нуклеотидкетма кетлигини мувофиқ оксилларнинг аминокислотали кетма кетлиги ҳақидаги маълумотлардан топилади.

2. Линкерларни олиш учун олигомерлар синтезланади, улар ўзаро қовушадиган (гибридланадиган) палиндром бир занжирли нуклеотид кетма кетликдир. Линкерлар рестрицирловчи эндонуклеазалар учун танийдиган сайтларга эга, бу эса улар ёрдамида ДНК фрагментларини клонлаштириш имконини беради (5.8, А ва Б расм).

¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington

Узунлиги 6 12 жуфт нуклеотидларнинг қисқа дуплекси ўлжа ДНК билан ўтмас учлари бўйлаб юради (одатда ДНКга қараб). Янги молекула керакли рестрицирловчи эндонуклеаза билан кесилади ва учи бўртиб турган занжирли (учи ёпишқоқ) фрагментлар олинади, уларнинг ёрдамида ўлжа ДНК мувофиқ векторга тизилади. Тизилишни амалга оширишдан аввал ёпишқоқ учли ДНКни ортиқча линкерли молекулалардан ажратиш учун фракцияланади. Вектор ҳам рестриктаза билан қайта ишланади, уни ёпишқоқ учли ДНК фрагментлари билан ёқилади ва ДНК лигаза Т4 фага ёрдамида тикилади. Ўлжа ДНК таркибида линкерли кетма кетликларда мавжуд бўлган рестрикция сайтлари бўлмаслиги керак, акс ҳолда у ҳам фермент билан эрийди.



5.8 Расм. Анъанавий линкерлар ва адаптер. А. 6 жуфт нуклеотидлардан ташкил топган *EcoRI*-линкер. Б. 8 жуфт нуклеотидлардан иборат *EcoRI*. В. Ёпишқоқ учли *BamHI*- ва *SmaI* учун танийдиган сайтли *BamHI*- *SmaI* адаптер.

3. Линкерли кетма кетликлар “адаптер”ларнинг вариантларидан бири иккита ва ундан ортиқ рестрицирловчи эндонуклеаза учун сайтларни сақлайди (5,8, В расм). Бу ҳолда вектор *SmaI*- сайтларга эга бўлиши мумкин эмас, на вектор, на ДНК *BamHI*- сайтларни ташиши керак эмас.

4, 17 24 звенодан иборат бир занжирли олигонуклеотидлар ДНКни сенквенирлашда праймерлар сифатида ва ПЦР ўтказишда ишлатилади.

5. Бир занжирли олигонуклеотидлар *in vitro* махсус сайт мутагенези учун праймер сифатида ишлатилади.

6. Қайсидир аниқ оксилни кодловчи нуклеотид кетма кетликни кимёвий синтез қилиш зарурати мувофиқ генни клонлаш қийинлашганда пайдо бўлиши мумкин. Бунда геннинг нуклеотид кетма кетлигини оксилнинг аминокислотали кетма кетлиги ҳақидаги маълумотлардан топилади. Ушбу ген ташкил топган кодонлар эга организм томонидан яхши ўқилмаганда ва трансляция даражаси жуда паст бўлганда кимёвий синтезга мурожаат қилинади. Бу ҳолда генни кодонларнинг шундай тўплами билан синтезланадики (кодонларни оптималлаштириш), бунда кодланаётган

оқсилларнинг аминокислотали кетма кетлиги ўз ҳолида қолади, кодонлар эса эга организм томонидан самаралироқ ўқилади.

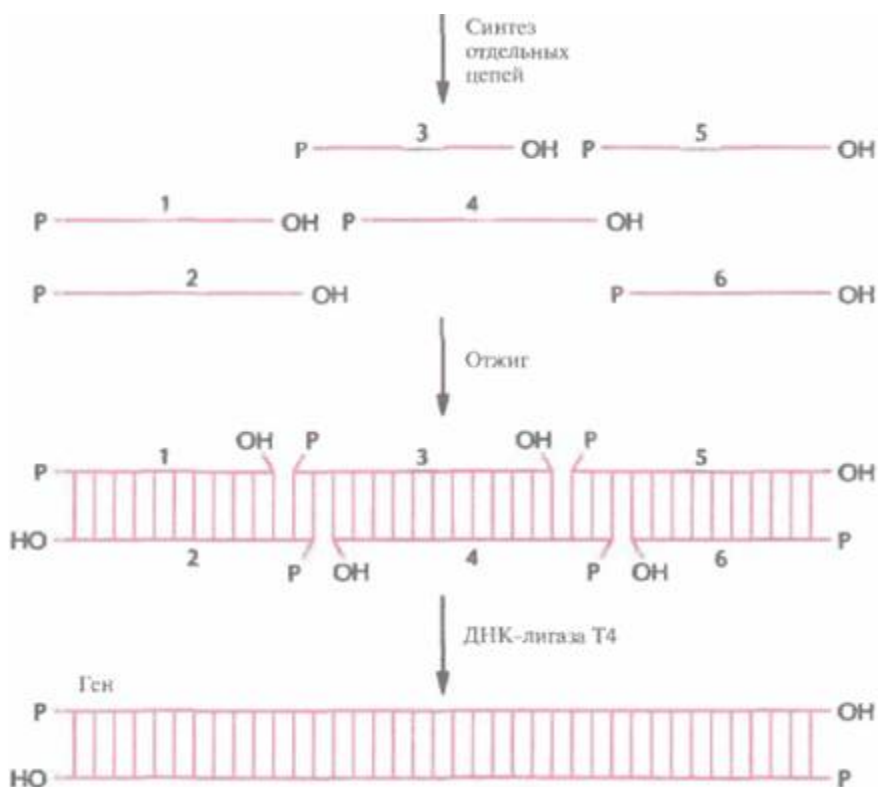
Генларни синтезлаш

Агар кимёвий синтезланган икки занжирли ДНКдан ген ёки унинг фрагменти сифатида фойдаланиш назарда тутилаётган бўлса, занжирларнинг ҳар бири алоҳида синтезланиши зарур. Калта генларни (60–80 п.н) олиш техник жиҳатдан мураккаб эмас: бунинг учун комплементар занжирлар синтезланади, сўнг улар ёндирилади. Йирик генлар учраган ҳолда махсус стратегия қўлланади, чунки кимёвий синтезнинг ҳар бир цикли самарадорлиги асло 100% бўлмайди. Масалан, агар ген 999 жуфт нуклеотидлардан иборат бўлса ва ҳар бир циклнинг самарадорлиги 99% бўлса, у ҳолда тўлиқ ўлчамли бир занжирли ДНК улуши жараён тугагач 0,004%дан ошмайди. Бу муаммони ҳал этиш учун синтетик (икки занжирли) генлар модуллардан - (бир занжирли) узунлиги 20 дан 100 нуклеотидгача бўлган фрагментлардан йиғилади.

Синтетик генларни тузиш усулларида бири ҳар қайсиси бир бирини ёпадиган учли, узунлиги 20–60 нуклеотид бўлган олигонуклеотидлар йиғиндисини олишдан иборат.

¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington

Занжирларнинг нуклеотид кетма кетлиги шундай бўладики, ёндирилгандан сўнг геннинг учигаги сегментлари ўтмас бўлиши керак. Ҳар бир ички сегмент 3'- ва 5'- бўртиб чиқиб турган учларга эга, улар қўшни сегментларга комплементардир (5.9 расм).



5.9 расм. Калта олигонуклеотидлардан ташкил топган синтетик генларни йиғиш.

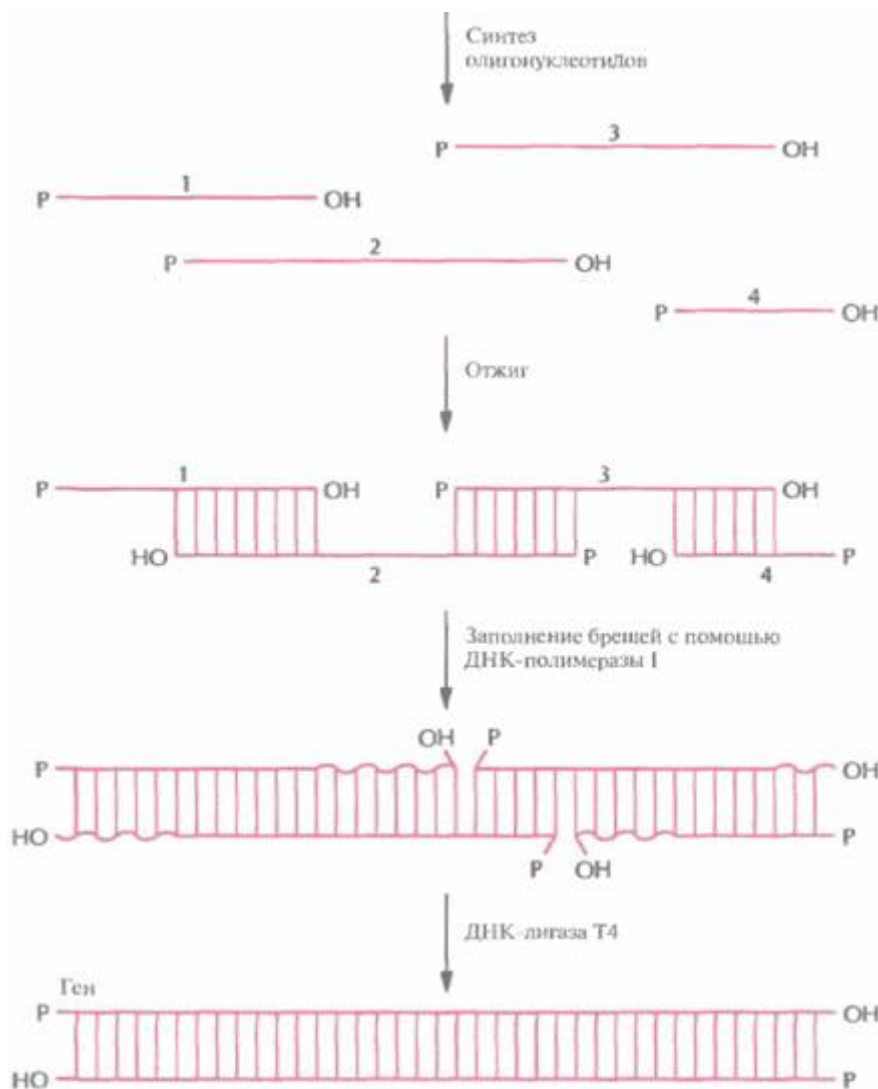
Узунлиги 20дан 60 звеногача бўлган алоҳида олигонуклеотидлар ёндирилган вақтда улардан икки занжирли молекула ҳосил бўлиши учун ҳар бири худди шундай нуклеотид кетма кетликлар билан синтезланади. Қолган бир занжирли узилишлари T4 ДНК лигаза ёрдамида тикилади.

Ген йиғиб бўлингач T4 ДНК – лигаза ёрдамида бир занжирли узилишларни тикиб чиқиш қолади. Синтетик генлар шундай тузилган бўлиши мумкинки, оқсил кодловчи кетма кетликдан ташқари уларнинг клонлаштирувчи векторга (рестрицирловчи эндонуклеазлар учун сайтлар) тузилишини таъминловчи учли майдонга, шунингдек агар бу зарур бўлса тўғри инициация ва терминация, транскрипция ва трансляция учун сигнал кетма кетликларга эга.

Тўлиқ ўлчамли генларни бошқа усул билан олиш учун узунлиги 40 дан 100 звеногача бўлган ёпилган олигонуклеотидларнинг махсус тўплами синтезланади. Ёндирилаётганда 3'- и 5'- учли ўзарокомпектар нуклеотидларнинг 6-10 жуфтланиши содир бўлади, уларнинг орасида эса катта тешиқлар қолади. Бутун тузилмани стабиллаштириш учун жуфтлашган майдонларнинг узунлиги катта бўлади. Тешиқлар ферментатив йўл билан ДНК полимераза I *Escherichia coli* ёрдамида тўлдирилади, у инициациялаш репликациялаш учун 3'- гидроксил гуруҳ ва бир занжирли майдонлардан

матрица сифатида фойдаланади. Қолган бир занжирли узилишларни Т4 ДНК лигаза ёрдамида тикилади. (5.10 - расм).

Узунроқ генлар (>1000 п. н.) одатда икки занжирли фрагментлардан йиғилади, уларнинг ҳар бири ўз навбатида 4-6 бир бирини ёпадиган олигонуклеотидлардан (ҳар бири 20 дан 60 п.н гача) иборат. Агар синтез ва ёқилгандан сўнг етарли миқдорда фрагментлар ҳосил бўлса, улар бир бирига шунчаки уланади. Акс ҳолда ҳар бир фрагмент клонлаштирилади ва амплификацияланади. Икки занжирли фрагментлар кетма кетликда тўлиқ ўлчовли ген ҳосил бўлгунча бир бирига боғланади.



5.10 расм. *in vitro* узун генининг ферментлар иштирокида йиғилиши. Аввал кимёвий усуллар бир алоҳида олигонуклеотидлар шундай нуклеотид кетма кетликлар билан синтезланадики, ёндириш вақтида уларнинг орасида узунлиги 6 -10 жуфт нуклеотидлар бўлган жуфтлашган майдонлар ҳосил бўлиши керак. Уларнинг орасидаги қолган тешиклар ДНК – полимераза I *E. coli* ёрдамида тўлдирилади, бир занжирли узилишлар эса T4 ДНК лигаза ёрдамида тикилади.

Кимёвий синтезланган генининг нуклеотид кетма кетлиги тўғрилигини кафолатлаш учун ҳар бир икки занжирли фрагмент, кейин эса бутун ген секвенирланади.

ДНКни секвенирлаш усуллари

ДНК молекуласи ҳақидаги тўлиқ маълумотни фақатгина унинг нуклеотид кетма кетлигини аниқлагандан сўнг олиш мумкин. Шундай қилиб гени секвенирлаш орқали унинг вазифасини, нуклеотид кетма кетлигини вазифаси аниқланган генлар учун солиштириб аниқлаш мумкин. Нуклеотид кетма кетлик ҳақидаги маълумотларсиз молекуляр клонлаштириш бўйича тадқиқотлар ўтказиб бўлмайди. ДНК у ёки бу фрагментини секвенирлашни

А. Максам ва В. Гилбертлар томонидан ишлаб чиқилган кимёвий усул, ёки Ф.Сангер томонидан таклиф этилган ферментатив усул билан ўтказиш мумкин, аммо ҳозирги вақтда кўпроқ дидезоксинуклеотид усул кенг тарқалган.

Янги усулларни яратиш – бу фаннинг исталган тармоғининг ривожланиши учун тurtкидир. Улар илгари маълум бўлмаган маълумотларни олиш имконини беради, бу эса ўз навбатида кузатилаётган воқеа, ҳодисаларнинг моҳиятини чуқурроқ тушунишга олиб келади ва янги кашфиётларни келтириб чиқарувчи тадқиқотларни рағбатлантиради. Молекуляр биотехнологияга келсак, унинг асоси сифатида шундай усуллардан фойдаланилдики, улар ДНК ва ПЦР ни секвенирлаш. ДНКнинг нуклеотид кетма кетлигини ДНК полимераза билан амалга ошириладиган занжирнинг узайишини тўхтатиш йўли орқали ферментатив нусха кўчириш усули билан аниқлаш – тез, жуда содда ва ишончли усул. ДНК фрагментининг нуклеотид кетма кетлиги молекуляр даражада унинг тўлиқ тавсифи бўлишидан ташқари, унинг кодланаётган майдонини тенглаштириш, ПЦР учун потенциал праймер танлаш, гендаги мутация ўзгаришларини аниқлаш имконини беради. 1977 йилда Сангернинг ДНКни секвенирлаш учун дидезокси усули пайдо бўлгунга қадар занжирнинг махсус сайт кимёвий парчаланиш усулидан фойдаланилган (А. М. Махани, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 74: 560-564, 1977). Яна илгари нуклеин кислоталарни секвенирлаш РНКнинг нуклеин кетма кетлигини аниқлаш демак эди. Бунинг учун ДНКнинг керакли фрагменти РНКга РНК – жинс имераза ёрдамида кўчириб ўтказилади (транскрибировать), кейин эса сўнгисининг нуклеотид кетма кетлиги аниқланади. Жараён жуда мураккаб ва узок давом этарди. У қуйидагидан иборат эди: радиоактив мўлжалланган РНК турли рибонуклеазалар билан қайта ишланган, кейин ҳосил бўлган маҳсулотни хроматографик бўлиниши амалга оширилган., такроран ферментлар билан қайта ишланган, иккинчи парчаланишдаги маҳсулотларнинг ишқорий гидролизи амалга оширилган, гидролиз натижасида олинган маҳсулотларнинг хроматографик бўлиниши амалга оширилган, олигонуклеотидларнинг кетма кетлиги уларнинг уч майдонларини бир бирига ёпишишига асосланиб аниқланган ва бошланғич молекула қайта тикланган.

¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak *Molecular biotechnology* –Washington

Дидезокси усулнинг пайдо бўлиши билан бу жараёндан деярли фойдаланилмай қўйилди. Ҳозирда РНКнинг ўзини эмас, балки унга худди матрицадаги каби қайта транскриптаза ёрдамида синтезланган ДНК

секвенирланади ҳамда Максам ва Гилберт усулларидан эмас, балки М13 фага асосида клонлаштириш тизими яратилгандан сўнг пайдо бўлган Сангер усулидан фойдаланилади. ДНКни тўғридан тўғри секвенирлаш инсон турли касалликларининг молекуляр асосларини тадқиқ этиш, ташхис қўйиш ва даволаш усулларини ишлаб чиқишда ҳақиқий инқилоб содир этди. Тадқиқотларнинг жуда кўп соҳаларига, шу жумладан молекуляр биотехнологияга ПЦР усулининг ишлаб чиқилиши катта таъсир кўрсатди (Kary Mullis; U.S. patent 4,683,202). Клонлаштирилган ёки геном ДНКнинг сегментларини амплификация қилиш орқали катта миқдорда ДНК олиш имкони яратилгач, РНК ноёб молекулаларининг ДНК нусхаларини клонлаштириш, геном кутубхоналарининг скрининги, ген мутацияларини аниқлаш, хромосомаларни жисмоний картирлаш (картирование) ва бошқа муаммолар ҳал бўлди. ПЦРнинг биринчи бор амалиётда қўлланиши серповидхужайрали анемияни ташхислаш тест тизимини яратиш бўлган(Saiki et al., *Science* 230: 1350-1354, 1985). ПЦР шундай ноёб усулки, бошқа барчага яхши маълум бўлган усуллар ичида унинг тенги йўқ. 1986 йилдан бошлаб, унинг ёрдамида 10000 дан ортиқ тадқиқотлар ўтказилди, ва уларнинг турли хил бўлишига қарамасдан, ПЦРдан фойдаланишнинг истиқболлари яна ҳам одамни ром қилмоқда.

Назорат саволлари:

1. ДНКни секвенирлаш усулларига изох беринг
2. Генларни синтезлаш қандай амалга оширилади ?
3. Синтезланган олигонуклеотидларни қўллаш қандай амалга оширилади?
4. Фосфорамидитли усулнинг моҳияти нимада?
5. ДНК ни кимёвий синтезлаш қандай амалга оширилади?

