

**O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY TA'LIM, FAN VA
INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI**

**Xalilov Ilxom Mamatqulovich
Sherqulova Jamila Payanovna
Qobilov Fazliddin Bozorovich
Xalilova Feruza Mamatqulovna**

MOLEKULYAR MIKROBIOLOGIYA

O'quv qo'llanma

**“Durdona” nashriyoti
Buxoro – 2024**

UO'K 577.2:573.6(075.8)

28.4ya73

X 21

Xalilov, I.M.

Molekulyar mikrobiologiya [Matn] : o'quv qo'llanma / I.M. Xalilov, J.P.

Sherqulova, F.B. Qobilov, F.M. Xalilova; muharrir A. Qalandarov; tuzuvchi

I.M. Xalilov; tarjimon I.M. Xalilov. - Sadriddin Salim Buxoriy, 2024. – 272 b.

KBK 28.4ya73

O'quv qo'llanmada biokimyoviy, molekulyar biologik, genetik muhandislik va mikrobiologiyadagi ekologik tadqiqotlarda mikroorganizmlarning genetik axborot tashuvchilari – eksperimental namunalardan ajratilgan DNK va RNK molekulalari bilan ishlashning asosiy zamonaviy texnika va usullari jamlangan. Birinchi marta mikroorganizmlarning aralash kulturalari bilan ishlashning molekulyar usullari va mikroorganizmlarini tahlil qilish usullari bo'yicha umumlashtirilgan materiallar keng taqdim etilgan.

O'quv qo'llanma molekulyar biologiya va gen injeneriyasi metodlari hamda ularni mikroorganizmlar fiziologiyasi va ekologiyasini o'rganishda qo'llanilishiga qiziquvchi biologiya yo'nalishi talabalari, magistrantlar, o'qituvchi va tadqiqotchilar uchun mo'ljallangan.

Kalit so'zlar: molekulyar mikrobiologiya, molekulyar biologik usullar, mikroorganizmlar genetikasi.

Mualliflar:

Xalilov Ilxom Mamatqulovich, O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi
Mikrobiologiya institutining katta ilmiy xodim, biologiya fanlari nomzodi

Sherqulova Jamila Payanovna, Qarshi Davlat Universitetining
“Mikrobiologiya va biotexnologiya” kafedrasini mudiri, biologiya fanlari falsafa
doktori, dotsent

Qobilov Fazliddin Bozorovich, O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi
Mikrobiologiya institutining katta ilmiy xodim, biologiya fanlari nomzodi

Xalilova Feruza Mamatqulovna, Buxoro Davlat Universitetining katta
o'qituvchisi

Taqrizchilar:

Shakirov Z.S., O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya
institutining biologiya fanlari doktori

**O'quv qo'llanma Qarshi davlat universiteti rektorining 2023-yil
19-dekabrda 284 I-sonli buyrug'iga asosan nashr etishga ruxsat berilgan.
Ro'yxatga olish raqami 284 I-10.**

ISBN 978-9910-694-39-4

KIRISH

Uzoq vaqt davomida turli xil tabiiy namunalardagi mikroorganizmlarning murakkab tuzilmalarini aniqlashning imkoni bo'lmadi, bu mikroorganizmlarning ekologlarining ishini juda qiyinlashtirdi. Mikroorganizmlarni ajratib olishning klassik usullari, ma'lum oziq-ovqat muhitida yetishtirilishi mumkin bo'lgan boyitish va sof kulturalarni olishga asoslangan bo'lib, tabiiy namunalardagi ko'p miqdordagi mikroorganizmlarni ajratib olish va aniqlash imkonini beradi. Shunga qaramay, hozirgi vaqtda Yerdan mavjud bo'lgan prokariotlarning umumiy xilma-xilligining 0,1% dan kamrog'ini shu tarzda yetishtirish mumkinligi umumiy qabul qilingan.

DURDONA

1-MAVZU. MIKROORGANIZMLARDA DNK IRSIY AXBOROT TASHUVCHISI

Reja:

1. DNK va RNK tuzilishi va farqi, nuklein kislotalarining strukturaviy tuzilishi
2. Hujayralarda irsiy axborot amalga oshirilishi
3. Replikatsiya
4. Transkripsiya
5. Oqsillar biosintezi

Tayanch soʻz va iboralar: DNK va RNK tuzilishi va farqi, nuklein kislotalarining strukturaviy tuzilishi, gen strukturasi, hujayralarda irsiy axborot amalga oshirilishi

Nuklein kislotalar yangi bir biologik modda sifatida 1868 yili shveytsariyalik biolog olim Fridrix Misher tomonidan kashf etilgan edi. U yiringni tashkil qiladigan qon elementlari — leykotsitlar (“yiring hujayralari”) yadrosidan fosforgia boy noma’lum birikmani ajratib olib, unga “nuklein” nomini beradi.

