

**ЎЗБЕКИСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ЖОҚАРЫ ХЭМ ОРТА АРНАЎЛЫ БИЛИМ МИНИСТРЛИГИ**

**ЖОҚАРЫ ТӘЛИМ СИСТЕМАСЫ ПЕДАГОГ ХЭМ БАСШЫ КАДРЛАРДЫ
ҚАЙТА ТАЯРЛАУ ХЭМ ОЛАРДЫҢ ҚӘНИЙГЕЛИГИН
ЖЕТИЛИСТИРИЎДИ ШӨЛКЕМЛЕСТИРИУ
БАС ИЛИМИЙ – МЕТОДИКАЛЫҚ ОРАЙ**

**ҚАРАҚАЛПАҚ МӘМЛЕКЕТЛИК УНИВЕРСИТЕТИ ЖАНЫНДАҒЫ
ПЕДАГОГ КАДРЛАРДЫ ҚАЙТА ТАЯРЛАУ ХЭМ ОЛАРДЫҢ
ҚӘНИЙГЕЛИГИН ЖЕТИЛИСТИРИЎ АЙМАҚЛЫҚ ОРАЙЫ**

“МОЛЕКУЛЯР ЗООЛОГИЯ”

**моделі бойынша
О Қ Ы Ў –МЕТОДИКАЛЫҚ КОМПЛЕКС**

Нукус – 2017

Бул оқыу методикалық комплекс Жоқары хәм орта арнаулы билим министрлигиниң 2017 жыл 24-августдағы 603-санлы буйрығы менен тастыйықланған оқыу реже хәм дәстүр тийкарында таярланды.

Дүзиуши:

доцент Г.Туремуратова

**Пикир
билдириушилер:**

доцент Р.Е.Кошанова
доценти Ш.Алламуратов

*Оқыу-методикалық қолланба ҚМУ-ниң ____ . Кеңесиниң 2017 жыл _____ даги
____-санлы қарары менен баспаға усыныс етилген.*

МАЗМУНЫ

I. ИСШИ ДӘСТҮР	4
II. МОДУЛДЫ ОҚЫТЫҰДА ПАЙДАЛАНЫЛАТУҒЫН ИНТЕРАКТИВ ТӘЛИМ МЕТОДЛАРЫ.....	12
III. ТЕОРИЯЛЫҚ ШЫНЫҒЫҰ МАТЕРИАЛЛАРЫ	15
IV. ӘМЕЛИЙ ШЫНЫҒЫҰЛАР МАТЕРИАЛЛАРЫ.....	67
V. КЕЙСЛАР БАНКИ	71
VI. ӨЗ БЕТІНШЕ ТӘЛИМ ТЕМАЛАРЫ	74
VII. ГЛОССАРИЙ	75
VIII. ӘДЕБИЯТЛАР ДИЗИМИ	81

I. ISШИ ДЭСТҮР

Кирисыў.

Бул дәстүр раўажланған шет ел мәмлекетлериниң жоқары тәлим жөнелисинде эрискен үтыслары хәмде арттырған тәжрийбелери тийкарында “Биология” қайта таярлаў хәм тәжрийбе асырыў үшын таярланған үлгили оқыў реже хәмде дәстүр мазмунынан келип шыққан ҳалда дүзилген болып, ол заманагой талаплар тийкарында қайта таярлаў хәм тәжрийбе асырыў протсесслериниң мазмунын раўажландырыў хәм де жоқары тәлим орынлары педагог кадрларының кәсиплик компонентлигин жәнede арттырып барыўды мәқсет етип қояды.

Жәмийет раўажланыўы тек мәмлекет экономикалық жағдайының жоқарылығы менен, бәлким бул имканият хәр бир адамның камал табыўы хәм тутас раўажланыўына қәншелли бағдарланғанлығы, инновациялардың үсыныс етилиўы менен де өлшенеди. Демек, тәлим системасы нәтийжелилигин асырыў, педагогларды заманагой билим хәмде амелий конликпе хәм тәжрийбелер менен қуралландырыў, шет ел алдағы тәжрийбелерин үйрениў хәм тәлим практикасына үсыныс етыў бүгинги күнның актуал ўазыйпасы эсапланады. “Молекуляр зоология” модули тап сол бағдардағы мәселелерди шешиўге қаратылған.

Буннан тысқары, бул бағдардағы халық аралық хәм Өзбекистанда алып барылып атырған илимий изертлеўлер хәм олардиң әҳмийети туўрысында мағлыўмат бериледи. Үйренилип атырған түрлер нуклеотидлер избе-излигин халық аралық генбанк базасына (NCBI) жайластырыў қағыйдасы хәм жоллары таныстырылады.

Модулдиң мәқсети хәм ўазийпалары

“Молекуляр зоология” модулиниң мәқсети: педагог кадрларды қайта таярлаў хәм тәжрийбе асырыў курси тыңлаўшиларын хайўанлар геносистематикасына тийисли мағлыўматларды бериў, оны орынлаўдиң илимий- методикалық хәм әмелий тәреплери менен таныстырыў, илимий-изертлеў лабораториясы шараятында оны әмелге асырудың шәрт шараятлары менен танысады.

Тыңлаўшилар бул пәнди өзлестириў барысында хайўанлар тоқымасынан геном ДНК ажратыў, ПЦР-амплификация өткериў шәрт-шараятлары хәм мәқсети, гель-электрофорез арқалы рДНК хәм мтДНК концентрациясын анықлаў, ПЦР өнимлерин тазалаў, секвенирлеўге бериў, алынған нуклеотидлер избе-излиги Bioedit дәстүринде дурыслаў, анализ ушын танланған избе-изликлерди дузиў, ClustalW дәстүрлери жәрдемінде нуклеотидлер избе-излигин тегислеў жумысларын алып барыў, генбанк базасы мағлыўматлары менен салыстырыў, алынған нәтийжелер тийкарында түрди анықлаў ямаса жаңа түр ҳаққында мағлыўмат бериледи.

Сол себепли педагог кадрларди қайта таярлаў хәм тәжрийбе асырыў курси тыңлаўшыларына нанобөлекшелерден түрлерди анықлаўда молекуляр таксономия методидан кең пайдаланыў жолларын ашып бериў хәм бул пәнди

биология хәм басқа түрлес пәнлер тараўларында педагог кадрларди қайта таярлаў хәм тәжрийбе асырыў курсинда билим алып атырған тыңлаўшыларға үйретиў заман талабына муапықлығы менен ажратып тұрады.

Модул бойынша тыңлаўшылардиң билими, конликпеси, тәжрийбеси хәм компетенцияларына қойылатуғын талаплар.

“Молекуляр зоология” курсын өзлестириў процессинде әмелге асырылатуғын мәселелер шеңберинде:

Тыңлаўшы:

- хәзирги заман хайўанлар молекуляр таксономиясы, систематикасы хәм филогенетикасына тийисли мағлыўматлар;

- ПЦР-амплификация өткерий шәрт-шараятлары хәм мәксети;

- гель-электрофорез өткерий;

- ПЦР өнимлерин тазалаў, секвенирлеўге берий;

- алынған нуклеотидлер избе-излиги тийкарында түрлерди идентификация қылыў;

- түрли программаларда филогенетик теректи дузий хәм оннан пайдаланыў;

- алынған нуклеотидлер избе-излигин халықаралық Генбанк жайластырыў сияқлы **билимлерге ийе болыўы;**

- Тыңлаўшы:

- хайўанлар тоқымасынан геном ДНК ажратыў;

- ПЦР-амплификация өткерий;

- гель-электрофорез қойыў;

- алынған нуклеотидлер избе-излиги бойынша Blast дәстүри арқалы (NCBI) түрлерди идентификация қылыў **конликпе хәм тәжрийбелерин ийелеўи;**

Тыңлаўшы:

- “молекуляр таксономия” методи арқалы бәсекели хәм жаңа түрлерди анықлаў;

- Филогенетик терек дузий хәм түрлердиң молекуляр филогениясын үйрениў сияқлы **компетенцияларын ийелеўи лазым.**

Модулди дузий хәм өткерий бойынша усыныслар.

“Мобил үлгилер жаратыў” курси лекция хәм әмелий шынығыўлар түринде алып барылады.

Курсды оқытыў процессинде тәлимниң заманагой методлары, педагогик технологиялар хәм ахбарат-коммуникация технологиялары қолланылыўы нәзерде тутылған:

- лекция сабақларында заманагой компьютер технологиялары жәрдемінде презентацион слайдлар хәм электрон-дидактик технологиялардан;

- өткерилетуғын әмелий шынығыўларда техникалық қураллардан, экспресс-сораўлар, тест сораўлары, ақлий хұжим, топарлы пикирлеў, киши

топарлар менен ислеу, коллоквиум өткериу, хэм басқа интерактив тәлим усылларын қоллау нәзерде тутылады.

Модулдиң оқыу режедеги басқа модулар менен байланыслығы хэм избе-излиги.

“Молекуляр зоология” пәнин өзлестиреуде педагог кадрларды қайта таярлау хэм тәжрийбе асыруу курси тыңлаушылары биологиядан: зоология, паразитология, ботаника, генетика, молекуляр биология, биохимия хэм физиология нызамлары хаққында тусиникке ийе болуулары керек. Зоологиядан түрлердиң биологиялық хәр түрлилиги, түрлер ишиндеги полиморфизм машқаласы, систематикасы; биохимиядан - ферментатив реакциялар механизмлери, ислеу процесслери; клетка биологиясынан - клетка дузилиси, клеткада тийкарғы процесслердиң кешийи, клеткалардиң көбейийи; молекуляр биологиядан - ДНК хэм РНК дузилиси, интрогрессия, транскрипция, трансляция нызамлары, рибосомалар дузилиси, генетик код структурә элементлери хаққында жетерли билимге ийе болуулары шәрт.

Модулдиң жоқары тәлимдеги орны

Модулди өзлестиреу арқалы тыңлаушылар заманагой “молекуляр зоология”, яғный хайуанлар геносистематикасы усылының орнын үйренуу, анализ қылуу, әмелде қоллау хэм бахалауға тийисли кәсиплик компетентликке ийе болады.

“Молекуляр зоология” модули бойынша сағатлар бөлистрилиуи

№	Модул темалары	Тыңлаушының оқыу жүклемеси, сағат					
		Хәммеси	Аудитория оқыу жүклемеси				Өз бетинше тәлим
			Жәми	Соннан			
				Теориялық	Әмелий шынығыу	коше шынығыу	
1.	Зоология пәни хэм принциплери. Хайуанлар биологиялық хәр түрлилигин үйренууде молекуляр-генетик усылларди қоллау. Омыртқасизлар молекуляр систематикасы хэм таксономиясын үйренууде дуньяда хэм Өзбекистан бойынша алып барылып атырған илимий изертлеулер.	4	6	2	2	2	
2.	Молекуляр-генетик анализлер ушын зоологиялық үлгилерди жийнау талаплары. Геном ДНКсын ажратуу. Амплификация - ПЗР методидиң тийкарғы тусиниги. ПЗР-амплификация.	8	6	2	4		2
3.	Агароза гелида электрофорез усылының тийкарғы тусиниги. Рибосомал хэм митохондриял ДНК тазалау.	4	6	2	2	2	
4.	Секвенирлеу – ДНКның бирлемши нуклеотидлер избе-излигин анықлау. Нуклеотидлер избе-излиги тийкарында организмди идентификация қылуу.	4	4	2	2		
5.	Филогенетик теректи дузиу. Нуклеотидлер избе-излигин Генбанк (NCBI) базасына жайластыруу. ДНК	6	4	2	2		2

	– диагностика (ПЦР усылы)						
	Жәми:	30	26	10	12	4	4

ТЕОРИЯЛЫҚ ШЫНЫҒЫҰЛАР МАЗМУНЫ

1-тема: Зоология пәни хәм принциплери. Ҳайўанлар биокөптүрлигин үйренёўде молекуляр-генетик усылларди қоллаў. Омыртқасызлар молекуляр таксономиясын үйренёўде дуньяда хәм Өзбекистан бойынша алып барылып атырған илимий изертлеўлер.

Кирисыў. «Биокөптүрлилик» тусынигин анықлаў. Түрлер хәртүрлиги. Бәсекели түрлер. Түрлер ишиндеги полиморфизм. Геносистематика, биокөптүрликти үйренёўдеги молекуляр-генетик усыллар тәрийхи. ДНК-штрихкодлаў. Молекуляр анализлерде қолланылатуғын маркерлер, ядро генлери. Омыртқасызлар молекуляр систематикасы хәм таксономиясын үйренёўде дуньяда хәм Өзбекистан бойынша алып барылып атырған изертлеўлер.

2-тема: Молекуляр-генетик анализлер ушын зоологиялық үлгилерди жийнаў талаплары. Геном ДНКсын ажратыў. Амплификация - ПЗР методиниң тийкарғы тусыниги. ПЗР-амплификация.

Молекуляр-генетик анализлерде зоологиялық үлгилерди жийнаў талаплары. Стандарт фенол-хлороформ хәм коммерциялы реагент топламлары жәрдемінде омыртқасызлар үлгисинен геном ДНКсын ажратыў. ПЗР-амплификация откериў. ПЗР ушын керекли митохондриял хәм ядро праймерлерин таңлаў. ПЗР режими.

3-тема: Агароза гелида электрофорез усылының тийкарғы тусыниги. Рибосомал хәм митохондриял ДНКсын тазалаў.

Агароза гелин таярлаў хәм ПЗР өнимлеринде электрофорез откериў. ДНК концентрациясын өлшеў. ДНК тазалаў топламлары жәрдемінде агароза гели хәм реакция араласпасындағы ДНКны ажратыў.

4-тема: Секвенирлеў – ДНКның бирлемши нуклеотидлер избе-излигин анықлаў. Нуклеотидлер избе-излиги тийкарында организмди идентификация қылыў.

ПЗР-амплификацияның асимметрик реакциясын флуоресцент нишанлы нуклеотидлер жәрдемінде дузиў (секвенирлеў реакциясы) (2 режеге қараң). ПЗР-амплификация реакциясындағы ассиметрик фрагментлерди тазалаў. Blastn программасы жәрдемінде коплеген тегислеў жумысларын алып барыў. Анализ ушын танланған избе-изликлерин дузиў. ClustalW, Bioedit программалары жәрдемінде нуклеотидлер избе-излигин тегислеў жумысларын алып барыў

5-тема: Филогенетик теректи дузиў. Нуклеотидлер избе-излигин генбанк (NCBI) базасына жайластырыў. ДНК – диагностика (ПЦР усылы).

Филогенетик теректи дузиўде MEGA-5 программасында көбирек хакийкатға уксаитуғын усылы (maximal likelihood), максимал экономикалық (maximal parsimony), шамалап корилген орташа жуплық (UPGMA) хэм жақын қоңсылар (Neighbor-joining) дәстүрлери арқалы тексерыў. Алынған нуклеотидлер избе-излигин ҳалықаралық Генбанк (NCBI) жайластырыў. Хайўанлар паразитлерин экспресс-анализ усылы (ПЦР технологиясы).

ӘМЕЛИЙ ШЫНЫҒЫҰЛАР МАЗМУНЫ

Оқыў шынығыўларын дузиў бойынша ӨзР ФА Өсимлик хэм хайўанат элеми Молекуляр биология хэм биотехнология лабораториясы илимий хизметлери тәрәпинен корсетпе хэм үсыныслар ислеп шығылады. Онда педагог кадрларди қайта таярлаў хэм тәжрийбе асырыў курси тыңлаўшылары тийкарғы лекция темалары бойынша алған билим хэм конликпелерин шынығыўлар алып барыў процессинде жәнеде байытады. Сондай-ақ, сабақлық хэм оқыў қолланбалар тийкарында тыңлаўшилар билимлерин беккемлеўге эрисыў, тарқатпа материаллардан пайдаланиў, илимий мақалалар хэм тезислерди таярлаў арқалы тыңлаўшилар билимин асырыў, темалар бойынша көргизбели кураллар таярлаў хэм басқалар усыныс этиледди.

1-әмелий шынығыў:

Омыртқасыз хайўанлар тоқымасынан геном ДНКсын стандарт хэм Diatom DNA топламынан пайдаланған ҳалда ажратыў.

Diatom DNA Prep (Россия) реагентлери топламы жәрдемінде ДНК ажратыў методи. Бул топлам ДНКны түрли тәбийий материаллардан ажратыў, сондай-ақ клиник үлгилерден ДНКны тез тазалап алыў имканын береди. Бул усыл ФХ – методынан тезлиги (1дана үлгиге 30 мин. – 1,5 ўақыт сарыпланады), токсик (зәхәрли) реагентлердиң ислетилмеўы менен ажралып тұрады. Тәсир қылыў механизими гуанидинтиоционатлы лизис қылыўшы реагенттың ислетилиўыне тийкарланған болып, ол клетканы лизисыне, клетка солубилизациясына, сондай-ақ клетка нуклеазалы денатурацияға алып келеди. Лизис қылыўшы (майдалаўшы) – реагент қатнасында ДНК NucleosTM – сорбент топламында актив сорылады, соң спиртли эритпеде белок хэм дузлардан аңсат жуўылады. Сорбенттен ажратылған ДНКны ПЗР да ислетиў мумкин. Топламның курамы: майдалаўшы реагент, дузли буфер Nucleos сорбентиниң суспензиясы, “Экстра Ген” ион алмасыныўши араласпа суспензиясы. Diatom DNA Prep 200 реагентлер топламы жәрдемінде нематодалардиң тоқымаларынан ДНКны ажратып алыў методы төмендеги басқишларди өз ишине алады. Бул топлам бағдарламасында көрсетилген.

2- әмелий шынығыу: **ПЗР реакциясын өткеріу.**

ПЗР қойыу үшін ажратылған ДНК үлгілерине жетерли (0,5 мкл) эппендорф пробиркасы хәм сол эппендорфларға мас штативлерден пайдаланылды. Реакция араласпасын таярлауда «Евроген» фирмасында ислеп шығарылған эритпелерден пайдаланылды. Бул реактивлер суу (тазаланған), 10x буфер, dNTP эритпеси, 50x TAG-полимераза хәмде сол фирмада ислеп шығарылған нематодалар үшін мас праймерлерден пайдаланылды. Бул материаллар тийкарында ПЗР үшін араласпа (Master-mix) таярланады. Араласпа таярлауда 10 мкл хәм 200 мкл пипеткалардан пайдаланылды.

3- әмелий шынығыу:

Агароза гелин таярлау хәм ПЗР өнимлеринде электрофорез өткеріу.

ПЗР өнимлеринде ДНКның бар екенлигин электрофорез қылыу усылы арқалы анықлау мүмкин. 1% агароза гель таярлауда 1 г агарозаны 250 мл колбаға салынды хәм устине 100 мл ТАЕ (Tris-acetate, edta) араласпасын салып қол менен агароза эригенше араластырылады. Микроволновка печкасы жәрдемінде 2-3 минут қайнатылды хәм араласпаның температурә 45-50°C жеткенше хана температурасында сууытылды. Соң 3 мкл этидий бромисти араласпасы салынды. Таяр болған араласпаны 10 ямаса 15 дана кетекшеден ибарат тарақ (гребенка)ға салынды хәм гель қатаман дегенше сақланды. Гель қатғанға шекем 25 мкл лы ПЗР өнимлеринен 4 мклдан алып 1 мкл бояу менен араластырылады. Қатған гель ТАЕ араласпасы менен толдырылған камераға салынды хәм гель кетекшелерин хәр бирине ПЗР араласпасы салынды хәмде кетекшени ақырғысына маркер («DNA Ladder» – бул 1000 bp Ladder фирмасы «Fermentas» ДНК ны неше жуп нуклеотид оқытылғанын билдиреди). Камерада 45 минут 80-100 вольт, 100 миллиампер кушленуу менен ДНК айдалды. Электрофорез тамам болғаннан соң камерадан гелди абайлылық пенен алып, трансиллюминаторда көз менен көрип тексерилди хәм сууретке алынды.

4- әмелий шынығыу:

ClustalW, Bioedit программалары жәрдемінде нуклеотидлер избе-излигин тегислеу жұмыстарын алып барыу.

Сиквенстен келген мағлыұматларди тегислеуде «Chromas version 1.45» (McCarthy, 1996 – 1998), «Clustal X version 1.81» (Thompson, Gibson, 2000), «Gendoc version 2. 5. 000» (Nicholas, 1999), «ForCon version 1.0 for Windows» (Raes, Van de Peer, 1996), PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998) биоинформатик дәстүрлерден пайдаланылады.

BioEdit – избе-изликлерин дузиулеуши биологиялық редакциялау болып, Windows 95/98 / NT / 2000 / XP / 7 жазылған. Жұмыс столы компютеринде интуитив интерфейс менен бир қанша документлерди қолай функциялары менен избе-изликлерин туырлау хәм манипуляция қылыу сияқлы функцияларын орындау үшін салыстырмалы аңсат. Избе-изликлер

вариантлары хәм бир неше манипуляциялар, сыртқы орайларды дәстүр жойбарларын процессин жеңиллестириўде, избе-изликлерге кириў хәм манипуляциялаўда ноқат хәм кнопкаларға тийиў сияқлы әпиўайы операцияларды орынлаў имканын бередиди.

5- әмелий шынығыў: BLAST (NCBI) – ислеў.

Объект ДНКсының бул тараўы избе-излиги белгили болғаннан соң, оны мағлыўматлар базасы (NCBI) менен салыстырылады, қайсы объекттиң бул избе-излиги басқа барлық түрлер салыстырылады хәм үйренилип атырған түр тез анықланады. Егерде избе-излик базадағы қандайда бир туўры келмесе, демек бул жаңа түр, яғный белгисиз түр табылғанынан дерек бередиди. Хайўанлардиң сондай тараўын үйренуў мәқсетинде митохондриял ямаса ядро гениң фрагментлери таңланды.

6- әмелий шынығыў: Филогенетик терек дузиў (MEGA-5).

Филогенетик анализ - BLAST ямаса MSA ушын анық болмаған избе-изликлер ортасындағы мунәсебетлерин анық көрсете алатуғын шақаланған диаграммаларди жарата алады. Филогенетик терек, эволюцияның өзара байланысларын хәм дивергенция модулына молжелленген эволюцион хәм салыстырмалы изертлеўлер ушын пайдалы хәмде молекуляр хәм биохимиялық изертлеўлерде ген ямаса белок функциялары туўрысында гипотезаның генерациясында әҳмийетли есапланады. Филогения үлкен тараў есапланып, өз-өзинен путин бир курсди ийелейди. Мәқсет тек филогенетик терек дузиўден тысқары, бәлким “қырқыў хәм қойыў” принциплерин тусиныў хәм билиў керек болады.

ОҚЫТЫЎ ТҮРИ

Бул модуль бойынша төмендеги оқытыў түрлеринен пайдаланылады:

- лекциялар, әмелий шынығыўлар (мағлыўматлар хәм технологияларын аңлап алыў, ақый қизиғыўди раўажландириў, теориялық билимлерди беккемлеў);

- топарда сәубетлесиў (көрилип атырған жойбар шешимлери бойынша усыныс бериў қәбилиетин асырыў, эситиў, дурыс пикир хәм логикалық жуўмақлар шығарыў);

- бәсеке хәм дискуссиялар (жойбарлар шешими бойынша дәлиллер хәм тийкарлы аргументлерди бериў, эситиў хәм машқалалар шешимин табыў қәбилиетин раўажландырыў).

БАҲАЛАЎ МИЙЗАНЛАРЫ

№	Оқыў-тапсырма түрлери	Максимал балл	Баҳолаў мийзаны		
		2,5	"жоқары" 2,2-2,5	"жақсы" 1,8-2,1	"қанықарлы" 1,4-1,7
1.	Тест-сынаў тапсырмаларын орынлаў	0,5	0,4-0,5	0,34-0,44	0,28-0,3
2.	Оқыў-жойбар жумысларын орынлаў	1	0,9-1	0,73-0,83	0,56-0,7
3.	Өз бетинше жумыс тапсырмаларын орынлаў	1	0,9-1	0,73-0,83	0,56-0,7

II. МОДУЛДЫ ОҚЫТЫҰДА ПАЙДАЛАНЫЛАТУҒЫН ИНТЕРАКТИВ ТӘЛИМ МЕТОДЛАРЫ

“Тусиниклер анализи” методи

Методдиң мәксети: бул метод талабалар ямаса қатнасыўшыларды тема бойынша таяныш тусиниклердиң өзлестириў дәрежесин анықлаў, өз билимлерин еркин түрде тексериў, баҳалаў, сондай-ақ, таза тема бойынша дәстлепки билимлер дәрежесин анализ қылыў мәқсетинде қолланылады.

Методди әмелге асырыў тәртиби:

- қатнасыўшылар шынығыў қағийдалары менен таныстырылады;
- оқыўшыларға темаға ямаса бапға тийисли болған сөзлер, тусиниклер аты тусирилген тарқатпалар бериледи (индивидуал ямаса топарлы тәртипде);
- оқыўшылар бул тусиниклер қандай мәни аңлатыўы, қашан, қандай жағдайларда қолланылыўы ҳаққында жазба мағлыўмат береди;
- белгиленген ўақыт ақырына жеткеннен кейин оқытыўшы берилген тусиниклердиң дурыс хәм толық мәнисин оқып еситтиреди ямаса слайд арқалы корсетеди;
- хәр бир қатнасыўшы берилген дурыс жуўаплар менен өзиниң шахсий мунәсебетин салыстырады, парқларын анықлайды хәм өз билим дәрежесин тексерип, баҳалайды.

“Кейс-стади” методи

«Кейс-стади» - англишан сөз болып, («case» – анық жағдай, хәдийсе, «stadi» – үйренуў, анализ қылыў) анық жағдайларди үйренуў, анализ қилиў тийкарында оқытыўди әмелге асырыўға қаратылған метод есапланади. Бул метод дәстлеп 1921 жыл Гарвард университетинде әмелий жағдайлардан экономикалык басқарыў пәнлерин үйренуўде пайдаланыў тартибинде қолланылған. Кейсда ашық ахбаратлардан ямаса анық ўақия-хәдийседен жағдай сыпатинда анализ үшын пайдаланыў мумкин. Кейс хәрекетлери өз ишине төмендегилерди алади: Ким (Who), Қашан (When), Қайерде (Where), Не үшын (Why), Қандай (How), Не-нәтийже (What).

“Кейс метод” ын әмелге асырыу басқишлары.

Жумыс басқишлары	Искерлик түри хәм мазмуны
1-басқиш: Кейс хәм оның ахбарат тәмийнаты менен танистырыу	<ul style="list-style-type: none"> ✓ жеке тәртипдеги аудио-визуал жумыс; ✓ кейс менен танысуу(текстли, аудио ямаса медиа түринде); ✓ ахбаратты улыўмаластырыу; ✓ ахбарат анализи; ✓ машқалаларди анықлау
2-басқиш: Кейсди анықластырыу хәм оқыу тапсырығын белгилеу	<ul style="list-style-type: none"> ✓ индивидуал хәм топарда ислеу; ✓ машқалаларди актуаллық иерархиясын анықлау; ✓ тийкарғы машқалалы жағдайди белгилеу
3-басқиш: Кейсдеги тийкарғы машқаланы анализ қилыу арқалы оқыу тапсырмасының шешимин излеу, шешіу жолларын ислеу шығыу	<ul style="list-style-type: none"> ✓ индивидуал хәм топарда ислеу; ✓ дурыс шешим жолларын ислеу шығыу; ✓ хәр бир шешимнің имканиятлары хәм тосықларын анализ қилыу; ✓ дурыс шешимлерин таңлау
4-басқиш: Кейс шешимин формаландырыу хәм тийкарлау, презентация.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ жеке хәм топарда ислеу; ✓ дурыс вариантларди әмелде қоллау имканиятларын тийкарлау; ✓ дәретиуши-жойбар презентациясын таярлау; ✓ ақырғы жуўмақ хәм жағдай шешиминің әмелий аспектерин жаратиу

Кейс. ДНК дан таярланған наноқурылма (Гарвард университети илимпазлары жаратқан) хәм “Ормекши” нанороботи (Колумбия университети илимпазлары жаратқан) өзлеринің химиялық қурамы менен парқланади. Әмелиятта қобирек олардың қайсы биринен пайдаланиу қолайлы?