Фойдаланиладиган адабиётлар :

1. Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology -Washington 2010. 1020 p.
2. Deniz Ekinci “Biotechnology” Croatia, 2015
3. Artikova R.M., Murodova S.S. Qishloq xo‘jalik biotexnologiyasi.Darslik.T.: Fan va texnologiya. 2010.- 276 b.
4. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
5. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo‘stoni.2013.-223b

6. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик -Т.: Таълим, 2009. -528 б.

5-мавзу: Оқсиллар терапияси

Режа:

Оқсиллар терапияси

1. Оқсиллар терапияси
2. кДНК интерферонларини ажратиб олиш
3. Инсонлар интерферонлари
4. Инсонларнинг ўсиш гормони
5. Ген экспрессиясининг оптимизацияси
6. ДНКза I
7. Альгинат-лиаза
8. Инсоннинг кўп клонли антителалари

Таянч иборалар:

Терапея, тест, интерферон, фермент, антитела, алгинат, ДНК

Оқсиллар терапияси

Рекомбинантли ДНК технологияларининг пайдо бўлишидан аввал инсон оқсили асосидаги кўпгина доривор препаратларни факат унча кўп бўлмаган миқдорда олиш мумкин бўлган, сабаби уларни ишлаб чиқариш жуда қimmatга тушган ва биологик таъсири механизми баъзида яхши ўрганиб чиқилмаган эди. Янги технология ёрдамида препаратларнинг барча спектрларини самарали тестдан ўтказиш ва клиникада қўллаш учун етарли бўлган миқдорда олиш мумкин деб тахмин қилинган. Вабуумидруёбгачикди .Бугунгакелибинсоннинг 400 дан ортикгенлар и (асосан ДНК кўринишида) турли оқсиллари клонлаштирилган бўлиб, амалда улар доривор препарат бўлишлари мумкин.Ушбу генларнинг кўп қисми хўжайин хужайрада экспессияланди ва хозирда уларнинг махсулотлари инсоннинг турли касалликларини даволашда қўллаш эхтимолига текширувдан ўтказилмоқда (11.1 жадвал). АКШда хозирда,30дан ортик шундай биологик препаратлар маъқулланди (10.2 жадвал). Бирок хали уларнинг кенг миқёсда қўлланилиб, сотувга чиқарилишига хали кўп йиллар бор; аввалига улар хайвонларда текшириб кўрилади шундан сўнг, клиник синовдан ўтказилади, бироқ, фармацевтик фирмалар хозирданоқ уларга қизиқишмоқдалар.

Мутахассисларнинг ҳисоб китобларига кўра инсон оксили асосидаги доривор препаратларнинг дунё бозоридаги ҳажми 150 млрд долларга етган ва доимий равишда ўсиб бормоқда.рекомбинантли оксиллар асосидаги доривор препаратлар нинг дунё бозоридаги ҳажми йилига 12-145% га ўсмоқда. Инсоннинг кўпгина касалликларини даволаш ва профилактика қилишнинг янги методлари XX асрда инсонларнинг фаровон яшашларини ўсишига улкан ҳисса қўшди. Бироқ бу жараён тугади деб айтиб бўлмайди. Эски деб аталмиш касалликлар (масалан, сил касаллиги) профилактика тадбирлар сусайиши биланоқ ёки бўлмаса, янги резистентли штаммлари пайдо бўлганида яна юзага келиши мумкин.Терапевтик воситалар сифатида специфик антителолардан фойдаланиш истикболи жуда эътиборли;улардан келгусида токсинларни нейтрализация қилишда, бактериялар, вируслар билан курашишда ва ҳатто, рақни даволашда ҳам фойдаланиш мумкин. Антителони ўз-ўзини бошқарадиган рақетага ўхшатиш мумкин у ёки ёт агентни нейтраллайди, ёки специфик нишон-ҳужайрани емириб юборади. Афсуски, антителодан, унинг имконияти жуда кенг дейилиши қарамасдан бошқа касалликлар ва уларнинг патологияларини даволашда фойдаланилмаган. Фақат сўнгги пайтдагина рекомбинант ДНК ва кўп клонли антителолар олиш методикаси ривожлангандан сўнг ва молекуляр структураси ва иммуноглобулин функциялари расшифровкалангандан сўнг специфик антителолардан турли касалликларни даволашда кўллашга бўлган қизиқиш яна ортди.¹

Фармацевтика

қДНК интерферонларини ажратиш олиш

Инсон оксилнинг гени ёки қДНКсини ажратиш олиш учун турли ёндашувлардан фойдаланиш мумкин. Бир қатор ҳолатларда керакли бўлган оксил ажратиш олинади ва унинг тегишли майдонидаги аминокислотали кетма-кетлиги аникланади.

¹ Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington

Шулардан келиб чиқиб унинг кодловчи кетма-кетлигини топадилар ,тегишли олигонуклеотидни синтезлайдилар ва ундан геномни ёки библиотекали қДНКдан керакли генёки қДНК ажратиш олиш учун гибридизацион зонд сифатида фойдаланадилар.

Бошқа ёндашувни тозаланган оксилга антителалар ишлаб чиқариш ва уларни маълум бир генлар экспрессияси содир бўлаётган библиотекалар скрининги учун ишлатадилар.Кўпинча қандайлир битта тўқимада

синтезланаётган инсон оқсили учун шу тўқимадан ажратиб олинган мРНК асосида олинган кДНК-библиотека ДНК-нишон билан тўйинтирилган бўлади. Масалан, ошқозон ости беши Лангеранс оролчалари хужайраларида синтезланадиган асосий оқсил инсулин бўлиб, бу хужайралардан ажратилган 70 % мРНК ни айнан у кодлайди

Бироқ кДНКни тўйинтириш принципларини инсоннинг миқдори жуда кам ёки синтезланиш жойи номаълум булган оқсиллари учун қўллаш мумкин эмас.

Бу ҳолатда бошқа экспериментал ёндашувлар зарур бўлади

Таркибида α -, β - ва γ -интерферонлари (ИФ α , ИФ β , ИФ γ) бўлган инсон интерферонлари –табiiй оқсиллар бўлиб, уларнинг ҳар бирини терапевтик мақсадларда қўллаш мумкин. (10.3 жадв.). Уларнинг кДНКси ажратиб олинганда улар таркибида етарлича тегишли мРНК ва оқсиллар йўқлиги сабабли бўлган қийинчиликларни енгишга иакон берувчи янги ёндашувларни ишлаб чиқишга тўғри келди.

10.2 жадвал. Инсон касалликларини даволаш учун қўлланишга озиқ –овқат маҳсулотлари, медицинаментлар ва косметика воситаларини назорат қилиш бўйича Департамент(АҚШ) рўхсатини олган баъзи бир рекомбинантли оқсиллар :

Интерферонларнинг кДНК ажратиб чиқариш процедураси қуйидагилаодан иборат:

1. Инсон лейкоцитидан мРНК ажратиб олишди ва уларни ўлчамларига кўра фракцияларга ажратишди; тескари транскрипция ўтказишди ва плазмида рВR322н *Pst*I сайтига киритилди.

2. Олинган маҳсулот билан *Escherichia coli* ни трансформациялашди, ҳосил бўлган 6000 клонни 12 гуруҳга ажратдилар ҳар бирига 512 клондан тўғри келди. 3. Клонларнинг ҳар бир гуруҳи тозаланмаган препарат ИФ-мРНК билан гибридизланди.

4. Таркибида клонланган ДНК ва мРНК бўлган гибридлардан мРНК ажратиб олинди ва у оқсилни хужайрасиз синтезлаш системасида транслация қилинди.

5. Транслация натижасида олинган ҳар бир қоришманинг вирусга қарши интерферонли фаоллиги белгиланди. Интерферонли фаоллик кўрсатган гуруҳлар таркибида ИФ-мРНК билан гибридлашган кДНК клони мавжуд бўлган.

6. Позитив группалар ҳар бирида 64 тадан клон бўлган 8 та ним гуруҳларга ажратилди ва тестдан ўтказилди. Ним гуруҳларга ажратишни таркибида инсоннинг тўлиқ ўлчамдаги ИФ-кДНКси бўлган гуруҳ қолмагунга қадар давои эттирилди. Тегишли кДНКга мос бўлган кўп миқдордаги ИФ олиш зарур бўлса экспрессиянинг юқори даражасига етиш имконини берувчи *E. coli*-векторда субклонлаштириш мумкин.

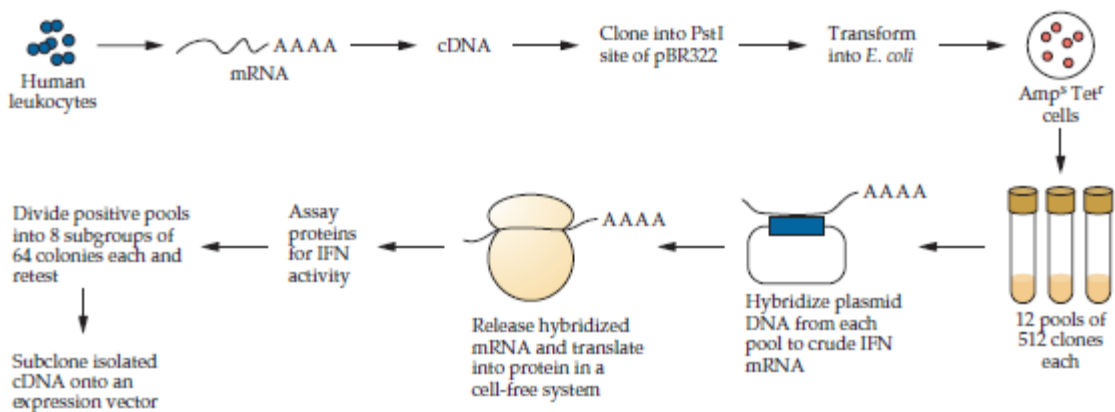
Инсонлар интерферонлари

Интерфероннинг биринчи гени 1980-х йй. бошларида олинган бўлиб, ўшандан бери бир неча турдаги интерферонлар топилган. Юқорида айтиб ўтилганидай, уларнинг биологик ва кимёвий хусусиятларига кўра уч гуруҳга ажратиш мумкин: ИФ α , ИФ β ва ИФ γ . ИФ α ва ИФ β вируслар ёки вирусли РНК препаратлари билан ишлов берилган хужайралар билан синтезланадилар, ИФ γ эса хужайраларни ўсишини стимуллаштирувчи моддаларга жавобан ишлаб чиқарилади. ИФ α минимум 15 та неаллел генларни ўз ичига олган генлар оиласи билан кодланади. ИФ β ва ИФ γ ҳар бири алоҳида бир ген билан кодланадилар. ИФ α подтиплари турли спецификага эга. Масалан, вирус билан ишлов берилган буқа хужайралари линиясидаги ИФ α_1 ва ИФ α_2 ларнинг самарадорлиги текшириб кўрилганда бу интерферонлар ўхшаш вирусга қарши фаоллик кўрсатадилар, инсоннинг вирус билан ишлов берилган хужайраларида эса ИФ α_2 интерферони ИФ α_1 га қараганда кўпроқ фаоллик кўрсатади. Агар вирусга қарши фаоллик сичқон хужайраларида текшириб кўрилса, унда ИФ α_2 интерферони ИФ α_1 га қараганда 30 марта камроқ фаоллик кўрсатади. Комбинацияланган хусусиятга эга ИФ яратишга ИФ α интерферон турлича эканлигини эътиборга олиб бир неча мартаба уриниб кўрилди.¹

¹ Bernard R. Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology – Washington

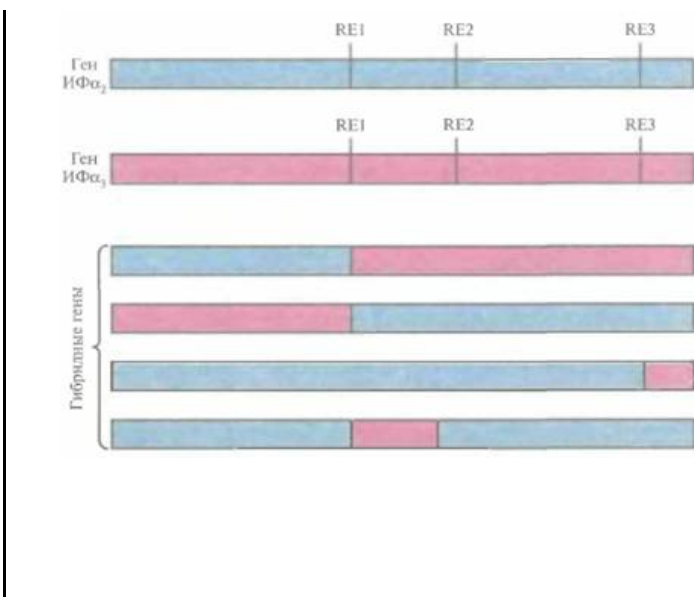
Назарий жиҳатдан турли ИФларнинг кетма-кетликлари қисмларини бирлаштириб бунга эришиш мумкин. Бу ҳар бир бошланғич оксилга нисбатан бошқача хусусиятларга эга бўлган гибрид оксилни ҳосил бўлишига олиб келади. ИФ α_1 ва ИФ α_2 ларнинг кДНКси солиштирилганда шунини кўрсатдики, улар 60, 92 ва 150 позицияларда бир хил рестрикция сайтларини кўрсатадилар. Уларнинг ҳар бирининг кДНКси парчаланиб кетгандан сўнг бу сайтларда ва бундан кейинги легириланиш фрагментларида бир неча гибрид

FIGURE 10.1 Overview of the protocol used to isolate IFN cDNA.



Бу генлар экспрессировали в *E. coli*, да синтезланган оксилларни экспрессияладилар, тозаладилар ва уларнинг биологик функцияларини тадқиқот килдилар. Гибрид ИФ ларнинг ҳимоя қилиш хусусиятларини сут эмизувчиларнинг хужайраларида текшириб кўрилганда шу нарса маълум бўлдики, улардан баъзи бирлари бош молекулаларга нисбатан кўпроқ фаоллик кўрсатар эканлар. Ундан ташқари, кўпгина гибрид ИФ лар назорат хужайраларда 2'—5'-олигоизоаденилат-синтетазалар индукцияладилар. Бу фермент 2'—5'-боғланган олигонуклеотидлар синтезида иштирок этадилар ва улар ўз навбатида, вирусли м РНК ни парчалаб юборувчи латент хужайрали эндорибонуклеазани фаоллаштирадилар. Бошқа гибрид ИФлар инсоннинг турли хил рак хужайраларидаги турли микроорганизмларда бош молекулаларга нисбатан кўпроқ антипролифератив фаоллик курсатади.

¹ Bernard R. Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology –Washington



Расм.10.1. ИФ□□, ИФ□□ ва тўрт гибрид генларнинг структураси.. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов ИФ□□ и ИФ□□ генларининг нуклеотид кетма-кетликлари солиштирилганда уларда рестрицирлайдиган (RE1, RE2, RE3) эндонуклеазалар учун сайтлар мавжудлиги аниқланди.

Бу сайтлардаги рестрикция ва олинган фрагментларнинг лигирланиши турли ҳилдаги гибрид генлар пайдо бўлишига олиб келади.Расмнинг қуйи қисмида уларнинг тўрттаси акс этирилган.¹

Инсонларнинг ўсиш гормони

Янги оксилларни трагетию конструирования новых белков путем замены функционал доменлар ёки йўналтирилган мутагенез ёрдамида алмаштириш йўли билан конструкциялаш стратегиясидан оксилнинг биологик таъсири кучайтириш ёки сусайтириш да фойдаланиш мумкин.Масалан,инсон бўйини ўсиш гормони (ГРЧ)турли ҳилдаги ҳужайралар билан яъни рецепторли ўсиш гормони ва пролактинли ўсиш гормони билан ҳам боғланиши мумкин. Даволаш жараёнида турли ножўя эффектларни олдини олиш мақсадида ГРЧ ни пролактинли рецептор билан боғланишига йўл қўймаслик керак. Ушбу рецептор билан боғланувчи ўсиш гормони молекулалари майдончаси ўзининг аминокислотали кетма-кетлиги билан пролактинли рецепторлар ўзаро таъсирга киришувчи майдонча билан фақат қисман тўғри келганлиги сабабли у билан боғланувчи гормонни танлаб олинган ҳолда камайтиради.Бунинг учун специфик мутагенез сайтидан фойдаланилди.Натижада,ГРЧни пролактинли рецептор билан юқори аффинли боғланиши учун зарур бўлган баъзи бир аминокислоталарнинг ёнбош гуруҳлари(Hi18, His-21 и Glu-174) - Zn^{2+} ионлари учун лигандларда маълум бир ўзгаришлар рўй берди.Модификацияланган ўсиш гормонлари фақатгина” ўзининг” рецептори билан боғланади.Олинган натижалар шубҳасиз қизиқиш уйғотади,лекин модификацияланган ГРЧ лардан клиникада фойдаланиш мумкинми йўқми бу ҳали ноаниқ.

Ген экспрессиясининг оптимизацияси

Янги оксил олиш етарли эмас унинг гени экспрессиясини оптималлаштириш муҳимдир.Аввалига тадқиқотчилар экспрессиянинг прокариотик ёки эукариотик системаларида етарли миқдорда аутентик оксил олиш имконини текшириб кўрадилар. Прокариотик системалар улар билан ишлаш арзонга ташиши ва ишлаб чиқариш унумдорлиги юқори бўлиши сабабли устунликка эгадирлар. Афсуски, барча микроорганизмлар ҳам бир ҳилда гетерологик оксилларнинг функционал шаклини синтезлай олмайдилар ,шу боис тегишли солиштириш баҳоланилишини олиб бориш

зарур. Инсоннинг интерлейкин-3 гени экспрессиясигурли хужайин-хужайраларда ўрганиб чиқилганда энг яхши “хўжайин” бўлиб *Bacillus licheniformis* (жадв.. 10.4)чиқди. *E. coli*нинг битта системасида экспрессиянинг бирмунча юқори даражасига эришилди, 20 кДа массада олинган оқсил массаси 15 кДа бўлган етилган аутентик оқсил эмас, балки интерлейкин-3нинг β-галактозидаза *E. coli* майдончаси билан кўшилиб кетишини ўзида акс эттиради. Одатда бунга ўхшаш химерли оқсилдан дори сифатида фойдаланиб бўлмайди.

Kluyveromyces lactis ва *Saccharomyces cerevisiae*, ачитқилари хужайралари, шунингдек инсон хужайралари ҳам интерлейкин-3ни гликозирлаши мумкин, бироқ улардаги экспрессия даражаси жуда паст бўлади. Гликозилирлаш интерлейкин-3 нинг фаоллигига таъсир кўрсатмайди, лекин уларнинг молекулалари ўлчамида сезиларли фарқ бўлади.

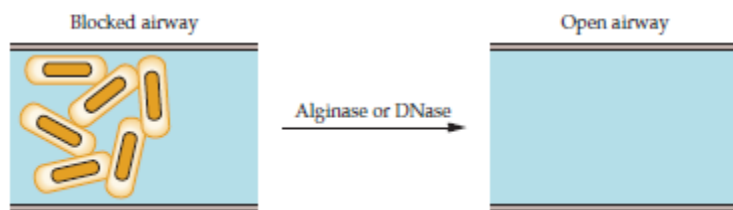


Расм 10.5. Инсоннинг ўсиш гормони нинг модификацияланган ва нативной шаклининг схематическое тасвири (ГРЧ). Олигонуклеотид-йўналтирилган мутагенез ёрдамида получена форма ГРЧ шакли олинди, пролактинли рецептор билан боғланиш қобилиятини йўқотган, бироқ ўсиш гормони рецепторига спецификани сақлаб қолган.