Keyinroq bu birikma kislota xususiyatiga ega boʻlganidan “nuklein kislota” deb ataladi. Ammo uzoq yillar davomida biologlar bu birikmalarga e’tiborini qaratmaydi. Natijada ularning hujayradagi ahamiyati oʻrganilmay qoldi va asosan kimyoviy obyekt sifatida tadqiq qilib kelindi. 1891 yilda nemis olimi Kossel bu moddalarni gidroliz qilib, ular uch xil komponentdan: purin va pirimidinlar qatoriga kiradigan geterotsiklik azotli asoslar, uglevod va fosfat kislotadan tashkil boʻlganligini aniqlashdi. Shuningdek, tajribalar nuklein kislotalarning ikki tipi mavjud ekanligini koʻrsatdi. Ular keyinroq tarkibiga kiradigan uglevod komponenti — pentoza yoki dezoksiriboza boʻlishiga qarab **ribonuklein kislota(RNK)** va **dezoksiribonuklein-kislota (DNK)** nomini oldilar. Undan avvalroq esa nuklein kislotalarning birinchi tipi olingan manbaga qarab achitqi yoki sitoplazma nuklein kislota, ikkinchi tipi boʻqoq bezi (timus)dan ajratib olingani uchun timonuklein kislota yoki yadro nuklein kislota deb atalar edi. Nuklein kislotalarni gidroliz qilib, ularni polimer birikma va monomerlari azot asosi, uglevod va fosfat kislotadan tashkil topgan

nukleotidlar RNK — ribozopolinukleotid va DNK — dezoksiribozopolinukleotid ekanligi tasdiqlandi.

Ammo 1950 yilgacha nuklein kislota molekulasini to'rt xil nukleotidlarning tartibli takrorlanishi — tetranukleotidlardan iborat degan fikr qabul qilingan edi. Bu tushunchaning noto'g'ri ekanligini turli manbalardan ajratilib olingan DNK molekulalarining nukleotid tarkibini sinchiklab o'rganib, ular orasidagi katta farqni amerika olimi Chargaff aniqladi. Nuklein kislotalarning aniq tuzilishi 50- yillardan keyin, ularning biologik funksiyasi, biosintezi va boshqa xususiyatlarini tadqiq etish jarayonidagina to'la tushunila boshlandi, hozirgi kunda ham bu ishlar davom etadi.

50- yillarda oqsil sintezining ribosomalarda bajarilishi tasdiqlandi. Lekin informatsiyani DNK dan ribosomalarga ko'chiradigan vositachi (informatsion RNK) mavjud degan tushuncha faqat 1961 yilda F. Jakob va J. Mono tomonidan e'lon qilingan edi. Nuklein kislotalar funksiyasini o'rganishda asosiy bosqichlardan biri informatsiyani DNK da yozilish usuli va uni oqsil strukturasiga uzatish prinsipi, ya'ni genetik kodni rasshifrovka qilish bo'ldi. Bu kashfiyotgacha RNK ning uch tipi informatsion yoki matritsa RNK si (mRNK), ribosoma RNKsi (rRNK) va transport RNKsi (tRNK) mavjud ekanligi, ularni oqsil sintezida ishtirok etishini belgiladi.

Genetik kodning mazmuni shundan iboratki, oqsil molekulasidagi har bir aminokislota uchta nukleotiddan iborat tripletga muvofiq keladi. Oqsil sintezi ribosomalarda kechar ekan ularga birikkan matritsa RNK si (mRNK)da tegishli aminokislota muvofiq kodon faollangan aminokislota tashuvchi transport RNK si (tRNK)ning antikodoni bilan vaqtincha bog'lanib, har bir aminokislota DNK da yozilgan informatsiya asosida sintezlanayotgan oqsil zanjirida o'z o'rniga qo'yadi. Mana shu mexanizm tufayli DNK da yozilgan informatsiya RNK vositasida oqsil molekulasida aminokislotalar tartibi sifatida realizatsiya qilinadi. Informatsiya oqimini DNK-»-RNK-»Oqsil yo'nalishida uzatilishi molekulyar biologiyani asosiy postulatidir. Genetik kod kashf etilishi bilan nuklein kislotalarni tuzilishi va funksiyasini o'rganishda yangi bosqich ochildi: DNK molekulasida hujayrada spetsifik fermentlar — endonukleazalar, restriktazalar tomonidan maxsus joylaridan kesilishi, ulanishi, turli modifikatsiyalarga duchor bo'lishi, RNK matritsasida DNK sintezlanish fenomeni (teskaritranskripsiya) va uning fermenti