Кейси бажариш босқчилари ва топшириқлар:

- Кейсдаги муаммони келтириб чиқарган асосий сабабларни белгилаңг (индивидуал ва кичик гуруҳда).
- Амалиётда икки нанороботни қўллаш бўйича афзаллиқлар ҳақидаги маълумотларни жамлаңг (жуфтликлардаги иш).

Технологияның мақсети: Бул технология қатнасыўшилардағы улыўмалық пикирлерден жеке жуўмақлар шиғарыў, салыстирыў, теңлеў арқалы ахбаратти өзлестириў, жуўмақлаў, сондай-ақ, еркин доретиўши пикирлеў конлиқпелерин формаландирыўға хизмет қилади. Бул технологиядан лекция шиниғыўларында, бекемлеўде, отилген теманы сораўда, уйге тапсирма бериўде хэмде әмелий шиниғыў нәтийжелерин анализ етиўде пайдаланыў үсыныс этилади.

Технологияны әмелге асирыў тәртиби:

- қатнасыўшилар темаға тийисли болған ақырғы жуўмақ ямаса идея усыныс этиледи;

- хәр бир қатнасыўшыға ФСМУ технологиясының басқишлары жазылған қағазларди тарқатилади:

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

- қатнасыўшилардиң мүнәсебетлери индивидуал ямаса топарлы тәртипте презентация қилинади.

ФСМУ анализи қатнасыўшиларда кәсиплик-теориялық билимлерин әмелий шиниғыўлар хэм бар тәжрийбелер тийкарында тезрек хэм нәтийжели өзлестирилиўыне тийкар болады.

Үлги.

Пикир: “Осимликлер биотехнологиясы тусиниги хэм оның тарийхи”.

Тапсирма: Бул пикирге салыстирма мүнәсебетинизди ФСМУ арқалы анализ қилиң.

III. ТЕОРИЯЛЫҚ ШЫНЫҒЫҰ МАТЕРИАЛЛАРЫ

1-тема: Зоология пәни хәм принциплери. Хайўанлар биокөптүрлилигин үйренейде молекуляр-генетик усылларди қоллаў. Омыртқасызлар молекуляр таксономиясынүйреїде дуньяда хәм Өзбекистан бойынша алып барылып атырған илимий изертлеўлер.

РЕЖЕ:

1. Зоология пәни хәм принциплери.
2. Турлер көптүрлилиги. Жумбақлы турлер.
3. Биокөптүрликти үйренейдеги молекуляр-генетик усыллар тарийхи.
4. ДНК-итрихкодлаў.
5. Молекуляр анализлерде қолланылатугын маркерлер, ядро генлери.
6. Омыртқасызлар молекуляр таксономиясын үйрениїде дуньяда хәм Өзбекистанда алып барылып атырған изертлеўлер.

Таяныш сөзлер: Биокөптүрлилик, бәсекели түрлер, полиморфизм, ДНК-итрихкодлаў, ядро генлери, молекуляр таксономия, Гель-электрофорез, УФ-нуры ТАЕ, агароза, бромистый этидий, ДНК тазалаў топламы, ДНК-маркер.

1.1. Зоология пәни хәм принциплери.

Зоология – хайўанлар тиришилигин илимий үйрениїден ибарат болып, хайўанат әлеми бойынша инсанлардиң әсирлер даўамында жийналған изертлеўлери тийкарында жаратылған. Инсаният мәдениятының түрли дәўирлериндеги мифологиясында хайўанлар хәм олардиң келип шығыўы туўрысында хәр түрли сырлы әпсаналар тоқып шығарған. Эндиликде болса зоологлар, бул сырлы карасларды үйрениї ушын илим-пәнниң алдағы технологиялары хәм методларына таянбақда. Биз хайўанлар көптүрлилигин характерлеў хәм оның систематикалық система тийкарында дузиїди үйренемиз. Биосфераның барлық бағдарларын үйрениїдеги қурамалы хәм қызыклы процесс миңлап зоологлар үлеси тийкарында қурылады.¹

Хайўанат әлеми тиришилик эволюциясы теректиң өзине тән бөлимин пайда етеди. Бул жүдә үлкен хәм әйемги бөлим болып, 600 миллион жыллар алдын кембрий дәўирине шекем пайда болған. Хайўанлар әлемин жәнеде үлкенрек болған эукариотлар деген бөлимге де киритеди. Эукариотлар клеткалары мембрана менен қапланған ядроға ийе болған организмлер есапланады.

¹ Hickman et al., 2008, 3 бет

Тиришилик тарийхы кең көлемдеги хэм хэр дайым пайда болып тұратуғын өзгеристи көрсетеди, оны биз *эволюция* деп атаймыз. Тиришилик шежиреси дәстлепки тиришилик формаларынан баслап, хәзирги кунде жасап атырған миллионлап түрлерге шекем раўажланды хэм тармақланды, жәнеде жаңа қасийетлер формаланды хэм әўладлардан әўладларға өтип келди.

Тири системалардиң улыўмалық қасийетлери. Тиришилик эволюциясындағы эң әҳмийетли қасийетлер химиялық бийтакрарлық; қурамалылық хэм иерархик дузилис; көбейиў (нәсиллик хэм өзгериў); генетик дәстүрге ийе болыў; әтрап-орталық менен өзара мунәсебетте болыў хэм хәрекетти өз ишине алады.

1. Химиялық бийтакрарлық. *Тири системалар жалғыз (такрарланбас) хэм қурамалы молекуляр дузилисти көрсетеди.* Тири системалар, макромолекулалар деп аталыўши ири молекулаларды бирлестиреди, олар тири емес материяның киши молекулаларына салыстырғанда қурамалы. Биз биологиялық молекулалардиң торт тийкарғы дәрежеге ажратамиз: нуклеин кислоталары (полинуклеотидлер), белоклар, углеводлар хэм майлар (липидлер).

2. Қурамалылық хэм иерархик дузилис. *Тири системалар жалғыз (такрарланбас) хэм қурамалы иерархик дузилисти көрсетеди.* Тири емес материя да хеш болмағанда атомлар хэм молекулалардан дузилген хэм ол да көбинесе жоқары дәрежедеги тәртипли дузилеске ийе. Бирақ, тири әлемдеги атомлар хэм молекулалардиң өзара байланыс схемалары тири емес әлемде учрамайды. Тири системаларда сондай иерархик дузилисти гузетемиз, ол макромолекулалар, клеткалар, организмлер, популяциялар хэм түрлерди, қурамалықтиң өсип барыўы тәртибинде өз ишине алады.

3. Көбейиў. *Тири системалар өзлерин көбейтире алады.* Тиришилик өз-өзинен пайда болмайды, бәлким тиришиликтин алдыңғы формасынан көбейиў жолы менен жузеге келеди. Генлер жаңа генлерди жаратыў ушын өзлерин репликация (өз нусхаларын жаратыў) қылады. Клеткалар жаңа клеткаларды жаратыў ушын бөлинеди. Организмлер, жаңа организмлерди жаратыў ушын, жынысый ямаса жынысый емес жоллар менен көбейеди. Популяциялар жаңа популяцияларди пайда етиў ушын бөлимлерге ажралыўы мумкин; түрлер де, түрлениў деп аталыўшы процесс арқалы жаңа түрлерди пайда етиў ушын бөлимлерге бөлиниўлери мумкин.

4. Генетик дәстүрге ийе болыў. *Генетик дәстүр нәсиллигиң исенимлигин тәмийинлейди.* Организмлердиң раўажланыўы хэм жасаўы ушын зәрүр белок молекулалары *нуклеин кислоталарында* кодланған. Ҳайуанлар хэм көплеген басқа организмлерде генетик мағлыўматт ДНКда жайласқан. ДНК нуклеотидлар деп аталыўшы бөлимлердиң сызықлы хэм узын шынжырларынан ибарат болып хэр бир нуклеотид бир қант фосфатыны (деоксирибоза фосфат) хэм төрт азотлы тийкарлардан бирейин (аденин, цитозин, гуанин ямаса тимин, қысқаша белгилениўи, мәс түрде А, Ц, Г хэм Т) өз ишине алады. Нуклеотидли тийкарлардиң избе-излиги ДНК молекуласы арқалы белгиленетуғын белоктағы аминокислоталар тәртиби ушын кодди (арнаўлы мағлыўмат) өз ишине алады. ДНКдағы тийкарлар хэм

белокдағы аминокислоталар избе-излиги ортасындағы маслық *генетик код* деп аталады.

5. Затлар алмасыныұы. *Тири организмлер атраптадағы азық затларды қабыл қылыұ арқалы өзлерин сақлап қалады.* Азық затлар тири системаларды қурыұ (синтез қылыұ) хәм тәминлеұ ушын химиялық энергия хәм молекуляр бөлимлерди қолға киритиұ ушын пайдаланылады. Бул әхмийетли химиялық процесслерди биз затлар алмасыныұы (*метаболизм*) деп атаймиз.

6. Раұажланыұ. *Барлық организмлер өзине тән тиришилик циклинен өтеди.* Раұажланыұ организмның пайда болыұынан (әдетте мәйек клетканың сперма арқалы туқымланыұынан) баслап, ер жетиұге шекем басынан кеширетуғын өзгерислерди билдиреди. Раұажланыұ әдетте форма хәм өлшемлердеги өзгерислерди хәмде организм шеңбериндеги дузилмелер арасындағы парқланыұын көрсетеди.

7. Атрап-орталық пенен өзара мунәсебет. *Барлық ҳайұанлар атирап-орталық пенен өзара мунәсебетте болады.* Организмлердин атирап-орталық менен өзара мунәсебетин үйрениұши пән *экология* деп аталады. Ғайұанлардин географиялық бөлистирилиұи хәм көплигине тәсир қылыұшы факторларды үйрениұге айрықша қызығыұ пайда болмақта. Экология пәни атрап-орталықтағы қозғатыұшилар арқалы қандай тәсирлениұи хәм өз затлар алмасыныұы хәм физиологиясын тәртипге салған ҳалда оларға қандай жуұап қайтарыұын изертлейди.

8. Хәрекет. *Тири системалар хәм олардин бөлимлери система ишинен анық хәм бақланатуғын хәрекетти көрсетеди.* Тири организмлердин атрап-орталықтан алған энергиясы, оларға басқарылатуғын хәрекетлерди әмелге асырыұға имкан береди.²

Пән принциплери. Тәбият пәни. Пән - бул тәбийий әлем туұрисында сораұлар бериұ хәм базда бул сораұларға анық жуұаплар алыұ усылы есапланады. Пән, заманагой тусиникке көре, инсаният тәрийхинда жақында (ақырғы 200 жыл ишинде ямаса соған уқсас) формаланған болсада, тәбият туұрисында сораұлар бериұ бурыннан бар. Бул бөлимде, зоология пән сыпатында қандай методологияны қоллаұын көзден өткеремиз. Бул қәсийетлер пәнлерди илимий билиұ системасынан тысқары болған тараұлар, мысалы, көркем өнер хәм диннен ажратады. **Илимий метод.** Пәннің усы тийқарғы мийзанлары *гипотетик-дедуктив метод*ди формаландырады. Бул методдин биринши адымы қызықтырып атырған сораұға потенциал (кутилетуғын) жуұаплар ямаса гипотезалар дузиұден ибарат. Бундай гипотезалар әдетте тәбиятты буннан алдыңғы гузетиұлерине тийқарланады ямаса сондай гузетыұлерге тийқарланған теориялардан келип шығады. Илимий метод бир қатар адымлар избе-излиги көринисинде қисқаша тусиндирилиұи мумкин: 1). Гузетиұ; 2). Сораұ бериұ; 3). Гипотеза; 4). Әмпирик тексериұ; 5). Жуұмақлар; 6). Баспа.³

Бул тараұдағы жумыслардин үлкен жеңислерге ерисиұи хәм

² Hickman et al., 2008. 4-9 бетлар

³ Hickman et., 2008. 11-12 бетлар

күшейтирилиуине қарамастан, хәзирги ўақытта биокөптүрликти үйрениў жағдайы дәрежеси қыйын аўхалда болады. Хәзирги дәўирде 1,9 млн жақын тири организмлер бар болып, кейинги 250 жыл ишинде олардиң үлкен бөлиmine тусиник берилген. Түрли изертлеўшилердиң пикрине көре, хәзирги ўақытта көби ямаса азы менен текқана омыртқалы ҳайўанлардиң (90 % жақын) хәм жоқары дәрежели өсимликлердиң (85% жақыны) түрлерине сыпатлама берилген. Буўын аяқлылардиң 25 % жақын түрлери анализ қылынған (сол қатары 10 % насекомалар), 5 % замаррық хәм диатом суў отлары хәм б.к. (Шнеер, 2007).

2000 жыллар басында таксономик мағлыўматларди кең хәм толық пайдаланыўын тәминлеў мәқсетинде интерактив каталоглар (Catalog of Life) дузиў усыныслары пайда бола баслады (Bisby, 2000; Godfray, 2002). Бул ўақытта бир топар изертлеўшилер, пайда болған машқалаларды нәтийжели шешиўде ДНК-систематика жәрдем береди деп айтқан (Tautz, 2002, 2003). Бундай усыныслар пайда болыўына себеп секвенирлеў технологиясында революцион (Сэнгер-секвенирлеў технологиясы) өзгерислери болды. Молекуляр-генетик усыллардан пайдаланып, биокөптүрликти хәм систематика машқалаларын тусиндириў хәдден зияд қизиқлы болып қалмақта. Бирақ, текқана молекуляр-генетик усыллардан пайдаланыўда систематиклер менен биргеликте болмастан, бар түрди анық бахалаў мумкин, бирақ оларды тусиндириў барысында жәрдем бере алмайды. Бундай қараслардиң абзаллығы сонда, бөлек алынған избе-изликлердиң ДНК-маркерлери ол ямаса бул түрлер ўәкиллерин қәнийге тарепинен бул түрдиң дәстлепки анық идентификациясы қылынбағанлығы кем мағлыўмат есапланады (бундай усылдағы биокөптүрликти кең тарқалған), бирақ текқана морфологиялық усылларды қоллаў да, биокөптүрликти ели анықланбаған бөлимин ашып бералмайды.

2003 жылы “ДНК-штихкод” усылы ямаса молекуляр “баркодиң”ди усыныс етиўди. Бул усылдың тубинде сондай көз қарас бар, қайсы геном тараўының онша үлкен болмаған размери табылды (600-800 нуклеотидлер), солай етип, бир түр индивидлери ямаса хәр түрли түрлер избе-излиги узынлығы бир қийлы болады. Сондай тараўды ДНК-штрихкод (barcode) деп атады. Объект ДНКсының бул тараўы избе-излиги белгили болғаннан соң, оны мағлыўматлар базасы (IBOL) менен салыстырылады, қайсы объекттиң бул избе-излиги басқа барлық түрлер менен салыстырылады хәм үйренилип атырған түр тез анықланады. Егерде избе-излик базадағысы туўры келмесе, демек бул жаңа түр, яғный белгисиз түр табылғанынан дерек береди. Хайўанлардың сондай тараўын үйрениў мәқсетинде митохондриял генниң фрагментлери, яғный цитохромоксидазаның кодлаўшы 1 суббирлиги (CO1) таңланды. Бул усыл хәзирги ўақытта жүдә кең тарқалды, мағлыўматлар базасы (IBOL) бәрхә жаңа избе-изликлери менен толдырылмақта.

Бирақ бул усылда да бир қанша кемшиликлер бар. Бириншиден, табиий, митохондриял генлер фрагментлери бойынша түрлер маслығын анықлаў қийын. Бул жағдайда митохондриял интрогрессия (introgression-интрогрессия – түрлер ортасындағы гибридлениў нәтийжесинде басқа түрди

генди алыуы) менен тоқнасыу келиуши мумкин, псевдогенлер барлығы хэм басқаларды есапқа алыу керек. Буннан тысқары, тек митохондриял ДНК избе-излиги менен ядро ДНКсы полиморфизмын бахалай алмауы мумкин, бул ели анықланбаған биокөптүрликти бахалауда жүдә зәрүр есапланады. Солай болса да, бул усыл хәзирде биокөптүрликти үйрениуде тийкарғы молекуляр-генетик усыл болып хызмет қылмақта.

Систематика хэм филогенияда молекуляр-биологиялық белгилердин қолланылыуы өтген әсирдин 70-жылларында пайда болды. Бул ўақытта систематик дузилеслер ушын эукариотлардин нуклеотидлер избе-излигин 18S, 5,8S ямаса 28S рДНК генлери универсал маркер сыпатында таңланыуы, жоқарыда айтылғандай, сиквенирлеу усылының раўажланыуы хэм материлларды қысқа мүддетте алыу хэм қайта ислеу имканын берди. геномда рибосомал избе-изликлер коплеп үлгилерде бар болыуы хэм бир неше бөлимлерден дузиледи, кайсы олардан бири, рибосома функционал суббирлигине тийисли (18S, 5,8S ёки 28S) болып, тийкарынан стабил есапланады, яғный эволюцион консерватив есапланады, бул жағдайда, ITS1 хэм ITS2 ишки спайсер избе-излиги, карама-қарсы, эволюцион өзгериушең есапланады (лабилний). Консерватив тараўлар полимер шинжырлы реакциялар биринши баскишда - праймерлерди изертлеп атырған ДНК-матрицаға байланысыуында, вариабель тараўлар болса, түрлерди идентификациялауда қызмет қылады. Түрге тән вариабель тараўлардин уқсаслық дәрежеси хәр түрли түрлердин эволюцион туўысқанлығын аңлатады.

Систематика хэм филогения өзиниң дузилесин «рибосомал» хэм «белоклы» тереклер дузиу ушын таза үлкен усылға ийе болды, секвенирлеу болса әпиўайығана лаборант жумыси болып қалмақта. (Бул еле бизде емес). Соны айтыу мумкин, биологияда таза парадигма формаланды – органик әлемниңде барлық формаларында ДНК хәр түрли көринислери бар.

Бирақ, усыныс етилген молекуляр филогенетик тереклерде сәйкес емесликлер пайда болды. Систематика хэм филогенетиканың өнимли раўажы, морфологиялық, физиологиялық хэм молекуляр мағлыўматлары менен биргеликте – организмлердин систематикасы хэм филогенетикасының синтетик системасын ислеп шығыу есапланады. Сондай көз қараслар жуз жыллықтың 90 жыллардан баслап актив исленбекте.⁴

Филогенетик реконструкцияларды жоқары таксономик дәрежеде орынлау ушын басқа генлер ямаса ядро ДНКсы тараўлары, мысалы, элонгация факторы (elongation factor, Ef-la), белок ыссылык стреси генлери, миозинлер, гистонлар пайдаланылады. Соның менен бирге белоклардин аминокислоталар избе-излиги хэм РНКның екилемши системалары да салыстырылады. Шаңарақ хэм әўладлар дәрежесинде болса митохондриял генлер анализ қылынады.

Бул қолланба “Хайўанлар молекуляр систематикасы хэм

⁴ Patterson, 1994; Margulis и др., 1996

филогенетикасы”н үйрениушилерге молжелленген болып, молекуляр-генетик мағлыұматлары тийкарында хайұанлар систематикасы, таксономиясы хэм филогениясын, морфологиялық хэм физиологиялық мағлыұматлар менен бирге кең қоллау имканин бериуге қызмет қылады.

Биологиялық көптүрлилик тусиниги. Биокөптүрлиликти үйрениу биологияның тийкарғы ұазийпаларынан бири есапланады. Бирақ, биринши нәубетте "Биологиялық көптүрлилик" тусинигине нелер кириуйин анықлау зәрүр. Заманагой концепцияға көре, организмлер биокөптүрлилиги барлык орталықлардағы тири организмлер, курғақлық, теңиз хэм басқа суу экосистемалардағы экологиялық комплекслер: түр ишинде, түрлер хэм экосистемалар ортасында көптүрлиликти пайда етеди. (*Рио-де-Жанейро, 3-14 июн 1992 йил*, Бирлескен Миллетлер Шөлкеминиң этрап-орталық хэм раўажланыу конференциясында қабыл қылынған биологиялық көптүрлилик туурысындағы Конвенция).

Буған көре биологиялық көптүрлилик уш типге болинеди:

- экосистемалар хэм ландшафтлар (жасау жериниң хәр түрлилиги);
- түрлер хәр түрлилиги;
- генофонд (генетик хәр түрлилик).

Генетик хәр түрлилик який генетик полиморфизм – популяциялардиң белгилер ямаса табияттиң генетик маркерлери хәр түрлилиги [Ramel, 1998]. Генетик хәр түрлилик түр ямаса популяция топарлары, популяциялардиң генетик қәсийетлери әхмийетли курамлық бөлими есапланады. Генетик хәр түрлилик генетик маркерлерди таңлауға, бир қанша өзгериушең параметрлерде аңлатылады [Leffler, 2012]:

1. Виртуал гетерозиготалы - π , яғный, популяцияда еки тосаттан таңланған генотипли функционал емес нуклеотид сайт ортасындағы парк қатнасы.

2. Локусдағы аллеллер саны.

3. Генетик аралық (популяциялар ортасындағы генетик хәр түрлиликти баҳалау).

Биз биокөптүрлилик тек еки түрдеги яғный түрлер хәр түрлилиги хэм популяцияның генетик полиморфизмин молекуляр-генетик методлардан пайдаланып үйренемиз.

1.2. Түрлер хәр түрлилиги. Жумбақлы түрлер.

Көп жағдайларда тек морфологиялық мийзанлар жәрдемінде түрлер курамын үйрениу қыйын ямаса “бәсекели, анық емес түрлер”ди ажратуу хәтте имкансиз [Bickford, 2006]. Бул ҳалда әлбетте молекуляр генетик методларды қоллау керек.

Жумбақлы (анық емес) деп аталған түрлер, еки ямаса оннан артық түр бир түр сыпатында суўретленген (бир атға ийе) хэм әң кемінде сыртқы морфологиялық парқлар гузетиледи [Bickford, 2007]. Биринши, бул түрлер молекуляр-генетик усыллардан алдын Линней класификациясы қабыл қылынған ұақытта ойлап табылған.

Жумбақлы түрлер, сондай-ак, уқсас түрлер ямаса эгизек түрлер депте

айтылады. Биринши мәрте "эгизек-түрлер" атамасын [Майер, 1963] киритген. "Жумбақлы түрлери" термини кейіншелик пайда болды [Henry, 1985], бірақ көбірек туұрырақ деп есапланды, айрым авторлар "эгизек-түрлер" атамасын тек қыз түрлер үшін, қайсы улыұмалық бір шақадан раұажланған түрлерге тән деп есапланды. Бирқанша, жумбақлы түрлер хақийқаттан да қыз түрлерге мас келеди, бул жағдайларда синоним есаплау мумкин, бірақ көп авторлар барлығын " жумбақлы түрлер" деп атап келмекте [Knowlton, 1986]. Буннан тысқары, бир қанша авторлар "жумбақлы түрлер" хәм "псевдоанық емес түрлер" тусиниклерине ажратған. Анықланған морфологик белгилерге қарап ажратиу менен бирге анық емес түрлер молекуляр-генетик методлар жәрдемінде ажратылады. Бул жағдайда түрлер "псевдокриптик" түрлер деп аталады [Saez, 2003].

Симпатрик жумбақлы түрлер. Соңғы уш он жыллықларда молекуляр генетик усыллар жәрдемінде псевдокриптик хәм жумбақлы түрлердің саны ДНК-избе изликлер анализ тийкарында анықланды [Carr, 2010]. Бул усыллар ПЗР (полимераза шынжырлы реакция) тийкарында амплификация методлары хәм раұажланыуы хәмде зәрүрли көбейтириу усылларына тийкарланған технологиялар тийкарында әмелге асырылады. Биз түр тийкары хәр дайым морфологик өзгерислер менен бирге емес хәм бул жағдайда, түрлердің хақийқий саны да зәрүр саналады, бул тек морфологик гузетиулер тийкарында сыпатланады. Бірақ, айрым ўақытлары генетик усыллардан пайдаланыу суўретленген түрлердің санын асырыу үшін емес бәлким кемейтириуи мумкин.

Бир қанша түрлер зәрүр морфологик хәр түрлиликке ийе хәм айрым жағдайларда көп санлы систематиклер морфологик, рең өзгериуи [Knowlton, 1987]. Генетик анализ бир неше түрли таксонлар кенже түрлер хәм түрлер арасында тийкарсыз генетик изоляция жоқлығын көрсетеди, бул болса шалғытыушы болыуы мумкин [Nygren, 2011]. Айрым сут эмизиушилерди ўирениу тәрийхында бир қанша түрлер бөлек бир неше түрлерге ажратылған хәм және изертлеу нәтийжесинде бир неше морфологик типлер кейин бир түр екенлиги гузетилген [Linnaeus, 1746, 1758; Agassiz, 1862; Naeckel, 1879; Mayer, 1910; Kramp, 1961]. Бул жумбақлы симпатрик түрлер биокөптүрлиликтің есабын алыуда зәрүр, популяция дузилиси хәм динамикасын ўирениу, сондай-ақ, топарлар экологиясын ўирениу үшін жүдә әхмийетли екенлигин айтыу лазым [De Leon, 2010]. Көппеп популяция динамикасы (әсиресе, теңиз) группалары ели жақсы ўиренилмеген хәм буның себеплеринен бири анық емес түрлер саны көп екенлиги есапланады [Eckert, 2003]. Бірақ, түрлердің морфологик мағлыұматлары хәм биологик мағлыұматлары бир қанша сораўлар туұдырады, түрлери арасындағы генетик аралықлар хәм қайсы түр ишиндеги генетик полиморфизмге мас келеди. Түрдің биологик концепциясы бөлек түр сыпатында таңлау үшін тийкарғы мийзан бир түр шеңберінде организмлер бир-бири менен эркин хәм көбейиуде изоляцияланбаған халда көбейеди [Mayr, 1970]. Симпатрик жумбақлы түрлер арасында молекуляр-генетик хәр түрлилик бар екени олар ортасында шағылысыу жоқ екенлиги курамалы түрлердің бар екеннен

дерек есапланады.

Аллопатрик түрлер хәм космополит түрлер. Географиялық ажралған түрлер, географиялық изоляцияланған түрлерди өзара шағылыстырыу имканы жоқ, бул болса аллопатрик түрлерди тусиндириуе узил кесил дәлил бола алмайды. Айрым авторлар аллопатрик топарлар ортасында дивергенцияны бақлауда 3-5% нуклеотидлердің алмасыныуы мумкин деп есаплайды. Көпшилик авторлардың пикрине көре ядро геномының 5%ге шекем кем ямаса көп парқ қылыуы еки синоним түрлердің шағылысыуында кем жағдайды келтирип шығарады. Айрым авторлардың пикринше, бул сорауға жууап табыуда түрли таксон қиз түрлери арасында көбейу бойынша изоляцияланған түрлердің дивергенциясы нәтийжеси есапланады. Бирақ, полиморфизм дәрежеси геном дәрежесинде текқана жоқары таксонлар емес, балким жақын түрлер ортасында да, сол таксон дәрежесинде де өзгереді. Көбейу бойынша изоляцияланиу хәм белгили генетик аралықта жайласыушы исенимли байланыслық үлкен генетик аралық деп белгиленген (бул түрлердің пайда болыу ыақыты) бул болса олар ортасындағы көбейу ыақытын белгилейди [Coyne, Orr, 1989, 1997; Sasa, Chippindale, Johnson, 1998; Presgraves, 2002; Mendelson, 2003]. Хайуанларда репродуктив тосық *Drosophila* әулады әкиллери арасындағы симпатрик түрлер арасында дивергенция дәрежеси кемрек аллопатрик хәм көбейуден кейин көбейуден алдыңғы бөлеклениуе қарағанда тезрек жуз береді (пуштсыз ямаса стерил дурагайларда [Coyne, Orr, 1989, 1997; Howard, 1993; Butlin, 1995; Hostert, 1997] пайда болады. Бул пуштсызлық гибрид түрлер ортасындағы зиянлы эпистатик тәсирлер изшил әсте-ақырын топланыуы нәтийжесинде рауажланады, бул “түрлер хәр түрлилиги сағаты” деп де аталады [Coyne, Orr, 1989, 1997; Sasa, 1998; Orr, Turelli, 2001].