Альгинат-лиаза

Альгинат –бу бир катор денгиз ўтлари, шунингдек тупроқ ва денгиз бактериялари билан синтезланадиган полисахариддир. Унинг мономер бириклари иккита сахарид – β-D-маннуронат ва α-L-гулурунат бўлиб, уларнинг миқдори ва тақсимланиши конкрет бир альгинатнинг хусусиятларини белгилайди. Масалан, α-L-гулурунат қолдиқлари кальций ионларини боғлаш йўли билан буйраклар ўртасидаги ва буйрак ичидаги чокларни хосил қилади; β-D-маннуронат қолдиқлари эса бошқа металл ионларини боғлайдилар.

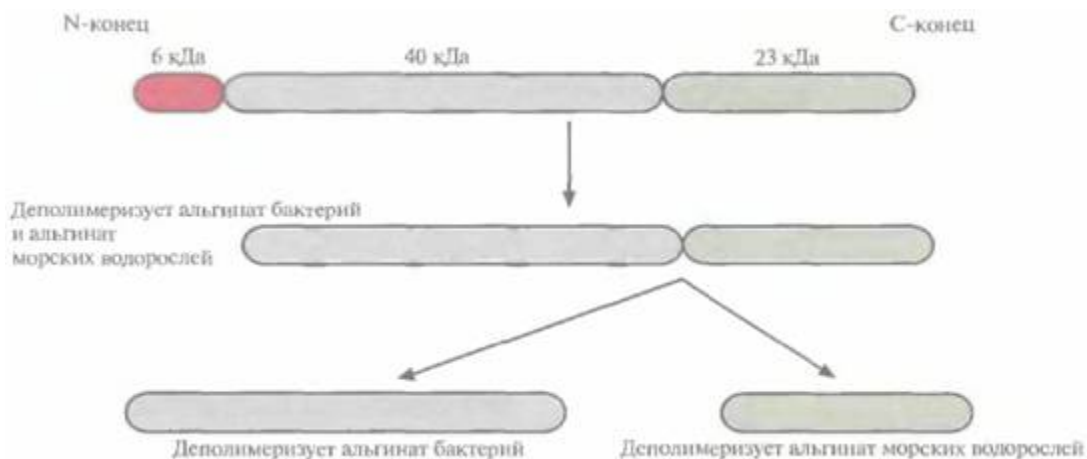
FIGURE 10.11 Schematic representation of a portion of a human lung occluded by a combination of live alginate-secreting bacterial cells, lysed bacterial cells, and leukocytes and their released DNA. This matrix may be digested by alginate lyase or DNase I.



Шундай чоклари бўлган альгинат қайишқоқлиги полисахарид молекулаларига тўғри пропорционал бўлган эластик гель хосил қилади. *Pseudomonas aeruginosa* шилимшиқ штаммлар муковисцидозом билан касалланган беморлардаги шилимшиқнинг қайишқоқлигини сезиларли даражада оширади.

Нафас йўллари тозалаш ва беморнинг ҳолатини яхшилаш учун ДНКаз I билан ишлов беришга қўшимча равишда альгинат-лиаза ёрдамида альгинатни деполимеризация қилиш керак. Ген альгинат-лиаза гени *Flavobacterium* sp., дан ушбу ферментни фаол ажратиш чикарувчи граммусбат тупроқ бактерияси ёрдамида олинди. отрицательной почвенной бактерии, активно вырабатывающей этот фермент. На основе *E. coli* асосида ыл создан банк клонов *Flavobacterium* клонлар банки яратилди ва улар орасида альгинат-лиазани таркибида қаттиқ альгинат бўлган муҳитга кальций ионлари қўшиб элаб чикариш йўли билан синтезлайдиганларининг скрининги ўтказилди.

Бундай шароитда муҳитдаги альгинат, альгинат-лиазани продуцирлайдиган колониядан ташқари чок хосил қилади ва хира тортиб қолади. находящийся в среде, за исключением того, который окружает продуцирующие альгинат-лиазу колонии, образует сшивки и становится мутным. Гидролизланган альгинат чок хосил қилиш хусусиятини йўқотади. шунинг учун альгинат-лиазани синтезлайдиган колония атрофидаги муҳит шаффоф бўлиб қолади. Мавжуд бўлган колонияларнинг биридаги клонланган ДНК фрагменти мол. массаси 69000га яқин бўлган полипептидни кодлайдиган очик ҳисоблаш рамкаси борлигини кўрсатди. Янада батафсил ўтказилган биокимёвий ва генетик тадқиқотлар шуни кўрсатдики,



Расм. 10.15. *E. coli* дан келиб чиққан рекомбинантли альгинат-лиаза *Flavobacterium* дан аввалги оқсил процессинги, мол. масси 69 кДа бўлган пептид 6 кДа оқсил парчаланиши натижасида мол. масси 63 кДа, бўлган, бактериал альгинат ва денгиз сув ўтлари альгинатини деполимерлаш хусусиятига эга оқсил процессинги. 63кДа оқсил парчаланганда мол. массаси 23 кДа бўлган, денгиз сув ўтлари альгинатини фаол деполимеризацияловчи оқсил ва бактериал альгинатни гидролизловчи, мол. массаси 40 кДа бўлган оқсил беради.

ушбу полипептид *Flavobacterium* sp. (расм. 10.3) томонидан ишлаб чиқарилувчи учта альгинатдан аввалги полипептид бўлиши мумкин. Аввалига қандайдир бир протеолитик фермент ундан массаси 6000га яқин бўлган N-концевой пептидни ажратиб олади. Қолган мол. массаси 63 000 га тенг бўлган фермент бактериялар ва денгиз сув ўтлари томонидан ишлаб чиқарилувчи альгинатни деполимерлаш хусусиятига эга.

Уни шундан сўнг кесилганда. При его последующем разрезании образуется продукт мол. массаси 23 000 бўлган, денгиз ўтлари альгинатини деполимерловчи махсулот ва мол. массаси 40000 бўлган, бактериялар альгинатини парчалайдиган фермент хосил бўлади. Мол. масси 40 000 бўлган, ферментларни катта миқдорда олиш учун уни кодловчи ДНК ни полимеразли занжирли реакция методида (ПЦР) амплифицирлашди, шундан сўнг *B. subtilis* дан ажралиб чиққан, α -амилазы *B. subtilis* нинг сигнал пептидини кодловчи пазмидали вектор га киритадилар

α -амилазы *B. subtilis*. Транскрипция пенициллиназа генининг экспрессияси системаси ёрдамида назорат қилинди. (расм. 10.4). Плазмидадан олинган *B. subtilis* хужайралар трансформацияси ва уларни таркибида альгинат бўлган қаттиқ мухитга кальций ионлари қўшиб сочиб юборилган пайтда катта ореолли колониялар хосил бўлди. Бундай колониялар суяқ мухитда етиштирилганда рекомбинантли альгинат-лиаза культурал мухитга ажралиб чиққан. Кейинги тестлар шуни кўрсатдики, бу фермент

муковисцидоз билан оғриган беморларнинг ўпкасидан ажралиб чиққан *P. aeruginosa* шилимшиқ штаммлар билан синтезланувчи альгинатларни суюлтириш хусусиятига эга.

Рекомбинантли альгинат –лиазанинг клиник тестдан ўтказилиши мақсадга мувофиқми йўқми, шуни аниқлаш учун қўшимча тадқиқотлар ўтказиш лозим.

.Инсоннинг кўп клонли антителалари

Иммунотерапиянинг тахмин қилинаётган истикболига қарамай ушбу метод кўп клонли хайвон антителаларидан фойдаланиш ва уларга керакли молекулаларни боғлаш билан боғлиқ бўлган бир қатор чекловларга эга. ,

Кимёвий боғланиш жараёнининг ўзи унчали самарали эмас, боғланиш тасодикий тарзда бўлади ундан ташқари, бунда терапияда қўлланиладиган плазминоген ёки бошқа моддалар активаторининг фермент активлиги пасайиши мумкин. Ва ниҳоят, препарат кўп матотаба киритилиши кўзда тутилаётган бўлса, қарама –қарши иммун реакциялар пайдо бўлишининг ва бемор сенсабилизациясининг олдини олиш мақсадида хайвоннинг эмас, балки инсоннинг антителасидан фойдаланиш зарур. Қарама-қарши реакция чақирмайдиган махсус антитеоаоар яратиш мушкул иш. Сабаби анъанавий гибриидом технологияси билан инсон антителасини олишда бир қатор муаммоларга дуч келинади.

- Инсоннинг сичқон мисломаси ужайралари билан қўшилиб олинган хужайралар барқарор эмас ва шу сабабли кўп клонли инсон антителасини ишлаб чиқара олувчи хужайра олиш қийин.

- Сичқон миеломасини ўрнини босувчи инсон миеломасининг самарали хужайра линияларини олишга ҳозирча муваффақ бўлинмади.

- Инсоннинг турли антигенлар ёрдамида иммунизациялаш этика нуқтаи назаридан ўтказилмайди. человека различными антигенами не проводится по соображениям этического характера. Шундай қилиб, инсон антителасини олиш учун бошқа ёндашувлар ишлаб чиқиш зарур. Схемаларнинг бирида фаол равишда специфик антителаларни ишлаб чиқарувчи, инсоннинг В-лимфоцитларига флуоресцентли белгиланган антиген билан ишлов берилди, сўнгра хужайрали сортер ёрдамида шу антителаларни ишлаб чиқарувчи В-лимфоцитлар наъмунасини билан тўйинтирилди. В-хужайралар микроорганизмларда ўсишини тезлаштириш учун уларга Эпштейн—Барр вируси ўтказилди. В –хужайралар билан трансформацияланган баъзи бир клонлар селекцияланувчи антигенлар билан ўзаро таъсир қилувчи кўп

клонли инсон антителаларини ишлаб чиқаради. Афсуски, кўп клонли антителалар чиқиши унча кўп бўлмади ва уларнинг боғланиш активлиги паст эди.

Назорат саволлари:

1. Оқсиллар терапиясига изох беринг
2. кДНК интерферонларини ажратиб олиш қандай амалга оширилади?
3. Инсонлар интерферонлари қандай мақсадларда фойдаланилади?
4. Инсонларнинг ўсиш гормони олиш имкониятлари
5. Ген экспрессиясининг оптимизацияси қандай амалга оширилади?
6. ДНКза I ферменти қандай мақсадларда фойдаланилади
7. Альгинат-лиаза ферменти қандай олинади?
8. Инсоннинг кўп клонли антителалари қандай олинади?

Фойдаланиладиган адабиётлар :

1. Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology/ Washington 2010. 1020 p
2. Artikova R.M., Murodova S.S. Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi.Darslik.T.: Fan va texnologiya. 2010.- 276 b.
3. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
4. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo'stoni.2013.-223b
5. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик -Т.: Таълим, 2009. -528 б.

IV. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ МАТЕРИАЛЛАРИ

1-амалий машғулот:

Ўсимликлардан хужайра органиодларини ажратиш

Ишдан мақсад: Ўсимликларни меъерий ривожланиш жараёнини ядро, хлоропласт ва митохондрия геноми ўзаро ҳамкорликда бошқаради. Бу ҳамкорликдаги жараённинг молекуляр механизмини билиш учун хужайра органоидлари геномининг структуравий ва функционал хоссалари алоҳида ҳамда тўлиқ ўрганилиши лозим. Бу эса ўз навбатида хужайра органоидларини тоза ҳолда ажратиб олишни тақозо этади.

1-иш. Ғўза ўсимлиги хужайрасидан ядро ажратиб олиш услуги.

Материал ва асбоб ускуналар. 50 г икки кунлик ғўза ўсимтаси, 100 мл 70% спирт, 1 метр капрон, гомогенизатор, К-23, К-32 центрифугалари пробиркалари билаи, 2 та стакан, 2 та колба.

Ишни бажариш учун намуна: 50 г 2-кунлик ғўза ўсимтаси 70% спиртда 2 дақиқа сақлангандан сўнг дистилланган сувда ювилади. Шу йўсинда стерилланган ғўза ўсимтасига 150 мл А буфери солинади ва 30 сек. давомида юқори айланишга эга бўлган (25000-30000 айл/дақ) ўткир пичоқли гомогенизаторда Майдаланади. Гомогенат 4 қаватли стерилланган капрон ёрдамида филтрланади ва хужайра бўлақларини олиб ташлаш учун 10 дақиқа 4⁰С хароратда 600 айл./дав; тезликда К-23, центрифугасида айлантирилади ва чўкма ташлаб юборилади. Супернатант 1800 айл/дақ. тўзликда 10 дақиқа, 4⁰С хароратда К-23 центрифугасида айлантирилади. Чўкма 10 мл Б буфери суспензия ҳолатига келтирилади ва қатламли сахароза (1,6; 2,2 М) градиентининг юқори қисмига эҳтиёткорлик билан қуйилади. Сахароза эритмаси В буфери ёрдамида тайёрланади: ҳосил қилинган градиент 22000 айл/дақ. тезликда 4⁰С хароратда 2 соат К-32 центрифугасида айлантирилади (бакет роторда) Чўкмада шикастланмаган функционал фаол ядро жойланади.

Буфер эритмалар:

- ❖ ***Буфер А:*** 0,4 М маннит; 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 3 мМ ЭДТА; 0,1 % Альбумин (хайвон зардобидан олинган); 1% ПВП ; 1 мМ октанол
- ❖ ***Буфер Б:*** 50 мМ трис - НСl, рН7,5; 10 II NaCl₃; 10 мМ MgCl₂.
- ❖ ***Буфер В:*** 50 мМ трис - НСl, рН 7,5; 25 мМ NaCl; 10 мМ MgCl₂.

2-иш. Ғўза ўсимлиги хужайрасидан хлоропласт олиш.

Материал ва асбоб ускуналар.

100 г 14 кунлик ғўза барглари, 100 мл 70% спирт, 1 метр капрон, гомогенизатор, К-23, К-32 центрифугалари пробиркалари билан, 2 та стакан; 2 та колба.

Ишни бажариш учун намуна:

100 г 14-кунлик ғўза ўсимлиги барги 70 % спиртга 2 дақиқага солиб қуйилади сўнг дистилланган сувда ювилади. Стерилланган ғўза барги 400 мл А буферда 30 сония давомида юқори айланиш тезлигига эга бўлган гомогенизаторда майдаланади. Гомогенат 4 қаватли стерилланган капрон ёрдамида филтрланади ва 1800 айл/дақ. тезликда центрифугаланади, Бунда хужайра бўлақлари ва ядро чўкмага тушади. Супернатантдан хлоропласт 2500 айд/дақ. тезликда центрифугалаш йўли билан олинади. Чўкма 20 мл А буфериде суспензия ҳолатига келтирилади ва сахароза градиенти ёрдамида (0,5М; 0,8М; 1,6М; 2,0М;) тозаланеди. Сахароза градиети В буфери ёрдамида тайёрланади. Ҳосил бўлган градиент 22000 айл/дақ. тезликда центрифугаланганда хлоропласт 1,6 М сахароза қатламининг юқори қисмига жойланади. Пипетка ёрдамида хлоропласт қатлами эҳтиёткорлик билан олинади ва А буферда 3 марта суюлтирилади. Суюлтирилган хлоропласт

суспензияси 2500 айл/дақ. тезликда центрифугалаш йўли билан тоза хлоропласт чўкмаси олинади.

Буфер эритмалар:

- ❖ **Буфер А:** 0,4 М маннит; 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 3 мМ ЭДТА; 0,1 % Альбумин (хайвон зардобидан олинган); 1% ПВП ; 1 мМ октанол
- ❖ **Буфер Б:** 50 мМ трис - НСl, рН 7,5; 25 мМ NaCl; 10 мМ MgCl₂.

3-иш. Ғўза ўсимлиги хужайрасидан митохондрия олиш

Материал ва асбоб ўскўналар. 50 г икки кунлик ғўза ўсимтаси, 100 мл 70% спирт, 1 метр капрон, гомогенизатор, К-23, К-32 центрифугалари, пробиркалари билан, 2 та стакан, 2 та колба.

Ишни бажариш учўн намуна: 50 г 2-кунлик ғўза ўсимтаси худди ядро ажратиш услубидагидек стерилланади, майдаланади ва филтрланади. Олинган гомогенат 10 дақиқа давомида 3000 айл./дақ тезликда центрифугаланиб хужайра бўлаклари 5 ядро ва хлоропластдан халос бўлади. Супернатант 15 000 айл/дақ. тезликда 45 дақиқа центрифугаланиб митохондрия чўктириб олинади. Чўкма 20 мл А буферда суспензия ҳолатига келтирилиб қатламли саҳароза градиентида (0,6; 0,9; 1,6 М) 22000 айл./дақ.-тезликда 2 соат центрифугалаш йўли билан (шикастланган митохондриялардан, крахмал доначаларидан) тозалаб олинади. Тоза митохондрия 1,6 М саҳароза қатламининг тепа қисмида жойлашади. Пипетка ёрдамида митохондрия қатлами эҳтиёткорлик билан олиниб, А буферда 3 марта суюлтирилади ва 15000 айл/дақ. тезликда центрифугалаш йўли билан тоза митохондрия чўктириб олинади.

Буфер эритмалар:

- ❖ **Буфер А:** 0,4 М маннит; 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 3 мМ ЭДТА; 0,1 % Альбумин (хайвон зардобидан олинган); 1% ПВП ; 1 мМ октанол

Назорат саволлари:

1. Ўсимли хужайрасидан ядро ажратиб олиш қандай амалга оширилади?
2. Ўсимликлардан хужайра органиодларини ажратишдан мақсад нима?
3. Гомогенат қандай олинади?
4. Буфер эритмалар қандай тайёрланади?
5. Ўсимлиг хужайрасидан хлоропласт олиш жараёнлари қандай амалга оширилади?
6. Супернатантқандай олинади

Фойдаланилган адабиётлар рўйхати

1. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.

2. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo'stoni.2013.-223b
3. P.M.Артикова, Н.А.Хўжамшукуров “Молекуляр биология” фанидан лаборатория машғулоти учун услубий қўлланма Тошкент.: ТКТИ.2013.62 б.
4. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан лаборатория машғулоти учун ўқув-услубий қўлланма. Тошкент.: ТКТИ.2013.20 .
5. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан амалий машғулоти учун ўқув-услубий қўлланма; Тошкент.: ТКТИ.2013. 32б.

2. Ўсимлик хужайрасидан нуклеин кислотлар ажратиш усулларини ўрганиш

Ишдан мақсад: Генларнинг молекуляр даражада ўрганишда асосий вазифа ДНК на РНК препаратларини олишдир. Рекомбинант ДНК технологиясига асосланган ген муҳандислиги тажрибаларида ажратилган ДНК геном клонларининг банкини яратишда, ажратилган РНК хусусан мРНК кДНК библиотекасини яратиш, биринчидан фойдали генларни аниқлашда, иккинчидан геном банкидаги клонлардан шу генларни топиш учун зондларга эга бўлиш учун зарурдир.