Molekulyar mikrobiologiya

aniqlandi. Mana shunday mexanizmlardan foydalanib P. Berg (1972 y.) hujayradan tashqarida ikkita farqli viruslar DNKsini ulashga erishadi. Shuning bilan turli organizmlarning genetik materiali, ya'ni ularning DNK molekulalarini ma'lum fragmentlarini ulash, chatishtirish (rekombinatsiya) orqali yangi sun'iy organizmlarni olish imkoniyatini beradigan ajoyib soha-**genetik injenerligi** paydo bo'ldi. Genetik injenerlikning asosiy quroli, **restriktazalar** — juda ham spetsifik fermentlardir.

DNK fragmentlarini olish uchun restriksion endonukleazalardan, ularni ulash uchun DNK — ligazalardan foydalaniladi. Irsiy belgilarni tashuvchi bunday rekombinatsiyalangan DNK ni hujayraga kiritib, yot informatsiyani amalga oshirish, replikatsiya, transkripsiya, oqsil sintezini ta'minlash usullari ishlab chiqildi. Begona organizmlarda, masalan, bakteriyalarda hayvonlarning tegishli genlarini o'qilishini (ekspressiyasini) ta'min qiladigan sistemalarini tuzish aniq qilingan belgilarga ega tirik organizmlarni yaratish imkoniyatini tug'dirdi. Tez orada bunday imkoniyatlar biotexnologiyada amalga oshirila boshlandi. Odatda hayvon va odam organizmidan sintezlanadigan xilma-xil oqsillarni biosintez qilish qobiliyatiga ega mikroblar olindi, xususan rekombinatsiyalangan genlardan foydalanib odamlar uchun zarur gormonlar va fermentlar — insulin, o'sish gormoni, interferon va boshqalarni olish yo'lga qo'yildi. Bu soha keng miqyosda jadal rivojlanmoqda [To'raqulov Y.X, Bioximiya, 1996]

Nuklein kislotalar yuqori molekuli biopolimerlar bo'lib, molekulyar massasi 250 dan $1,2 \cdot 10^5$ kDa atrofida bo'ladi. Ular tirik organizmda irsiy belgilarni saqlab, ularni avloddan-avlodga o'tkazishda bevosita ishtirok etib, kibernetik vazifani bajaradilar.

Nuklein kislotalarning kimyoviy tarkibi

Nuklein kislotalar fermentlar, kislota, ishqor va boshqa kimyoviy birikmalar ta'sirida bir necha bo'laklarga parchalanadi. Mazkur struktura birikmalariga azot asoslaridan purin va pirimidin, uglevod komponentlaridan riboza va dezoksiriboza hamda fosfat kislota kiradi.

Purin asoslari

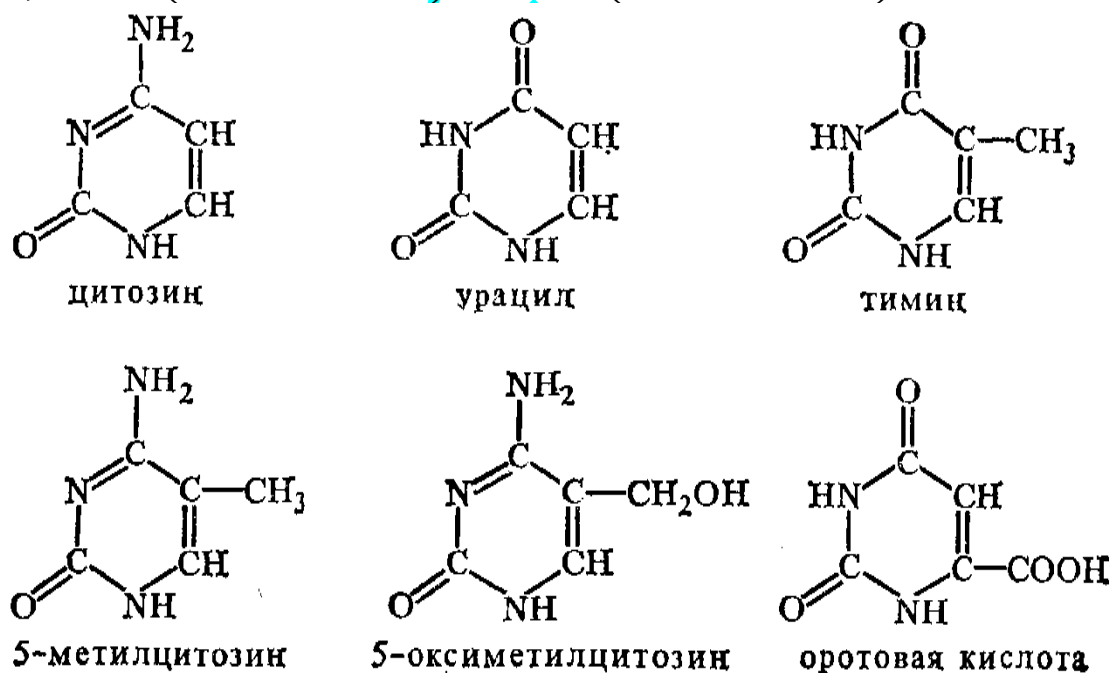
Nuklein kislotalar (DNK, RNK) tarkibida asosan ikki xil purin asoslari adenin (A) va guanin (G) uchraydi. Bu birikmalar molekulasida pirimidin va imidazol halqasidan tashkil topgan purinning hosilalari hisoblanadi: Quyida ko'rsatilgan purin azot asoslaridan tashqari, hujayrada gipoksantin (6-oksopurin) va ksantinlar (2,6-dioksopurin)