Теңиз омыртқасызларынан полихетлер классының географиялық тарқалыуы хәм түрлер қурамы жақсы мысал болады. Хәзирги ыақытта полихетлердің 10000 нан артық түри белгили болып топар барлық жерде тарқалған хәм олар теңиз экосистемасының зәрүр компонентлеринен есапланады, олардың геофикалық тарқалыуы дерлик үйренілмеген. Полихетлердің үлкен бөлими космополит түрлер есапланады. Әдетли систематикалық жандасыуға тийкарланып бир түр морфологиялық жақтан парқ қылмайтуғын түрлерден пайда болады. Хәзирги заманда полихетлердің биогеографиясына тийисли илимий жұмыслар көбейип бармақта. Хәзирги кунде “кең тарқалған” көптукли куртлардың түрлерин тийкарлауда классик таксономия усыллары космополитизм хәдийсесин тийкарлауға жетерли болмай қалды. Көп жағдайларда жоқарыда айтылғанындай, репродуктив бөлеклениуе анық дәлилдер табылмады, бирақ, кең қамраулы анализлер соны көрсетпекде хәм генетик, хәм морфологиялық парқлар менен бирге түрлердің экологиялық парқлары бар. Мысалы, *Owenia fusiformis* Delle Chiaje, 1844 (Oweniidae), *Sternaspis scutata* Ranzani, 1817 (Sternaspidae) хәм *Scoloplos armiger* (Muller, 1776) (Orbiniidae) түрлери барлық океанларда, хәр түрли тереңликлерде хәм әмелде хәр түрли температураларда ушрауы анықланған. Бирақ, ақырғы мағлыуыматларға

тийкарланып *O. fusiformis* комплекс түрлер деп табылмақта. Хәзирги кундеги толақанлы изертлеулерден RAPD усылы жәрдемінде анық нуклеотидлер избе-излиги салыстырылмаған. Оның жәрдемінде анықланыўынша *Neopetitia (Petitia) amphophthalma* Siewing, 1956 (Syllidae) олар космополит түрлер эмес бәлким *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) ниң бөлек амфианланттик тарқалған комплекс түрлер үәкиллери есапланады. Кейиншелик ядро хәм митохондрия маркерлерден пайдаланып изертлеулер алып барыў жолға қойылды. *S.armiger* (Orbiniidae) түри В. Блейдорн [Bleidorn, 2006] автпрлығында үйренилген космополит түр есапланады. Жоқарыда айтып өтилгендей, бул түрлердиң үәкиллери барлық жерлерде, де литораль, хәм суўдиң терең бөлимлерінде ушрайы. Арқа муз океаны аймағында бул түр полихетлердиң кең тарқалған түри есапланады. Ядро хәм митохондриялы маркерлер жәрдемінде алып барылған изертлеулерден белгили *S.armiger* космополит түр есапланбайды, өзи комплекс түр саналады. Тиниш океанында болса еки *S.armiger* түрлери хәм еки ямаса уш түри Атлантика океанында анықланған. Және бир жарқын мысал, Нигренниң молекуляр-генетикалық изертлеулери есапланады. Циркумбореаль хәм трансарктика түрлер хәм олардиң морфологиялық парклары үлкен қызығыў оятады. Отген әсирдиң басланыўы хәм орталарында бир қанша нинатерилилер түрлери (теңиз жұлдызлары хәм теңиз кирпतिकенлери) морфологиялық белгилерине тийкарланып трансарктика хәм циркумбораль тарқалыўы ҳаққында илимий жумыслар баспадан шыққан.

Кейиншелик айрым тийкарғы таксонлар туўысқан-түрлер есапланған. Комплекс теңиз жұлдызларының *Leptasteria* әўлади арктика хәм субарктика түрлер үйренилиўи нәтийжесинде өзине Арктика хәм Арқа Атлантиканың орайлық Калифорниядан то Аляскаға шекем болған аймағында тарқалған 60 түрди бириктириўи белгили болды. Аляска аймағындағы комплекс түрлер дәстлепки урынысларда теңиз жұлдызларының аллазим вариациясы сыпатында үйренилген, хәзирги ўақытта болса кең қамраўлы изертлеулер, Арктика хәм Антартиканың көплеп ноқатларынан тексерийлер ушын топланған материаллар көп санлы генлер анықланған.

Молекуляр методлар усы топарларды ажратиў ушын тийкарғы орай болып хизмет қылды. Сол сияқлы жумыслар көплеп алып барылмақта. Жумбақлы түрлердиң комплексын изертлеу жүдә қийин. Бирақ, бул сияқлы жумыслар үйренилмеген биокөптүрликти изертлеуде үлкен әхмийетине ийе биокөптүрликти изертлеуде анық емес түрлер ямаса түр ишиндеги полиморфизмди үйрениў жүдә әхмийетли есапланады.

Жумбақлы пайда болыўы. Молекуляр-генетикалық мағлыўматлар жумбақлы (анық емес) түрлерди терең суўлардағы моллюскалардан дүшшы суў балиқларына шекем хәм тропик гүбелеклерден арктика өсимликлерине шекем бөлек түрлерди топарларға ажратыўда генетикалық дифференциация қилиўда морфологиялық хәм географиялық мағлыўматларди толдырыўда, экологиялық ямаса минезлик паркларды толдырыўда әхмийетли есапланады. ISI Web of Science (<http://scientific.thomson.com/products/wos/>)

хәм Zoological Record Plus (<http://www.csa.com/factsheets/zooclust-set-c.php>) базаларындағы мағлыұматларды үйрениұ нәтийжесинде “жумбақлы түрлер” хәм “эгизек түрлер”ге тийисли ақырғы 50 жылда 3500 ден артық мақалалар бар. Бундай үлкен жасырын генетик хәр түрлилик жумбақлы түрлер саны менен жасаұ орталығы ортасында байланыслылық бар жоқлығы хаққында сораұ туұылыұына себеп болады. Жумбақлы түрлерге бағишланған мақалаларды санасақ көпшилик изертлеұ жұмыслары ол ямаса бул топар хайұанлар менен байланыслылық. Кем санлы мақалалар жоқары дәрежели өсимликлер хәм микроорганизмлердиң жумбақлы түрлерине бағишленған. Соннан келип шыққан халда илимпазлардиң ол ямаса бул топарлардиң жумбақлы түрлерин үйрениұи нәтийжесинде бирден бир жуұмаққа келиұ қыйын. Көпшилик шыбынлардың космополит түрлери хәр түрли континентлерде тарқалған (жумбақлы түрлер саны салыстырмалы кемрек), бирақ, көпшилик моллюскалар менен шуғылланыуши қәнийгелер (хәүескерлер сулыұ шығанақларын тереди) пикиринше моллюскалардиң тарқалыұы морфологиялық хәр түрлиликке байланыслы (“майдаланған” түрлер). Тропик хәм өли аймақлардан анықланған жумбақлы түрлердиң саны санаұда бир қанша машқалаларды келтирип шығарады. Белгили еки, уш анықланған түрлер тропик регионлпрдпн табылған, бирақ жумбақлы түрлердиң ярими өли аймақларда анықланған. Бул болса жумбақлы түрлердиң пайда болыұ нызамларын ашыұда өли аймақлардан табылған түрлер көпшилик изертлеұшилер тәрeпинен анықланғанлығы менен тәрипленеди [Carroll, 2004].

Жумбақлы түрлердиң пайда болыұы биринши нәўбетте организмди анықлаұда морфологиялық белгилерине тийкарланады. Жоқарыда көрсетилгениндей түрлер хәр түрлилиги хәр дайым хәм морфологиялық өзгерислер менен бирге болады [Templeton, 1981].

1.3.Биокөптүрликти үйрениұде молекуляр-генетик усылларының қолланылыұ тәрийхы.

Биокөптүрлилик хәм систематиканы үйрениұде 1960-1970 жылларда Аллозим технологиясы (изофермент) анализи исенимли жерди ийелейди. Бул изоферментлер полиморфизм ашылыұы менен байланыслы. Фосфолипидлер курамы бойынша да талай жұмыслар әмелге асырылды.

Паразит нематодалар түриниң популяциян структурасын анықлаұ ушын биринши нәўбетте түрли ферментлер, белоклар электрофорези методларын қоллаұға тийкарланған. Бунда криптик түрлерди анықлаұда электрофорез хәрeкетинде белоклар изоформаларын бөлиниұ усылы есапланады.

Бул методлар көп мийнет талап қылыұши талап қылыұши хәм анықланатуғын ферментлердиң жетерли дәрежеде туұры (стабил) болмаслығы себепли барқулла исенимли емес эди. Соған қарамастан, әхмийетли нәтийжелер алынған. Зәрүр жұмыслар топарына италиялық проф. Л.Паджиниң изертлеұлерин киритиұ зәрүр. Оның басшылығында теңиз хайұанларының паразит аскаридалары тийкарғы ферментлериниң өзгериұшеңлик спектрлери изертленди. Содан, *Pseudoterranova decipiens*

нематодасы популяцион структурасын үйрениуі ушын 16 дана энзим локуси, содан бир неше малатдегидрогеназа, эстеразалар хәм басқа ферментлер ислетилди (Paggi et al., 1991). Бул ферментлердиң спектрлериндеги анық парклар үсы нематоданың арқа атлантика популяциясы уш генетик еркин түрлерден ибаратлығын көрсетти (А, В, С). Тек бир рет дурагай индивид – А хәм В формалары шағылысыуының пайда болыуы анықланды. Паджи хәм авторларының көрсетиуінше, хәр бир ушлик формалар шегарасында генетик хәр түрлиликтің дәрежеси жүдә кем болып, үсы формалар ортасында болса үлкен (хәр бир топар ишиндеги паркдан еки дәрижеде көп). Бул уш топардиң ажралыу дәуири 2-4 миллион жылды қурайды. Ферментлерди изертлеу нәтийжесинде бул уш топар ортасындағы морфологиялық парклар, соның ушын олардиң географиялық тарқалыу қәсийетлери анықланды. Соны да айтып отиу зәрүр, бул формалардиң хәр бирине өзине тән хожейинлери бар.

Тап сондай жұмыслар *Ostertagiinae* кенже туқымласы нематодлариниң таксономикалық жағдайы бойынша көп излениулер алып барылған. Солардан, *Teladorsagia* (= *Ostertagia*) әуладин уш, *T. circumcincta*, *T. davtiani* хәм *T. trifurcata* түрлери статусы барысында анықлық емес де бар еди. Кейиншелик, бул түрлерди аллозим анализи тийкарында көрип шығып, олар бир түрдиң түрли морфалары деген жуўмаққа келген (Andrews & Beveridge, 1990).

Жаңа методлардан пайдаланыу, арнаулы ПЗР, полиморф түрлер хаққындағы машқалаларды шешиуде хәм жаңа мағлыұматларды алыуда имқан жаратты. Бундай әмелге асырылған изертлеулерде *Ostertagia gruehneri* Skrjabin, 1929 хәм *O. arctica* Mizkewitsch, 1929 түрлериниң ITS-1 ишки транскрипцияланыуши спейсер) хәм ITS-2 тараулары бойынша нуклеотидлер избе-излиги салыстырмалы түрде үйренілгенде, анық түрдеги паркларыулар жазылмаған болып, бул жағдай олардиң бир түрге тийисли экенлигинен дерек береді (Dallas et al., 2000). Бундай әмелге асырылған изертлеулерде *Teladorsagia circumcincta* (Stadelman, 1894), *T. trifurcata* (Ransom, 1907) хәм *T. davtiani* (Andreeva et Satubaldin, 1954) түрлерин рибосома ДНКсы курамында ITS-2 тарауы (ишки транскрипцияланыуши спейсер) салыстырма түрде үйренілгенде анық тәрздеги паркларыулар жазылмаған болып, бул жағдай олардиң бир түрге тийисли экенлигинен дерек береді (Stevenson et al., 1996, Амиров ва бошқ., 2014).

1.4. ДНК-штрихкодлау.

Негизинде не усыныс қылынған еди? Пайдаланылатуғын үлгиден ДНК ажыратыуға, биринши нәубетте таксономик тәркиби сол тараудағы эксперт таманнан хәр таманлама анықланған хәм ваучер үлгиниң сақланған болыуы керек. Егер, үлги жүдә жүдә киши болса хәм оннан бирар бөлиминен ДНК ажратыуды имканы болмаса, онда анық фотографиясы болыуы шәрт (е-ваучер). Генбанк (GenBank) базасындағы мағлыұматлардың анық емеслиги хәм машқалаларды қәтелер әллеқашан илимий әдебиятларды додалап атыр. Сөз, секвенирлеу қәтесинде, үлгидеги түрлерди таксономиясын анықлауда бийпаруалық (этикетлерди шалғытыу, материалды жетерлише тексермеслик) ямаса объектив себеплер тәсиринде,

вариабельлик халларда хэм жаман ажралыушы түрлер тұрысында барады [Tautz, 2002; Harris, 2003; Vilgalys, 2003]. Мәселен, айрым топар замарқлардың надурьс анықланыуы, 20 % ти курауы мүмкин [Bridge, 2003; Nilsson, 2006]. Үлгилердің жыйнау дизиминде анық мағлыуматлар ушын айрықша әхмийетте бериледи (жыйнау жайы, анық координаталары, жыйнаушының фамилиясы). Илгери мағлыуматлар базасында бундай пикирлер талқыланады, лекин хәзирде бундай мағлыуматлар әлбетте болыуы шәрт. Бәрше организмлер ушын тән болған маркер таңлау идеясы бар еди. Мысал ушын, насекомалар систематикасына арналған обзорда [Caterino, 2000], авторлар маркерлерди стандартизация қылуы зәрүрлигин талқылады, сондай қылып, түрли әмелиятшылар, түрли маркерлерди бөлек топарлары бойынша жақсы нәтийжесин есапқа алды (тийкарынан төменги таксономик дәрежедеги топарлар ушын), нәтийжеде салыстырыу хэм улыумаластыра алмады.

Таңланатуғын жалғыз ген төмендеги тән саларға ийе болыуы керек: ол салыстырмалы қысқа фрагментли тараў болыуы керек, жетерлише вариабель болып, жақын туысқанлық түрлерди ажратыу, буның ушын бул фрагмент ўзидан ён томонларда консерватив соҳа бўлиши керак (етарлича консерватив болыуы, себеби кең өзине тән праймерлер менен амплификация қылыныуы керек). Секвенирлау жеңил хэм арзан болыуы ушын салыстырмалы киши размердеги фрагментлер (700-800 ж.н атирапындағы) болыуы керек. Тегислеуди әпиуайы болыуы ушын онда бөлиниуи (инделей) составы кем болыуы керек. Стандарт ген сыпатында 5' фрагментти, белок митохондриясының цитохром-оксидаза кодлаўшы 1 суббирлиги (CO1 ямаса сох1) таңланды, қайсысы алдыңғы түрлер ортасындағы өзгериушеңлик дәрежесин жақсы көрсеткен [Moore, 1995]. CO1 гени изертленген митохондриял геномлардың хәммесинде қатнасады, ол 1540 нуклеотидлерди өз ишине алады, салыстырмалы әмелиятлар ушын әдетте оның вариабель бөлими жақын 650 ж.н. пайдаланылады. Оның амплификациясы ушын стандарт паймерлери жаратылған [Folmer, 1994; Zhang, Hewitt, 1997].

Ядро генлерине қарағанда митохондриял генлер менен ислеу бир қанша қолайлы. Бул генлерди жеңил түрде амплификация қылынады (әсиресе бузылған материаллар), хәр бир клеткада 100-10000 митохондрийлар бар. Митохондриял геномның полиморфизм дәрежеси ядро геномина қарағанда бир қанша жоқары (5-10 мәрте), интронлар сақламайды. 2000 жыллардан баслап митохондриял ген менен түрлердің анықлау хэм ажратыуды ыспатлауға тән көплеген ислер баспадан шықты. Тийкарғы әмелиятшылар ушын қолайлығы, лекин маркердің жетерли дәрежеде сыпатлылығы. Соның ушын CO1 гениң фрагментлери тек ғана түрлерди анықлауда (хайуанларда) пайдаланыу мүмкүн, бул түралы көплеп ислер орынланды.

Хайуанлардың түрли топарларына тийисли 13000 аслам жуплықтағы түрлеринде CO1 гени фрагментлери менен салыстырған [Hebert, 2003a] болып, түрли түр организмлери 2% кемирек парк қылады, бир түр

организм үшін болса 1% аспайды [Hebert, 2003b]. Изертленіп атырған хайуанлардың бұл ізбе-изліктің ішкі хәм түрлер ортасындағы парқланыу (дивергенция) дәрежесі 5-20 мәртеге парқ қылады. Көплеген әмелият жұмыстарда CO1 генлери фрагментлери менен тұры идентификация қылынған топарлары 96-100% шөлкемлестирди.

Хеберт хәм оның да авторлары 2004 жылда CO1 гени фрагментлери тийкарында ДНК-штрихкодтың нәтийжесин испатлау бойынша 4 жұмыс баспадан шықты. Олар түрлі топар хайуанларда орынланған, гөбелеклерде (Hebert, 2004a), қусларда [Hebert, 2004b], өрмешеклерде [Barrett, Hebert, 2004] хәм аяққуйрықлыларда [Hogg, Hebert, 2004]. Авторлар өзлеринің мағлыуматлары хәм генбанк базасы мағлыуматларынан пайдаланылды. Әдетте, Кимураның иккипараметрлі модулиндеги аралықты есапқа алған халда ізбе-изліктің парқын табылды [Ней, Кимура, 2004] хәм ішкі хәм түр ортасындағы вариабеллікті салыстырыу. Айрым халатларда нәтийжели таксономик идентификация қылынғанларға баха бериледи, буның үшін үйренілген бир түрдің ізбе-изліклери алынды, терек қылынды (жақын қоныслар усылы), кейин нәубет пенен басқа индивидлардың ізбе-излігі қосылды хәм бұл түрлер кластер қылынды хәм тексерилди.

2004жылы Арқа Американың қуслары бойынша жұмыс дағаза қылынды [Hebert, 2004b], бунда илгери морфологиялық анықланған, орнатылған ДНК-штрихкод жәрдемінде түрлер ортасында тегисілік тексерип көриледи. CO1-ізбе-излігі бойынша түрлер ортасындағы парқ, ішкі түрлерге қарағанда 19-24 мәрте көп (тийислі 7,05-7,93%, қарама-қарсы 0,27-0,43%) екенлігі анықланды хәм мағлыуматларға баха берилди.

Канада Артикасынан аяққуйрықлылардың (Collembola түркүми) 13 әуладына тийислі 19 түрі үйренилди (хәр бир уәкилинен 1-3ден). Бир әуладқа тийислі болған түрлер ортасындағы парқлар 8-19 % шөлкемлестирди, бұл халда бир түрдің идивидлары ортасындағы парқлар болса көбинше 1 % кем болды. Бұл жұмыста ушыратылған екеуинен парқланыуы (дивергенция) (5 хәм 13%), авторлар бұған бир-бирине уқсаған “егізек” түрлердің еле анықланбаған дәлилі деп есаплады.

Нәтийжеде Хебертты “штрихкодтың атасы” деп атай баслады [Marshall, 2005] хәм оны авторлары сол пикирге келинди, ДНК-ШК еле анықлама берілмеген түрлер хәм таза түрлерді идентификация қылыу жарамлы есапланады, бұл толығы менен сыпатлынды. Бунда CO1-фрагменти бойынша ішкі хәм түрлер ортасындағы парқ 10 мәртеге шекем парқ қылыуы (10xSST - species-screening threshold) усыныс етилди ямаса түрлер ізбе-излігі ортасындағы парқ шама менен 2-3 %, түрлерді анықлау шегарасында болады [Hebert, 2004b]. Екинши критерия өзара (реципрокной) монофил болыу, солардан ізбе-изліктің орнын толдырып болмауы есапланады.

1.5. Молекуляр анализлер ушын пайдаланылатуғын генетик маркерлер, ядро генлери.

Жоқарыда айтылған пикирлерден келип шыққан халда мәлим болды, изертлеушілердің барлық талабларына жууап беретуғын жалғыз маркер таңлау мумкин эмес. Түрлерди тууры анықлау хэм ажратиу, түр ишиндеги хэм популяциялар ишиндеги полиморфизм дәрежесин анықлау хэмде филогенетик тереклер дузиу ушын бир неше маркерлерден пайдаланған халда әмелге асырылды. Мысал ушын симпатирик түрлерди ажратиу ушын, яғный түрлер ортасында шағылысыу бар жоқлығын сыпатлау ушын ядро хэм митохондриялар маркерлер пайдаланыу ақалы әмелге асырылады. Бирак, идеал маркер талабын дузиу мумкин [Cruickshank, 2002].

1. Ол геномда бир үлгиде болыуы керек. Егерде көпи үдгили генлерден пайдаланылғанда, үлгилер нуклеотидлер избе-излигинен парк қылыуы мумкин, барлығынан жаманы, бөлиниу хэм қосымшалардың болыуы (рРНК кодлауыши ишки транскриб болмаған спейсер генлери), ПЗР өнимлерин векторда “клонирование” ислерин қылыу хэм кейиншелик бир неше бактериал клонлардан қойылған плазмидаларды секвенирлеу, бул гөнерген кең анализлерди қылып болмауына ямаса көп қәрежетлиликке алып келеди [Patwardhan, 2014].

2. Солай етип, кейинги анализлер ушын қабыл қылынған маркерлер сыпатындағы ген избе-излиги, басқа организмлердің сол генинің избе-излиги менен тегислеу процедурасынан отиу керек, тегислеу аңсат әмелге асырылыуы керек. Бул соны билдиреди, анализ қылынатуғын избе-излик узынлығы бойынша үлкен парк қилмаслығы, қосыу хэм бөлиниулер көп болмаслығы лазым. Бирак, айрым жағдайларда корилип атырған тарауди тегислеу қыйын болыуы ямаса екилемши системадағын салыстырыу (тРНК), бундай избе-изликлерди ислетиу мумкин болады [Kjer, 1995].

3. Әхмийетке ийе болған мағлыұматты алыу ушын алмастырыу саны оптимал болыу керек. Егер генди эволюцияланыуы тез болса, бул гомоплазияға алып келеди, бул алынатуғын мағлыұматларды исенимлилигин төменлетеди. Басқа тәрептен, консерватив тарауының (мысалы, рРНК кодлауыши) жақын избе-излигин салыстырыуға (ямаса жақында ажралған түрлер) бул генетик анализ менен олардың ажратип болмайды [Patwardhan, 2014].

4. Фрагментлерди амплификация қилиуда ислетилетуғын праймерлер гениң консерватив тарауына мас болыуы, себеби үйренилип атырған систематикалық жағынан узақ болған организмлерди фрагментлерин амплификация қилиу мумкин болады. Бирак, олар жүдә “универсал” болмаслығы керек, терис жағдайда геномның басқа тарауларын өзине тән болмаған амплификацияға алып келеди [Yli-Mattila, 2000].

Төменде кең тарқалған ядро хэм митохондриялар маркерлер көрип шығылады.

Рибосомал РНК (рРНК) кодлауыши ядро генлери. Рибосомал генлер өзиниң универсаллығы хэм жоқары консерватив хэм вариабель доменлериниң болыуы менен маркерлер ишинде эң жақсылары есапланып,

салыстырмалы узақ топарларды да филогенетик байланысларын үйрениўде пайдаланылады [Patwardhan, 2014]. Барлық организмлерде рибосомалар тийкарынан еки суббирликлерде, киши (18S – эукариотларда хәм 16S – қалған барлығында) хәм үлкен. Бактериялар хәм археобактерияларда үлкен суббирликтің еки вариантда: 5S, 5,8S хәм 25S/28S. рРНКның ишки системасыт үлкен хәм киши суббирликтери, тийисли 10 хәм 8 вариабель бағдарларын пайда етеди. рРНК белоккодлаўши генлерге қарағанда кемрек эволюциялайды [Schmidt, 2007].

16S рРНК – пайдаланылған маркерлер ишинде бириншилеринен бири есапланады. Биринши болып, ПЗР хәм секвенирлеў дәўиринен алдын, 1960 жылларда Dubnau хәм авторлары 16SPHK избе-излиги анализи ушын *Bacillus Cohn*, 1872 әўлады түрлеринде қоллаўды [Dubnau, 1965]. Бирақ, Возаниң [Woese, 1987] классик исшилеринен кейин, бул ген бактериялар таксономиясында қолланыла баслады. Бул геннің избе-излиги узынлығы 1550 ж.н. ибарат болып, түрли топар бактериялар ушын олигонуклеотид “имзалары” қәсийетке ийе болып, хәм вариабель хәм де консерватив тараўларын пайда етеди [Clarridge, 2004]. Хәзирги ўақытта секвенирлеўди жаңа әўладлары қоллаған халда метагеном изертлеўлерден пайдаланылмақта (әдетте 4-5-4 секвенирлеў, бунда оқыў үлкен узынлықда болады).

5S рРНК – 120 нуклеотидли коплеген организмлердің рибосомаларында қатнасыўши жоқары консерватив избе-излик болып, айрым замаррықлар, айрым хайўанлар хәм көпшилик протистлерден тысқары, өсимликлердің филогениясын дузиўде пайдаланылады [Troitskii, 2003]. Бирақ, қысқа размерде болғанлығы ушын, исенимлилик хәм анықлығы тийисли жұмысларда томенлеў.

28S рРНК – узынлығы 1000 нуклеотидден артық. Оның избе-излиги көплеген көпклеткалы хайўанларда анықланған. Оның екилемши дузилисин салыстырыў хәм сол салыстырыў тийкарында филогениясын қуриў – филогенетик анализлер ушын тийкарғы инструмент есапланады. Айрым жағдайларда бул геннің толық размери эмес, оны фрагменттери пайдаланылады (400 нуклеотидге жақын C2-C3 тараўлары) [Schmidt, 2006].

18S рРНК – бул геннің толық размери 1800 нуклеотидге жақын болып, филогенетик тереклерде кең қолланылады, айрым жағдайларда болса түрди идентификация хәм ажаратиўда ислетиледи. Қалаберсе, вариабель тараўының болыўы менен ол ген жақын түрлерди ажрата алмаўы мумкин, улыўма алғанда избе-излик жетерлише консерватив. Кейинги ўақытларда филогенетик анализлер ушын 18S, хәмде 28S рРНК геннтери ислетилмекте. рРНК 18S гени көбинесе инфузорийлар хәм басқа эпиўайы хайўанлар түрлерин анықлаў мәқсетинде метагеном анализинде қолланылмақта.

Соған қарамастан, рибосомал генлер гумансыз көпкопиялы, қағийдадан тысқары сыпатында олардан тек биркопиялы генлер маркертери сыпатында көрсетеди. Олардың пайдаланыўы мумкин оның жоқары консерватив себепли есапланады, геннің барлық нухалары бир

қийлы. Хромасомада, генлер, рРНК кодлаушы генлер аралығын дузиушы ишки транскриб спейсери делинеди (Internal transcribed spacer, ITS).

ITS – кодланмайтуғын избе-излик, соның ушын оларда рибосомал хэм белоккодлаушы генлерге карағанда полиморфизм жүдә жоқары. Олардиң праймерлери универсал хэм хәр қандай таксономик топарлар тийисли фрагментлерин амплификация қилиўда пайдаланыў мумкин [Persson, 2000], мысалы, суў өтлары, жоқары өсимликлер хэм омыртқасыз хайўанлар, буннан тысқары, замаррықлар ушын да ислеп шығылған, қайсы молекуляр штрихкод сыпатында қолланылмақта.

Сол уқсас универсал праймерлер байланыслығы, олардиң избе-излиги рРНК кодлаушы тийисли 28, 18 ямаса 5,8 консерватив избе-изликлери генлерине мас келеди. Бул маркерлердиң кемшилиги, биринши нәўбетте, бир неше избе-изликлерди тегислеўдиң қыйынлығы, себеби, олардиң узынлығы түрли түрлерде сезилерли дәрежеде парқ қылады, жоқ болыў хэм қойылыўлар болыўы мумкин. Бирақ, бул барлық организмлерде де болмаслығы мумкин, көп жағдайларда бул маркерден жақын түрлерди ажратиўда пайдаланыў мумкин болады.

1.6. Омыртқасыз хайўанлар молекуляр систематикасы хэм таксономиясы бойынша алып барылып атырған изертлеўлер.