Қизиқтирувчи ген клонлаштирилиб, шу геннинг структураси ва хусусиятлари ўрганилгандан сўнг, шу клонлаштирилган генни яна ўсимлик хужайрасига трансформация қилиш мумкин. ДНК ва РНК олиш муолажалари трансформацияланган ўсимлик тўқималарида ва бутун регенирацияланган ўсимликларда экзоген ДНК экспрессиясини ўрганишда асосий қурол бўлиб хизмат қилади.

Ген муҳандислигила генларни ажратиш олиш. уларнинг структурасини, экспрессиясини ўрганишда ДНКни тоза ҳолда ажратиш олиш муҳим аҳамиятга эга. ДНКни ажратиш олишда чўкма ва хужайраларни майдалаш асосий омиллардан бири ҳисобланади. Бундан ташқари, ўсимлик экстракти таркибидаги жуда катта миқдордаги танинлар, полисахаридлар, пигментлар юқори молекуляр оғирликдаги ДНК молекуласини ажратиш олишда қийинчиликлар туғдиради.

Буларнинг ҳаммаси ДНКнинг миқдорини спектрофотометрда ўлчашда нотўғри натижа чиқишига олиб келади. Ундан ташқари рестрикция-модификация ферментларининг фаоллигини чегаралайди. Бу Саузерн гибридизациялашда, генларни клонланштиришда халақит беради.

Хужайра майдалангандан сўнг центрифуга ёрдамида майдаланган хужайра мембраналари ва оксиллар денатурация қилиниб, чўктирилади. Бунинг учун хлороформ-фенол-изоамил спирти аралашмаси ишлатилади.

Масаланинг қўйилиши: Кўп миқдордаги ДНКни тозалаш зарур бўлса цезий хлориднинг сузиш зичлигида ультрацентрифугалаш услубида мақсадга эришиш мумкин. ДНК диализ ёрдамида тузлардан тозалаб олинадиган этил спиртида чўктирилади. Шу босқичда ДНКни РНКдан ва бошқа ортикча нарсалардан тозалаб олинадиган ТЕ буферига эритилиб Спектрофотометрда миқдори ўлчанади, сўнг агарозали гел электрофорези ёрдамида тозалиги аникланади.

1-иш. Ўсимлик баргидан ДНК ажратилиши.

Материал ва асбоб-ускуналар: 4 гр 14-кунлик ғўза барглари, ҳавонча, центрифуга, центрифуга стаканлари, 2 та колба, 2 та стакан, шиша таёқча, рефрактометр, диализ қоғози, магнитли аралаштиргич, спектрофотометр, музлатгич.

Ишни бажариш учун намуна:

1. 4 г барг ҳавончада сую азот ёрдамида кукун ҳолига келгунча майдаланади.
2. Кукунни 50 мл буфер В билан бирга колбага солинади, 20 дақиқа давомида аралаштириб турилади.
3. 30 мл фенол қўшилади ва яна аралаштирилади (30 дақ.)
4. К-23 центрифугасида 10^0 Сда 5000 айл./дақ тезликда 1 соат айлантдирилади.
5. Устки қисми тоза колбага олиниб тенг миқдорда фенол-хлороформ аралашмаси солиниб, 10 дақиқа аралаштирилади.
6. 30 дақ. 10^0 да 5000 айл./дақ тезликда центрифугаланади.
7. Устки қисмини олиб тенг миқдорда хлороформ қўшилиб, 10 дақиқа аралаштирилади ва яна центрифугалаш йўли билан фазаларга бўлинади.
8. Суюқ қисми, 2 миқдор этил спирти солинган стаканга аста секинлик билан аралаштирилиб музлатгичга қўйилади. «Медуза» ҳосил бўлгандан сўнг таёқчага ўраб олиниб 10 мл ДНК эритувчи (ТЕ) буферига стаканга эритилади.
9. ДНК эритмасига этидий бромид 02 мг/мл ва 1,55 г/мл цезий хлор солинади (синиш кўрсаткичи 1,3860).
10. Суюқлик центрифуга пробиркаларига солинади тенглаштириб оғзи маҳкамлангандан сўнг 20 соат 50000 айл./дақ. тезликда (15^0 С) центрифугаланади.
11. УФ нурлари остида ДНК шприц ёрдамида тортиб олинади.
12. ДНКни этидий бромидидан изоамил спиртида 5 марта экстракция қилиб тозаланади.

13. Цезий хлордан ТЕ буферидан 4⁰С да 24 соат агнитли аралаштиргичда буферни бир неча марта алмаштириб диализ қилиш йўли билан тозаланади.

14. ДНК миқдорини спектрофотометрда 260 нм тўлқин узунлигида кварцли кювета ўлчанади.

В буфери:

0,2 М NaCl

0,05 I HCl

0,01 М ЭДТА

0,01 М ДДТ

0,2% SDS

Фенол, 0,1 М NaCl; 0,1 М трис–HCl, pH 8,0; 0,01 М ЭДТА билан тўйинтирилади

Хлороформ: изоамил спирти (24:1)

ТЕ-буфери: 10 мМ трис–HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА

4,5 г цезий хлориднинг ТЕ буферда эритмаси.

Этидий бромид эритмаси 10 мг/мл.

Диализ учун буфер: 10 мМ трис pH 8,0, 1 мМ ЭДТА

2-иш. Ўсимлик хужайрасидан РНК ажратиш.

Материал ва асбоб-ускуналар: 5 г барг, суяқ азот, ҳавонча, 2 та 250 мл колба, 100 мл стакан, 1 м дока, стол центрифугаси, центрифуга пробиркалари, магнитли аралаштиргич, резина нокчага уланган пипетка, музлатгич, муз хаммоми, спектрофотометр.

Ишни бажариш учун намуна:

1. 5 г ўсимлик материали суяқ азот ёрдамида музлатилади ва ҳавончада кукун ҳолига келтирилади ва 250 мл-ли таги юмалоқ колбага солинади.
2. 50 мл буфер Г солинади ва тез аралаштириб, 4 қават докадан ўтказилади. 8000 айл/дақ. Тезликда 10 дақиқа -4⁰С центрифугаланади.
3. Устки суяқ қисмини олиб 1/20 ҳажми 10% ли SDS (охирги концентрацияси 0,5%) солинади.
4. Тенг миқдорда сув билан тўйинтирилган фенол, тенг миқдорда хлороформ: изоамил спирти аралашмаси (24:1) солинади ва магнитли аралаштиргичлида 20 дақиқа хона хароратида аралаштирилади. Сўнг центрифуга пробиркаларига солиб стол центрифугасида 2500 g –да 10 дақиқа давомида центрифугаланади. Денатурацияга учраган оксиллар органик суяқлик ва сув қаватлари ўртасида интерфаза ҳосил қилади.
5. Устки суяқ қисми ва интерфаза резина нокчага уланган пипетка ёрдамида 250 мл колбага тортиб олинади ва тенг миқдорда хлороформ солиб 10 дақ. давомида аралаштирилади.

6. Центрифугаланиб фазаларга ажратилади ва устки суюқ қисми тоза 100 мл-ли стаканга олиниб, 1/20 ҳажм 3 М натрий ацетат ва 2 ҳажм этанол солиб 20⁰С ҳароратда кеча давомида нуклеин кислоталар чўктирилади.
7. Центрифугаланиб, чўкма -4⁰С да икки марта 1-2 мл рН 6, 0,3 М натрий ацетат билан ювилади (этанол ва ДНК дан тозалаш учун)
8. Чўкма икки марта таркибида 0,1 М калий ацетат бўлган 80%ли этанол билан ювилади ва шу эритмада -20⁰Сда сақланади. РНКнинг миқдорини чўкмани олдиндан қурииб, дистилланган сувда эритиб спектрофотометрда аниқлаш мумкин. Олинган эритманинг оптик зичлигини 260 нм ($103_{260}=40$ мкг/мл²) ўлчанади. Препаратнинг тозаллигини баҳолаш учун Уф нурларининг ютилиши спектри ўлчанади: тоза РНК учун - $03_{260}: 03_{260}=2,0$ бўлиши керак.

Буфер эритмалар ва реактивлар:

Буфер Г: 0,2 М трис-НСl, рН 8,5; 0,2 М сахароза; 30 мМ магний ацетат; 60 мМ КСl. Эритмалар автоклавда стерилланиб суюқ ҳолда ёки -20⁰С да музлатиб сақланади. Ишлатишдан олдин 1% гача поливинилпиролон ва 0,31% гача 2-меркаптоэтанол қўшилади.

Хлороформ: изоамил спирти (24:1), сувда тўйинтирилган фенол, 3 М натрий ацетат, 0,1М калий ацетат.

Назорат саволлари:

1. Нуклеин кислотлар ажратишнинг қандай усулларини биласиз?
2. Ўсимлик баргидан ДНК ажратиш қандай амалга оширилади?
3. Ўсимлик хужайрасидан РНК ажратиш қандай амалга оширилади?
4. ДНК ажратиш учун фойдаланиладиган буфернинг таркиби нималардан иборат?
5. РНК ажратиш учун фойдаланиладиган буфернинг таркиби нималардан иборат?

Фойдаланиладиган адабиётлар

1. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
2. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo'stoni.2013.-223b
3. P.M.Артикова, Н.А.Хўжамшукуров “Молекуляр биология” фанидан лаборатория машғулотлари учун услубий қўлланма Тошкент.: ТКТИ.2013.62 б.
4. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан лаборатория
5. машғулотлари учун ўқув-услубий қўлланма. Тошкент.: ТКТИ.2013.20 б.
6. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан амалий машғулотлар учун ўқув-услубий қўлланма; Тошкент.: ТКТИ.2013. 32б.

2-амалий машғулот:

Гел электрофорез ёрдамида оқсиллар спектрини ўрганиш

Ишдан мақсад: Оқсиллар электрофорези табиий аралаш моддаларнинг таркибини, ажратиб олинган препаратларнинг фракцияларини, субфракцияларини, ажратиб олинган оқсилларининг спектрини аниқлашда катта аҳамиятга эга. Оқсиллар электрофорезида зарядга эга бўлган оқсил молекулаларининг электр майдонида аниқ бир ҳаракат тезлигида анодга ёки катодга қараб ҳаракати тушинилади.

Масаланинг қўйилиши: Оқсилларнинг ҳаракат йўналиши молекула ёки полипептиллارнинг изо-электрик нуқтасига ва электрофорез учун ишлаталадиган буфернинг рНига боғлиқ. Оқсилларни ишқорий ёки кислотали гелда электрофорез қилиш мумкин. Ҳар қандай шароитда ҳам оқсиллар юқоридан пастга қараб ҳаракат қилади.

Материал ва асбоб ва ускуналар: Оқсил намунаси, вертикал электрофорез аппарати, четлари резина прокладка билан ёпилган шиша камера, тароқча. электродлар, доимий ток манбаи, 7 та 100 мл-ли , 1 та 2 л-ли колбалар, шприц, гелни бўйаш учун идиш.

Ишни бажариш учун намуна:

Гел тайёрлаш: Полиакрамид гелъ - атрофи резинка тиқин билан ёпилган 2 та шиша ойна орасига қўйилади. Гелъ 1- йирик тешикли, 2- майда тешикли қисмлардан иборат бўлади. Юқори йирик тешикли қисмида оқсилларнинг микқори йиғилиб, пастки майда гелда фракцияларга ажратилади. (зарядга ва молекулаларнинг ўлчамга қараб).

Майда тешикли гел тайёрлаш учун 1 ҳажм А эритмаси, 2 ҳажм В эритмаси, 1 ҳажм дистилланган сув (рН 8,9), 2 ҳажм, ПСА аралаштирилиб пластинка орасига қўйилади. Гелга ҳаво кириб қолмаслиги ва текис чиқиши учун аралашма устига шприц ёрдамида 1 см гача сув солинади. Сўнг 37⁰С ҳароратли термостатга қўйиб қўйилади, Полимеризация яъни (гелнинг қотиши) тахминан 1 соат давом этади. Полимеризациядан сўнг гел устидаги сув шприц ёрдамида тортиб олинади ва иккинчи гелъ солинади. Йирик тешикли гелъ солингандан сўнг, оқсил эритмаси солинадиган чуқурча ҳосил қилиш учун тишлари 0,5 см тароқча гелга ботириб қўйилади. Йирик порали гелни тайёрлаш учун 1 ҳажм В эритмаси, 2 ҳажм Г эритмаси, 4 ҳажм Е эритмаси, 1 ҳажм Д эритмаси аралаштирилади. Йирик порали гелъ 37⁰С ҳароратли термостатда 20-25 дақиқада полимеризация бўлади. Полимеризация тугагандан сўнг тароқча олиниб, тишларидан ҳосил бўлган чуқурча сув билан ювилади, сўнг ўрганилаётган оқсил препарати солинади (0,1 мг). Оқсил эритмаси буфер билан аралашиб кетмаслиги учун 40%

сахароза ва оксил билан бирикмайдиган буюқ солинадн. Ишқорий гелда бромфенолкўк (0,001 г 100 мл сувдаги эритмаси), кислотали гелда эса метил кўк ёки метил яшил буюғи ишлаталади. Ҳар битта ячейкага (чуқурчагача) 4 мА ток кучи берилади. Электрофорез 45-60 дақиқа давом этади. Электрофорез тутагандан сўнг гел 01%ли амидо қора буюғида 20 дақ. буюлади. Гел буюлганидан сўнг сув билан ювиб, 7% ли сирка кислотасини сувдаги эритмасига солиб кўйилади.

Гел тайёрлаш учун эритмалар:

- ❖ **А – эритмаси:** 1 НСl - 48,0 мл, трис-36,0 гр, ТЭМЭД- 0,23 мл дистилланган сув билан 100 мл гача олиб борилади ,
 - ❖ **В-эритмаси:** Акриламид -28,0 гр, Метилен бис акриламид (БИС)- 0,8г-, дистилланган сув 100 мл гача.
 - ❖ **ПСА - эритмаси:** Пересульфатаммоний - 0,14 г дист. сув 100 мл
 - ❖ **Б – эритмаси:** 1Н НСl -4,4 мл, трис-5,98 г, ТЭМЭД-0,46 мл дист. сув 100 мл гача.
 - ❖ **Г- эритмаси:** Акриламид 10 г, БИС -2,5 г., дист. сув 100 мл-гача.
 - ❖ **Электрод буфери:** Трис – 1,2 г, Глицин – 5,8 г. 200(1 мл гача сув
- Буёвчи ва фиксация қилувчи эритма:** 0,1 г Амидоқора 100 мл 7%ли сирка кислота.

Назорат саволлари:

1. Оксил электрофорези қандай ускуналарда амалга оширилади?
2. Электрофорез аппарати таркибига нималар киради?
3. Оксилни электрофорез қилишдан мақсад нима?
4. Оксилларни электрофорези учун буфернинг таркиби нималардан иборат?

Фойдаланиладиган адабиётлар

1. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
2. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo'stoni.2013.-223b
3. P.M.Артикова, Н.А.Хўжамшукуров “Молекуляр биология” фанидан лаборатория машғулоти учун услубий қўлланма Тошкент.: ТКТИ.2013.62 б.
4. P.M.Артикова, Ген ва хужайра инженерлиги фанидан лаборатория машғулоти учун ўқув-услубий қўлланма. Тошкент.: ТКТИ.2013.20 б.
6. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан амалий машғулоти учун ўқув-услубий қўлланма; Тошкент.: ТКТИ.2013. 32б.

3-амалий машғулоти:

Протопластлари олиш ва бир бирига қўшилишини ўрганиш

Протопластларни олиш усули.

Ишдан мақсад: Замбуруғлардан протопласт олиш учун ток шиллик курти ошқозонидан ажратиб олинадиган хитиназа ферментидан фойдаланилади. Хозирги пайтда бир қатор микроорганизмлардан литик ферментлар ажратиб олиш йўлга қўйилган. Булар жумласига *Streptomyces*, *Arthrobacter luteus*, *Bacillus circulans*, *Trichoderma harzianum*, *Actinomyces*лар киради.

Шунинг учун микропрепаратлардан истаганча протопласт ажратиб олиш имконияти зарурдир. Протопласт олишда литик ферментлардан ташқари осмотик стабилизаторлар ҳам катта вазифани бажариди. Хужайра деворларидаги осмотик тўсиқ протопластларда табиий муҳофазани йўқотганлиги туфайли осмотик таъсирга сезгир бўлиб қолади.

Масаланинг қўйилиши: Стабилизаторсиз озикада хужайрани ўраб турувчи нозик цитоплазматик мембрана фермент таъсирида тез парчаланadi. Протопластларнинг ёрилишини олдини олиш мақсадида литик бирикмага хил моддалар қўшилади, бу моддалар суюқликдаги осмотик босимни хужайра ичидаги суюқлик босимига тенглаштирилади, шунинг билан бирга стабил жараёни таъминлайди. Стабилизатор вазифасини ўтовчи моддаларнинг миқдори самарасига катта таъсир кўрсатади. Стабилизатор сифатида қанд, кўп атомли спиртлар, неорганик бирикмалар, мангий, сорбит, раминоза, мальтоза, сахароза, KCl_2 , $MgCl_2$, $NaCl$, NH_4Cl , $MgSO_4$ ва бошқалар ишлатилади. Стабилизаторнинг миқдори замбуруғларнинг турларига қараб 0,4 дан 2,0 М гача бўлиши мумкин. Стабилизаторларнинг миқдори тўғри танланса литик ферментнинг таъсири кучаяди, Протопластлар олиш имконияти самарали кечади. Протопласт олиш учун суюқ бой озикада

замбуруғ тайёрланади, Бой озиканинг таркиби - Чапека озикаси, пептон - 10 г/л , ачитқи атолизати - 1 г/л. Микроорганизмар 16-18 соат давомида 30⁰ С хароратда чайқатиш усули билан ўстирилади, шунинг билан бирга микроорганизмлар суюқ озикада чайқатгичда кечқурундан машғулот ўтказгунгача ўстирилади.

Ишни бажариш учун намуна:

1. Биообъектларни танлаш

Мақсаддаги махсулотни синтез қилувчи биообъект олинади масалан, эукариотцефалоспоринлар продуценти *Acrimonium chrysogenum* ва шу махсулотни продирловчи хусусиятига эга қилиш учун мўлжалланган иккинчи биообъект прокариот *E. coli*).

2. Хужайра деворини ферментлар билан ишлов бериш.