Стронгилидлер паразит нематода топарлары арасында эволюцион жағдайы жағынан жақсы нәтийжели есапланады. Олардиң кең көлемдеги хәр түрлилиги XX әсирде изертлеўшилердиң бул нематодаларды Strongylida Railliet et Henry, 1913 отрядына ажратыўға алып келди. Олардиң эркин жасаушы нематодалар – рабдитидалар менен көп қәсийетлериниң морфологик уқсаслығы көп ўақыттан бери белгили эди. Нематодалар систематикасында молекуляр методлардиң кең қолланылыўы стронгилидлердиң статусы мәселесин тикледи, себеби рибосомал избе-изликтинң анализи нәтийжелерине көре стронгилидлер рабдитидлердиң бир бағдары экенлигин көрсетеди (Aleshin et al., 1998; Blaxter et al., 1998; Sudhaus, Fitch, 2001). Стронгилидлердиң топырақтағы Heterorhabditidae (Poinar, 1975) туқымласы энтомопатоген нематодалар менен тұрақлы филогенетик байланыслылығы анықланған.



Расм. Нуклеотидларнинг SSU асосидаги Нематода синфининг филогенетия гипотезаси.

Стронгилидлердин туўысқанлық байланыслары туўғрысындағы көз қараслар П.Де Лей хәм М.Блакстер (Blaxter, De Ley, 2002) усыныс еткен нематодалар классы системасында өз көринисин тапқан. Бул системада стронгилид (дәрежеси) (Rhabditida Chitwood, 1933 отряди қурамындағы Strongyloidea Weinland, 1858) үлкен туқымлас дәрежесине тусириледи. Стронгилид қурамындағы үлкен туқымласлар туқымлас дәрежесине тусирилди: Strongylidae Baird, 1853; Trichostrongylidae Leiper, 1912; Metastrongylidae Leiper, 1908 хәм Ancylostomatidae Looss, 1905. Соның менен бирге бул үлкен шаңараққа Heterorhabditidae Poinar, 1975 туқымласы авторлары тәрәпинен киритилген. Стронгилидлер дәрежесиниң бундай өзгериўлери кладистик хәм үрип әдетлик жандасыўлар ортасындағы өзара келисилип, олар Trichostrongylidae туқымласының “ишки” таксономик структурасын өзгерттирмеген.

Паразитлер молекуляр таксономиясы бойынша Өзбекистандағы изертлеўлер.

ӨзР ФА ҰХОГИ Молекуляр биология хәм биотехнология лабораториясында түрли топар хайўанлар паразит гельминтлериниң түрлер қурамы, молекуляр таксономиясы, филогениясы хәм систематикасын үйрениў машқалалары менен шуғылланады. Сол қатары, туяқлы хайўанлар нематодалариниң морфологиясы, молекуляр диагностикасы хәм олардиң санын бақлаў бойынша илимий изертлеў жұмыслары өткерилмекте. Хәзирде *Metastrongylus*, *Dictyocaulus*, *Protostrongylus*, *Spiculocaulus* хәм *Cystocaulus* әўладының 9 түри хәм *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Marshallagia*, *Teladorsagia* ва *Setaria* әўладларының 8 түри бойынша 50 артық рибосомал ДНКсы ITS хәм 28S тараўының нуклеотидлер избе-излиги анализ қылынды. Анықланған нематодалар ишинен 5 түри халықаралық Генбанк (NCBI) базасына жайластырылды хәм ол ушын таза есапланды (Abramatov et al., 2013; Kuchboev et al., 2015; Амиров х.б., 2014, Амиров х.басқ., 2015).

Биоинформатик анализ қылынған ITS тараўының нуклеотидлер избе-излиги тийкарында өпке нематодаларын тез анықлаў мәқсетинде түрлерге тән болған алель праймерлер жаратылды. Бул ашылыў ушын ӨзР интеллектуал мулк агентлигине патентлеў ушын талапнама берилди. Бул келешекте ветеринария әмелиятында паразит нематодалардиң молекуляр диагностикасы ушын ПЗР системасында пайдаланыў мумкин болады.

Оннан тысқары қой хәм қара малларда паразитлик қилыўшы хәм сол ўақытға шекем алымлар ортасында кескин бәсекиге себепши болған гемонх нематодасының еки түри устинде молекуляр- генетик изертлеўлер өткерилди. Бул усыл жәрдемінде гемонх түрлерди рибосомал ДНКсы ITS-2 үйренилди хәм анализ қылынды. Нәтийжеде бул түрлердиң бөлек-бөлек түр экенлигин тәсдийиклаў имканын берди (Кучбоев х.т.б., 2012, Abramatoev et al., 2013). Алынған нуклеотидлер избе-излиги Генбанк базасына жайластырылды (NCBI).

Еки протостронгилид нематодасы ушын түрге тән болған праймерлер жаратылды хәм ойлап табыўды Патентлеў ушын буйыртпа берилди.

Лабораторияда пән докторы, пән намзады, уш киши илимий хизметкерлер жумыс алып барады хәм уш әмелият ханалары: молекуляр биология, ламинар бокс, автоклаф хәм центрифуга ханалары хәмде илимий хизметкерлер ушын мөлжелленген еки ханада илимий-изертлеў жумыслары алып барылады.

Лаборатория илимий-изертлеў жумыслары алып барыў ушын керек болған барлық заманагой аспаб-ускенелер хәм буйимлар менен тәминленген.

Беккемлеў ушын сораўлар:

1. Геносистематика нени үйренеди?
2. Биологиялық көптүрлилик терминин анықлаң хәм тусиндириң?
3. Жумбақлы түрлер дегенде нени тусинесиз?
4. Түрлер ишиндеги полиморфизм не?
5. «Эгизек-түрлер» терминин пәнге ким киргизген?
6. ДНК-штрих кодин тусиндирип бериң?

Пайдаланылған әдебиятлар:

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

2-тема: Молекуляр-генетик изертлеулер үшін зоологиялық үлгілерді жыйнаұталаптары. Геном ДНКсыны ажыратыұ. Амплификация - ПЗР методының тийкарғы түсиниги. ПЗР-амплификациясы.

РЕЖЕ:

2.1. Молекуляр-генетик изертлеулерде зоологиялық үлгілерди жыйнаұ талаптары.

2.2. Стандарт фенол-хлороформ хам коммерциялы реагент топламлары жәрдемінде омыртқасызлар үлгисинен геном ДНКсын ажратыұ.

2.3. ПЗР-амплификация өткеруі.

2.4. ПЗР үшін керекли митохондриял хам ядро маркерлерин таңлаұ.

Таяныш сөзлер: *деструктив өзгеруи, диктиокауллар, гемонхлар, паробнемалар, контаминация, Гель-электрофорез, УФ-нури, ТАЕ, агароза, бромистый этидий, ДНК тазалау топламы, ДНК-маркер.*

2.1. Молекуляр-генетик анализлер зоологик үлгілерди жыйнау талаптары.

Зоология гүзетиу объекти – көп клеткалы (Animalia) хам бир клеткалы организмлер (протистлер есапланады. Молекуляр- генетик анализ үшін үлги сыпатында гүзетип атырған омыртқасыз хайуан көлемине қарап пүтин организмлер (өлшеми кемінде 1 см), дене бөлимлери, тоқыма хам ишки оргынлар бөлеклери хизмет қылыуы мүмкин. Қолайлы үлги өлшеми - 5 мм х 2-3 мм, ауырлығы 0.1 ден 5 г ға шекем. Молекуляр- генетик анализ үшін зәрүр болған материалларды топлау процесінде керекли үлги ДНК молекуласын деструктив өзгеруин алдын алыу мақсетінде 70°С лы шуқыр музлатуы халатына түсирилиуи ямаса, 70% ли этанол еритпесінде (C₂H₅OH) белгилеп қойылыуы зәрүр. Тутуы процесінде кейин организм набыт болса, үлгини белгилеп алыу, 20-30 минут дауамында әмелге асырылыуы зәрүр. Тексерилип атырған хайуан үлгілерди формальдегид еритпеси менен белгилениуи, жарақсыз есапланады, себеби төмендеги бул зат ДНКға қатаң тәсир көрсетеди, таназулди алып келеди хам анализ нәтийжелерин дерлик ямаса толық бузылыуына себеп болады. 70% ли этанол еритпесінде белгилеп қойылған үлгілерди музлатқышта сақланыуы мақсетінде тұры болады, егер бундай шәрәят болмаса, хана температурасында куяш нуры түспейтуғын жерда сақланыуы усынылады. Сақлау үшін 1-2 мл пробиркалардан (эппендорфлар) пайдаланылады.

2.2. Стандарт фенол-хлороформ хам коммерциялы реагент топламлары жәрдемінде омыртқасызлар үлгисинен геном ДНКсын

ажыратыу.

ДНК хэм РНК ажратыуды тәминлеуде бир қатар приоритет талаптарды ажратыу мүмкин:

- биологиялық материалдың лизисы;
- селектив экстракция (сорбция);
- үлкен көлемде топлау;
- ПЗР төменлетиуши компонентлерден ажратыу;
- ДНК хэм РНК ажратыу;
- жоқары проценте шығыуы;
- калибровка мүмкүнлиги хэм жақсы бақлау;
- контаминацияның жоқлығы;
- аз уақыт сарыпланыуы;
- автоматизацияның мүмкүнлиги.

Эукариот организмлерден нуклеин кислоталарды ажыратыу хэм фракциялауда традицион хэм коммерсион таяр реагент-топлам усыллары (наборда истиң орынланыуы келтириледи) пайдаланылады.

Маселен, геном ДНКсы хайуанлардың өкпе хэм асқазан-ишек дизиминде эндопаразитлик қылып жасаушы нематодалар тоқымаларынан ажратылады. Алдыннан 96%ли этил спиртке салынған нематодалар саат айнасында дистилленген суу менен жақсылап жуылады хэм хәр бирин айрықша 100 мкл лизис буфферин салынған эпепендорф пробиркасына салынады. Ири нематодалардан (диктиокауллар, гемонхлар, парабронемалар) ДНКсын ажратыуда, олардың бас бөлими ислетилгени макул (денени бас бөлиминен қызылөнеш таусылған жерине шекем) хэм бул бинокуляр лупасы астында, көз скальпели яки бритваны лезвиясы жәрдемінде кесип алынады (еркек нематодалардың куйрық тәрәпи болса морфологиялықанализи ушын қалдырылады) (1-сүүрет).



1- сүүрет. ДНК ажратыу ушын нематод денесинен препарат таярлау.

Фенол – хлороформлы усылы (ФХ- методи).

Бул – нуклеин кислоталарды ажратыудың классик усылы. Бул усыл протеиназа К қатнасыуында детергентлер тәрәпинен биологиялық материаллардың майдаланыушы хәмде фенол хэм хлороформ жәрдемінде нуклеин кислоталарды ажратып алыныуы өз ишине алады (2-сүүрет). Буның абзаллығы сонда, Diatom DNA Prep (Россия) хэм Dneasy Tissue Kit (Германия) реагентлер топламына қарағанда бул усыл менен бираз көп

муғдарда ДНК ажратып алынады. Усылдың кемшилигине болса оның дуамлылығы, курамалылығы, агрессив органик еритиушилердин ислетилиуи хэм ДНКны белоктан да, РНКдан да жетерли дәрежеде тазаламаслығын киритиу мүмкин.



2-суўрет. ДНК экстракциясы ушын Фенол-Хлороформ реагенти.

Нематода тоқымаларынан нуклеин кислоталарды ФХ – экстракция қылыу усылы төмендеги басқышлардан ибарат:

1. Нематода денесинен 0,05 г ауырлықтағы тоқыманы бөлеги алынады.
2. Нематодалардың тоқымалары, курамында 40 мМ трис – HCl (pH=8,0), 0,5 мМ ЭДТА, 1^xSSC болған буфер еритпеси (тоқыма хэм буфердин 100 мкг; 500 мкг қатнаса) гомогенизация қылынады.
3. 0,5% ке шекем SDS хэм протеиназа K ди ақырғы концентрациясы 1 мг/мл болғанша қосылады, араластырылады хэм 37°C температурда 2-3 саат дауамында инкубация қылынады ямаса 18 саатқа қалдырылады.
4. Пробиркаға 5 М натрий ацетат ақырғы концентрациясы 0,1 М болғанға шекем қосылады хэм араластырылады. Соң 1:1 қатнаста фенол, түйинган HCl триси (pH=8,0) кўшилиб, 10-15 дақиқа давомида араластырылады.
5. Хлороформди 1:1 қатнастағы көлемде қосып, және 5-10 минут дауамында араластырылады.
6. Алған араласпаны 4°C температурда 20 минут центрифуга қылынады (бир минут дауамында 4000 айланба тезликте).
7. Жоқарыдағы фракцияны ериген ДНК менен (супернатант) пипетка жәрдемінде тартып алынады.
8. ФХлы белоктан ажратыу процеси (депротеиназация) оннан пўткиллей айрықша болғанға шекем тәкирарланады.
9. Ажратып алынған супернатантға 2:1 қатнастағы көлемде хлороформ қосылып, 10-15 минут араластырылады, соң 15 минут центрифуга қылынып (бир минут дауамында 4000 айланба тезликте) жоқары фазасы алынады.
10. 1 мл ли ериген ДНКға 5 М натрий ацетат ақырғы концентрациясы 0,2 М болғанша қосылып, араластырылады.
11. Еки көлемдеги 96% ли этанол еритпеси қосылып, ДНК шөкпеге түскенге шекем бир темпте араластырылады.

12. -20°C температурда бир сутка дауамында суытылады, соң 15 минут дауамында 15000 айланба тезликте центрифуга қылынады (0°C қа суығанша).

13. Супернатант алып тасланады, ДНК шөкпеси 70% ли этанол еритпесинде жуылады.

Этанол еритпеси төгип тасланады, ДНК хауада этанол еритпеси ушып кеткенге шекем қурытылады хәм ионсызлантырылған суўда еритиледи.

Алынған ДНК препаратларын концентрациясы спектрофотометрде анықланады. Ажратылған ДНК концентрациясы 2,0 – 2,3 мкг/мкл шөлкемлестириледи.

Diatom DNA Prep (Россия) реагентлары топلامы жәрдемінде ДНК ажратыуь методи.

Бул метод реагентлер ямаса китлер жәрдемінде нуклеотидлерди экстракция қылыу усылларынан бири есапланады. Бул топлам ДНКны түрли тәбий материаллардан ажратыу, сонлықтан клиник үлгилерден ДНКны тез тазалап алыу имканын береди. Бул усыл ФХ – усылдан жеделлиги (1 үлгиге 30 мин. – 1,5 уақыт сарыпланады), токсик (зәхәрли) реагентлердиң ислетилмеслиги менен ажралып тұрады. Тәсир қылыу механизими гуанидинтиоционатлы лизис қылыушы реагенттиң ислетилиуине тийкарланған болып, ол клетканы лизисине, клетка солубилизациясына, сондайқ клетка нуклеазалы денатурацияға алып келеди. Лизис қылыушы (майдалаушы) – реагент қатнасыуында ДНК NucleosTM – сорбент топلامында актив сорылады, соң спиртли еритпеде белок хәм дузлардан аңсат жуылады. Сорбенттен ажратылады ДНКны ПЗР да ислетиу мүмкин.

Топламды составы: майдалаушы реагент, дузлы буфер Nucleos сорбентиниң суспензиясы, “Экстра Ген” ион алмасыныуы араласпасы суспензиясы (3-сүўрет).



3 сүўрет. *Diatom DNA Prep 200* топلامы.

Diatom DNA Prep 200 реагентлер топلامы жәрдемінде нематодалардың тоқымаларынан ДНКны ажратып алыу усылы төмендеги басқышларын өз ишине алады.

1. Қолланбаға қарап буферде исши еритпеси таярланады.

2. 1,5 мл пробиркаға нематода денесинен 0,05 г ауырлықтағы тоқыма бөлекшеси кесилип салынады (нематоданың бас бөлими алынғаны мақул, себеби қуйрық бөлими морфологиялық тәрeпинен идентификация қылыуы

керекли әхмийетке ийе) хәм 800 мкл майдалаушы реагент пенен майдаланилады хәм қол жәрдемінде 5-10 мәрте араластырылады.

3. Араласпа 5-7 минут 65°С температурға термостатқа қойылады.

4. Пробиркадағы араласпа минутина 5000 айл/мин тезлигинде 10 секунд дауамында центрифуга қылынады.

5. Супернатант таза пробиркаға алынады, оған алдыннан гомогенизацияланған Nucleos суспензиясы 20-40 мкл муғдарынан қосылады.

6. Пробирканы ротатор жәрдемінде 10–20 айл/мин яки қол жәрдемінде араластырыу керек, соң 5000 айл/мин тезлигинде 10 сек. центрифуга қылынады хәм супернатант алып тасланады.

7. Шөкпеде 400 мкл майдалаушы реагент салынып, вортекс пенен гомоген халатқа келгенше жедел араластырылады.

8. Араласпаға дузлы буфердің 1 мл исши еритпеси қосылып, 5-10 мәрте араластырылады, 5000 айл/мин. тезлигинде 10 сек центрифуга қылынады, соң супернатант алып тасланады.

9. 7 – басқыш қайта тәкирарланады.

10. Шөкпе 65°С температурға 4-5 минут дауамын қуырытылады.

11. Сол пробирканың өзине “Экстра Ген” суспензиясы 50-100 мкл муғдарда қойылады хәм гомоген халатқа келгенше араластырылады, соң 65°С температурға 5 минут дауамында термостатқа қойылады хәм және араластырылады.

12. Соң 1 мин дауамында 10000 айл/мин. Тезлигинде центрифугаланады.

13. Супернатант таза пробиркаға алынады, -20°С температурға сақланады.

Ажратып алынған ДНК концентрациясы 0,12-0,17 мкг/мкл ды шөлкемлестириледи.

“Тез” ФХ – усылынан ажратып алынған ДНК ны көп халатларда белок хәм углевод қалдықларинан тазалау керек. Буны болса Diatom реагентлер топلامындағы Nucleos суспензиясы жәрдемінде, усылдың 5 – басқышынан баслап тазалау мүмкин.

Dneasy Tissue Kit (Германия) реагентлер топلامы жәрдемінде ДНК ажратыу методиди.

Dneasy Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) реагентлер топلامы абзаллығы жинисий ер жеткен нематодалардың 10 мг тоқымасынан тысқары, жүдә киши өлшемдеги нематодалардың личинкасы ямаса майегинен геном ДНКсын ажратып алыу мумкин (4-суўрет). Бунда нематода тоқымасының киши бөлеги ажратып алынады ямаса пипетка менен 1-2 дана личинка ямаса мэйеги алынады хәм 1,5 мл ли “Эпендорф” пробиркасына салынады. Үлгилер аўырлығы 10 мг дан аспаўы керек.

1. Биологик материалға 180 мкл ATL буфери салынады.

2. 20 мкл протеиназа К қосылады хәм вортексде 15 сек дауамында араластырылады. Пробиркалар термостатда 55°С температурға

биологиялық материалдің толық майдаланыуына шекем инкубация қылынады. Үлгилерди 1-3 сағатға ямаса кешке 18 сағатға қалдириу мумкин.

3. 15 сек дауамында вортекс қылынады, кейин 200 AL буфери қосылып, 15 сек вортексте араластырылады, 70°C температурда 10 минут инкубация қылынады.

4. Соң 200 мкл этанол (96-100% ли) қосып, вортексте гомоген эритпе пайда боламан дегенше араластырылады.

5. Хәр бир гомоген абайлылық пенен (Dneasy Mini spin column) фильтирли эпиндорф пробиркаларға салынып, қапқақлары жабылып 1 минут дауамында 8000 айл/мин тезликде центрафуга қылынады.

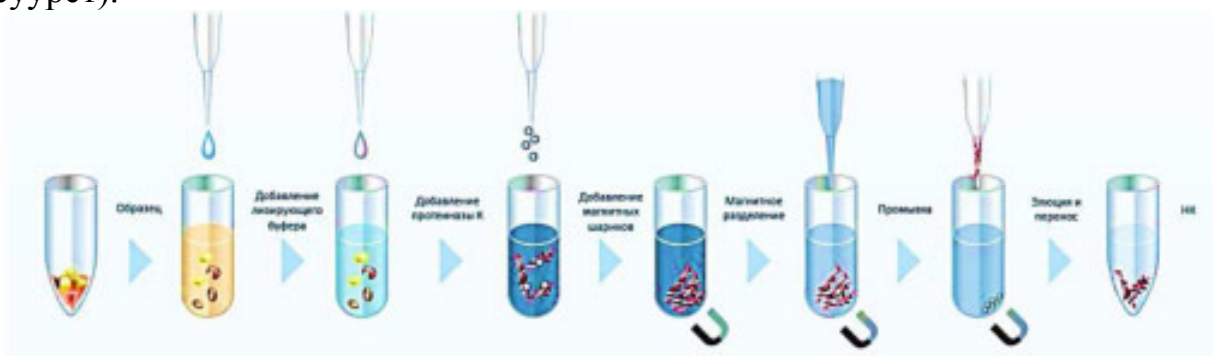
6. Эпиндорфға отген таза суйықлықты 2 мл ли пробиркаларға өткерилип, устине 500 мкл AW1 салынып 1 минут дауамында 8000 айл/мин тезликде центрифуга қылынады.

7. Таза суйықлықты 2 мл ли фильтирли пробиркаларға өткерилип, устине 500 мкл AW2 буфер салынып фильтрден суйықлык толық ажраламан дегенше 14 000 айл/мин тезликде 3 минут дауамында центрифуга қылынады.

8. Фильтрли эпиндорфди басқа 1,5 мл ли ямаса 2 мл ли пробиркаларға өткериледи хәм устине 50-100 мкл АЕ буфер ямаса дистилленген суу салынады, соң хана температурасында 2 минут инкубация қылынады хәм 8000 айл/мин тезликде 1 минут центрифуга қылынады. Буферде эриген ДНК -20°C температурда сақланады.

9. Элюат алыу процессин 8 - басқишқа қарап такрарлау мумкин.

Буннан тысқары, хәзирги уақытта нуклеин кислоталарды автоматик түрде ажратып алыу ушын бир неше приборлар ислеп шығарылған (4-суурет).



4-суурет. MagPurix 12s системасы жәрдемінде НК автоматик түрде ажратып алыу басқишлары. НК ажратып алыуда затларды ажратыуда магнит шариклары жәрдемине тийкарланған.

ПЗР-амплификациясы методиниң тийкарғы тусиниклери.

Полимераза шынжыр реакциясы (ПЗР) - *in vitro* амплификация методи болып, оның жәрдемінде қысқа уақыт дауамында тұрақлы сандағы ДНК избе-излигин әдеттегиден 1000 мәрте көбирек таңлау ямаса көбейтириу мумкин (Mullis, Faloona, 1987). Метод мәниси – пробиркада тұрақлы ДНК бөлимлерин қайталаныушы температур цикллерінде көп мәртебели көшириу (амплификация). Амплификацияның хәр бир циклинде жоқарыда

синтезленген фрагментлер және ДНК-полимераза ферменти жәрдемінде көшириледі хәм ДНК фрагментлери өзине тән көп мәрте үлкенлеседи (Болдырева, 2005).

ПЗР қолланылыуы тарауы: геном избе-излигин жоқары дәрежелі клонлау (Scharf et al., 1986), митохондрия хәм геном ДНК ларын тууры секвенирлеу (Wong et al., 1987), нуклеотид избе-излиги өзгериушеңлигин анализлеу хәм кеселлик қозғатыушыларын анықлау (Kwok et al., 1987).

Полимера шынжыр реакциясын өткериуі ушын реакцион араласпада хәр түрлі қурамлар болыуы зәрүр (Саики и др., 1990):

Еки праймер – жасалма жол менен синтезленген.

Праймердің нуклеотидлер избе-излигине болған талаптар:

1. Ишки екилемши дузилистің болмаслығы;
2. Нуклеотидлер қурамының тең салмақланған болыуы Г/Ц, А/Т хәм барлық избе-излик бойынша тууры бөлистирилгенлиги;
3. Димер праймерлер болмаслығы ушын, 3'ши ақырғы арасында комплементарлықтың болмауы.

Праймерлердің оптимал концентрациясы 0.1-0.5 мкМ. Праймерлердің жоқары концентрациясы өзине тән болмаған қыздыруға ямаса өзине тән болмаған ПЗР-амплификация өнімлери жийналыуына алып келиуі мүмкин.

ДНК-полимераза термостабиллиги (Тақ-полимераза). ДНК-полимеразаның улыұмалық қәсийети сонда, 5'х3' бағдарында нуклеин кислоталардың матрициаланған синтезин алып барыуы. Көпшилик ДНК-полимеразалар қәтелик арқалы қосылған нуклеотидлерди алып таслау ушын молжелленген 3'х5' экзонуклеазалы активликке ийе болады. Әдетте реакция өткериуі ушын 0.5-0.25 бирлікде термостабил полимеразаның *Thermus aquaticus* өзи жетеди.

2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат араласпасы (дНГФ - дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) - Тақ-полимераза жәрдемінде екинши ДНК шынжыры синтези ушын пайдаланылады. Ностабилленген дОТФ араласпа ДНК полимераза жұмыси анықлығын кемейтиреді. дНГФ жоқары концентрациясы Mg^{2+} , ионлары концентрациясын кемейтиреді хәм ДНК полимераза активлигин пәсейтиреді.

Буфер – белгили концентрациядағы катион хәм анионлар араласпасы болып, реакция ушын оптимал шараят жаратады: стабил рН хәм эритпениң ион куши.

Анализ қылынып атырған үлги – реакция араласпасына киритиуі ушын таярланған препарат болып, ПЗР-амплификациясы ушын нишан есапланған ДНКны өзінде сақлайды.

Mg^{2+} иони - Тақ-полимераза жұмыси ушын керекли. Жұмысши концентрациялар диапазоны: 0,5-5,0 мМ (10 мМ - ДНК-полимеразаны 40-50% ге пәсейтиреді Mg^{2+} концентрациясының асыуы полимераза шынжыр реакциясының өзине тәнлигине хәм нәтийжелилигине кушли тәсир көрсетеди: ПЗР- өнімлер шығыуын көбейтиреді, бирақ праймерлер гибридлениуі тәнлиги пәсейеди. Mg^{2+} оптимал концентрациясы ДНК-матрицасы хәм праймерлери нуклеотид избе-излигине байланыслы. Mg^{2+}

дНТФ менен комплекс пайда етеди, тап сол комплекслер Таq- полимераза ушын субстрат есапланады. Mg^{2+} концентрациясы котерилиўи ДНК эриў температурасын котерилиўине хэм праймерлер гибридлениўи анықлығын пәсейиўине алып келеди.

Циклик температура режими - ПЗР- амплификациясында анализ қылынып атырған ДНКдағы қатар хәдийселер болып тұрақлы температура параметрлери тәминленеди. Хәр бир амплификация цикли 3 дана басқишдан ибарат (Рыбчин, 2002):

1. *Денатурация*. Реакцион араласпаны $95^{\circ}C$ ге шекем қыздырылады, буның нәтийжесинде еки шынжырлы ДНК молекуласы шешилип кетеди (ажралып) хэм еки бир шынжырлы молекула пайда етеди.

2. *Жумсатыў (праймерлердиң қосылыўы, гибридлениўи)*. Праймерлер бир шынжырлы ДНКға қосылады. Көзленген специфик тараў шегарасындағы қарама-қарсы ДНК шынжырларына мас келетуғын избе-изликке туўры хэм қарама- қарсы праймерлер комплементар болып қосылады. Хәр бир жуп праймер ушын өзиниң жумсатыў температурасы бар болып, ол $50-65^{\circ}C$ аралықда болады. Жумсатыў ўақыты 20-60 сек.

3. *Элонгация (ДНК синтези)*. ДНК шынжырының қарама-қарсы бағдарында 5'ши ақырдан 3'ши ақырға комплементар қурып питиўи. ДНКның таза шынжырлары синтези ушын 2'- дезоксинуклеозид-5'- трифосфат эритпеси материал болып хизмет қылады. Бул басқишда реакцион араласпадағы температураны оптимум дәрежесине алып шығылады ($72^{\circ}C$). Элогация даўам етиў ўақыты апмлификация қылынып атырған ДНК фрагментиниң узынлығы ямаса ДНК-полимераза ферментиниң ислеў тезлиги менен белгиленеди. Элонгация ўақыты әдетте төмендеги формула жәрдемінде анықланады: T (элонгация) = 1 минут \times N (м.ж.н. ДНК).