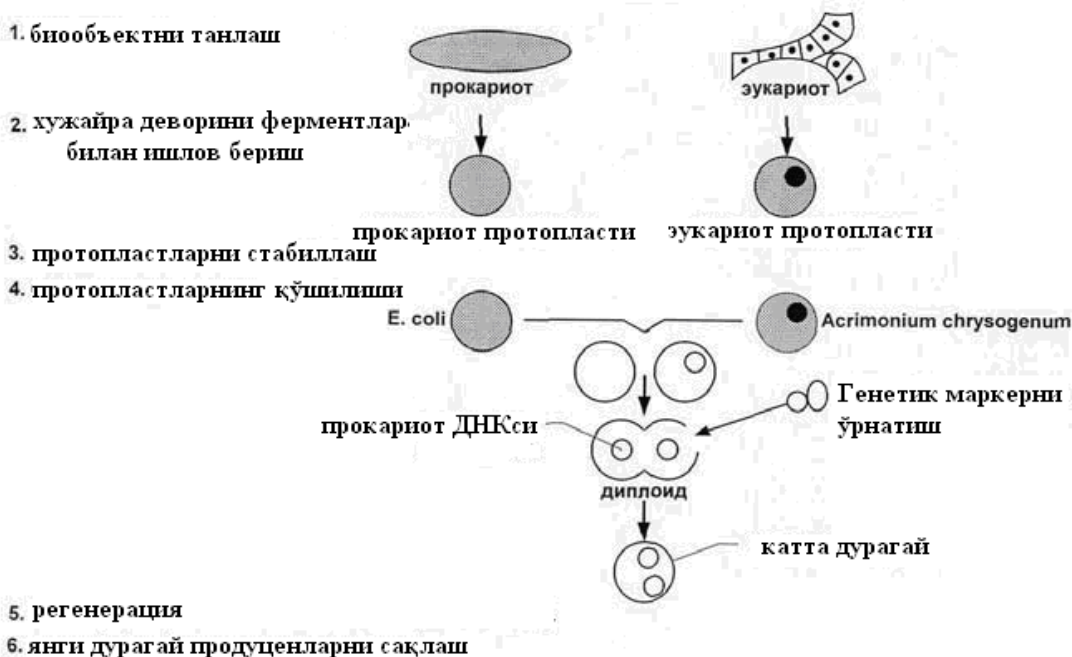
3. Протопластларни стабиллаш

10% ли маннит, сахароза натрий хлорид тутувчи гипертоник эритма. Эритманинг ион кучи хисобига хужайра тургор ҳолатида бўлади, ёрилиб кетмайди, шунингдек эритма билан ферментлардан ювилади.

4. Протопластларнинг қўшилиши.

Протопластларнинг қўшилиши полиэтиленгликолда ПАВ мухитида амалга оширилади, унда хужайра цитоплазмаси бузилади ва иккита протопластлар қўшилади. Бу жараён аста-секин амалга ошади.

протопластлар олиш техникаси



Хужайралар қўшилишини енгиллаштириш учун хужайраларни компитентли қилиш лозим. Бунинг учун:

1. хужайралар оғир металллар билан ишлов берилади
2. хужайраларни тез музлатиб эритилади
3. хужайралар ферментлар билан ишлов берилади.

Протопластлар қўшилганда иккита тўплам хромосомали яъни диплоид тўплам (дурагай ҳосил бўлганда ДНК рекомбинацияси содир бўлади)га эга бўлган протопластлар ҳосил бўлади.

5. Регенерациялаш (протопластнинг хужайра деворини тиклаш).

Олинган дурагай эукариотлар ва прокариотлар учун зарур бўлган компонентлар тутувчи қаттиқ озиқа мухитига экилади. Бунда хужайра қобиғи тикланади.

Дурагай хужайрани дурагай бўлмаган хужайрадан фарқлаш учун 4-чи босқичда маркер ген тутувчи яна битта протопласт киритилади. Маркер – қайсидир ферментнинг генининг бир қисмини тутувчи, озиқа мухитига экилганда белги берувчидир бу ҳолатда маркер бўлиб β-лактамаза хизмат қилади. Озиқа мухитига бензилпенициллин қўшилганда фақат β-лактамаза тутувчи хужайралар яъни дурагайлар ўсади.

Янги продуцентларнинг дурагайларини сақлаш

Назорат саволлари:

1. Протопластларни олишнинг қандай усуллари мавжуд?
2. Протопластлар ажраишда қандай ферментлардан фойдаланилади?
3. Протопластларни ажратиш усуллари босқичлари
4. Протопластлар қўшилиши қандай олиб борилади?
5. Электрофорез аппарати таркибига нималар киради?
6. Оқсилни электрофорез қилишдан мақсад нима?
7. Оқсилларни электрофорези учун буфернинг таркиби нималардан иборат?

Фойдаланиладиган адабиётлар

1. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
2. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo'stoni.2013.-223b
3. P.M.Артикова, Н.А.Хўжамшукуров “Молекуляр биология” фанидан лаборатория машғулоти учун услубий қўлланма Тошкент.: ТКТИ.2013.62 б.
4. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан лаборатория машғулоти учун услубий қўлланма. Тошкент.: ТКТИ.2013.20 б.
6. P.M.Артикова Ген ва хужайра инженерлиги фанидан амалий машғулоти учун услубий қўлланма; Тошкент.: ТКТИ.2013. 32б.

V. КЕЙСЛАР БАНКИ



«Кейс-стади» (Case-study) – моделлаштирилган ва реал вазиятларни ечиш ва муҳокама қилиш учун таҳлилларга асосланган, ўқитиш тизими. “Кейс-стади” методи ўзига индивидуал, гуҳух ва коллектив ривожланиш ўз ичига олган, ривожланаётган ўқитиш технологиясини интеграциялайди, бу эса ўқитилаётганларни шахсий сифатларини шакллантиради.

“Кейс-стади” методи деганда ўқитишнинг актив методи тушунилади, бунда ўқувчилар гуруҳида вазифани муҳокама қилишни ўқитувчи томонидан ташкиллаштиришига асосланади, бу вазифа ўзида маълум ёки номаълум аниқ бир вазиятни ифодалайди.

Кейсни муҳокама ва анализ қилишда “ақлий хужум” номини олган ғоялар ишлаб чиқиш методи муҳим ўрин эгаллайди. Ўқитиш жараёнида “ақлий хужум” методи иштирокчиларнинг ижодий фаоллигини ривожлантиришда муҳим ўрин эгаллайди. “Ақлий хужум” 3 босқични ўз ичига олади.

Биринчи босқич психологик тинч ҳолатга кириш, одатий ҳолатни, кулгили ва омадсиз кўринишдан кўрқишни рад этишни ўзида акс эттиради; бунга қулай психологик шароит ва ўзаро ишончни яратиш орқали эришилади, фикрлар ўз муаллифлигини йўқатганида, умумийга айланади. Бу босқичнинг асосий вазиваси – тинчлантириш ва эркин ҳолатга ўтиш.

Иккинчи босқич – бу хужумни ўзи; бу босқичнинг вазифаси – фикрлар оқими, кўчкисини ҳосил қилиш; бу босқичда “ақлий хужум” қайидаги принциплар асосида амалга оширилади:

- фикр бўлса – гапираман, фикр бўлмаса – жим ўтирмайман;
- исталган фикр рағбатлантирилади, қанчалик кутилмаган фикр бўлса, шунча яхши;
- таклиф қилинган фикрлар иложи борича кўп бўлиши керак;
- билдирлган хамфикрларни исталганча бирлаштириш, ўзгартириш ва яхшилашга руҳсат этилади;
- танқид қилинмайди, исталган фикрни, ёмон деб тан олишларидан кўрқмасдан билдириш мумкин, танқид қилувчиларга сўз берилмайди;
- иштирокчиларнинг ижтимоий ҳолатининг ҳеч қандай ахамияти бўлмайди, бу абсолют демократия ва бир вақтнинг ўзида фикрлар авторитаризмидир;
- барча фикрлар - фикрлар рўйхати баённомасига ёзиб борилади;
- сўзлаш вақти – 1-2 дақиқадан ошмайди.

Учинчи босқич куйидаги қоидалар бўйича, муаммони конструктив ечимини топиш учун фикрларни ижодий таҳлил қилишни ўзида акс эттиради:

- барча фикрларни ҳеч бирини камситишсиз таҳлил қилиш;
- фикрга тизимдан мос жой топиш ва фикрга мос тизим топиш;
- мохиятни керак бўлмаганда оширмаслик;
- олинган натижанинг гўзаллик ва нафислиги бузилмаслиги лозим;
- мутлақо янги қараш бўлиши керак («ахлатдаги дур»).

“Кейс-стади” методи бўйича вазифа.

Мавзу: “Case-study – педогог фаолиятининг замонавий қуроли”

Мақсад: Кейс методини қўллаш орқали педогогнинг профессионал маҳоратини такомиллаштириш заруратига ишонтиришни долзарблаштиришга шароит яратиш.

Вазифалар: 1. Кейс-стади интерактив методини педагогнинг профессионал маҳоратини такомиллаштиришдаги аҳамиятини аниқлаш.
 2. Ўрганилаётган методни ўзига хослиги ва уни профессионал ўқитишни ташкиллаштириш шартларини аниқлаш.
 3. Педагогик фаолиятга кейс-стадини киритиш жараёнини моделлаштириш.

Ўқитишнинг самарадорлиги:

- иштирокчилар кейс методининг ўз фаолиятини такомиллаштириш учун интерактив таъсири ҳақида фикрга эга бўлишади;
- кузатув, тажриба, ўйлаш ёки фикрлардан олинган маълумотни тушуниш, баҳолаш, таҳлил ва синтез қилишга танқидий ёндашадилар, бу кейинги ҳаракатларга асос бўлиб хизмат қилади.

Муваффақият меъзонлари:

- педагогик маҳоратни оширишнинг заруратини тушуниш;
- бошқариш стратегиясини ислох қилиш зарурлигида ўзига ишончли шакллантириш;
- профессионал маҳоратни ошириш доирасида кейс методи ҳақидаги маълумотга эга бўлиш;
- амалиётда ўқув жараёнини бошқарувида ушбу интерактив методни қўллашнинг муҳимлигини исботлай олиш;
- ўқув-методик фаолиятни замонавий асбоби (инструмент) кейс-стади орқали режалаштириш қобилияти.

Асосий зоя: Case-study интерактив методининг мохияти. Педагогнинг ўзини такомиллаштириши услубий ҳамкорликни самарадорлигини оширишга имкон беради.

Ресурслар, материаллар ва усқуналар: Флипчарт, маркерлар, стикерлар, қоғоз варақлар, проектор ва “Кейс-стади – интерактив ҳамкорлик технологияси” мавзусида тақдимот.

I-Босқич. Муаммога шўнғиш

Саломлашиш. Визуаллаштириш

Хурматли хамкасблар!

Келинглр ўзимизни таништирамиз ва танишиб оламиз.

Ташриф қоғози сифатида рангли қоғозлар ишлатиш таклиф қилинади. Ташриф қоғозига ўз исмингизни ёзиб фличартга ёпиштиринг. (рангли қоғозлар кейинги ротация учун керак)

Муаммони актуаллаштириш.

“Қора қути”

Хурматли хамкасблар!

Сизни қаршингиза машхур қора қути. Нима деб ўйлайсиз қора қути билан қандай савол хамрохлик қилади? (иштирокчилар жавоблари)

Тахминий жавоб: Қора қутида нима бор?

- Бу одатий жавоб, лекин биз бошқа йўлдан борамиз.

- Айтингчи қора қутини нима билан боғласа бўлади?

- Одамни қора қути билан боғласа бўладими? Нима учун?

Тахминий жавоб: инсонни фикрлаш жараёни шундай тузилганки, инсон миясида қандай фикр, ғоялар борлигини ҳеч ким билмайди. Бу хам аслида қора қути: ўзининг топишмоқлари бор, олдиндан айтиб бўлмайди, ўзига хос.

Биз уни фақат тадқиқ қилишимиз мумкин: ушлаб кўриб, эшитиб, оғирлигини...

- Агар таълим ва педагогнинг фаолиятига бевосита эътибор қаратиладиган бўлса, ўзаро таъсир жараёнини кўр-кўрона бошқаришга тўғри келишини аниқ кўриш мумкин...

Хулоса: Бизнинг педагог сифатида вазифамиз, ҳар бир ўқувчининг салоҳияти ва профессионал жамоадаги конструктив хамкорликка қизиқишини ўрганишдир.

Қора қути ва уни ичида нима борлиги тўғрисидаги саволга қайтишимиз, уни ичида нима борлигини билишимиз мумкинми? Уни очиб кўришимиз мумкинми?

Агар инсон тўғрисида гаплашсак, уни ўз фикрларини баён қилишига кўндириш учун нима қилиш керак?

Хулоса: Ишонч – катта куч. Бунинг учун бошқа инсонлар каби ўз фикрларини баён қилиш учун манфаатдор бўлиши керак: маънавий, жисмоний, ва моддий.

Биз ўз иш тизимимизни шундай қуришимиз керакки, бунда ҳар бир педагог ўз фаолиятини тақдмотидан манфаатдор бўлиши керак. Бунга эришиш учун ҳозирги тез ўзгараётган замонда доимий ўз устимизда ишлашимиз лозим.

Муҳокама қилиш учун саволлар.

- Бунинг учун нима қилиш керак? Иш тизимини қандай яратиш керак?

- Аввало, стереотиплардан қутулиш керак, фаолиятни янги шакл, метод ва усуллар билан инновацион режимда режалаштириш керак.

Сизларга ўқув-методик фаолиятнинг бир йўналишини кўриб чиқишни таклиф қиламан.

Иш тизими тақдимоти.

Биз шартли равишда иш шакллари 3 гуруҳга бўлдик:

Анъанавий (олдиндан белгиланган)

Инновацион (замонавий шакллар, фаолиятнинг замонавий қуроли сифатида кенг фойдаланилади)

Тахрирланган (шакллантирилган) (бу гуруҳга кенг қўлланилмайдиган шаклларни киритдик)

Келинг методик фаолиятнинг ёрқин шаклларидан бўлган – Кейс-стади методига тўхталамиз. Лекин, тақдимотга ўтишдан аввал муаммоли савол берамиз:

- Баъзида нохуш воқеалар содир бўлади: тестлар ва нормативлар вақтида топширилмайди, вазифалар нотўғри бажарилади, ишда қатнашишдан бош тортилади, лойихаларни амалга оширишда панд беради... ва х.к. Ва хар доим бахона топилади. Айбдор ўз кадрини туширмаган холда ўз айбини тан олиши учун нима қилиш керак?

Тахминий жавоб: унда хамдардлик билдира оладиган вазиятга суний равишда тушириш керак.

Хулоса. Кейс технологиясининг мохияти айнан шунга асосланади.

1-CASE

Бу case стади усулида кўзланган мақсад – ДНК ва РНКнинг хужайрадаги роли ўрганиш.

Генлар транскрипцияси РНК ҳосил бўлишига олиб келади. РНК нинг ҳамма турлари ядрога синтезланади. ДНК матрициасида кечадиган ҳамма синтезлар ДНК да ёзилган ахборотга мувофиқ амалга ошади. РНК нинг барча турлари тРНК, рРНК ва мРНК синтезланишида, асосларнинг комплементар бўлиши принципига биноан, ДНК асосларининг тартиби РНК асослари тартибини белгилайди.

Полинуклеотид занжир фақат рибозонуклеотид трифосфатлардан синтезланади ва бу жараёнда аорганик пирофосфат молкулалари ажралиб чиқади. РНК синтези бир неча босқичда: а) инициация (бошланғич), в) полимеразация ва з) терминация (тугаш).

ДНК репликацияси. ДНК биосинтези-генлар репликацияси, яъни организм белгиларининг юзага чиқишидир. Гетерополимер бўлган информатсион макромолекулалар генетик информатсияни ўзининг бирламчи структураларида сақлайди ва ташийди. ДНК молекуласида нуклеотидлар

изчил жойлашган бу информация репликация ҳам транскрипцияда амалга ошади. Генетик информациянинг реализация қилиниши ДНК

Молекуласида нуклеотидлар тартиби шаклида ёзилган буйрук (кўрсатма)ни оксил молекуласи синтезида аминокислоталар тартибга айлантиришдан иборат. Информация оқими қуйидаги йўналишда кечади:

ДНК → РНК → оксил → хужайра → организм

Ҳозирги замон биологиясининг асосий постулати ДНК РНК ни яратади, РНК оксилни. ДНК нинг ўзи информация хазинаси, у оксил синтезида бевосита иштирок этмайди. ДНК фақат хужайра циклида, бола хужайралар пайдо бўлишидагина иккита занжирга ажралади ва бунда ҳар бир занжир мувофиқ етишмаган комплементлар занжир синтезланиб, битта ДНК молекуласидан иккита молекула яратилади. Бу фундаментал жараён хужайралар бўлиниши, белгиларнинг наслдан-наслга ўзгармай ўтиш асосида бўлиб, репликация, нусха олиш деб аталади. Ирсий информация амалга ошишининг иккинчи босқичи оксил синтезини бошқарадиган уч хил РНК молекулаларини синтез қилишидир. Бу жараён транскрипция (кўчириб ёзиш) дейилади. Молекуляр биологиянинг “марказий догма”си

ДНК → ДНК → РНК → оксил принципига мувофиқ, информация оксилга ўтар экан, унинг орқага қайтмаслиги қайд қилинади

Ген муҳандислиги ферментлари. Ген муҳандислиги ферментлари ДНК молекулалари билан турли хил муолажаларни ўтказишга ёрдам бериб, уларни тегишли жойидан қирқиш, турли хил бўлақларини улаш, табиатда мавжуд бўлмаган янги хилдаги кетма-кетликларни синтез қилишда қўлланилади. қуйида ген муҳандислигида фойдаланиладиган асосий ферментларни кўриб чиқамиз.

ДНК полимеразалар. Ген муҳандислигида кенг қўлланиладиган ферментлардан бири Есолі нинг Т4 фагидан ажратиб олинган ДНК полимераза I ҳисобланади. ДНК полимераза I комплементар нуклетидларни бириктириш йўли билан ДНК занжирининг 5' -3' йўналишида узайтириш хусусиятига эга. ДНК полимеразанинг бу хусусияти ген муҳандислигида иккинчи комплементар занжирни ҳосил қилиш: бир занжирли матрица –ДНК сига қўшилганда праймер иштирокида икки ҳисса ортишида кузатилади. Бу хусусият қДНК-библиотекаларини тузишда қўлланилади. ДНК полимераза ДНК занжиридаги “бўшлиқ” ларни тўлдиришда ҳам фойдаланилади, масалан, 5' - учли бўлақларни тегишли тартибда уланишида ҳам иштирок этади. ДНК полимеразанинг экзонуклеаза фаоллигидан ДНК бўлагига радиоактив нишон киритишда қўлланилади.

Баъзи вируслардан РНК га боғлиқ ДНК полимераза, яъни тескари транскриптаза ёки *ревертаза* деб номланувчи махсус ДНК полимераза ажратиб олинган. Ревертазалар ДНК нинг комплементар занжирини матрица

РНК сида ҳам синтезлай олади. Ревертазалар ёрдамида кДНК-мРНК нинг ДНК нусхаларини олиш мумкин. кДНК генларининг тузилишини ўрганиш бу генларнинг геномдаги тўлиқ нусхаларини аниқлаш имконини беради.

Ҳар бир тирик организмда нуклеин кислоталарнинг ҳар икки тури-рибонуклеин кислота (РНК) ва дезоксирибонуклеин кислота (ДНК) мавжуд. Фақат вируслар буларнинг бир турини, ё ДНК, ёки РНК ни тутлади. Нуклеин кислоталар оксиллар билан бирга ҳаётнинг моддий асосини ташкил қилади. Улар бир-бири билан ҳар томонлама узвий боғлиқ, аммо уларнинг ҳужайрадаги ўрни ва функцияси тубдан фарқ қилади: оксиллар ассосан қурилиш ва ҳужайранинг ишчи органлари материали, нуклеин кислота эса информаион материал, у организмнинг тузилиши, ўсиши, ривожланишига тегишли ахборотнинг сақланиши, такрорланиши, алмашинуви ва наслдан-наслга ўтишини таъминлайди

1. РНК ирсий ахборотни ўзида ташиши мумкинми? Агар мумкин бу жараён қандай амалга ошади?

2. Ҳужайрада ДНК синтези амалга ошадими, Агар синтезланса қандай қандай амалга ошади?.

3. Рестриктаза ферменти нуклеин кислоталарни кесадими? Агар кесса бу қандай амалга оширилади?

4. ДНК билан РНКнинг фарқи нимада? Фарқини кўрсатинг

2-CASE

Бу case стади усулида кўзланган мақсад – Генетик код, ген муҳандислиги моддий асослари хақида маълумот беришдир.

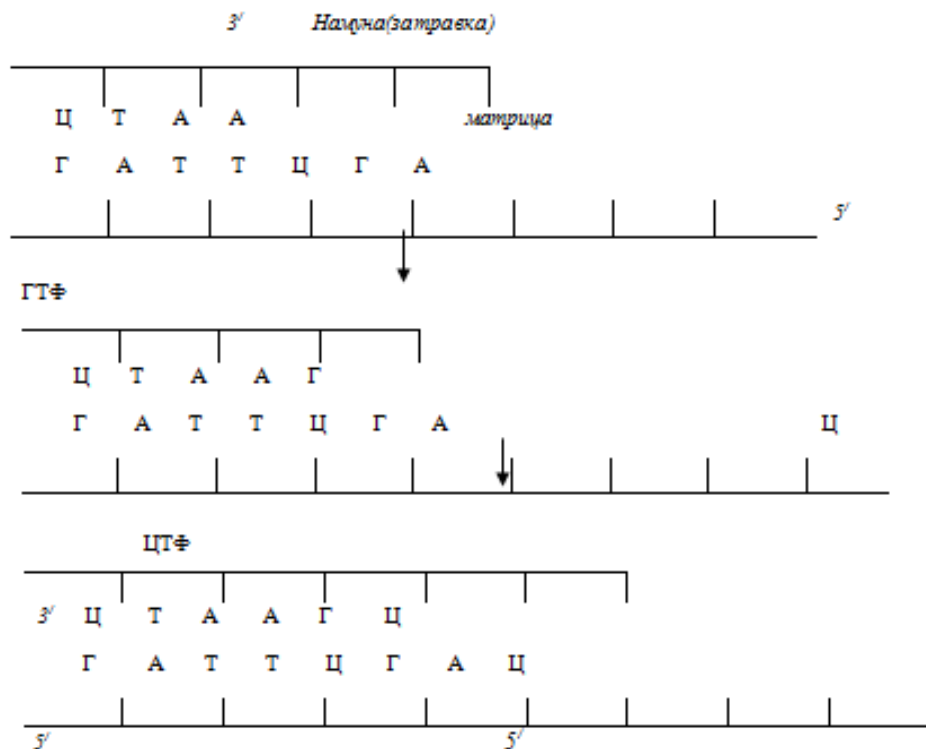
4 хил нуклеозидтрифосфат (dATФ, dГТФ, dТТФ, dЦТФ) бўлиши шарт. Бирорта нуклеозидтрифосфат этишмаса реакция бормайди. Дифосфатлар ёки монофосфатлар иштирокида ДНК синтези реакцияси амалга ошмайди.

2. Бу реакция, албатта оз миқдорда тайёр ҳолдаги намуна (затравка) иштирок этишни талаб қилади. Бу реакцияда ДНК «нусха» вазифасини бажаради. Янги синтезланаётган ДНК таркибидаги нуклеотидларнинг кетма-кет жойлашиши – нусха ДНК томонидан белгиланади. ДНК синтезида ионлар ҳам иштирок этади. Намуна билан матрица занжирининг йўналиши антипараллелдир.

Навбатдаги, нуклеотид ДНК-полимераза учун субстратдир, реакцияга юқори энергетик активланган формада киришади. Полимеризация намунанинг 3' - томонидан ўсиб боради, яъни синтез 3' 5' йўналишда боради. 3' – ОН – группаси навбатдаги

дезоксирибонуклеозидтрифосфатнинг комплементар бўлгандаги – фосфат билан реакцияга киришиб, трифосфатни ҳосил қилади. Трифосфатни ҳужайрадаги трифосфатаза ферменти парчалаб юборади. Шундай қилиб, ДНК – полимераза ферменти иштирокида, намуна матрицага антипараллел ҳолатда ўсиб боради ва маълум вақтдан сўнг қўш спирали структура ҳосил қилади.

ДНКнинг матрицали синтези



Эукариот ҳужайраларда ДНК – полимеразаларни 3 та типии маълум: α , β , γ . Ҳужайрадаги ДНКнинг репликацияси асосан полимераза - α иштирокида боради, репарация – полимераза – β , митохондрияда ДНКнинг репликацияси полимераза – γ иштирокида боради.

Генетик код универсалдир. Ҳамма организмларда-эукариотларда, прокариотларда ва вирусларда ҳам барча кодонлар учун бирдай белгилардан фойдаланилади. Бинобарин, генетик код дунёда ҳаёт пайдо бўлгандан бери ўзгармай ҳукмронлик қилмоқда. Бунга 3млрд йил бўлди. Аммо энг кейинги йилларда бу догмага бир оз ўзгартириш киритишга тўғри келди. Митохондрияларнинг генетик системаси маълум биологик кодга тўла тўғри келмади. Унинг ДНКси (15669 нуклеотид) нинг айрим генлари нуклеотид тартиби полипептидларнинг аминокислота тартиби билан солиштирилганда коддан четлашишлар мавжуд эканлиги аниқланди. Лекин бу ажойиб феноменнинг келиб чиқиши ва маъноси ҳали тушунилгани йўқ.

Жадвалдан кўришиб турибдики, бир хил аминокислоталарни ифодаловчи триплетлар бир-бирига ўхшаш бўлади. Масалан: валин аминокислотасини ифодаловчи триплетларнинг барчаси ГУ диплети, Аланинни ифодаловчи триплетлар ГЦ диплети билан бошланган бўлади.

У ахборотни тўғри ўқишга хилофлик килмайди, балки репликация ёки транскрипция жараёнида пайдо бўлиши мумкин бўлган хатоларни четлатишга ёрдам беради.

Генетик код
Кодоннинг иккинчи нуклеотида

	У	Ц	А	Г		
Кодоннинг биринчи нуклеотида	У	УУУ } Фен УУЦ } УУА } Лей УУГ }	УЦУ } Сер УЦЦ } УЦА } УЦГ }	УАУ } Тир УАЦ } УАА } терминатор УАГ } терминатор	УГУ } Цис УГЦ } УГА } терминатор УГГ } Три	У Ц А Г
	Ц	ЦУУ } Лей ЦУЦ } ЦУА } ЦУГ }	ЦЦУ } Про ЦЦЦ } ЦЦА } ЦЦГ }	ЦАУ } Гис ЦАЦ } ЦАА } Глу ЦАГ }	ЦГУ } ЦГА } ЦГА } ЦГГ }	У Ц А Г
	А	АУУ } Иле АУЦ } АУА } АУГ } Мет	АЦУ } Тре АЦЦ } АЦА } АЦГ }	ААУ } Асп ААЦ } ААА } Лиз ААГ }	АГУ } Сер АГЦ } АГА } АГГ } Арг	У Ц А Г
	Г	ГУУ } Вал ГУЦ } ГУА } ГУГ }	ГЦУ } Ала ГЦЦ } ГЦА } ГЦГ }	ГАУ } Асп ГАЦ } ГАА } Глу ГАГ }	ГГУ } ГГЦ } ГГА } ГГГ }	У Ц А Г

Кодоннинг учинчи нуклеотида

Генетик код универсалдир. Барча организмларда – эукариотлар, прокариотларда ва вирусларда ҳам барча кодонлар учун бирдай белгилардан фойдаланилади. Барча кодон учта нуклеотиддан (триплетдан) иборат. Ёнма-ён турган кодонлар бир-бирини қопламайди, яъни биринчи кодоннинг охириги нуклеотида ундан кейинги кодоннинг бошланғич нуклеотида бўла олмайди. Информация маълум нуқтадан бошланади.

Бир хил аминокислоталарни ифодаловчи триплетлар бир-бирига ўхшайди.

Аминокислоталар коди луғатида, кодирланаётган оксил информацияси и-РНКда ёзилган булади.

Кодонлар 5' → 3' йўналишда ўқилади.

Кодонлардаги учинчи азот асос, биринчи ва иккинчи азот асосларига караганда камроқ спецификликка эгадир. Метионин аминокислотасини ифодаловчи кодон 1 та бўлиб, иницирловчи кодондир. Ахамият бериб қаралса, метионин ва триптофандан ташқари қарийб ҳамма аминокислоталар биттадан ортиқ кодонларда ифодаланади.

ДНКдаги аминокислоталар коди шундай ёзилганки, у и-РНКдаги код сўзларига комплементар бўлиб антипаралел ҳолатдир, яъни Т

қолдиғига А қолдиғи комплементардир ва А қолдиғининг ҳолати У қолдиғига комплементардир.

Масалан: Метионин учун: иРНК ва ДНК кодонлар куйидаги ҳолатда кўринади:

иРНК(5) АУГ(3)

ДНК (3) ТАЦ

Одатда кодонлар ва антикодонлар $5 \rightarrow 3$, чапдан ўнгга қараб ёзилади.

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

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

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

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

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

Ген инженерлигининг пойдевори — *рекомбинат ДНКлар технологияси* — генетик структураларни бирга кўшиш техникаси — молекуляр

биологиянинг энг мухим ютуқларидандир. Бу технологиядан фойдаланиб, зарур маҳсулот (оқсил) ни кодирлайдиган ДНК молекуласини кичик бир кисми — гени кесиб олиш, унинг ёт ген билан комбинациясини яратиш, сўнгра бу янги геномни муносиб хужайраларга киритиб хўжайин-хужай ра ДНК сининг синтез механизми ёрдамида кўп марта лаб кў- пайтириш мумкин.

1. ДНК полимераза реакцияларни катализлайдими? Унинг қандай хусусиятлари бор?

2. Генетик код универсалми? Агар универсал бўлса сабабларини кўрсатинг.

3. Плазмидаларни ген муҳандислигида қўллаш мумкинми? Мумкин бўлса қандай қўллаш мумкин?

4. Турли организмлар ДНКсини бирлаштириш мумкинми? Мумкин бўлса қандай

ДНК-полимераза иштирокида катализланадиган реакция бир қанча ўзига хос хусусиятларга эга:

Реакция нуклеозидтрифосфатлар иштирокида боради.

3-CASE

Бу case стади усулида кўзланган мақсад – гкнларни клонлаш учун фойдаланиладиган векторлар, ферментларнинг рекомбинант ДНК олишдаги ролини ўрганиш.

Бегона ДНКнинг репликацияси, экспрессияси ва трансформациясини (бошқа организмга кўчишини) таъминловчи ДНК молекуласи *вектор* деб аталади. Вектор хужайрага кўшимча ирсий ахборот киритилишини амалга оширади. Вектор сифатида плазмидалар, бактериофаглар, мобил элементлар ва ҳайвонларнинг вирусларидан фойдаланиш мумкин. Ҳозирги вақтда жуда кўп векторлар яратилган бўлиб, уларни бир нечта типга бўлиш мумкин:

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

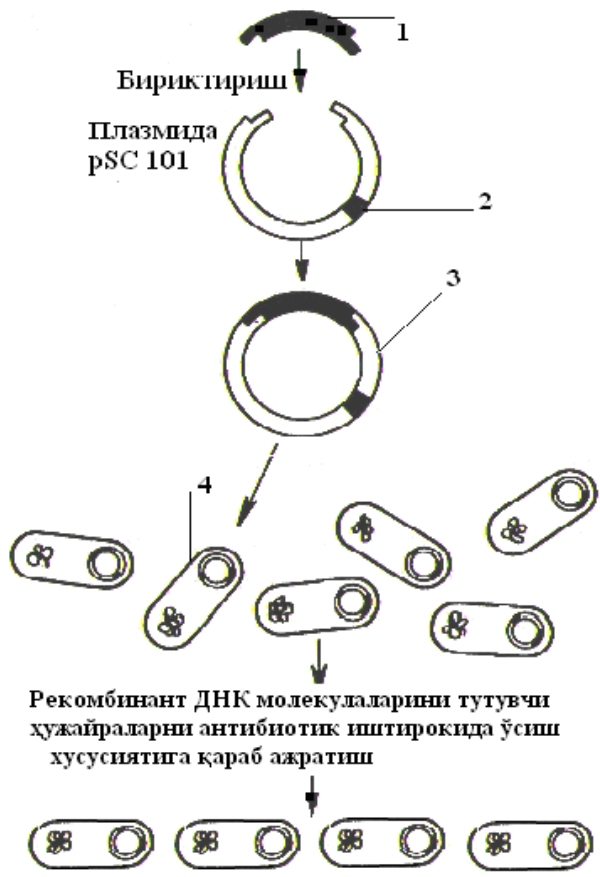
2. Экспрессион векторлар. Улардан генларнинг муайян кетма-кетлиги аниқлаш ва уларнинг оқсил маҳсулотларини таҳлил қилиш, муайян оқсилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Кўп сонли экспрессион тизимлар, айниқса прокариот организмлар учун мавжуд. Шунингдек сут эмизувчилар, ўсимликлар ва ачитқилар хужайраларида генлар экспрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган.

3. Трансформация учун векторлар. Реципиент геномига бегона ДНК фрагментларини киритиш учун фойдаланилади. Бундай векторлар одатда геномга интеграцияланишига ёрдам берувчи махсус изчилликлар тутади. Замонавий вектор тизимлар полифункционал бўлиб, бир нечта функцияни битта векторга жамлайди. Биринчи табиий векторлар бактериялардан ажратилган бўлиб, кўпчилиги тажриба мақсадидан келиб чиққан холда (экспрессион векторлар, клонлаш учун векторлар, трансформация учун векторлар) ген мухандислиги усуллари ёрдамида қайта яратилган.

Вектор молекулаларнинг таркибида маркер ген бўлиши, бу ген хужайрада вектор иштирок этаётгани хақида маълум қилувчи фенотип бериши яъни вектор селектив ирсий белгига эга бўлиши керак. Кўпинча селектив белги сифатида табиатда кенг тарқалган антибиотикка чидамлилиқ генидан фойдаланилади.

Бактерия хужайрасида хромосома ДНКсидан ташқари, кўп нусхада халқасимон ДНК молекулалари ҳам мавжуд. (1-25 м.н.ж.). Бундай халқасимон молекулалар *плазмидалар* деб аталади. Баъзи плазмидалар таркибида антибиотикга чидамлилиқ генларини тутади.

Плазмидалардан вектор сифатида биринчи марта 1973 йилда П.Берг лабораториясида фойдаланилган. Тажрибалар унча катта бўлмаган (~9 м.н.ж.), тетрациклинга чидамлилиқ гени тутувчи *E. coli* плазмидаси pSC 101 да олиб борилган.



ДНК фрагмент-ларини плазмидалар ёрдамида клонлаш бўйича тажриба схемаси.

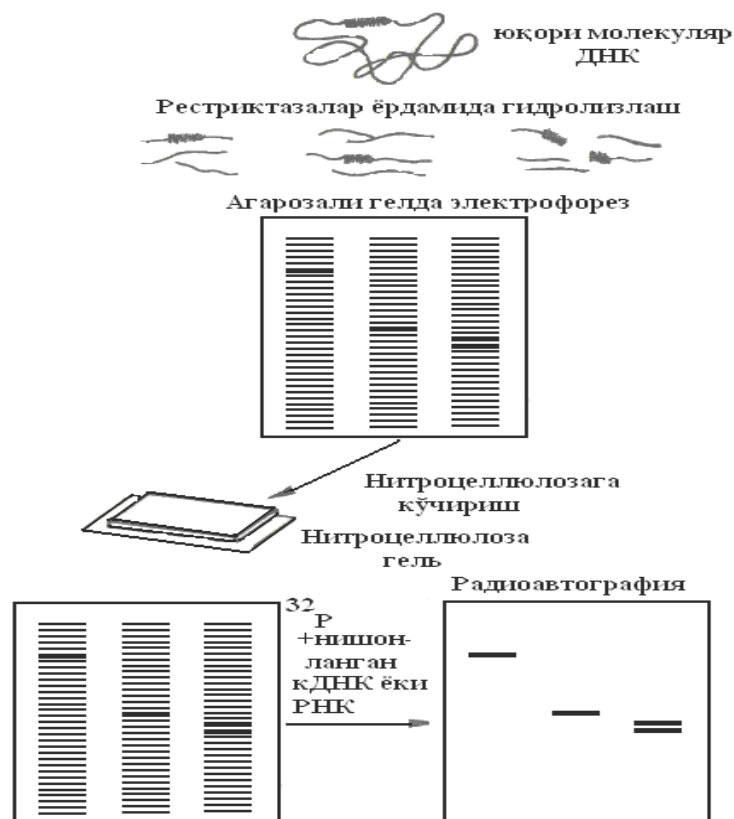
1-Бириктирилаётган гетеро-логик ДНК; 2-антибиотикка чидамлилиқ бўйича маркер; 3-ДНКнинг рекомбинант молекуласи; 4-Рекомбинант ДНКни бактерия ҳужайрасига киритиш.

Плазида таркибида фақат бир дона EcoPI рестриктаза ферменти таниб кесадиган сайт (махсус нуклеотидлар изчиллиги) бўлганлиги сабабли, фермент плазмиданинг халқасимон кўш занжирини фақат бир жойидан кесиб «ёпишқоқ» учли очик халқа ҳолатига ўтказди.

Плазида pSC 101нинг ДНКси ичак таёқчаси учун бегона ДНКнинг EcoPI–фрагментлари билан аралаштирилади. ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида бегона ДНК фрагментлари ва pSC 101 плазида ягона рекомбинант молекулага бирлаштирилади. Сўнгра бу рекомбинант плазмидани E. coliнинг компитент ҳужайраларига кўшилганда у бактерия ҳужайрасига киради. Рекомбинант плазмидани тутувчи ҳужайралар тетрациклинли селектив муҳитда ажратилади.

ДНК лигаза кўшни нуклеотидлар орасидаги фосфодиэфир боғларини тиклаш орқали ДНК бўлақларини боғлаш каби битта асосий вазифани бажаради. Бу жараён лигирлаш деб аталади. Ген муҳандислигида кўпинча лигирлаш учун T4 фагининг ДНК-лигазасидан фойдаланилади. T4 лигаза ёрдамида ДНК нинг ҳар қандай бўлаги “ёпишқоқ учли” ёки “тўмтоқ учли” қисмлари бириктирилади. Бу энг кўп қўлланиладиган ферментлардан биридир.

ДНК таҳлилининг блот-дурагайлаш усули нафақат кДНК ва геном библиотекалари скринингида, шунингдек геном ДНКсини таҳлил қилишда ҳам фойдаланилади. Шу усул ёрдамида геномда муайян ДНК изчиллиги иштирокини аниқлаш мумкин (масалан, трансген ўсимликлар геномида бегона ген иштироки, ген нусхаларининг кўпайиши, геннинг нуклеотид изчиллигидаги ўзгаришларни таҳлил қилиш мумкин). Блот-дурагайлаш усули билан ДНКни таҳлил қилиш муайян ДНК фрагментларининг уларни специфик нишонланган зондлар билан дурагайлаш йўли орқали аниқлашга асосланган. У қуйидаги босқичлардан иборат: 1) ДНК рестрикцияси; 2) рестрикцияланган ДНК фрагментларини гелдан нейлон филтрга кўчириш ва уларни иммобилизациялаш; 3) нишонланган зонд билан дурагайлаш.