Апмлификацияның температура цикли көп мәрте қайтарылады (25 хэм оннан көп). Хәр бир циклде синтезленип атырған ДНК фрагментлери еки мәрте көбейеди. Циклик процесс нәтийжеси ДНК фрагментлериниң өзине тән экспоненциал көбейиўи есапланады.

Тамамланып атырған қурылыс. Әдетте ПЗР- амплификациясы ақырғы циклинен соң дерлик синтезленген ПЗР өнимлерин тамамлаў ушын реакцион араласпаны қосымша түрде 5-15 минут даўамында $72^{\circ}C$ да инкубация қылынады (Саики и др., 1990).

"Ыссы старт" ("hot-start") – ПЗР амплификациясы реакциясындағы носпецефик өнимлериниң пайда болыўының алдын алыў ушын жандасыу есапланады. Оның мәниси, пробиркада праймерлерди специфик жумсатыў ушын керекли шараят боламан дегенше реакцияның басланбаўи (Щелкунов, 2004).

ГЦ қурамы хэм өлшемине қарап, праймерлер тұрақлы эриў температурасына ийе. Егер система температурасы эриў температурасынан бәлент болса, праймер ДНК шынжырында сақланып қалыў қәсийетин жоғалтады хэм денатурацияға ушрайды. Оптимал шараят усланып тұрылса, яғный эриў температурасын жумсатыў температурасына жақын болса,

праймер еки шынжырлы молекула пайда етеди. "Ыссы стартти" әмелге асырыу жолларынан бири бирлемши денатурация уақытында термоциклер шуқыршасына (лунка) пробирканы киритиу (Саики и др., 1990).

Бу ҳолатда, агар носпецефик юмшатиш температура циклланишига қадар бұлган бұлса элонгация содир бұлмайди, агар комплекслар киздирилса ДНК-праймер денатурацияга учрайди, шунинг ушын носпецефик махсулотлар ҳосил бұлмайди. Кейинчалик, пробиркадаги температура эриш температурасига нисбанат пасаяди ва бу спецефик амплификация махсулотлари ҳосил бўлишига олиб келади (Щелкунов, 2004).

Нәтийжели бақлау- реакцион араласпа қурамына кириуши барлық компонентлер реакцияны нормал өтиуин тәминлениуине исеним пайда етиуге жәрдем береди. Буның ушын жумсатыу ушын праймерлерден ибарат ДНК препаратларынан пайдаланылады: мысалы, керекли организм ДНК сы ямаса геномнің спецефик клонланған бөлими.

Контаминация – реакцион араласпаға сырттан амплификация реакциялары ушын нишан болып хизмет қылатуғын хәм жасалма нәтийжели, кери нәтийжелерди беретугын ДНК молекуласының тусип қалыуы.

Кери бақлау тәжрийбениң хәр бир сериясында контаминацияның жоқлығына исеним пайда етиу ушын пайдаланылады. Кери бақлау сыпатында бидистиллирленген суудан пайдаланыу усыныс етиледи.

Реакцион аралашмадаги бегона ДНКни йүкотиш ушын реакцион аралашмали (ДНК матрицаси йүк) пробирканы ультрабинафша нурланыуға 10 минут дауамында душар қылынады.

Реакцион аралашмадағы басқа матрицалардың дереги сыпатында болыуы мүмкин:

- Лаборатория ускенелери хәм пипеткаларда қалған ДНК қалдықлары арқалы;

- Үлгилер арасындағы қарама-қарсы контаминация;

- Алдыңғы ПЗР өнимлери.

Контаминацияның алдын алыу хәм жасалма кери нәтийжелердің алдын алыу ушын төмендеги қағийдаларға бойсыныу зәрүр:

- ПЗР ушын таярланып атырған матрица, ПЗРди туурыдан тууры өткерип атырған хәм ПЗР ди анализ қылып атырған жумыс орынларын бөлистириң.

- ПЗР ушын араласпаны ультрафиолет лампалы ламинерленген шкафда ямаса изоляцияланған боксда араластыриң. ПЗР ушын ислетилетуғын микроцентрифуганы, қолқаптарды хәм басқа ускенелерди де сол жерде сақлаң.

- Тек ПЗР ушын ислетилетуғын пипеткаларды арнаулы геуекли фильтри бар қапқақшаларды ислетиң.

- ПЗР ди өткерип атырғанда тек стерил материаллар хәм жаңа перчаткалардан пайдаланың.

ПЗР-амплификациясы.

18S рРНК гени фрагменти амплификациясы эукариот праймерлери (James et al., 2006) стандарт усул жәрдеминде откериледи (Sambrook et al., 2001).

2.3. ПЗР-амплификациясын өткеріу.

1. Жумысты баслаудан алдын реакцияның ДНК- полимераздан тысқары барлық компонентлерин эритип алың хәм бир қанша ўақытға музға жайластырып түриң. 0,2 мл пробиркани музға жайластырың, 34,8 мкл бидистиллирленген суў, 5 мкл 10X Тақ-буфер, 5 мкл 2,5 мМ MgCl₂, 1 мкл 2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат, 2 мкл ДНК матрицасы, 0,2 мкл Тақ-полимеразасы қосың, ақырғы көлем 50 мкл ди пайда етеди.

2. 0,2 мл пробиркадағы реакция араласпасын вортексе араластырың хәм микроцентрофугада 15 сек даўамында тамшыларды шөгинди жағдайына келтириң.

3. Термоциклер дәстүрин орнатың.

4. Термоциклер лункасына пробиркадағы реакция араласпасын жайластырың хәм термоциклер қапқағын беккем жабың.

5. ПЗР-амплификациясы тамамланғаннан соң үлгилерди агароза геледеги электрофорез методи жәрдеминде анализ қылыў мумкин. Амплификацияланған үлгини -20°C сақлаў зәрүр.

Кесте 1.

2.4. ПЗР ушын молжелленген реакция араласпасы қурамы, ПЗР режимі.

Реакция компонентлери	Көлем, мкл
10X Тақ-буфер	5
2,5 мМ MgCl ₂	5
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат	1
20 мкМ туўғры праймер *	1
20 мкМ терис хәм праймер *	1
ДНК матрицасы	2
Тақ-полимераза 5 ед/мкл	0,2
Бидистиллирленген H ₂ O	34,8
Реакцияның ақырғы көлеми	50

*праймерниң аталыўы хәм избе-излиги 2 кестеде көрсетилген.

Кесте 2.

18S рРНК гени фрагменти амплификациясы ушын специфик праймерлер.

Праймер номланиши	Нуклеотид избе-излиги 5'→3'
Универсал эукариот туўры праймери 18S-SR1R(1F)	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT
Универсал эукариот терис праймери 18S- SR1(578R)	ATTACCGCGGCTGCT

35 цикл,
кесте 3.

18S рРНК гени фрагменти амплификациясы режими

Температура	Ўақыт	Басқишлар излиги
95° С	5 мин	Дәстлепки қиздирыў
95° С	30 сек	Денатурация
60° С	30 сек	Жумсатыў
72° С	1,5 мин	Синтез
72° С	2 мин	Ақырғы синтез
10° С		Сақлаў

Беккемлеў ушын сораўлар:

1. Молекуля-генетик анализлери ушын зоологиялық материллар жийнаўға қандай талаплар қойылады?
2. ДНК экстрация ушын қандай детергентлерден пайдаланылады хәм оның инструкциясы?
3. Не ушын фенол хәм хлороформнан пайдаланылады?
4. Сорбция усылынан пайдаланыўда нуклеин кислоталардиң ажратыў хәм тазалаўдағы тийкарғы басқишлары қандай?
5. Қайсы мәқсетлерде дузлы буфер ислетиледи?
6. ПЗР тийкарғы принциплери қандай?
7. ПЗР цикли қайсы этаплардан ибарат?
8. Реакция араласпасы қайсы компонентлерден ибарат болады?
9. ПЗР қойыуда қайсы мәқсетте қандай бақлаў қойылады?
10. ПЗР-лабораториясы қандай дузиледи?

Пайдаланылған әдебиятлар:

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

3-тема: Агароза гелинде электрофорез усылының тийкарғы түсиниги. Рибосомал хэм митохондриял ДНК тазалаў.

РЕЖЕ:

3.1. Агароза гелын таярлаў хэм ПЗР өнимлеринде электрофорез өткерий. ДНК концентрациясын өлшеў.

3.2. Агароза гелинен ДНК ажратыў ушын ислетилетуғын ДНК тазалаў топламы (Цитокин).

Таяныш сөзлер; *Гель-электрофорез, УФ-нуры, ТАЕ, агароза, бромистый этидий, ДНК тазалаў топламы, ДНК-маркер.*

ДНК электрофорези - аналитик метод болып, ажратыў, теңлестириў хэм ДНК бөлеклерин тазалаў ушын пайдаланылады. ДНК электрофорези горизонтал бағдарда әмелге асырылады (Остерман, 1996).

ДНК молекуласы шекерфосфат қалдығы терис зарядланған, соның ушын ДНК шынжырындағы терис зарядланған катоддан электр майдан куши астында оң зарядланған анод тәрепке хәрекетленеди, Узынрақ болған молекулалар әсте көшеди, себеби гельде усланып қалады, қисқарак молекулалар тезрек хәрекет қылады (Маниатис, 1984).

Нәтийжелерди визуаллаў мәқсетинде эриген агарозаға бромлы этидий киритиледи (Dretzen et. al., 1991).

Алынған ДНК бөлимлери өлшемлери анализи ушын сызықлы ДНК маркеринен пайдаланылады.

Электр майдан кушлениўи үлкен әҳмийетке ийе, сол себепли бөлистирилиў нәтийжелилиги төменлеўи гузетиледи. ДНК бөлимлерин ажратыўда әң максимал нәтийжелиликкеа эрисиў мәқсетинде, кушлениў 1 сантиметр гельде 5 вольтдан аспаўы зәрүр (Girvitz et.al., 1990).

Гельдиң қурамына төмендегилер киреди: 1X ТАЕ (рН 8,1), агароза, бромлы этидий. Гельдиң процент үлесине қарап хәр қийлы қурамлы бөлимлер қосылады. Гельдиң процент улеси ДНК бөлимлери тарқалыў узынлығы арқалы танланады (4 кесте). 18S рРНК ген анализи ушын (узынлығы шама менен 600 ж.н.) 2% ли агароза гели оптимал есапланады.

Гельде агароза концентрациясының қатнасы хәм анализ қылынып атырған ДНК фрагментиниң оптимал размери.

Гелдеги агарозаның муғдары (%)	ДНК бөлимлери өлшеми (миң ж.н, Кб)
0,3	50-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

3.1. Агароза гелин таярлау хәм ПЗР өнимлеринде электрофорез өткеріу.

1. Гельди электрофорез ваннашасына қойыудан алдын үлгилерди киритиу үшін оргойнадан тарақшаларды орнатып шуқыршалар (лунка) жасап алың. Тарақшалардиң төменги тисшелери улыуа көлеми 50 мл болған гелдиң тийкарынан 2 мм аралығында жайлассын (улыуа көлеми 150 мл болған гелдиң тийкарынан 1мм аралығында жайлассын) (4-5 суўретлер).

2. 50мл 2%ли агароза гелин таярлау үшін 50 мл 1X TAE хәм 1 г агароза қосылады. 1X TAE басланғыш концентрациясы 50X TAE эритпесинен таярланады. (Трис, 0,5М ЭДТА рН 8,0, музлатылған уксус кислотасы).

3. Агароза тутқишин 1X TAE эритпеси жәрдемінде қайнау дәрежесинде сондай қиздириң, эритпе гомоген жағдайына келсин, яғный агарозаның эримеген бөлекшелери болмасын.

4. Бул процесстен соң 50°C дәрежесинде суўытың хәм 0,5 мкл бромли этидий қосың.

5. Барлық гел көлемин электрофорез ваннашасына қойың. Гель суўығаннан соң (30-45 минут хана температурасында), әстелик менен тарақшаларди алып таслаң хәм электрофорез ваннашасына 1X TAE буферин гел толық қапланаман дегенше қойың.

6. Үлгилерди 6X Loading Dye буфери (курамы: 4% ли тоқ сары G, 0.03% ли бромфенол, 0.03% ксилен- цианол FF, 15% Фиколла 400, 10 мМ трис-НСІ рН 7,5 и 50 мМ ЭДТА рН 8,0) менен сондай араластырың, үлгидеги ақырғы концентрация 1X болсын хәм микропипетка жәрдемінде гелдеги шуқыршаларға (лунка) қойың.

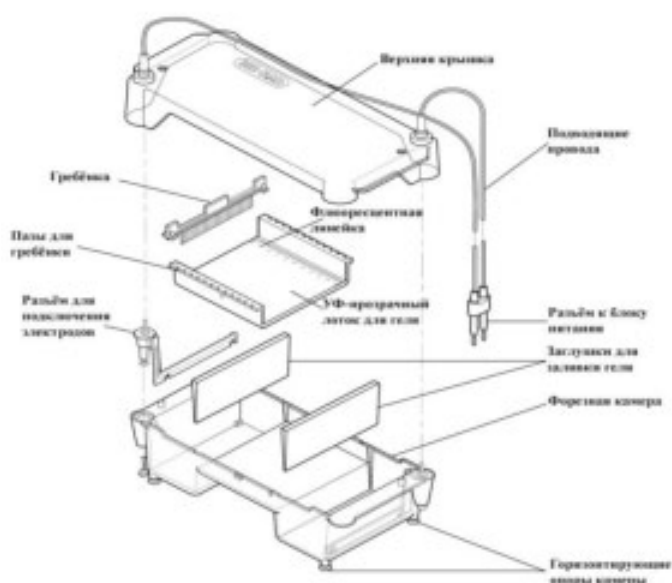
7. Алынған ДНК бөлимлери көлемин анализ қылу үшін лункаларды буреуине 2,5 мкл ли ДНК-маркерин **DirectLoa^{drM} Wide Range DNA Marker** қосың.

8. ДНК ажратиў ушын кушлениў 1 сантиметр гельде 5 вольттан аспаўы зэрүр.

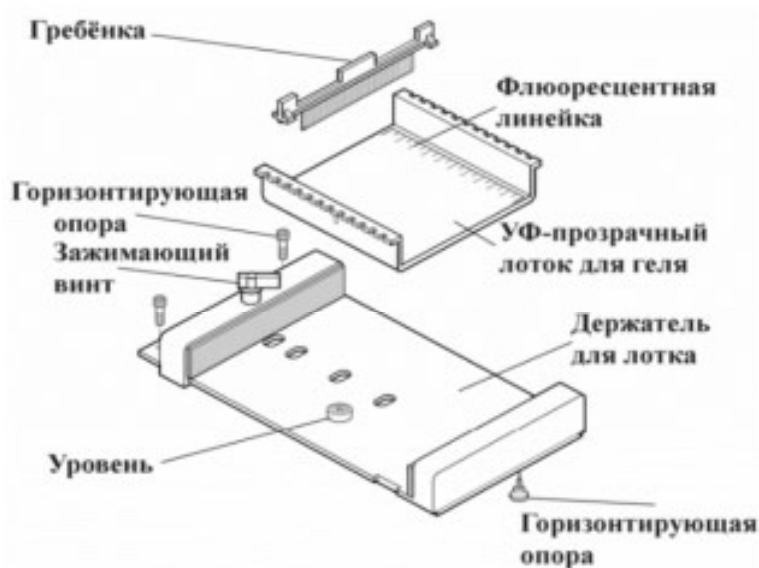
9. Электрофорез тамамланғаннан соң гельди ультрафиолет хәм трансиллюминатор нурларында көриң хәм суўретке алың, нәтийжелерди жазып алың.

Дыққат! Көз тор пердесиниң ультрафиолет нурлары зиянланбаўы ушын ДНК зонасын тексерийде трансиллюминатордиң комплект исиўлери арқалы ямаса арнаўлы қорғаў очкилары жәрдемінде әмелге асырылады.

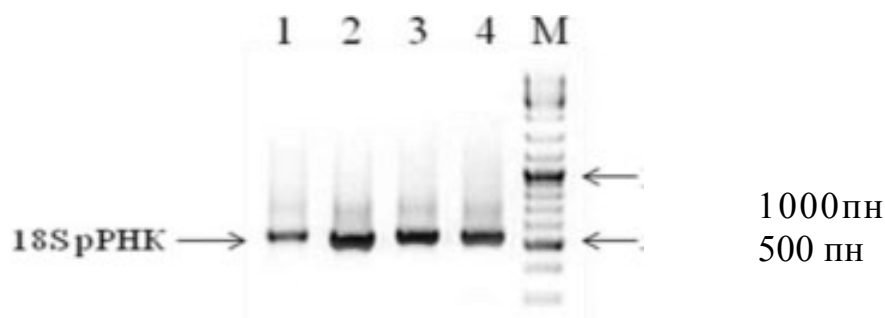
10. 6-суўретте барлық үлгидеги генлердиң 18S рРНК бөлиминде ДНК амплификациясын көрсетиўши ПЗР өнимлери анализи мысал түринде келтирилген. Генниң 18S рРНК бөлими амплификацияланған нуклеотидлер избе-излиги узынлығы шама менен 500 п.н қурайды.



4 - суўрет. Агароза гелинде горизонтал электрофорез өткериў ускенелери элементлери.



5 - суўрет. Гель қойыў ушын лоток хәм астына қоятын зат.



6-суўрет. 4 үлгидеги генлердиң 18S рРНК бөлиминде ДНК амплификациясын көрсетиўши ПЗР –амплификациясы.

11. Керекли ПЗР фрагментин скальпель жәрдеминде гельден кесип алың, 1.5 мл ли центрифугаланған пробиркаға жайластырың хәм тәрезиде өлшеп алың. ПЗР фрагментлерин ислеп шығарыўши тәрәпинен усыныс қылынған хәр түрли методикалар жәрдеминде ажратып алыў мумкин.

12. 5-кестеде ПЗР- амплификациясы анализи процессинде келип шығыўы мумкин болған машқалалар хәм олардиң шешими көрсетилген.

Кесте 5.

Келип шығыўы мумкин болған машқалалар хәм олардиң шешими

Машқала	Итималы бар себеп	Мумкин болған машқала шешими
ДНК гельда боялған жолдай көринеди.	Оним деградация қылынады.	Нуклеазалар жәрдеминде патасланыў орайын табың, материал узақ ўақыт сақланбағанлығына исеним пайда етиң ПЗР
	Амплификацияны өзине тән болмағаны.	Өзине тән бөлған праймерлер таңлап алың ямаса жәнede оптимал реакция шараятын танлаң
	ДНК матрицасы артықшасы	Кемрек муғдарда ДНК матрицасын алың.
Гельдеги өзине тән болмаған сизикшалар	Амплификацияны өзине тән болмағаны	Өзине тән бұлған праймерлар танлаб олинг ёки янада оптимал реакция шарoitини танланг
	ДНК матрицасы артықшасы	Кемрек муғдарда ДНК матрицасын алың
ПЗР- амплификациясы өнимдеги сизикшалар, азырақ ямаса жоқ болыўы	Анық емес боялған гель	Агарозаға көбирек муғдарда бромли этидий қосың
	ДНК матрицасын үлгиде жоқлығы	ДНК матрицасын қосың
	Праймерлер инкиразға ушраған праймеры	Таза праймерлер синтез қылың
	Праймерлер ДНК матрицада жумсамаўы	Өзине тән болған праймерлер танлап алың
	ПЗР өткерий ушын надурис шараят	Жәнede оптимал реакция шараятын танлаң
	Амплификатор бузылғанлығы	ПЗР ди басқа амплификаторда өткерин

3.2. Агароза гелинен ДНК ажратыуы ушын ислетилетуғын ДНК тазалау топلامы (Цитокин).

ПЗР нәтийжесинен алынған ДНК ларды тазалауы ушын 0,8 % 100 мл ли агароза гель таярланады. Электрофорезден қалған 21 мкл ПЗР өнімлерин 4 мкл краска менен араластырып, хәр бир үлги араласпаларды гель кетекшелерине салынып, 100 Вт кушлениу менен 1–1,5 сағат электрофорез камерасында жургизиледи.

Электрофорез камерасынан гелди алып, трансиллюминаторда қорғау көз айнегин такқан халда, гелдеги ДНК ноқатларын (пик) бир мәртелик лезвия жәрдемінде кесип алынады. Кесилген гель бөлеклерин 1,5 мл-ли эппендорф ыдысларына салынады. Соны айрықша итибарға алыу керек эппендорф ыдысларын тәрзиде тартыу хәм хәр бир эппендорфди тәртип бойынша номерлеу керек.

ПЗР өнімлерин гелден тазалауда “Цитокин” фирмасында ислеп шығарылған топламлардан пайдаланылды.

1. Эппендорфдағы гелди эритиу ушын гель ауырлығына тең 10 мг болса 10 мкл байланыстырыуи араласпа салынды.

2. Термостатға 65 °С ге 15 минут гель эригенше сақланды.

3. Термостатдан эппендорфди алып хана температурасында 1 минут сақланады хәм вортекс қылынады хәм 16000 айл/тез центрифуга қылынды.

4. Центрифугадан эппендорфларды алып жаңа фильтрли эппендорфларға пробирка ишиндеги араласпа салынады хәм жууыуи араласпадан 700 мкл салынады, 1 минут 16000 айл/тез центрифуга қылынады.

5. Эппендорф ишиндеги араласпа алып тасланады хәм 500 мкл жууыуи араласпа салынып, 5 минут 16000 айл/тез центрифуга қылынды.

6. Эппендорфдағы фильтрли калонка басқа таза 1,5 мл-ли эппендорфға өткериледи хәм 50 мкл элюат араласпасы ямаса тазаланған суу салынды, 1 минут хана температурасында сақланды, соң 1 минут 16000 айл/тез центрифуга қылынды

7. Эппендорфлардан фильтрли калонкаларды алып тасланады, эппендорфдиң астынғы бөлимине тускен гелден тазаланған өнімди -20°С сууытқышқа алып қойылады.

Гелден тазаланған ПЗР өнімлерин сиквенирлеу ушын нуклеотидлерин оқытуу ушын ЦКП «Геном» («Генотех») фирмасына берилди.

ПЗР өнімлерин сиквенирлеуге бериуде ПЗР өнімлерин концентрациясы анықланады хәм сол концентрацияға қарап ДНК 1 мл эппендорфларға салынып, устине ПЗРде қойылған праймерлерден тек.

Беккемлеу үшін сораулар:

1. Электрофорез усылы тийкарында қандай принцип бар?
2. 100 мл 2.0 %-ли агароза гели таярлау үшін қанша ауырлықтағы агароза керек болады
3. ДНК фрагменти размери 350 хәм 150 ж.н ажратыу үшін қандай концентрациялы агароза керек болады?
4. Электрофорез өткерилгенде ДНК молекулалары неге хәм қайсы тәрепке хәрекетленеди?
5. Электрофорез процессинде агароза гелинде ДНК молекулалары тезлиги қандай факторларға байланыслы?
6. Не үшін гелде пайда болған шаршадан қашыу керек?
7. Гелдеги ДНК көриниуи (визуализация) не есабынан әмелге асады?
8. Электрофорез пройессинде гелдеги ДНК молекулалары хәрекетин қандай қылып бақлау қылыу мумкин?
9. Электрофорездин қайсы басқишинда перчатка менен ислеу керек хәм неге?

Пайдаланылған әдебиат:

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

4-тема. Секвенирлеу – ДНК-ның бирлемши нуклеотидлер избе-излигин анықлау. нуклеотидлер избе-излиги тийкарында организмлерди идиентификация қылыу.

РЕЖЕ:

4.1. ПЗР-амплификацияның асимметрик реакциясын флуоресцент нишанлы нуклеотидлер жәрдемінде пайда этиу (секвенирлеу реакциясы).

4.2. ПЗР-амплификация реакциясындағы асимметрик фрагментлерди тазалау.

4.3. Blastn программасы жәрдемінде көплек тегислеу жұмыстарын алып бару.

Таяныш сөзлер: Секвенирлеу, NCBI, Blast, BioEdit, ClustalW2, Clustal Omega программалары.

4.1. ПЗР-амплификацияның асимметрик реакциясын флуоресцент нишанлы нуклеотидлер жәрдемінде дузиу (секвенирлеу реакциясы).

Автоматик ДНК секвенирлеу принципи анық ўақыт тәртибинде флуоресцентленген өнімлерди электрофоретик ажратуу, өзине тән терминация секвенирлеу реакциялары хэм олардиң детекциясын өз ишине алады (Inoue et al., 1998). Детекция гелидиң төменги бөлимінде, ДНК бөлимлериниң лазер нуры жәрдемінде бояу молекулалары қозғалыуы нәтийжесінде әмелге асырылады. Ажратуу арнаулы маслама, автоматик ДНК секвенаторы жәрдемінде әмелге асырылады. Биринши автоматик ДНК секвенаторы 1987 жыл Applied Biosystems фирмасы тәрпинен ислеп шығылған.

Автоматик ДНК секвенаторы арнаулы компьютер дәстүрлери жәрдемінде басқарылады. Мысалы, Applied Biosystems фирмасы масламасын жийнау дәстүри хэм мағлыұмат анализи менен бирге қосылады. Электрофоретик бөлиниу тамамланғаннан соң, Data Collection дәстүри жәрдемінде алдыннан жийналған мағлыұматлар өзине тән дәстүр жәрдемінде анализге жибериледи. Бунда ол ямаса бул нуклеотидлер тийкарындағы терминантланған ДНКның тийисли фрагментлериниң салыстырмалы бәлентлик шокқысы анықланады хэм бузилғанлары алып тасланады (Alpheu, 1997).

Автоматик ДНК секвенирлеудеги флуоресцентленген өнімлерди ажратуу терминантланған секвенирлеу реакцияларында, электрофорезден тысқары капилляр-гель электрофорези кең қолланылады (Sambrook et al., 2001). Оған жоқары сезиушеңлик, капиллярдиң жүдә кишкене ишки диаметри нәтийжеси есапланған жоқары бөлиниу тезлиги, сияклы қәсийетлери мас келеди. Дәстлепки жұмыстарда капилляр электрофорезин әмелге асыруу ушын әпуайы полиакриламид гели хизмет қылған (Lagio et

al., 1997). Бирақ оның өзгериушеңлиги, хаўа шарларының пайда болыуы сияқлы кемшиликтери методдиң өнимдарлығын көринер дәрежеде төменлетеди. Сызықлы полиакриламид усылынан пайдаланыу төмендеги машқалалардиң шешими болды хэм бул методдиң нәтийжелилигин асырыуға хизмет қылды. (Inoue et al., 1998).

Флуорцентленген терминантланған нуклеотидлер жәрдеминде ПЗР амплификациясы ассиметрик реакцияларын дузиу(секвенирлеу реакциясы) (2 темаға қараң).

Секвенирлеу реакциясындағы ПЗР басқишлары ушын мөлжелленген реакциялар араласпасы компоненттери 6-кестеде көрсетилген. Секвенирлеу реакциясындағы ПЗР басқишлары ушын мөлжелленген термоцикллер тәртиби 14-кестеде көрсетилген. ДНК секвенирлеу M13/pUC(-20) сияқлы стандарт праймерлер жәрдеминде ямаса ABI Prism 310 Genetic Analyzer автомат секвенаторы жәрдеминде өткериледи. Праймерлерди Синтол (Россия) кәрханасы синтезлеген.

Кесте 6.

Секвенирлеу реакциясындағы ПЗР басқишлары ушын мөршерленген реакциялар араласпасы курамы.

Реакция компоненттери	Көлеми, мкл
2,5X Ready Reaction Premix	0,5
TMS Buffer 5X	3,75
3,3 мкМ Праймер	1
ДНК	1
Бидистиллирленген суу	13,75
Реакцияның ақырғы көлеми	20

Кесте 7.

Секвенирлеу реакциясын өткерииуде температуралар дәуири тәртиби.