Саузерн бўйича блот-дурагайлаш усули принципи.

Юқори молекуляр хромосома ДНКси битта ёки бир нечта рестриктазалар билан кесилади. Хосил бўлган фрагментлар агарозали гелда электрофорез қилиш орқали ажратилади ва олдиндан денатурацияланган (0,4 М NaOH) гелнинг устига нейлон филтр, унинг устидан филтр қоғозлар қўйилади. Капилляр кучлар таъсирида ДНК фрагментлари перпендикуляр равишда филтрга ўтиб, у билан боғланади (иммобилизацияланади). Бундай кўчириш блоттинг (blot – сўриш) деб аталади. Бунда филтрда гелнинг репликаси хосил бўлади. Сўнг филтр радиоактив нишонланган бир занжирли зонд солинган эритмага жойлаштирилганда филтрга бириккан хромосома ДНКси фрагментлари билан қўшилиб дурагайланади. Зонд фақат ўзига гомологик ДНК изчиллиги тутувчи фрагментлар билан дурагайланади. Нишон билан боғланган фрагментлар радиоавтография орқали аниқланади. Саузерн (Southern blotting) бўйича блот-дурагайлашнинг схемаси берилган.

Радиоавтографияда хосил бўлган чизиқчалар орқали геномда таҳлил қилинаётган фрагментлар мавжудлигини, бу изчилликлардаги ўзгаришларни (делеция, инсерция), чизиқчаларнинг оч ёки тўқ ранги орқали геннинг геномдаги нусхалари сонини аниқлаш мумкин. Демак, бу усул бутун геном ва алоҳида генларни таҳлил қилиш учун ҳам қўлланилади.

1. Вектор молекулалар қандай мақсадларда қўлланилади?
2. Уларга қандай талаблар қўйилади?
3. Бактерия плазмидаларидан клонлашда фойдаланиш мумкинми? Қандай амалга оширилади?

4. ДНК лигазалар нуклеотидларни бир-бирига бирлаштирадими? Қандай амалга ошали?
5. ДНК таҳлилининг блот-дурагайлаш усули мавжудми? Мавжуд бўлса қандай таҳлил қилинади?

VI. МУСТАҚИЛ ТАЪЛИМ МАВЗУЛАРИ

Мустақил таълимни ташкил этишнинг шакли ва мазмуни

Мустақил таълим тегишли ўқув модули бўйича ишлаб чиқилган топшириқлар асосида ташкил этилади ва унинг натижасида тингловчилар битирув иши (лойиҳа иши) ни тайёрлайди.

Битирув иши (лойиҳа иши) доирасида ҳар бир тингловчи ўзи дарс бераётган фани бўйича электрон ўқув модулларининг тақдимотини тайёрлайди.

Электрон ўқув модулларининг тақдимоти қуйидаги таркибий қисмлардан иборат бўлади:

Силлабус;

Кейслар банки;

Мавзулар бўйича тақдимотлар;

Бошқа материаллар (фанни ўзлаштиришга ёрдам берувчи қўшимча материаллар: электрон таълим ресурслари, маъруза матни, глоссарий, тест, кроссворд ва бошқ.)

Электрон ўқув модулларини тайёрлашда қуйидагиларга алоҳида эътибор берилади:

- тавсия қилинган адабиётларни ўрганиш ва таҳлил этиш;
- соҳа тараққиётининг устивор йўналишлари ва вазифаларини ёритиш;
- мутахассислик фанларидаги инновациялардан ҳамда илғор хорижий тажрибалардан фойдаланиш.

Шунингдек, мустақил таълим жараёнида тингловчи касбий фаолияти натижаларини ва талабалар учун яратилган ўқув-методик ресурсларини “Электрон потрфолио” тизимида киритиб бориши лозим.

Мустақил таълим мавзулари

1. Культураланаётган ўсимлик хужайралари билан микроорганизмларнинг сунъий ассоциациясини яратиш.
2. Ўсимликларнинг хосилдорлигини оширишда биотехнология.
3. ДНК нуклеотидлари кетма-кетлигини аниқлаш ва ДНК бўлақларини синтезлаш.
4. Трансгенез назарияси ва унинг аҳамияти.

5. Прокариот ва эукариот хужайралар геномининг биокимёвий хусусиятлари.
6. Оқсил биосинтези ва унинг генетик даражадаги регуляцияси
7. Генлар экспрессиясининг биокимёвий бошқарилиши
8. Биокимёвий жараёнларнинг генетик регуляцияси
9. ДНК ва генетик коднинг моҳияти ҳамда унинг биокимёвий исботлари.
10. Хужайралар
11. генофондини сақлаб қолишда биотехнология.
12. Ўсимлик хужайралари селекциясида биотехнологиянинг аҳамияти.
13. Ўсимлик хужайраларини культуралашнинг иқтисодий аҳамияти.
14. Ўсимлик тўқималаридан фойдаланиб иккиламчи метоболитлар синтезини амалга ошириш.
15. Ўсимлик хужайра ва тўқималарида иккиламчи метоболитларнинг тўпланишига таъсир этувчи омиллар.
16. Биотехнологиянинг экологик аспектлари.
17. Ўсимликлар ресурслари культураларидан фойдаланиш истиқболлари.
18. Соматик хужайралар култураси.
19. Генофондни сақлаш усуллари.
20. Биологик азотфиксация самарадорлигини ошириш.

VII. ГЛОССАРИЙ

ТЕРМИНЛА Р	УЗБЕКЧА	Терминлар	ИНГЛИЗЧА
Агароза	денгиз сувўтларидан олинадиган полисахарид; электрофорез ва хроматографияда гелли муҳит сифатида фойдаланилади.	Agarose	Polysaccharides which receive from algae; It is used as a gel medium in electrophoresis and chromatography
Агрегация-	айрим организм ёки хужайраларнинг тўпланиши, ғуж бўлиб қолиши.	Aggregation	Education in a pile of some organisms and cells
Адаптация-	мослашиш- организмларнинг	Adaptation	the adaptation of organisms to a habitable

	г эволюция жараёнида юзага келган яшаш шароитига мослашуви		environment in the process of evolution
Азотобактер-	эркин ҳолда яшаб, ҳаводан азот тўпловчи бактериялар тури.	Azotobacter	a type of bacteria that live freely and gain nitrogen from the air
Анаэробноз-	Организмларнинг г эркин кислород бўлмаган муҳитда ҳаёт кечириши	Anaerobiosi s	Vital activity of organisms in the environment where there is no free oxygen
Антагонист	рақиб- микроорганизмлар ар ҳаётини тўхтатувчи ёки бутунлай барбод қилувчи бошқа бир микроорганизм.	Antagonist	Rival – microorganisms which stop vital functions or kill other microorganisms
Антигенлар-	иммун тизимда антителалар ҳосил бўлишини индуцирловчи, антитела пайдо бўлишига таъсир этувчи специфик ҳамкорлик қилувчи оқсиллар.	Antigens	specific proteins that induce and influence the formation of antibodies in the immune system
Адсорбция	қаттиқ бирикма – адсорбент билан суюқлик ёки газ компонентларни	Adsorption	Absorption process liquid and gas components into a solid compound - adsorbent

	<p>нг ютилиш жараёнидир</p>		
<p>Базал</p>	<p>асосий, асосга тегишли; асосида ёки унинг тагида жойлашган- базал таначалар- эукариотик жониворлар (оддий жониворлар, сувўтлар) хивчинларини цитоплазманинг ташқи қаватига ёпишиб туришига ёрдам берадиган тузилма.</p>	<p>Basal</p>	<p>Main; basal calves that help keep the flagella of eukaryotic animals (simple animals, algae) on the outer layer of cytoplasm</p>
<p>Базипетал транспорт</p>	<p>ўсимликдаги моддаларнинг илдизнинг апикал меристемасига транспорти.</p>	<p>Basipetal transport</p>	<p>Transport of plant substances to the root apical meristem</p>
<p>Бактериофаг лар</p>	<p>бактерияларни инфекцияловчи вируслар.</p>	<p>Bacteriophage</p>	<p>Viruses that infect bacteria</p>
<p>Бинар-</p>	<p>икки қисмдан иборат; бинарли номенклатура- микроорганизмлар арда авлод ва тур номи билан аталиши; бинарли бўлиниш-</p>	<p>Binary</p>	<p>consisting of two parts; binary nomenclature - the name of the micro- organisms with the name of generation and type; binary fission - the fission of cells during multiplication</p>

	хужайраларнинг кўпайиш вақтида иккига бўлиниши.		
Биогенез-	тирик организмлар томонидан органик бирикмаларнинг ҳосил бўлиши.	Biogenesis	release of organic substances from living organisms
Биомасса-	микроорганизмларни ўстирилганида хужайралари массаси ёки тирик организм массаси; фаол биомасса-биологик фаоллик кўрсатувчи масса; қуруқ биомасса-организмларнинг қуруқ биомассаси. У ҳўл биомассанинг 15-30% ини ташкил этади; ҳўл биомасса-сузиш ёки айлантириш, чўктириш натижасида суюқ озуқа муҳитидан ажратиб олинган хужайра	Biomass	Biomass is organic matter derived from living, or recently living organisms. Biomass can be used as a source of energy and it most often refers to plants or plant-based materials which are not used for food or feed, and are specifically called lignocellulosic biomass. As an energy source, biomass can either be used directly via combustion to produce heat, or indirectly after converting it to various forms of biofuel. Conversion of biomass to biofuel can be achieved by different methods which are broadly classified into: thermal, chemical, and biochemical methods.

	массаси.		
Биофилтър	-оқава сувларни биологик жиҳатдан тозалайдиган иншоот	Trickling filter	Biological wastewater treatment
Биореактор-	биологик реакцияларни амалга оширишга мўлжалланган сиғим. Бу атама аэроб ва анаэроб организм ҳужайраларини ўстириш учун зарур бўлган сиғимларда ҳамда ҳужайра ва ферментларни тўплашда фойдаланадиган найчаларга нисбатан ишлатилади.	Bioreactor	A bioreactor may refer to any manufactured or engineered device or system that supports a biologically active environment. In one case, a bioreactor is a vessel in which a chemical process is carried out which involves organisms or biochemically active substances derived from such organisms. This process can either be aerobic or anaerobic. These bioreactors are commonly cylindrical, ranging in size from litres to cubic metres, and are often made of stainless steel.
Биосинтез-	ферментлар таъсирида тирик организмларда оддий бирикмалардан мураккаб органик моддаларнинг ҳосил бўлиши.	Biosynthesis	Biosynthesis (also called biogenesis or anabolism) is a multi-step, enzyme-catalyzed process where substrates are converted into more complex products in living organisms. In biosynthesis, simple compounds are modified, converted into

			other compounds, or joined together to form macromolecules. This process often consists of metabolic pathways.
Биорекулт вация-	қазилма бойликлар олинганидан сўнг жойларни текислаб ўсимлик ўстириш	Reclamat ion	Plant cultivation after the excavation of minerals
Биотехнолог ия-	тирик организмлар ёки биологик қонуният ва хусусиятларнинг саноат миқёсида ишлатилиши хақидаги фан йўналиши.	Biotechnolo gy	Biotechnology is the use of living systems and organisms to develop or make products
Вектор-	генларни клонлашда фойдаланиладиг ан репликон. Таби й векторлар- кичик плазмидалар, вируслар ва бактериофаглар. Сунъий векторлар эса ДНК-лигаза ёрдамида ҳар хил манбалардан олинган ДНКни бирлаштириш асосида тузилади;	Vector	In molecular cloning, a vector is a DNA molecule used as a vehicle to artificially carry foreign genetic material into another cell, where it can be replicated and/or expressed. A vector containing foreign DNA is termed recombinant DNA. The four major types of vectors are plasmids, viral vectors, cosmids, and artificial chromosomes. Of these, the most commonly used vectors are plasmids.

	<p>ўрнини олиш вектори- клонлаштирувчи вектор; ўсимликларда клонлаш вектори- ўсимлик хужайрасига бегона ДНКни ўтказиш ва жойлаштириш билан шуғулланадиган ген муҳандислигида ишлатиладиган вектор; плазмида вектори-бегона, ёт ДНКдаги ген ёки бир неча генларни бу хилдаги генлари бўлмаган организмга ўтказиб қўйишида қатнашадиган плазмида.</p>		<p>Common to all engineered vectors are an origin of replication, a multicloning site, and a selectable marker.</p>
<p>Генотерапия-</p>	<p>реципиент геномига бегона генларни киритиш ёки биологик объект тўқималарида генетик соғлом соматик хужайраларни олиш ёрдамида</p>	<p>Gene therapy</p>	<p>Gene therapy is the therapeutic delivery of nucleic acid polymers into a patient's cells as a drug to treat disease.</p>

	наслий касалликларини даволаш.		
Генотип-	асос генларининг тўплами. Ирсий асос– организмларнин г генетик (ирсий) конституциясин инг ва унинг барча генларининг мажмуи.	Genotype	The genotype is the part (DNA sequence) of the genetic make up of a cell, and therefore of an organism or individual, which determines a specific characteristic (phenotype) of that cell/organism/ individual.
Генофонд-	организм турлари ёки популяциясидаг и ҳар хил генлар турларининг сони ва тарихи.	The gene pool	The gene pool is the set of all genes, or genetic information, in any population, usually of a particular species.
Гетерозис –	бир-биридан қатор хусусиятлар ва белгилари билан фарқланувчи бошланғич шаклларни чатиштириш натижасида пайдо бўлган биринчи авлод дурагайларинин г яшаш қобилиятининг	Heterosis	Heterosis, hybrid vigor, or outbreeding enhancement, is the improved or increased function of any biological quality in a hybrid offspring. The adjective derived from heterosis is heterotic.

	ошиши.		
Гибрид-	дурагай-генетик жиҳатдан ҳар хил бўлган турларни чатиштириш натижасида ҳосил бўлган гетерозигота жинси. Ота-она ирсий белгиларини ўзида мужассамлаштирган организм.	Hybrid	In biology a hybrid, also known as cross breed, is the result of mixing, through sexual reproduction, two animals or plants of different breeds, varieties, species or genera.[1] Using genetic terminology, it may be defined as follows.
Гиногенез –	муртак халтаси хужайраларидан ўсимлик пайдо бўлиш жараёни.	Gynogenesis	Offspring are produced by the same mechanism as in parthenogenesis, but with the requirement that the egg merely be stimulated by the presence of sperm in order to develop.
Гифлар-	ипчалар-замбуруғ танасини ташкил этувчи бир ёки бир неча хужайрадан ҳосил бўлган, микроскопда аранг кўриш мумкин бўлган иплар.	Gifral	A threads – of molds

Гормон рецептор комплекс-	гормон ва оқсил рецепторининг бирикиши, гормон таъсири амалга ошишининг биринчи босқичи.	Hormone receptor complex	Connect hormone and protein receptors, the first degree of the influence of the hormone
Гормон статуси	– онтогенезда ўсимлик ва ҳайвон гормон тизимининг умумий ҳолати,	Hormone status	The general condition of the animal and plant structure in ontogenesis
Деструкция –	моддаларнинг парчаланиш орқали физиологик фаоллигини йўқотиши.	Destruction	Loss of physical activity by splitting substances
Дидифференция -	ихтисослашган, бўлинмайдиган хужайраларнинг дифференцияланмасдан бўлинаётган каллус хужайраларига айланиш.	Differ	
Диплоид –	мазкур турга ҳос сонларни кўрсатувчи гомологик хромосомаларнинг иккита тўплами билан характерланувчи ядро, хужайра ва организм.	Diploid	Diploid cells have two homologous copies of each chromosome, usually one from the mother and one from the father.
Дифференциялаш –	асосий ва янги ҳосил бўлган		

	хужайралар орасида, шунингдек янги ҳосил бўлган хужайралар орасида фарк юзага келтирувчи жараёнлар комплекси.		
ДНК –	дезоксирибонуклеин кислоталар молекуласи, нуклеотидлар (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибоза ва фосфор кислота қолдиқларидан ташкил топган.	DNA	Deoxyribonucleic acid is a molecule that carries most of the genetic instructions used in the development, functioning and reproduction of all known living organisms and many viruses.
ДНК репликацияси –	ферментлар тўплами (ДНК полимераза, лигаза ва бошқалар) ёрдамида ДНК нусхасини ҳосил қилиш орқали унинг молекулаларини иккиланиши (икки марта кўпайиши).	DNA replication	Cell division is essential for an organism to grow, but, when a cell divides, it must replicate the DNA in its genome so that the two daughter cells have the same genetic information as their parent.
Ёпиқ тизим –	ташқи муҳит билан фақат энергия орқали алмашинувчи тизим.	Closed system	A closed system is a physical system that does not allow certain types of transfers (such as transfer of mass) in or out of the system.

Ёпишқоқ учлар -	комплементлар ҳолдаги ДНК молекуласининг битта ипли учи бўлиб, эндонуклеазалар ёрдамида кесиб олинади.	sticky ends	DNA end or sticky end refers to the properties of the end of a molecule of DNA or a recombinant DNA molecule.
Идентификация -	айнан ўхшатиш, тенглаштириш-модда ёки микроорганизмлар тури ва хилларини аниқлашга қаратилган тадқиқотлар тури.	Identification	Identification in biology is the process of assigning a pre-existing taxon name to an individual organism.
Иммобилизация (тўплаш) –	мембраналарда хужайра, ферментларни тўплашда фойдаланиладиган физик ва кимёвий жараён.	immobilization	An immobilized enzyme is an enzyme that is attached to an inert, insoluble material such as calcium alginate
Ингибитор-	тўхтатувчи-ферментлар, фаоллигини тўхтатувчи табиий ёки синтетик модда (сунъий олинган).	Inhibitor	Enzyme inhibitor, a substance that binds to an enzyme and decreases the enzyme's activity
Индуктор-	нофаол ҳолатга ўтказадиган паст молекулали модда.	Inductor	inactive state of low molecular weight substances.
Индукция-	фермент синтези, фаглар ривожланиши ва	Induction	Enzyme induction is a process in which a molecule induces

	мутацияга ўхшаган биологик жараёни ҳаракатга тушириш.		the expression of an enzyme.
Инициация-	молекуляр биологиядаги трансляция жараёнининг биринчи босқичи.	Initiation	The initial stage of the translation process in molecular biology
Инкубация-	ўстириш-маълум шароитда, ҳароратда микробларни ушлаб туриш, ўстириш.	Incubation	Cultivation. microbial exposure at a specific temperature
Инокулят-	кўпайтириш усули-тирик организмлар, масалан, микроорганизмлар суспензияси озуқа муҳитга ўтказилгандан кейин янги авлод беради.	The inoculum	method of reproduction of organisms, microorganisms
Интрон –	геннинг транскрибцияла наётган “сукунат сақловчи” процессинг жараёнида РНК молекулалари ажралиб чиқаётган ва кодонлар мавжуд бўлмаган қисми.	Intron	An intron is any nucleotide sequence within a gene that is removed by RNA splicing during maturation of the final RNA product.