Температура	Уақыт	Басқишлары
96° С	1 мин	дәстлепки қиздирый
96° С	10 сек	денатурация
55° С	50 сек	Жумсатыу
60° С	4 мин	Синтез
10° С		Сақлау

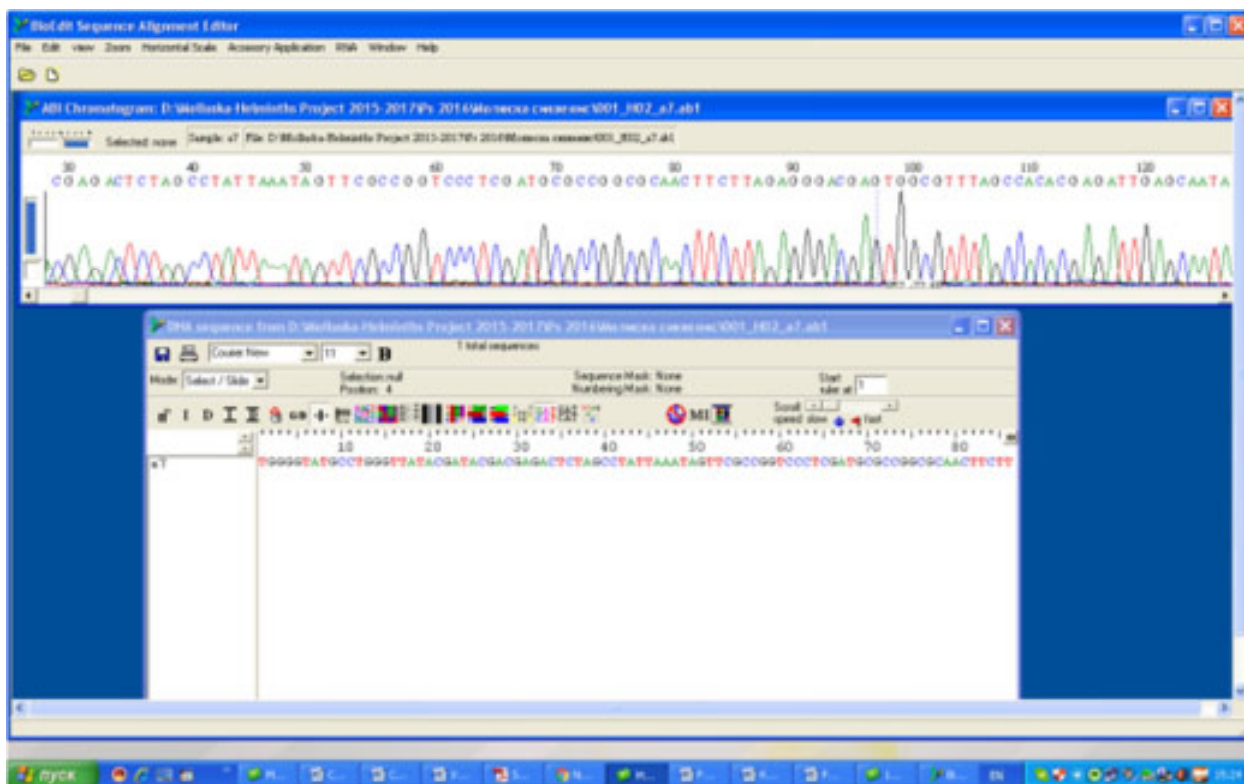
} 35 давр

ДНК- Секвенирлеуде праймерлердің нуклеотид избе-излигин

Праймердің аталыуы	нуклеотид избе-излигин 5'→3'
Секвенирлеу үшін праймердің T7 промотор бөлімі	TAATACGACTCACTATAGGG
Секвенирлеу үшін тууры праймер M13/pUC (-20)	GTAACAACGACGGCCAGTG

4.2. ПЗР амплификациясы ассиметрик реакциялары фрагментлерін тазалау.

1. ПЗР-фрагментлери сақланған пробиркаға 2 мкл 125 мМ ЭДТА, 2 мкл 3М натрий ацетат хәм 70 мкл 95% этанол қосың.
2. Араласпаны хана шараятында 15 минут дауамында инкубация қылың соң араласпаны вортекседе араластырың.
3. Араласпаны 30 минут дауамында 20°C да инкубация қылың.
4. 20 минут дауамында 13.3 мың минутдай центрифугалаң.
5. Керексиз суйықлықлы микропипетка жәрдемінде әстенлик менен алып таслаң.
6. Шөгіндиге 100 мкл 70 % ли этанол хәм 5 минут дауамында 13.3 миң минутдай центрифугалаң.
7. Керексиз суйықлықлы алып таслаң хәм пробиркаларды 37°C термостатда ашық халда курғатың.
8. Керексиз суйықлық пуўланғаннан соң 20 мкл Ni- Di формасында қосың.
9. Араласпаны 20 сек дауамында вортекседе араластырың.
10. Пробиркадағы араласпаны термоцеклерге жайластырың.
 - 2 минут дауамында 95° C ге шекем қыздырың;
 - Сақлау үшін 4° C ге шекем сууытың.
11. Пробалар жайласқан пробиркаларды термоцикллерден шығарғаннан соң, қысқа ўақыт дауамында (20 сек) центрифугалап, тамшыларды жоқ етип алың хәм пробаны арнаўлы секвенерлеу үшін мөлшерленген пробиркаға жайластырың.
12. Секвенерлеу нәтийжелерине BioEdit дәстүрлеу пакети жәрдемінде ислеу бериледи. Секвенерленген хромотограмма анализи үшін Chromas дәстүринен пайдаланылады. Мысал түрінде 5-суўретте BioEdit дәстүрлеу пакети жәрдемінде секвенерленген хромотограмма анализи көрсетилген. 18S рРНК гени бөліміндеги бирлемши нуклеотидлер избе-излигин (узынлығы 417 п.н.):



5 сүүрет. BioEdit дәстүри жәрдемдинде секвенс хроматограммасы улгиси.

Бирлемши нуклеотидлер избе-излиги анализи тийкарында организмди идентификациялаў.

Организмлердиң идентификациялаў әдетте нуклеотидлер избе-излиги анализи тийкарында, BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) көп мәртелик туўырлаў дәстүри жәрдемдинде мағлыўматлар базасында GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) өткериледи.

BLAST (ингл. *Basic Local Alignment Search Tool*) - бирлемши нуклеотидлер ҳәм белоклар избе-излигин салыстырыўга жәрдем бериўши алгоритм. BLAST алгоритми тийкарындағы компютер дәстүрлери бирлемши структурасы (избе-излиги) ямаса мағлыўматлар базасындағы фрагменти белгили болған белок ямаса нуклеин кислоталар гомологларын излеп табыўға имканият жаратады (Altschul et al., 1990).

BLAST сериясындағы дәстүрлер. Биологиялық избе-изликти анализ кылыў ушын 3 дана тийкарығы жандасыу бар:

Нуклеотидлер избе-излиги анализи. ДНК ямаса РНК нуклеотидлери избе-излиги менен ислеўге жәрдем бериўши алгоритмлер топламы. Blastn («Nucleotide BLAST») дәстүри хәр түрли мағлыўматлар базасына ийе болған нуклеотидлер избе-излигин салыстырыў ҳәм гомологиялық избе-изликти излеп табыўға жәрдем береді. Blastn жәрдемдинде анализ басқа алгоритмлерге салыстырғанда көп ўақытты алады, бирақ төмен гомологлы

избе-изликтерди салыстырыуы имканын береді. Megablast 95% ге шекем жақын тууысқан нуклеотидлер избе-излигин салыстырыуға молжелленген. Дәстүр көп нуклеотид избе-изликтерин бир избе-изликке жийнайды хәм BLAST база мағлыұматларын излей баслайды. Кейин megablast индивидуал избе-изликти салыстырыуы хәм статистик ислеу беріуі ушын алынған мағлыұматларға ислеу беріп баслайды. Discontiguous megablast дәстүри нуклеотидлер избе-излигин айрым бир мас келмеуі итибарға да алмауына жол қояды, ол парқланыуши бирақ избе-изликти салыстырыуы ушын мөлшерленген.

Белок избе-излиги анализи. Аминокислоталар избе-излиги менен ислеуге жәрдем беріуши алгоритмлер топламы. Стандарт Blastp («Protein BLAST») дәстүри хәр түрлі мағлыұматлар базасына ийе болған аминокислоталар избе-излигин салыстырыуы хәм гомологиялық избе-изликти излеп табыуға жәрдем береді. Басқа дәстүрлер сияқлы Blastp дәстүри жергиликли гомологик бөлімлерин табады. Төмендеги алгоритм жәрдемінде дәстүри хәр түрлі мағлыұматлар базасына ийе болған аминокислоталар избе-излигин салыстырыуы хәм гомологиялық избе-изликти излеп табыуы мүмкін. psi-blast («Position-Specific Iterated BLAST») алгоритм белоклар избе-излиги анализінде жәнеде сезгир алгоритм болып, оны белоклардың узақ тууысқанлары ямаса белоклардың таза шаңарақ ағзаларын табыуы ушын пайдасы болады. Қуйидаги алгоритмдан Blastp стандарт алгоритми избе-кетликни топа олмағанда еки гипотетик оксилларға алоқа юборғанда, муайян избе-кетлик билан ұхшашлик топилғанда фойдаланилады. Phi-blast («Pattern-Hit Initiated BLAST») пайдаланыуши берген шаблонди өзінде сақлауы хәм бир ұақытта пайдаланыуши берген сорау менен гомологик уқсас болған белоклар избе-излигин излеуі ушын молжелленген. Cdart («Protein homology by domain architecture») алгоритми белоклар курамын үйренеди. Ол барлық белоклар курамын theprotein nr мағлыұматлар базасында анализ қылады хәм излеуі алып барады.

Трансляция қылынған избе-изликтерди анализ қылуы. Арнаулы дәстүр болып, нуклеотид избе-изликти аминокислота избе-излигине трансляция қылуыға имкан береді. Blastx («Translated query vs protein database») алдын нуклеотид избе-изликти аминокислота избе-излигине трансляция қылады, кейин белоклар гомологиялық избе-изликти мағлыұматлар базасында излеп табыуға жәрдем береді. Blastx оқыуы ушын нуклеотид избе-изликтерин барлық бдана нұсқасын трансляция хәм анализ қылады. Сондай қылып, алгоритм de novo секвенирленген нуклеотид избе-

изликти хәм EST- избе-изликтикти («Expressed Sequence Tags») анализ қылады. Бул алгоритм басқа нуклеотид Blast ға қарағанда жәнede сезгир алгоритм есапланады, себеби салыстырыў белок избе-излиги дәрежесинде алып барылады. Басқа тәрeптeн, tblastn («Protein query vs translated database») алгоритми керисинше белоклар избе-излигин аңлап болмайтын нуклеотидлер избе-излигинде излеўге жәрдем бeреди. Хәм ақыры, tblastx («Translated query vs translated database») алгоритми, таза генлерди нуклеотид избе-изликте идентификация қылыўға пайдалы есапланады.

4.3. Blastn программасы жәрдемінде көплек тегислеў жұмысларын алып барыў.

BLAST алгоритмлери жәрдемінде, нуклеотид избе-излиги хәр түрли организмлер геноми мағлыўматлары базасында анализ өткерий мумкин: омыртқалылар (адам, тишқан, макака хәм басқалар), омыртқасызлар (дрозофила, *Caenorhabditis elegans* хәм басқалар), өсимликлер (арабидопсис, мэккежуўери хәм басқалар), замаррықлар (аспаргилл) хәм вирусларда.

BLAST ислеў принципи. BLAST сериясындағы дәстүрлер белгили бөлимлердеги избе-изликтик салыстырыў ушын жергиликли туўырлаў алып барады. Нуклеотид ямаса аминокислоталар избе-излиги BLAST серверине келгеннен соң, BLAST барлық бөлимлер (белоклар ушын бул 3 аминокислотанан ибарат избе-излик бөлими, нуклеин кислоталар 11 нуклеотидлерден ибарат) хәм уқсас бөлимлер кестесин дузеди. Кейин мағлыўматлар базасында излеў әмелге асырылады хәм гомологлар табылғанда олардиң өлшем бөлимлери узайтырылады (4 хәм оннан артық аминокислота, 12 хәм оннан артық нуклеотидлер) алдын аралықсыз, кейин аралықлардан пайдаланылған халда. Барлық мумкин болған өлшем бөлимлери узайтырылғаннан соң, мағлыўматлар базасындағы жәнede гомологик избе-излик жуп туўырланады хәм алынған мағлыўмат SeqAlign структурасында жазылады.

Үйренилип атырған избе-излик хәм BLAST мағлыўматлар базасындағы избе-излик уқсаслығы дәрежеси хәм әхмийетин анықлаў мәқсетинде Max ident (максимал уқсаслық), Query coverage (сораў қамраўы майданы) хәм E баҳа (expected value, E-value) (кутилген баҳа) дан пайдаланылады.

Blastn дәстүри жәрдемінде көп мартелик туырлаўди откерий

1. BLAST дәстүри бетине кириң:

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

BLAST тийкары бети ашылыуында төбе бөлимде 4 дана қосымша тийкары меню бар:

- Home – уй бетиндеги қайтыу ушын қосымша.
- Recent Results – 36 сағат ишинде қылынған излеу нәтийжелерин ашыу ушын қосымша.
- Saved Strategies – сизиң шахсий бетиңизде «My NCBI» излеу нәтийжесинен соң сақланған қосымша.
- Help - BLAST дәстүринде хужжетлер менен ислеу ушын каталогқа отиу қосымшасы.

2. Тийкары менюда Basic Blast графасындағы «nucleotide Blast» дәстүрин танлаң.

3. Избе-изликти киритиу айнасына FASTA форматында Enter Query Sequence киритиң. Үлги нәтийжесинде 18S рРНК бөлими нуклеотид избе-излигин танлаймиз.

4. Choose Search Set → Others → Nucleotide collection (nr/nt) параметрын танлаң.

5. Program Selection графасында somewhat similar sequences излеу алгоритмин танлаң.

6. BLAST кнопкасын басың.

Өткерилген анализге қарап, пайдаланылып атырған 18S рРНК гени избе-излиги тийкарындағы анализи нәтийжелерине қарап бул *Pseudonaraeus sogdiana* (ген 18S рРНК, KU760758) деп идентификация қылыу мумкин, бирақ 98 % уқаслық тийкарында (максимал идиентификация -98 %, сорауди әмелге асырыу областы – 90%, E value - 0.0)

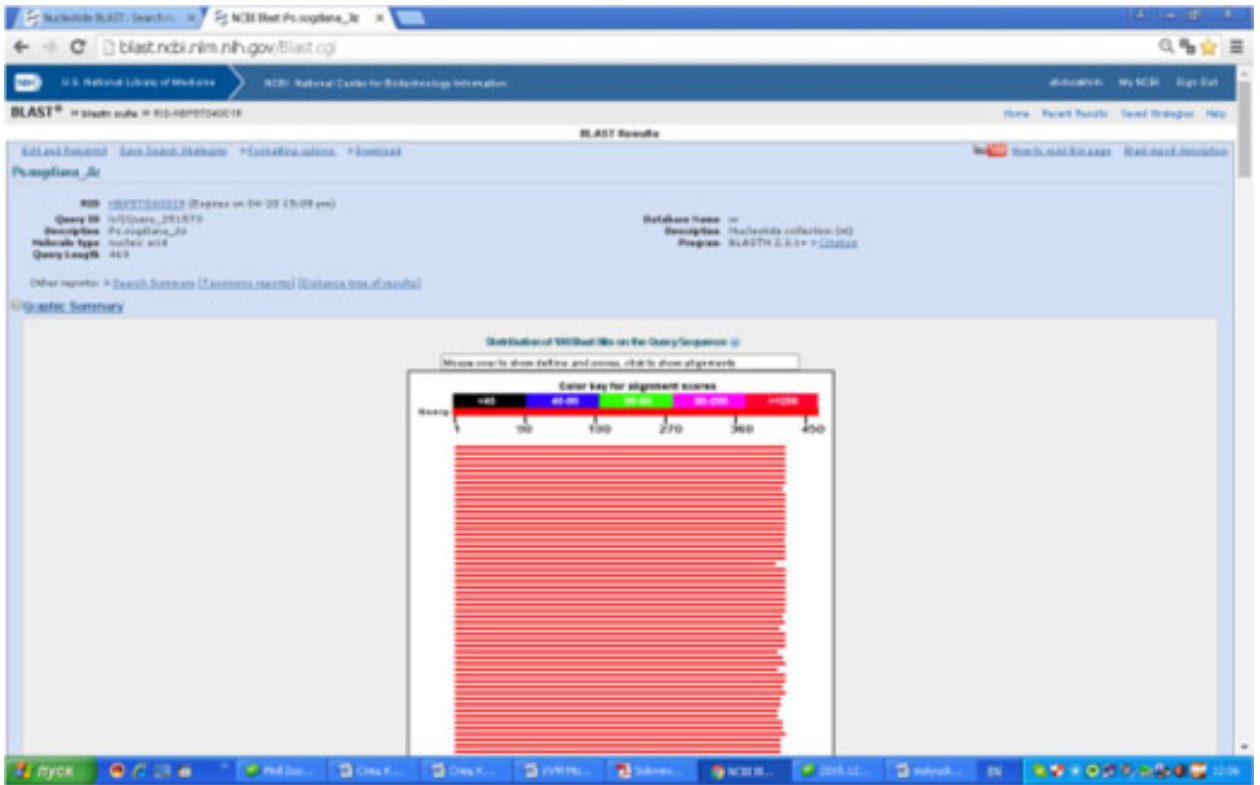


BLAST тийкары айнасы.



7 сүүрет. Нуклеотидлер избе-излиги анализи BLAST айнасы.

8, 9 хэм 10 сүүретлерде нэтийжелер анализи келтирилген.



8 сүөрет. BLAST дэстүри жумысы график нәтийжелери.

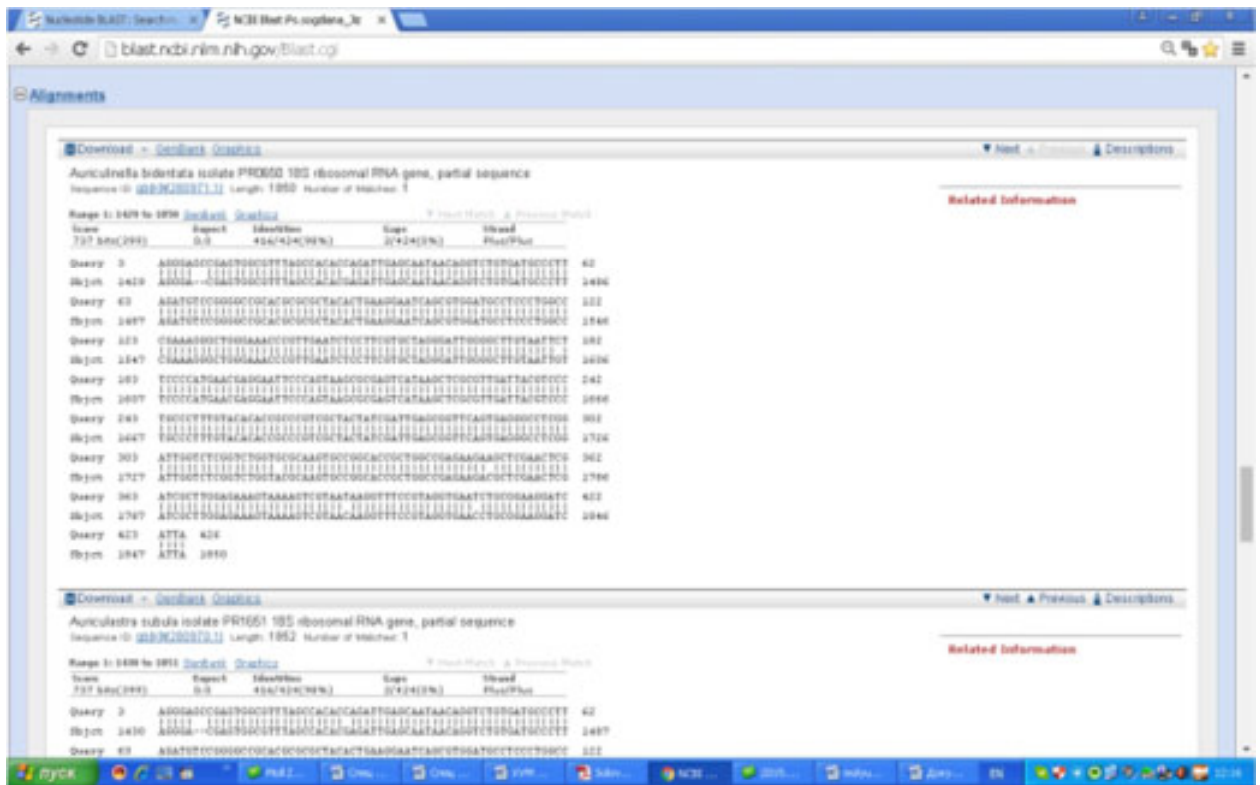
Descriptions

Sequences producing significant alignments

Select: All (11) | Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	737	737	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	737	737	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	737	737	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	737	737	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	737	737	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	732	732	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	730	730	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	730	730	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	726	726	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	726	726	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	723	723	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	721	721	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	721	721	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	721	721	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	719	719	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	717	717	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	717	717	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	717	717	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	717	717	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	715	715	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	715	715	90%	0.0	99%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	715	715	90%	0.0	97%	U00001.1
Aureocella anophagealensis F10402.101 (ncicr.org/blast/ncicr/blast/seqs/...	715	715	90%	0.0	99%	U00001.1

9 сүөрет. BLAST дэстүри текст түріндеги нәтийжелери.



10 сүүрэт. Үйренилип атырған нуклеотидлер избе излиги хэм мағлыұматлар базасында избе-изликтің жуп дурысланыұы.

Салыстырылып атырған избе-изликтің толықсиз гомологиясы хэм нәтийже болыұы мумкин: 1) GeneBank депонировать қылынған избе-изликлер қәте болыұы мумкин (Sbjct); 2) түр ишиндеги өзгериұшеңлик.

Беккемлеұ ушын сораұлар:

1. Сәнжер усылы тийкарындағы секвенирлеұде қандай принцип жатады?
2. Секвенирлеұ откериұде шинжырдың узиұде қандай компонентлер керек?
3. ПЗР-амплификациясы ассиметрик реакциясында фрагментлерди тазалаұды тусиндириң?
4. Blastn программасы жәрдемінде коплеген туұырлаұлар қандай өткериледи?
5. BLAST жәрдемінде бирлемши нуклеотидлер избе-излигин қандай анализ қылынады?
6. BLAST менен ислеұди принциплерын көрсетиң?

Пайдаланылған әдебият:

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

5- Тема. Филогенетикалық теректи дузиў. Нуклеотидлер избе-излигин генбанк (ncbi) базасына жайластырыў днк – диагностика (пзр усылы).

РЕЖЕ:

- 5.1. Анализ ушын алынған избе-изликлерди дузиў;
- 5.2. Clustal Omega дәстүри жәрдемінде нуклеотидлер избе-излигин коп мәрте туырлаў;
- 5.3. Филогенетик теректи дузиўде MEGA-5 программасында кобирек ҳақийқатға жақын усылы (*maximal likelihood*), максимал экономика (*maximal parsimony*), шамалап көрилген орташа жуплық (UPGMA) ҳәм жақын қоңсылар (*Neighbor-joining*) дәстүрлери арқалы тексеруў;
- 5.4. Алынған нуклеотидлер избе-излигин ҳалықаралық Генбанкке (NCBI) жайластырыў;

Таяныш сөзлер: Молекуляр филогенетика, Филогенетик терек, *fasta format*, MEGA-5, Генбанк.

Филогенетик теректи дузиў ушын алдын анализ ушын керекли избе-изликти анықлап алыў соң, оларды коп мәртелеп дузиўлеў зәрүр. Кейин, арнаўлы дәстүр жәрдемінде терек дузиледи ҳәм нәтийжелер график көринисінде көрсетиледи.

Филогенетик теректи дузиў ушын FASTA форматында нуклеотидлер избе-излиги дузиледи.

Избе-изликти таңлаўда керек болады:

- 1) Онша үлкен болмаған таңламада тоқтаў (< 50 избе-излик)
- 2) Фрагментлерге, ксенологларға, рекомбинант избе-излик, тандем қайталаныўларға (избе-изликлер көплеп қайталаныўы) жол қоймаў керек.

5.1. Анализ ушын алынған избе-изликлерди дузиў.

1. Бөлек текстли файлға (Microsoft Word) филогенетик терек дузиў ушын хизмет қылыўши организмлердиң (FASTA форматында), избе-излигин киргизиң.

2. Избе-изликти номерлең. Басқа текстли файлға организм атларына мас келиўши номерлер избе-излигин жазип шығың (11-12суўрет).

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

11-суўрет. Microsoft Word текстли файлында организмлер аталыўы.

5.2. Clustal Omega дәстүри жәрдемінде нуклеотидлер ізбе- излігін анықлап алыў соң оларди көп мәртебели туырлаў.

Clustal Omega дәстүри жәрдемінде нуклеотид кислоталар хәм белоклар ізбе-излігін анықлап алыў, соң оларды көп мәртебели туырлаўға мөлшерленген.

Clustal Omega топарлы қатар ямаса онлайн түрде ислейди.

1. Көп мәртебели туырлаў ушын Clustal Omega бетине кириң: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

2. Clustal Omega бас бетінде торт қосымша меню бар (13 суўрет):

- Step 1 (Адым 1) – қосымша ізбе-излікте FASTA форматында Microsoft Word документине анализ қылынып атырған нуклеотидлер ізбе-излігін киритыўши айнаны өзінде сақлайды. Графада Enter or paste да DNA таңлаймиз.

- Step 2 (Адым 2) – қосымша (Pairwise Alignment Options) жуп туырлаў вариантларын өзінде сақлайды: әстенрек (Slow) ямаса тезрек (Fast). Параметрлерин өзгертпеймиз (Slow);

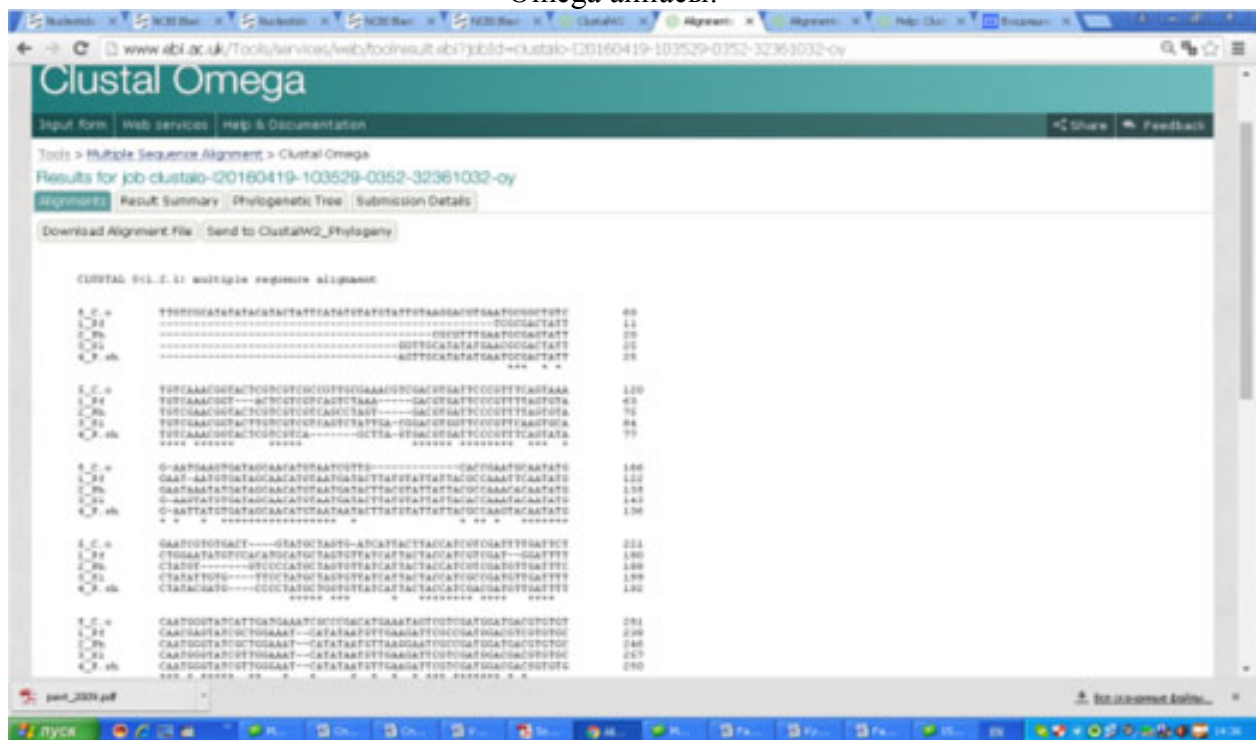
- Step 3 (Адым 3) - қосымша көплек туырлаў вариантларын өзінде сақлайды (Multiple Sequence Alignment Options): киритиў форматын анықлаймиз PHYLIP;

- Step 4 (Адым 4) – нәтийжелерин элеткрон почта арқалы жибериў ушын айна (өзиңиздиң электрон мәнзилиңизди графада EMAIL көрсетиң).

3. Туырлаўды иске асырыў ушын SUBMIT кнопкасын басың. Туырлаў нәтийжелерин бир неше минуттан соң электрон мәнзилге жибериледи (14-суўрет).



13 сурет. Нуклеотидлер избе-излиги анализи ушын туырлау параметрлери Clustal Omega айнасы.



14 сурет. Clustal Omega дәстүри жәрдеминде туырланыу нәтийжеси.

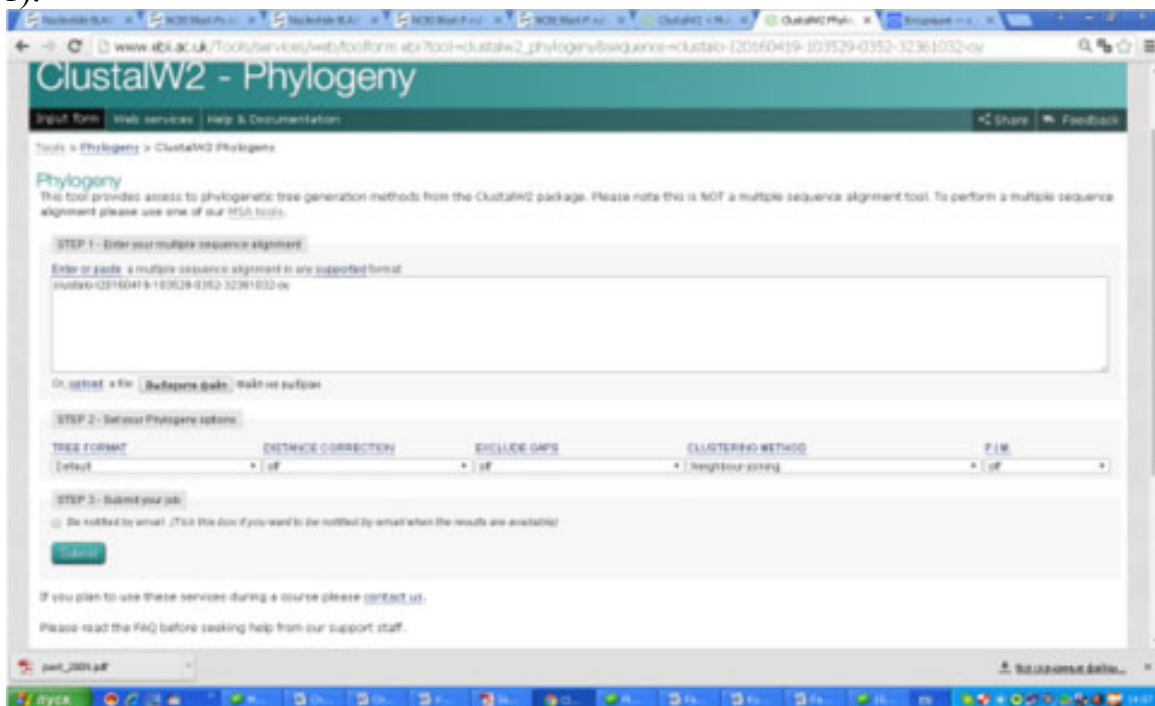
Clustaw2_phylogeny дәстүри жәрдеминде филогенетик теректи дузиу.

Step 5 (Адым 5) – Alignments айнасын оң тәрәпинде филогения дузиу ушын қосымша сақланады. (Send to ClustaW2_Phylogeny)

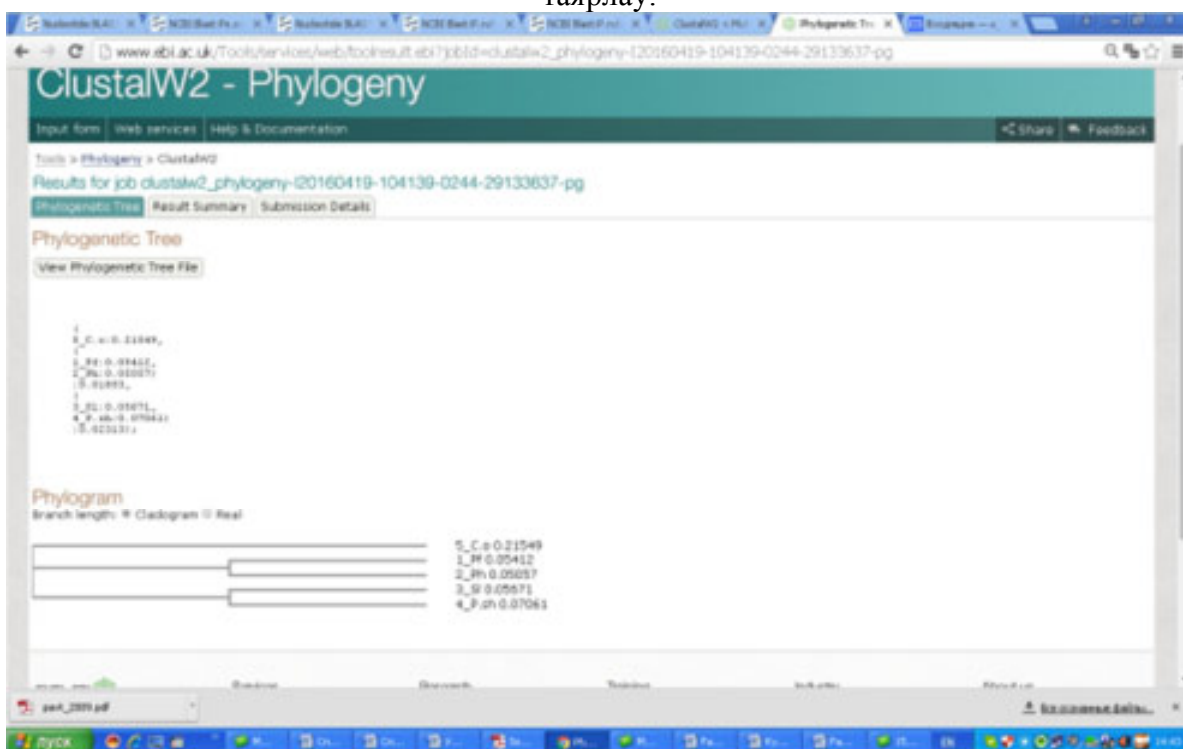
4. Send to ClustaW2_Phylogeny кнопкасын басың, басқа айнада

филогения дузиў ушын избе-излик ашылады (15-суўрет).

5. Басқа аянада Submit кнопкасын басың, бир неше минут даўамында файллар ҳам филограммалар бирден филогенетик терек ашылады (16-суўрет).



15 суўрет. Clustal W – Phylogeny дәстүри менен филогенетик мағлыўматларди таярлаў.



16-суўрет. Clustal W – Phylogeny жәрдеминде филогения дузиў.

5.3. Филогенетикалық теректи дузиўде MEGA-5 программасында көбирек ҳақийқатға уқсаслық усылы (maximal likelihood), максимал экономика (maximal parsimony), шамалап көрилген орташа жуплық (UPGMA) ҳәм жақын қоңсылар (Neighbor-joining)дәстүрлери арқалы тексерий.

MEGA 5 дәстүри жәрдеминде филогенетикалық теректи дузиў.

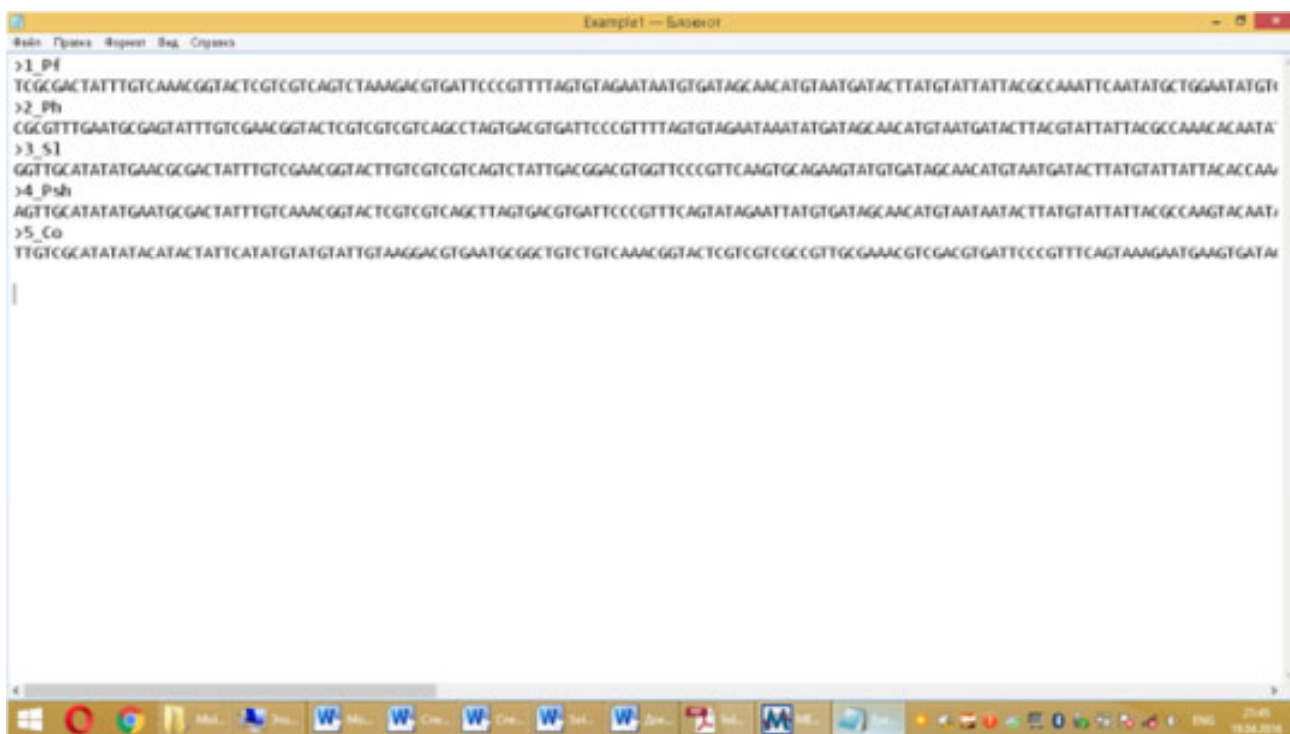
Филогенетикалық теректи дузиў ушын MEGA 5 дәстүринен пайдаланамиз. Дәстүрди ислеп шығарыўшы кәрхана бетинен бийпул көширип алыўымиз мумкин. Дәстүр дузилип атырған теректиң статистик әҳмийетин баҳалайды ҳәм бутстреп-анализ имканиятын бередиди. Максимал тежемлеў методи жәрдеминде минимал сандағы мутацияланған терек таңланады.

1. Текстли файл дуземиз ҳәм оған көп мәртели туырланған 5 избе-излик мағлыўматларын көширемиз (17-суўрет). Файлын атаймиз, мысалы Example1.txt.

2. MEGA 5.2 дәстүрин иске тусиремиз. Дәстүрдиң кириў параметрлери пайда болады (17 –суўрет): Align → Enter → Edit Built Alignment →Geartev a new alignment OK→ DNA→Align Explorer → Edit →Paste→Alignment by ClustarW→ Data →Export Alignment→Mega format → файлға ат беремиз.

3. Максимал тежеў методи менен ислеўши Mega 5 дәстүрин иске тусиремиз.

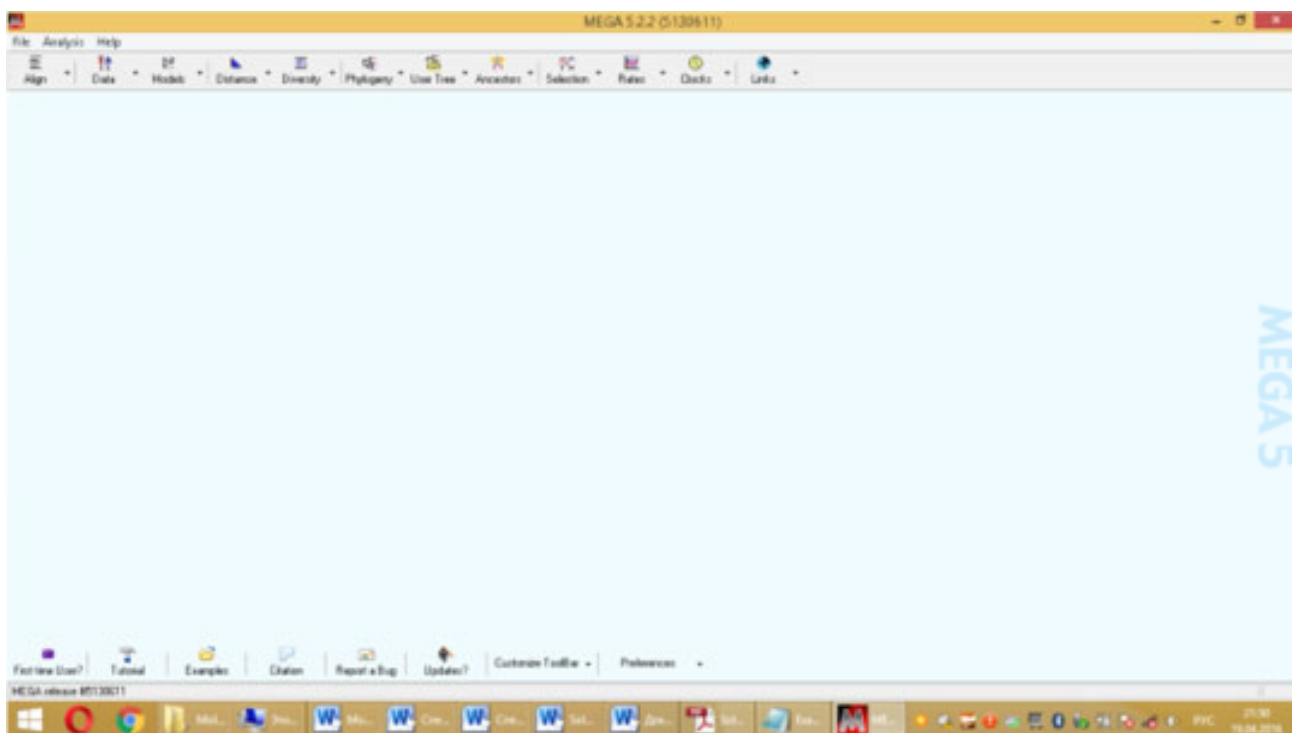
4. Файлға Example2 атын беремиз ҳәм Enter ди басамиз (18 суўрет).



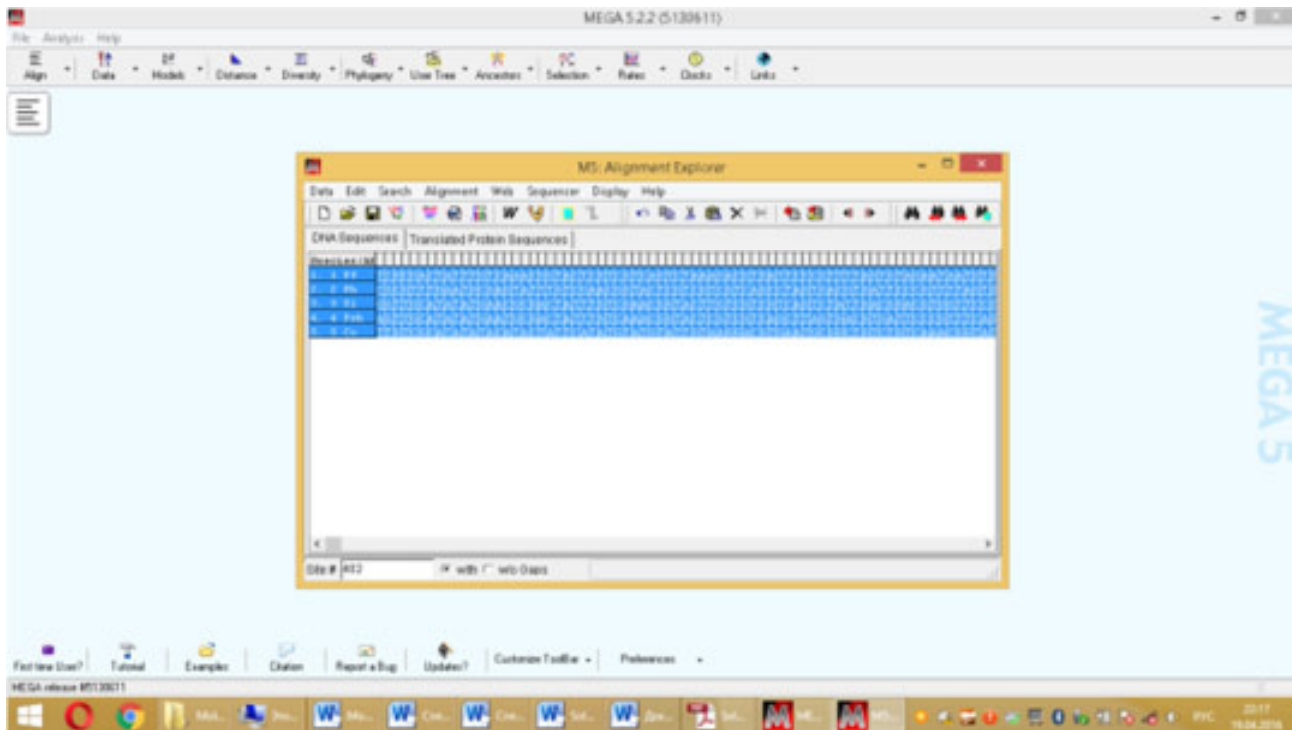
```
Example1 - Notepad
>1_Pf
TCGCGACTATTTGTC AAMCGGTACTCGTCGT CAGCTCTAAGACGTGATCCCGTTTTAGTGTAGATAATGTGATAGCAACATGTAATGATACTTATGTATTATTACGCCAATTC AATATGCTGG AATATGT
>2_Pb
CGCGTTTGAATGCGAGTATTTGT CGAACGGTACTCGTCGT CAGCTCTAAGACGTGATCCCGTTTTAGTGTAGATAAATATGATAGCAACATGTAATGATACTTACGTATTATTACGCCAAMCAATA
>3_S1
GGTTGCATATATGAACGCGACTATTTGT CGAACGGTACTTGT CGT CAGCTCTATTGACGGACGTGGTCCCGTTCAAGTG CAGAAGTATGTGATAGCAACATGTAATGATACTTATGTATTATTACCCAA
>4_Psh
AGTTGCATATATGAATGCGACTATTTGT CGAACGGTACTCGTCGT CAGCTCTATTGACGGACGTGATCCCGTTTCAGTATAGAAATATGTGATAGCAACATGTAATAACTTATGTATTATTACGCCAAGTACAAT
>5_Co
TTGTCGCATATATACATACTATT CATATGTATGATTTGTAAGGACGTGAATGCGGCTGTCTGT CAAACGGTACTCGTCGT CCGCGTTGCGAACGTCGACGTGATCCCGTTTCAGTAAAGAAATGAAGTGATA
```

17-суўрет. Избе-изликлерин көпмәртели тегислеўдеги текст файл (txt).

5.4. Алынған нуклеотидлер избе-излигин халықаралық Генбанк (NCBI) жайластырыу.



18 сүрет. MEGA 5 программасының анализи шығыу параметрлери.



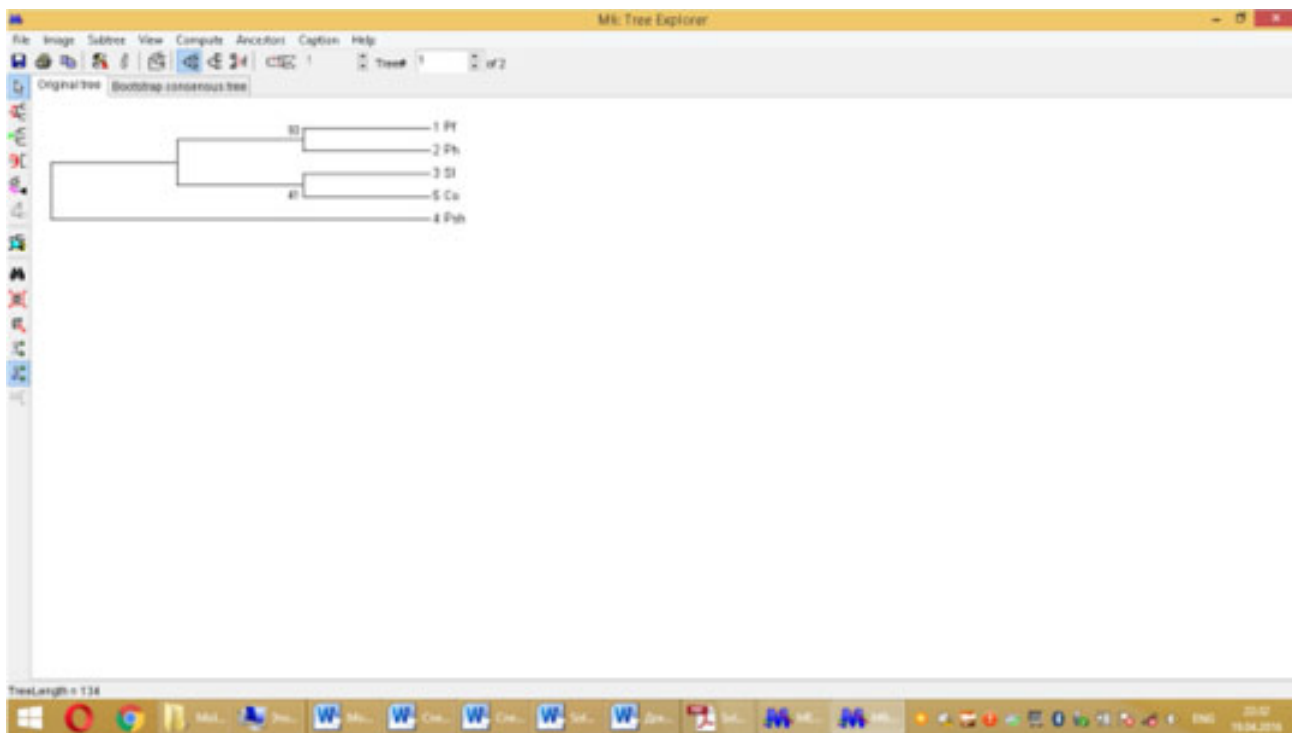
19-сүрет. Мега форматда мағлыұматларды тегислеу хәм өзгертириу.

Нәтийжеде мағлыұматлар mega формат файлинда сақланады хәм оны мысалы Example2 деп атау мумкин.

5. Example2 файли жәрдемінде максимал тежемлеу усылы менен терек

килий ушын Mega 5 программасын иске тусиремиз.

6. Example2 файлин киритемиз хәм Enter басамиз. Анализде шығыу параметрлери пайда болады (20-суўрет).



20 суўрет. Дәстүр анализинен шығыу параметри.

Хәр бир теректиң туйнегинде бутструп-медед бахалары жазылады, мысалы 93 жуўап (реплик). Бул сан тереклерде канша туйнеклер (әўлад) бар екенин характерлейди. Баҳасы 93ге қанша жақын болса, шақаланыудың исенимлиги сонша жоқары болады.

Беккемлеў ушын сораўлар:

1. Филогенетикалық терек деген не?
2. Филогенетикалық терек не ушын керек?
3. Қандай тереклер болады?
4. Терек ушын избе-излик қандай қылып таңлап алынады?
5. Объектлер ортасындағы аралықты қандай тусынсе болады?
6. Тереклерди қайсы on-line программаларда дузиў мумкин?
7. Алынған тереклерди қандай қылып жақсы корсетиў мумкин?

Пайдаланылған әдебият:

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

IV. ӘМЕЛИЙ ШЫНЫҒЫҰЛАР МАТЕРИАЛЛАРЫ

1-әмелий шынығыу:

Омыртқасыз хайуанлар тоқымасында геном ДНКсын стандарт хәм Diatom DNA топламынан пайдаланған халда ажратыу.

Diatom DNA Prep (Россия) реагентлери топламы жәрдемінде ДНК ажратыу методи. Бул топлам ДНКны түрли тәбийий материаллардан ажратыу, сондай-ақ клиник үлгилерден ДНКны тез тазалап алыу имканын береді. Бул усул ФХ – методдан тезлиги (1 дана үлгиге 30 мин. – 1,5 ўақыт сарыпланады), токсик (зәхәрли) реагентлердің ислетилмеуы менен ажралып тұрады. Тәсир қылыу механизими гуанидинтиоционатлы лизис қылыушы реагенттің ислетилеуынетийкарланған болып, ол клетканың лизисине, клетка солубилизациясына, сондай-ақ клетка нуклеазалы денатурацияға алып келеді. Лизис қылыушы (майдалаушы) – реагент қатнасында ДНК NucleosTM – сорбент топламында актив сорылады, соң спиртли эритпеді белок хәм дузлардан аңсат жууылады. Сорбенттен ажратылған ДНКны ПЗР да ислетіу мумкин. Топламның курамы: майдалаушы реагент, дузли буфер Nucleos сорбентиниң суспензиясы, “Экстра Ген” ион алмасыныушы араласпа суспензиясы. Diatom DNA Prep 200 реагентлер топламы жәрдемінде нематодалардың тоқымаларынан ДНКны ажратип алыу методи төмендеги басқишларын өз ишине алады. Бул топлам инструкциясында көрсетилген.

2- әмелий шынығыу:

ПЗР реакциясын өткеріу.

ПЗР қойыу үшін ажратылған ДНК үлгилерге жетерли (0,5 мкл) эппендорф хәм сол эппендофларға мас штативлерден пайдаланылды. Реакция араласпасын таярлауда «Евроген» фирмасында ислеп шығарылған эритпелерден пайдаланылды. Бул реактивлер Суу (тазаланған), 10x буфер, dNTP эритпеси, 50x TAG-полимераза хәмде сол фирмада ислеп шығарылған нематодалар үшін мас праймерлерден пайдаланылды. Сол материаллар тийкарында ПЗР үшін араласпа (Master-mix) таярланады. Араласпа таярлауда 10 мкл хәм 200 мкл пипеткалардан пайдаланылды.

3- әмелий шынығыу:

Агароза гелин таярлау хәм ПЗР өнимлерінде электрофорез өткеріу.

ПЗР махсулотларида ДНКнинг мавжудлигини электрофорез қилиш усули орқали анықлаш мумкин. 1% агароза гель таярлауда 1 г агарозаны 250 мл колбаға салып хәм устине 100 мл ТАЕ (Tris-acetate, edita) араласпасы салып қол менен агароза эригенге шекем араластырылады. Микроволновка печкасы жәрдемінде 2-3 минут қайнатылды хәм араласпаның температурасы 45-50°C жеткенше хана температурасында сууытылады. Соң 3 мкл этидий бромисти араласпасы салынды. Таяр болған араласпаны 10 ямаса 15 дана кетекшеден ибарат гребенкаға салынды хәм гель қатғанша сақланды. Гель

5- әмелий шынығыў: BLAST (NCBI) - ислеў.