Иссиқлик шоки оксиллари (ИШО) -	ҳароратнинг нормадан ошишига организм томонидан ҳосил бўладиган оксиллар.	Thermal shock proteins	
Компетенция –	хужайра, тўқима, орган ва организмнинг индуцирловчи таъсирларни қабул қилиши ва унга ривожланишини ўзгартириш орқали специфик таъсирланиш.	Competence	In microbiology, genetics, cell biology, and molecular biology, competence is the ability of a cell to take up extracellular DNA from its environment.
Комплементар занжир –	РНК ва унга ҳамкорлик учун мос келадиган нуклеотидларни синтезлан учун фойдаланиладиган ДНК занжирларидан бири.	complementary chain	The two base-pair complementary chains of the DNA molecule allow for replication of the genetic instructions.
Катализ-	озонланган ҳаво таркибида иштирок этадиган кислороднинг оксидловчилик хусусиятини ошириш	Catalysis	Catalysis is the increase in the rate of a chemical reaction due to the participation of an additional substance called a catalyst
Лигаза-ДНК	занжиридаги узилган қисмни фосфодиэфирбоғ ҳосил қилиш	DNA ligase	DNA ligase is a specific type of enzyme, a ligase, that facilitates the joining of DNA strands together

	ёрдамида бирлаштирувчи фермент.		by catalyzing the formation of a phosphodiester bond.
Лигирлаш –	ДНКнинг бир занжирдаги узилиш орқали ажралган асослар орасидаги фосфодиэфир боғларининг ҳосил бўлиши. Бу ибора тўмтоқ учларни бириктириш ҳолларида ва РНК боғлар ҳосил бўлишида ҳам қўлланилади.	Ligation	the covalent linking of two ends of DNA or RNA molecules, most commonly done using DNA ligase, RNA ligase (ATP) or other enzymes.
Лизис-	эриб кетиш, парчланиш-ферментлар, кислоталар ва ишқорлар таъсирида хужайраларнинг парчланиши; бактерия хужайрасида бактериофагларнинг кўпайиши натижасида унинг эриб кетиши.	Lysis	Lysis refers to the breaking down of the membrane of a cell, often by viral, enzymic, or osmotic mechanisms that compromise its integrity.
Маркер (ДНК) –	электрофорез гелида фрагментлар ўлчамини аниқлашда	Marker (DNA)	Genetic marker, a DNA sequence with a known location associated with a particular gene or trait

	<p>фойдаланиладиган маълум ўлчамдаги ДНК фрагменти.</p>		
Маркер ген –	<p>жойлашган жойи аниқланган ва аниқ фенотипик кўринишга эга ген.</p>	Marker gene	<p>A marker gene is a gene used in nuclear biology and molecular biology to determine if a nucleic acid sequence has been successfully inserted into an organism's DNA.</p>
Матрица.	<p>1) маълум бир тана (шакл) бўлиб, унга қараб янги шаклнинг ҳосил бўлиши; 2) (молекулали биологияда) ДНК ва РНК ипларини комплементлар синтезланиши учун асос сифатида хизмат қиладиган ва нуклеин кислоталардаги азот асосларининг кетлиги.</p>	Matrix	<p>Matrix, the material or tissue between cells in which more specialized structures are embedded</p>
Метаболизм-	<p>оралиқ алмашилиш, яъни моддаларнинг хужайра ичига тушган вақтидан охириги</p>	Metabolism	<p>Metabolism is the set of life-sustaining chemical transformations within the cells of living organisms.</p>

	<p>маҳсулотлар ҳосил бўлгунга қадар айланиши; катаболизм ва анаболизм жараёни йиғиндиси; қоронғуликда кечадиган метаболизм-микроорганизмларнинг (қирмизи бактериялар Rhodospirillum) қоронғида аэроб ҳолда ўсиш хусусияти. Бу хусусият бактерияларда нафас олиш занжирининг керакли қисмлари борлигидан далолат беради.</p>		
Метаболитлар-	<p>метаболизм жараёнида ҳосил бўладиган моддалар.</p>	Metabolites	<p>Metabolites are the intermediates and products of metabolism.</p>
Микроорганизмлар уюшмаси-	<p>ҳар доим бирга учрайдиган ва бир-бири билан боғлиқ ҳолда яшайдиган микроорганизмлар бирлашмаси.</p>	microbial colony	<p>A microbial colony is defined as a visible cluster of microorganisms growing on the surface of or within a solid medium, presumably cultured from a single cell.</p>
Микрофлора-	<p>ҳар хил турдаги микроорганизмларнинг маълум</p>	Microorganisms	<p>a collection of different species of microorganisms living</p>

	<p>яшаш муҳитидаги тўплами; автохтон микрoфлораси; сув микрoфлораси; ҳаво микрoфлораси; балчик микрoфлораси; одатдаги микрoфлора; организм микрoфлораси; кўшимча микрoфлора; тупроқ микрoфлораси; ризосфера микрoфлораси.</p>		<p>environment; avtoxenon microflora; microflora; microflora; mud microflora; normal microflora; microorganism; microflora; soil microflora; rizosfera microflora.</p>
Мицеллий-	<p>замбуруғ тана- замбуруғ, жумладан шўъласимон замбуруғларнин г ўсадиган танаси бўлиб, бир ва кўп хужайрали ипчалар (гиф)дан иборат.</p>	Mycelium	<p>Mycelium is the vegetative part of a fungus, consisting of a mass of branching, thread-like hyphae.</p>
Модификаци я-	<p>микроорганизмларнинг арнинг фенотипик ўзгариши, яъни хужайранинг генетик аппаратларига алоқадор</p>	Modification	<p>A modification is a change in the physical appearance of an organism (phenotype) caused by environmental factors.</p>

	бўлмаган ўзгаришлар.		
Морфогенез –	<p>орган (органогенез), тўқима(гистогенез) ва хужайраларнинг (цитогенез ёки хужайраларнинг дифференцияланиши) шаклланиш жараёни. Организмларнинг ривожланиши жараёнида тизимларнинг табақаланиши.</p>	Morphogenesis	Morphogenesis is the biological process that causes an organism to develop its shape.
Мутагенез-	<p>мутагенез ўзгаришнинг (мутагенезнинг) рўй бериши- организмда ирсий ўзгаришлар- мутацияларнинг вужудга келиш жараёни. Бу жараён асосида ирсий ахборотни сақловчи ва наслга ўтказувчи нуклеин кислоталар молекуласининг ўзгариши ётади.</p>	Mutagenesis	Mutagenesis is a process by which the genetic information of an organism is changed in a stable manner, resulting in a mutation.
Мутагенлар –	<p>ДНК молекуласида мутацияларнинг пайдо бўлиш</p>	Mutagens	A mutagen is a physical or chemical agent that changes the genetic material, usually DNA,

	<p>частоталарини оширувчи омил. Ирсиятни ўзгартирувчилар -мутациялар ҳосил қилувчи физикавий ва кимёвий омиллар;</p>		<p>of an organism and thus increases the frequency of mutations above the natural background level.</p>
<p>Мутация –</p>	<p>ген, хромосомадаги нуклеотид изчиллик, геномнинг бирорта белгининг ўзгаришига ва уларнинг авлодларда сақланишига олиб келувчи спонтан ва индуцирланган ўзгариши.</p>	<p>Mutation</p>	<p>A mutation is a permanent alteration of the nucleotide sequence of the genome of an organism, virus, or extrachromosomal DNA or other genetic elements.</p>
<p>Нишон - хужайра–</p>	<p>у ёки бу фитогармон рецепторини тутувчи ва фитогармоннинг концентрацияси ўзгарганда метаболизмни ўзгартирувчи хужайра.</p>	<p>Target cell</p>	<p>target cells are red blood cells that have the appearance of a shooting target with a bullseye.</p>
<p>Нуклеин кислоталар –</p>	<p>турли нуклеотидлар қолдиқларидан ташкил топган юқори молекуляр</p>	<p>Nucleic acids</p>	<p>Nucleic acids are biopolymers, or large biomolecules, essential for all known forms of life. Nucleic acids, which</p>

	табийй бирикмалар (полимерлар). Хужайра мағзининг асосини ташкил қилади. Нуклеин кислоталарнинг икки тури: РНК, ДНК хужайраларнинг доимий компонентларидир.		include DNA (deoxyribonucleic acid) and RNA (ribonucleic acid), are made from monomers known as nucleotides.
Ноосфера-	биосферани табиат қонунлари асосида бошқариш, инсон онгининг юқори тараққий этиши	Noosphere	The noosphere is the sphere of human thought
Органогенез –	уюшмасдан ўсаётган каллус хужайраларида органлар (илдиз, бошланғич барглар ва ниҳоллар) ҳосил бўлиш жараёни.	Organogenesis	In animal development, organogenesis is the process by which the ectoderm, endoderm, and mesoderm develop into the internal organs of the organism.
Очиқ тизим –	ташқи муҳит билан энергия ва моддалар билан алмашинадиган тизим.	Open systems	the external environment and the energy and material exchange with the system.
Озиқ занжири-	моддаларнинг айланма ҳаракати	food chain	A food chain is a linear network of links in a food web starting from producer organisms and

			ending at apex predator species, detritivores, or decomposer species.
Озонолиз-	Озоннинг иккиламчи ва бирламчи углерод боғларига фиксация жараёни	Oxonolysis	The process of fixing the first and second carbon ozone connection
Партеногенез –	асоснинг фақат она хужайра генлари иштирокида ривожланиши.	Parthenogenesis	Parthenogenesis is a natural form of asexual reproduction in which growth and development of embryos occur without fertilization.
Плазмида –	автоном репликацияланишга қодир, таркибида реципиентларнинг бегона генларини ва бошқа ДНК изчиллигини тутиш ва геномга киритиш хусусиятига эга, икки занжирли ҳалқасимон ДНК плазмид вектори асоси.	Plasmid	A plasmid is a small DNA molecule within a cell that is physically separated from a chromosomal DNA and can replicate independently.
Полиадениллаш –	полиаденил кислота изчиллигининг эукариот РНК 3-учига унинг синтези тугаганидан	Polyadenylation	Polyadenylation is the addition of a poly(A) tail to a messenger RNA.

	сўнг бирикиши.		
Полиплоидия –	организм гаплоид хромосомалар йиғиндисининг каррали ортиши билан боғлиқ бўлган ирсий ўзгарувчанлик.	Polyploid	Polyploid cells and organisms are those containing more than two paired (homologous) sets of chromosomes.
Пролиферация –	хужайра ва тўқималарнинг кўпайиш йўли билан ҳосил бўлиши.	Proliferation	The term cell growth is used in the contexts of cell development and cell division (reproduction).
Промотор –	геннинг транскрипцияси бошланиши учун жавобгар қисми.	promoter	In genetics, a promoter is a region of DNA that initiates transcription of a particular gene.
Пронуклеус –	уруғланган тухум хужайра ядроси.	Pronucleus	A pronucleus is the nucleus of a sperm or an egg cell during the process of fertilization, after the sperm enters the ovum, but before they fuse.
Протон помпаси	махсус оксиллар ёрдамида протонларнинг хужайра мембранаси орқали ўтиш жараёни.	Proton pump	A proton pump is an integral membrane protein that is capable of moving protons across a biological membrane.
Протопласт	механик йўл билан ёки ферментлар ёрдамида хужайралар	Protoplast	Protoplast, initially referred to the first human[citation needed] or, more generally, to the first

	қобиғидан маҳрум қилинган, мембрана ёрдамида шаклини ушлаб турувчи ўсимлик хужайраси.		organized body of a species. In modern biology.
Профаг	бактерия хромосомасига ўрнашган фаг геноми. Лизоген бактериялардан яширинган, юқмайдиган шаклдаги мўътадил бактериофаг.	Prophage	A prophage is a bacteriophage genome inserted and integrated into the circular bacterial DNA chromosome or existing as an extrachromosomal plasmid.
Процессинг	етилиш жараёни	Processing	maturation
Регенерация-	хужайралар тикланиши.	Regeneratio n	cell recovery
Рекомбинант ген –	турли генлар компонентларид ан таркиб топган ген.	Chimeric gene	Chimeric genes form through the combination of portions of one or more coding sequences to produce new genes. These mutations are distinct from fusion genes which merge whole gene sequences into a single reading frame and often retain their original functions.
Рекомбинант ДНК-	турли манбалардан олинган ДНК қисмларидан иборат ДНК.	Recombina nt DNA	Recombinant DNA (rDNA) molecules are DNA molecules formed by laboratory methods of genetic

			recombination to bring together genetic material from multiple sources, creating sequences that would not otherwise be found in the genome.
Рекомбинация-	кроссинговер натижасида ота-оналар генларининг қайта гуруҳланиши(та бақаланиши).	Recombination	
Репарация-	ДНКнинг синтези вақтида ҳамда ҳар хил физик ва кимёвий омиллар таъсирида ДНК молекуласи узилиб қолган ёки шикастланган молекулаларни тuzатишга бўлган хужайраларнинг махсус вазифаси.	Repair	DNA repair is a collection of processes by which a cell identifies and corrects damage to the DNA molecules that encode its genome.
Репрессия-	ген экспрессиясини ва ёхуд ўшанга тааллуқли фермент синтезини тўхтатиш механизми.	Repression	Expression of the gene and the mechanism of recovery of enzymatic synthesis
Репрессор-	маълум оперонда РНК	Repressor	A repressor is a DNA- or RNA-binding protein that

	синтезини тўхтатадиган бошқарувчи оқсил.		inhibits the expression of one or more genes by binding to the operator or associated silencers.
Рестриктазалар -	кесувчи ферментлар, рестрикция ферментлари, ДНКни маълум бир нуклеотидлар қаторида кесадиган ферментлар. Ген муҳандислигида қўлланиладиган восита.	Restriction enzymes	A restriction enzyme or restriction endonuclease is an enzyme that cuts DNA at or near specific recognition nucleotide sequences known as restriction sites.
Сайт-	ўрин, жойланиш-генлар харитасидаги нуқтали мутация ўрни.	Site-	Location, location of a point mutation in the gene map
Сегмент-	карж, бўлак.	Segment-	snippet
Селекция-	танлаш-хайвон, ўсимлик ва микроорганизмларнинг янги зотлари, навлари ва штаммларини яратиш усули.	Selection-	new strains of microorganisms
Скрининг-	битта ҳужайрадан клон олиш йўли билан микроорганизмларнинг аралаш популяциясидан керагини	Screening	Before switching on the contents of a clone of the candidate chart smeshannye population of microorganisms po points.

	ажратиш.		
Субстрат-	озука муҳит- микроорганизмларнинг ўсиши учун керак бўлган озука муҳити.	Substrat-	Pitatlnaya consistently dlya microorganisms kultivirovanie
Термодинамик тизим	қайта ҳосил қилиш, тўплаш ва фойдаланиш хусусиятига эга ўзаро боғлиқ элементлар комплекси.	thermodynamic system	I Properties sobratat complex elementnye
Трансдукция -	бактериофаглар ёрдамида генетик материални донор хужайрадан реципиент хужайрага олиб ўтиш.	Transduktsiya-	Perevesti retsipientnyx candidate trace donornyx candidate s pomoshchyu bacteriophage
Ультрафилтрация -	коллоид заррачаларни ажратиш жараёнидир	Ultrafiltratsiya	The process of selection of the colloidal particles
Фаглар-	вируслар.	Fag-	virus
Фенотип-	организмларнинг ривожланиши жараёнида юзага келган ҳамма белги ва хусусиятлар йиғиндиси.	Phenotype	Sum Properties signs during development of the organism processes
Ферментер-	айрим хомашёларни микроорганизмлар ёрдамида	Fermenter-	Apparatus for fermentation of certain raw materials using microorganisms

	бижғитиш учун ишлатиладиган ҳамма томони берк асбоб.		
Ферментлар-	Биологик катализатор	Enzymes	biocatalyst
Фитоалексинлар –	генотипик ва реал компонентлари.	phytoalexins	Genotype and the actual components
Фотосинтез-	ёруғлик энергияси иштирокида ўсимликлар, сувўтлари ва айрим бактериялар хужайраларида CO ₂ дан органик моддалар ҳосил бўлиш жараёни.		Identification of the organic substances CO ₂ in bacteria, some algae with light energy
Фрагментлар	парчалар, қисмлар.	Fragments	Part
Хемосинтез	айрим микроорганизмларга хос бўлган озикланиш тури.	xemosintez	Class pitaniya spetsificheskimi dlya microorganisms opredelennyx
Хромосомалар –	ДНК ва оқсиллардан иборат хужайра ядросини генетик структура ҳосиласи	Chromosomes	The genetic structure of the core protein and DNA
Центрифуга-	ажраткич,аналитик (лаборатория) ажраткич; тебранувчи ажраткич;	Tsentrifuga -	Separator, analytical (laboratory) Separator; vibration Separator; horizontal Separator; and evaporating Separator;

	<p>горизонтал ажраткич; буғлантурувчи ажраткич; чўктирувчи ажраткич; тиндирувчи ажраткич; препаратив ажраткич; ўз-ўзини бўшатадиган ажраткич; сузиш йўли билан ишлайдиган ажраткич; кўп бўлимли ажраткич; ўта тез айланадиган ажраткич; табақалаштирувчи, тафовутли ажраткич.</p>		<p>Mazur Separator; Stir Separator; Preparation Separator; self-released Separator; swimming, working through the Separator; Separator for the most part; very quickly turn into Separator; differentiated divergent Separator.</p>
Цитозин-	<p>ДНК ва РНК таркибида бўлган пиримидин асоси.</p>	Ctosine	<p>he Fundamental pyrimidine in DNA and RNA</p>
Энергиянинг миграцияланishi	<p>энергиянинг донордан акцепторга тўқнашув йўли билан узатилиши</p>	Energy migration	<p>Parcel Energia via stolknovenie s donor or acceptor</p>
Электрофорез	<p>электр майдони ёрдамида аралашмаларнинг бир жойдан иккинчи жойга ўтиши,</p>	Electrophoresis	<p>Allocate particles move mixtures from one place to another using an electric field</p>

	бўлақларга ажратиш.		
--	------------------------	--	--

VIII. АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

Махсус адабиётлар

1. Bernard R.Glik, Jack J. Pasternak Molecular biotechnology -Washington 2010. 1020 p.
2. Deniz Ekinci “Biotechnology” Croatia, 2015
3. Artikova R.M., Murodova S.S. Qishloq xo‘jalik biotexnologiyasi.Darslik.T.: Fan va texnologiya. 2010.- 276 b.
4. Mirxamidova P. va bosh. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Darslik. Ilm ziyo . 2014y, -335 b.
5. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.:Tafakkur bo‘stoni.2013.-223b
6. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик -Т.: Таълим, 2009. -528 б.
7. Мусаев Х.Н., Ахмедова Н.Х. Кимёвий микробиология. Дарслик. –Т. Фан ва технология. 2012.-428 б

VI. Электрон таълим ресурслари

Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги:

www.edu.uz.

Ўзбекистон Республикаси Алоқа, ахборотлаштириш ва телекоммуникация технологиялари давлат қўмитаси: www.aci.uz.

Компютерлаштириш ва ахборот-коммуникация технологияларини ривожлантириш бўйича Мувофиқлаштирувчи кенгаш: www.ictcouncil.gov.uz.

ЎзРОЎМТВ хузуридаги Бош илмий-методик марказ: www.bimm.uz

Тошкент ахборот технологиялари университети: www.tuit.uz.

1. www.Ziyonet.uz
2. Infocom.uz электрон журнали: www.infocom.uz
3. www.molbio.ru
4. www.biotech.com
5. www.ziyonet.uz