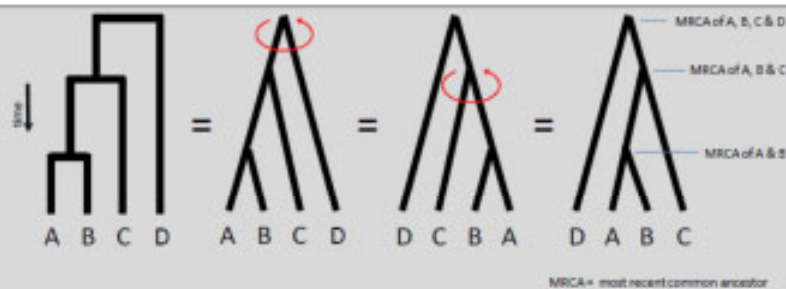
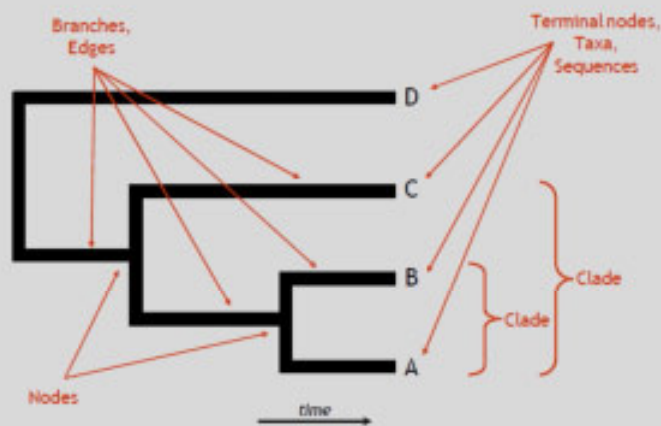
Объект ДНКсының бул тараўы избе-излиги белгили болғаннан, оны мағлыўматлар базасы (NCBI) менен салыстырылады, қайсы объекттиң бул избе-излиги басқа барлық түрлер салыстырылады хәм үйренилип атырған түр тез анықланады. Егерде избе-излик базадағы қандайда бир туўры келмесе, демек бул жаңа түр, яғный белгисиз түр табылғанынан дерек береді. Хайўанлардиң сондай тараўын үйрениў мәксетинде митохондриял ямаса ядро гениң фрагментлери таңланды.



6- әмелий шынығыў: Филогенетик терек дузиў (MEGA-5).

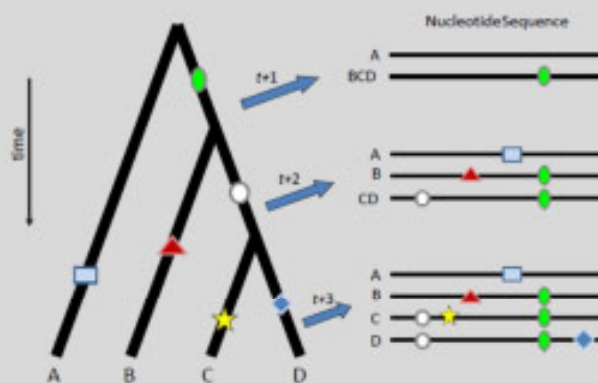
Филогенетик анализ - BLAST ямаса MSA ушын анық болмаған избе-изликлер ортасындағы мунәсебетлерди анық көрсете алатуғын шақаланған диаграммаларди жаратады алады. Филогенетик терек, эволюцияның өзара байланысларын хәм дивергенция модулына молжелленген эволюцион хәм салыстырмалы изертлеўлерди ушын пайдалы хәмде молекуляр хәм биохимиялық изертлеўлерде ген ямаса белок функциялары туўрысында гипотезаның генерациясында әхмийетли есапланады. Филогения үлкен тараў есапланып, өз-өзинен путкил бир курсди ийелейди. Мәксет тек филогенетик терек дузиўден тысқары, бәлким “қырқыў хәм койыў” принциплерин тусиниў хәм билиў керек болады.

В. 1 Филогенетическое дерево



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

В. 2. Рост филогенетического дерева



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

V. КЕЙСЛАР БАНКИ

КЕЙС-1

Биокөптүрлилик нелигин тусиндириң?

Биокөптүрлилик бул – “биологиялық көптүрлилик” атамасының қысқартпа түри болып, жер шарындағы тиришиликтің көптүрлилигин аңлатады. Айрым жағдайларда буның ушын “тиришилик системасы” атамасы да қолланылады. Бирақ биокөптүрлилик жүдә курамалы дузилме болып, уш курамлы бөлимден дузилген:

1. Генлер
2. Биологиялық түрлер
3. Экосистема

Ген бул – организм белгилерин өзінде сақлаған хәм клетка ядросында жайласқан ДНК нуклеотидлер избе-излиги тийкарында жазылған мағлыұматлар жийнағы есапланады. Генлер көздің кок ямаса қара болыұын, аяқлардың ири ямаса киши болыұын басқарады. Генлердің индивидуал өзгеріуи хәр биримизди уникал болыұымызды тәминлейди.

Биологиялық түрлер. Түр бул – мәлим аймақта тарқалған, айрым белги қәсийетлери менен бөлекленген бирақ шағылысып нәсил бере алатуғын индивидлер жийындысы есапланады. Бул хаққында биз ойламаұымыз мумкин, бирақ хәр куни бизге хәр түрли түрлерге душ келемиз. Түрлер көптүрлилиги биокөптүрлилигиниң эң әжайип формаларынан бири есапланады. Бизлердің планетамиз миллион түрлерди өзінде жийнаған болып, ели олардың көпшилиги үйренилмеген. Бугинги кунде 375 000 дан артық гулли өсимликлер хәм 15 000 түр сутәмизыұши хәм қусларғана бизге белгили.

Экосистема бул – белгили бир табиий шараятында тиришилик етиұши хәм тири хәм тири емес факторлар жийнағы есапланады. Экологлар түрлер хәр түрлилигин табиий шараятларда үйренеди. Жер шарында жүдә көп хәм хәр түрли экосистемалар бар. Олардан айрымлары бизге белгили, мысалы, тоғай, таұ ямаса теңиз сияқлылар.

КЕЙС-2

Қашан, қайжерде хәм не ушын биокөптүрлилик туұрысындағы Конвенция қабыл қылынған?

Биологиялық көптүрлилик туұрысындағы Конвенция “Жер планетасы” дәрежесинде 1992 жылда Рио-де-Жанейрода (Бразилия) имзаланған болып, 1993 жыл 29 декабрда күшке кирген. Бул биринши биокөптүрлиликте сақлаұға қаратылған глобал келисиұ болып, генетик ресурсларды сақлаұға жүдә үлкен жәрдем берген.

Биологиялық көптүрлиликте сақлаұ Конвенциясы секретарияты Монреалда (Канада) жайласқвн болып, Конвенция мәқсетлерин әмелге асырыұға молжелленген.

КЕЙС-3

Биокөптүрликти анықлауда қандай атамалар ислетиледи?

Биологиялық көптүрлилик, Биологиялық ресурслар, Биотехнология, генетик ресурслар келип шыққан мәмлекет, қолға уйретилген ямаса мәдениелестирилген түрлер, экосистема, ex-situ сақлау, Генетик материал, Генетик ресурслар, жасау жери, in-situ шараятлары, in-situ сақлау, қорғау астындағы регион.

КЕЙС-4

Өзбекистанда биологиялық көптүрлилик ҳаққындағы Конвенция қашан хәм ким тәрeпинен имзаланған?

Өз жақсы рауажланыуы ушын биологиялық көптүрликти сақлаудың әхмийетлигин тән алған Өзбекистан 1995 жылда биологиялық көптүрлилик ҳаққындағы Халықаралық конвенцияға қосылды. Биологиялық көптүрликти сақлаудың Миллий стратегиясы хәм режеси Ұәзирлер Мекемесиниң Баслығы Ислом Абдуғаниевич Каримов тәрeпинен тәсдиқланды (1 апрел 1998 ж. Парман № 139).

КЕЙС-5

Геномика хәм геносистематика

Геномика өзиниң тийкарында геносистематика деп аталады. Булардиң паркы организмлер геномин үйрениудеги жандасыуында өз көринисин табады. Хәзирги уақытта геносистематика тийкарынан ДНК бөлеклериниң нуклеотид избе-излигин (мысалы, генлерди) үйренеди хәм сол тийкарында организмлердиң туысқанлығы ҳаққында жуумақ шығарылады. Геномика болса ядро хәм клетка органеллаларын путкил геномларын изертлейди хәм оларды салыстырады.

Қайсы маркер организмлер эволюциясын үйрениу ушын әхмийетли қурал есапланады?

1980 жылларда эволюцияның әхмийетли молекуляр маркери – рибосомал РНК усыныс қыланды. Хәзирги уақытта барлық ислетип атырған маркерлер ишинде (гемоглобин, цитохром с хәм басқа.) тап рРНК филогенетик изертлеулердиң ғалаба қуралы есапланады. Буның бир қанша себеплери бар:

1. Рибосомал РНК жер жүзиндеги тиришиликтиң барлық клеткалық формаларда ушырайды хәм олардың барлығында бир түр функцияларды бежереди.

2. Рибосомал РНК етарлича консервативдир.

3. Молекуласында өзгериушеңлиги түрлише болған участкалардың бар болғанлығы ушын рРНК түрли таксономик дәрежеде эволюцион тууысқанлықларды анықлау ушын ислетилиуи мүмкин.

4. Генлердиң PCR амплификациясы технологиясының рауажланыуы хәм олардың нуклеотид избе-излигин тезде анықлаудың имканияты түрли организмларде рНК ның дүзилиси ҳаққында үлкен мағлыұматлар базасын

алыу имканын береді.

5. рРНК молекуласы екемши структураға ийе болып, ол аеуір жақсы үйренілген. Екемши структура прокариотларының 5S хәм 16S молекулалары ушын хәм эукариотлардың 5.8S и 18S ушын жақсы үйренілген.

КЕЙС-6

Молекуляр биология хәм оның тийкарғы ашылыулары ?

Молекуляр биология – нәсиллик ахборатты сақлау, көбейтириу, узайтыу хәм әмелге асыруу механизмлери, биополимерлер – нуклеин кислоталар хәм белоклардың структурасы хәм функциясы хаққындағы пән есапланады.

Тийкарғы ашылыулар.

1944й.	<i>ДНК ның генетик ролин сыпатлау.</i> Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод, Маклин Мак-Карти
1953й.	<i>ДНК структурасының анықланыуы.</i> Джеймс Уотсон, Френсис Крик
1961й.	<i>Ферментлер синтезиниң генетик регуляциясының ойлап табылыуы.</i> Андре Львов, Франсуа Жакоб, Жак Моно
1962й.	<i>Генетик Коддың ашылыуы.</i> Маршалл Нирнберг, Генрих Маттеи, Северо Очоа
1967й.	<i>Биологиялық актив ДНК ны in vitro синтези.</i> Артүр Корнберг (молекуляр биологиянинг норасмий лидери)
	<i>Генниң химиялық синтези.</i> Гобинд Корана
1970й.	<i>Терис транскриптаза ферментиниң жаратылыуын хәм терис транскрипция хәдийсеси.</i> Говард Темин, Дэвид Балтимор, Ренато Дульбеко
1974й.	<i>Рестриктазаның ашылыуы.</i> Гамильтон Смит, Даниэль Натанс, Вернер Арбер
1978г.	<i>сплайсиңниң жаратылыуы.</i> Филипп Шарп
1982г.	<i>Автосплайсиңниң жаратылыуы.</i> Томас Чек

КЕЙС-7

Рибосома структурасы.

Рибосомалар – мембраналары болмаған эң майда клетка органеллалары болыуына қарамастан олар құрамалы дузилеске ийе. E.coli клеткасында шама менен 10³-5х10³ рибосома бар. Прокариотик рибосомалардың сизіқлы өлшемлери 210х290 Å. Эукариотларда болса 220 х 320 Å.

Рибосомалардың 4 классы бар:

1. Прокариотик 70S
2. Эукариотик 80S
3. Митохондриялардың рибосомалары (55S – хайуанларда, 75S-замаррықларда).
4. Рибосомалардың хромосомалары (70S – жоқары дәрежелі өсімликлерде).

Тусиник: S – седиментация коэффиценти ямаса Сведберг константасы. Түрли молекулалар ямаса олардин бөлөклерин центрифугалаў ўақытында молекулалардин шөгиў тезлиги.

VI. ӨЗ БЕТИНШЕ ТӘЛИМ ТЕМАЛАРЫ

Өз бетинше жумысты дузиўдин түри хэм мазмуны.

Тыңлаўшы өз бетинше жумысты тұрақлы модул қәсийетлерин есапқа алған халда төмендеги түрлерден пайдаланып таярлаўы усыныс етиледі:

- нормалық хўжетлерден, оқыў хэм илимий әдебиятлардан пайдаланыў тийкарында модул темаларын үйрениў;

- тарқатпа материаллар бойынша лекциялар бөлимин өзлестириў;

- автоматластырылған үйретиўши хэм бақлаўшы дәстүрлер менен ислеў;

- арнаўлы әдебиятлар бойынша модул бөлимлери ямаса темалары устнде ислеў;

-тыңлаўшының кәсиплик искерлиги менен байланыслы болған модул бөлимлери хэм темаларын терең үйрениў.

Өз бетинше тәлим темалары:

1. Геномика хэм геносистематика.
2. Түрлер ишиндеги генетик полиморфизм.
3. Омыртқасызлар полиморфизми гипотезасы.
4. «ДНК-штрихкод» усылы хэм биокөптүрликти анықлаўдағы роли.
5. Омыртқасызлар молекуляр систематикасы хэм таксономия тараўындағы хәзирги изертлеўлер.
6. ПЗР усылы принциплери.
7. Электрофорез усылы принциплери.
8. BLAST ислеў принциплери.
9. Филогенетик терек хэм оның түрлери.
10. Өзбекистандағы молекуляр зоология бағдарындағы жумыслар.

VII. ГЛОССАРИЙ

Термин	Ўзбек тилинде	Инглиз тилинде
Ген банки (геном библиотекасы)	ДНК клонланыўши молекуласының топламы болып , геном хәр бир изби-излигиниң биреўден кем болмаған үлгисин сақлайды.	is a collection of cloned DNA molecules comprising at least one instance of each genome sequence.
Биологиялық систематика	тири организмлер классификациясы принциплерин ислеп шығыўшы пән болып бул принциплерди системаны курыў ушын практикалық үлги сыпатында ислетеди. Классификация дегенде барлық бар болған хәм қырылып кетген организмлерди системаға жайластырыў хәм тәрийиплеў тусиниледи	scientific discipline, which includes the principles of the development of the problem of classifying living organisms and the practical application of these principles to the construction of the system. Under the classification is defined here as the description and location of the system all existing and extinct organisms.
Вектор	(генетикада) – нуклеин кислотасы молекуласы, кобинесе ДНК болып, ол генетик инженерияда генетик материалды басқа клеткаға өткерийў ушын пайдаланылады	nucleic acid molecule, often DNA used in genetic engineering to transfer the genetic material of another cell.
Ишки транскрипциял аныўшы спейсер (қысқ. ITS).	Рибосома ДНК транскрипцион бирликлериниң бөлек компонентлерин кодламайтуғын участкалары болып есапланады. Бул участкалар рРНК генлерине салыстырғанда жоқары полиморфизм менен ажралып тұрады хәм соның ушын сол генлераралық спейсерлер сияқлы рибосома ДНК локусларының генетик маркерлери сыпатында	(Abbr. ITS). Noncoding regions separating the individual components of the ribosomal DNA transcription unit. These regions are characterized by a high polymorphism compared to rRNA genes, and therefore, as intergenic spacers are used as genetic markers of ribosomal DNA loci.

	ислетиледи.	
Геном	<p>тұрақлы түр организмнің клетка хромосомаларын гаплоид топламда жайласқан нәсиллик материал жийнағы есапланады.</p>	<p>a set of hereditary material contained in a haploid set of chromosomes of cells of this type of organisms.</p> <p>Treasure (from the Greek - "branch", "branch";. English clade.) - A group of organisms that are descended from a single common ancestor, and all descendants of that ancestor. The term is used in phylogenetics. Any treasure is regarded as a monophyletic group of organisms and can be represented by a cladogram (chart occurring organisms in the form of a tree, "pedigree").</p>
Делеция	<p>(латинша deletio – жоқ қылыу) - хромасома қайта қурылыуы болып, бунда хромосома участкасының жоқ болыуы тусиниледи.</p> <p>Делеция хромосома узилыуының себебинен який тегис емес кроссинговер нәтийжеси болыуы мумкин.</p>	<p>(From the Latin deletio - Destruction) - chromosomal rearrangements, in which there is loss of chromosome region. Deletion may be due to rupture of the chromosomes or the result of unequal crossing-over.</p>
Кладистика	<p>(кәдимги юноншада kládos - тармақ) – филогенетик систематиканың бағдары есапланады. Кладистик әмелияттың өзине тән тәрепи кладистик анализ (таксонлар ортасындағы туысқанлық байланысларын реконструкция қылыуда аргументацияның қатаң схемасы), монофилияны тусыныу хәм жойбарластырылған филогения менен иерархик классификация ортасындағы бир қыйлы ұқсаслықты</p>	<p>(From the ancient Greek (kládos) - Branch) - the direction of phylogenetic systematics. Features cladistic practice to use so-called cladistic analysis (rigorous argumentation schemes in the reconstruction of the familial relationship between taxa), the strict sense of monophyly and demand one-to-one correspondence between the reconstructed phylogeny and hierarchical classification.</p>

	талап қылыу есапланады.	
Кладистик анализ	хәзирги ўақытта қабыл қылынған биологиялық классификацияның тийкары болып, тири организмлер ортасындағы мунәсебетлерди есапқа алады.	the basis for most currently accepted biological classifications built taking into account the familial relationship between living organisms.
Кладограмма	(инглизше cladogram) – заманагой биологиялық систематикадағы тийкарғы тусиник – терек сияклы граф болып, таксонлар ортасындағы сингиллик мунәсебетлерин корсетеди.	(English cladogram.) - One of the basic concepts in modern biological systematics - tree graph showing the relationship of nursing relationship between taxa.
ДНК ны клонлау	(генлерди клонлау) – берилген избе-изликтеги ДНК ны ажратиу процесси болып, in vitro да оның коплеген үлгилерин алыу ушын ислетиледи. ДНК ны клонлау кобинесе генлерди сақлаушы бөлеклерди амплификациялау ушын қолланылады.	the process of allocating a given DNA sequence and production of many copies of it in vitro. DNA Cloning often used to amplify fragments containing the genes, and any other sequences - for example, promoters, coding sequences, and chemically synthesized oligonucleotides of random DNA segments.
Конспецификлик	биологиялық тарау тусиниги есапланады. Еки ямаса оннан коп организмлер, популяциялар ямаса таксонлар бир биологиялық түрге тийисли болса олар конспецифик есапланады.	this concept in the field of biology. Two or more individual organisms, populations or taxa are conspecific if they belong to the same biological species.
Лигирлеу	молекуляр биологияда ислетилетуғын атама болып, нуклеин кислота екиге молекуласының ДНК-лигаза ферменти жәрдемінде биригиуин аңлатады	a term used in molecular biology, which means the connection of two nucleic acid molecules with a DNA ligase enzyme.
Молекуляр филогенетика	полимер макромолекулалар – ДНК, РНК хәм белоклардың структурасын үйренуу тийкарында тири организмлер ортасындағы	way to establish kinship between living organisms based on the study of the structure of polymer macromolecules - DNA,

	туысқанлық байланыстарын жоқ қылыўшы усыл. Молекуляр-филогенетик анализдиң нәтийжеси тири организмлер филогенетик шежересин дузиў есапланады.	RNA and proteins. The result of a molecular phylogenetic analysis is the construction of a phylogenetic tree of living organisms.
Парафилия	(қәдимги юнонша –қасында хәм шаңарақлық әўлад) – монофилия тусинигине филогенетик систематика шеңберинде жәнede кушлирек қатаңлық бериў нәтийжесинде пайда болған тусиник есапланады. Парафилетик топарлар деп шамалап улыўмалық әўладдиң әўладларын тек бир бөлимин өз ишине алыўшы топарларға айтылады.	(Ancient Greek and -series - Family clan.) - A concept which has arisen as a result of giving greater rigor the concept of monophyly within phylogenetic systematics. Paraphyletic groups are called groups, including only a part of the descendants of the hypothetical common ancestor (more formal definition reads: paraphyletic group is obtained from a monophyletic by withdrawing from the last one terminal group).
Полимеразалы шинжыр реакциясы (ПЦР)	молекуляр биологияның үйреней методиди болып, биологиялық материалда (үлгиде) нуклеин кислота (ДНК) фрагментлерин сезилерли дәрежеде улкейтиўге имкан бериўши усыл есапланады.	experimental method in molecular biology, which allows to achieve a significant increase in low concentrations of specific nucleic acid fragments (DNA) in the biological material (sample).
Рестриксион фрагментлер узынлығының полиморфизми (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)	бул геном ДНК сын рестриксион эндонуклеазасы жәрдеминде кесип, пайда болған фрагментлерин (рестриктлерин) гель-электрофорез (ДНК электрофорез) жолы менен үйренейши усыл есапланады	(RFLP, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) - is a method of investigation of genomic DNA by cutting the DNA with restriction pomoschyendonukleaz and further analysis of the resulting fragments (restriction fragments) size by gel electrophoresis (electrophoresis of DNA).
Полифилия	(қәдимги юноншада коп	(Ancient Greek -. And many,

	санлы хэм –шаңарақ аўлад) – таксонниң хәр түрли аўладлардан келип шығыўы есапланады. Биологиялық систематикада полифилетик деп оны дузиўши кенже топарларды бул топарға кирмейтуғын басқа топарлар менен салыстырмалы жақын туўысқанлығы сыпатланған топарға айтылады. Оны әдетте конвергент ямаса параллел ҳалда пайда болған устиртин уқсаслық тийкарында ажратады	and - family clan) - the origin of taxa from different ancestors. Polyphyletic in biological taxonomy is a group for which is not contested a close relationship of its constituent sub-groups with other groups, are not included in this. Her selection is usually based on a superficial similarity that arose convergent or parallel.
Популяция	Бул конспецифик индивидлер топары болып, ол демографик, генетик ямаса мэкән жағынан басқа индивидлер топарынан ажралып тұрады.	a group of conspecific individuals that demographically, genetically or spatially separated from other groups of individuals.
Праймер	бул ДНК молекуласындағы қысқа РНК- сақлаўшы фрагмент болып, репликацияны инициациясы ушын әҳмийетли есапланады.	it is a short RNA - containing fragment in the DNA molecule required for replication initiation.
Рестрикция	арнаўлы фермент (рестриктаза) тәрәпинен әмелге асырылыўшы ДНК шынжырының бөлиниўи есапланады.	section of the DNA chain, implemented a special enzyme (restriction enzyme).
Рибосомал ДНК	рибосомал РНК ны кодлаўшы локус. Әдетте бул үлкен хэм курамалы дузилиске ийе локус болып, бир-биринен генлер аралық спейсерлер менен ажралған үлкен муғдардағы такрарланыўшы бирликлерден ибарат. Такрарланыўшы бирлик хәр бир индивидуал хэм рибосомал РНК лардиң биреўден үлгисин сақлайды.	The locus encoding ribosomal RNA. Usually it is large and difficult to organize locus, consisting of a large number of repeating units, separated by intergenic spacer. Repeat unit comprises a single copy of each individual gene of ribosomal RNA, which is located between the sequences of internal transcribed spacers.

Таксон	(латыншадан taxa; қәдимги юноншадан “тәртип”, “дузилме”) – улыўма тәнсе хәм белгилер тийкарында бирлесийши дискрет объектлерден дузилген классификациядағы топар есапланады.	(Latin taxon, plural taxa; from the ancient Greek "order, arrangement, organization."...) - A group classification, consisting of discrete objects, united on the basis of common properties and attributes.
Таксономия	(қәдимги юноншадан дизим, тәртип хәм нызам) – классификациялаў хәм систематизациялаўдин принциплери хәм әмелияты ҳаққындағы тәлиймат.	(From the ancient Greek - BUD, order, and -. The law) - the teaching of the principles and practice of classification and systematization.
Филогения	биологияның бир бөлими болып, организмлерди бир-биринен келип шығыў машқалаларын үйренеди.	part of biology, considering the origin of organisms from one another.
ДНК электрофорез	аналитик усыл болып, ДНК фрагментлериниң өлшеми (узынлығы) хәм түрине қарап ажратыўда ислетиледи. Үлгилерге берилген электр майданының куши ДНК фрагментлерин гел бойлап көшиўге мәжбур қылады. ДНК молекуласының шекер-фосфат тийкары терис зарядланғаны ушын ДНК шинжырлары терис зарядланған катоддан оң зарядланған анодға қарай хәрекетленеди. Салыстырмалы узынлаў молекулалар әстенрек көшеди, неге дегенде олар гелде усланып қалады. Келте молекулалар болса тезрек хәрекетленеди.	is an analytical method used to separate DNA fragments by size (length) and shape (in case of DNA secondary structure forms, such as pins). The forces of the electric field applied to the samples, DNA fragments are forced to migrate through the gel. Sugar-phosphate backbone of DNA is negatively charged and therefore the DNA strand moving from the cathode, negatively charged, the positive anode. Longer molecules migrate more slowly as delayed gel, shorter molecules move faster.

VIII. ЭДЕБИЯТЛАР ДИЗИМИ

1. Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation // Trends Ecol. Evol. -2007. - V. 22. -No.3. -P. 148-155.
2. Bisby F. A. The quiet revolution: biodiversity informatics and the Internet// Science. -2000. - № 289. -P.2309-2312.
3. De Ley P., Blaxter M. Systematic position and phylogeny // The biology of nematodes / Ed. by D.L.Lee. L.; N.Y.: Taylor and Francis, 2002. P. 1-30.
4. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
5. **Joan D. Ferraris, Stephen R. Palumbi Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols 1st Edition London: Imperial College Press, 2014, English**
6. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes.// Proc. R. Soc. Lond. . - 2003. -V. 270. -P. 313-321.
7. Hebert P. D. N., Gregory T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy// Syst. Biol. - 2005. -V. 54. -P. 852-859.
8. Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004a. - V.101. -P. 14812-14817.
9. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemplak T. S., and Francis C. M. Identification of birds through DNA barcodes// PLoS Biology. - 2004b. -V.2. - P.1657-1663.
10. Kuchboev A.E., Krucken J., Ruziev B.H., von Samson-Himmelstjerna G. Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan// Parasitology Research 2015, 114 (4). - P 1355-1364.
11. Leffler E. M., Bullaughey K., Matute D., Meyer W. K., Segurel L, Venkat A., Andolfatto P., Przeworski. Revisiting an Old Riddle: What Determines Genetic Diversity Levels within Species? // Plos. Biology. -2012. -V. 10. - Issue. 9. -P. 1-13.
12. McPherson M.J., Moller S.G. PCR. The Basics 2nd edition: Taylor & Francis Group, 2006. - 305 p.
13. Nygren A., Norlinder E., Panova , M., Pleijel F. Colour polymorphism in the polychaete *Harmothoe imbricate* (Linnaeus,1767) // Marine Biology Research. - 2011. -V. 7. -P. 54-62.
14. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

15. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P. A plea for DNA taxonomy// Trends Ecol. Evol. - 2003. -V. 18. -P. 70-74.
16. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P. DNA points the way ahead in taxonomy—in assessing new approaches, it's time for DNA's unique contribution to take a central role// Nature. - 2002. -V. 418. -P. 479.
17. Watts, D. Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer / D. Watts, J.R. MacBeath // Methods Mol. Biol. - 2001. - V.167. - P.153-170.2001. - 1626 p.
18. Woodruff D.S. Declines of biomes and biotas and the future of evolution// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2001. -V. 93. -P 5471-5476.
19. Abramatorov M.B., Amirov O.O., Kuchboev A.E., Khalilov I.M., Abdurakhmanov I.Y. Morphological and Molecular characterization of species *Haemonchus contortus* and *H. placei* (Nematoda: Trichostrongylidae) from Uzbekistan by sequences of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA// Sci Parasitol., Cluj-Napoca, Romania, 2013.14 (4): 1-7.
20. Банникова А.А. Молекулярная филогенетика и современная систематика млекопитающих// Журнал общей биологии. - 2004. - Т.65. - N4. - С.278-305.
21. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш ушын хайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. - №4. - 24-26 б.

Интернет сайтлар:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://www.megasoftware.net/>
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
<http://www.barcodeoflife.org/>