bo'lib, ular adenin, guaninlarning dezaminirlanishidan hosil bo'lib, nuklein kislotalar almashinuvida ishtirok etadilar.

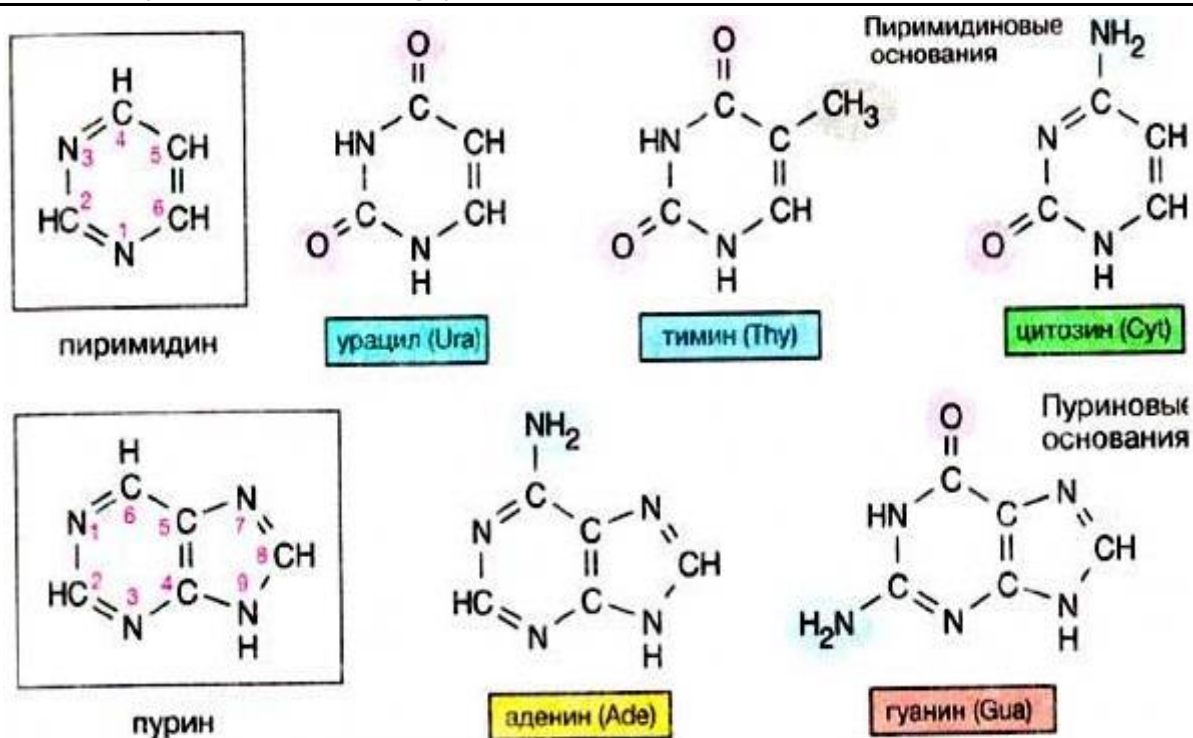


Purin va uning hosilalari.

Pirimidin asoslaridan nuklein kislotalar DNK va RNK tarkibida sitozin, urasil (RNK tarkibida) va timin (DNK tarkibida) kiradi.

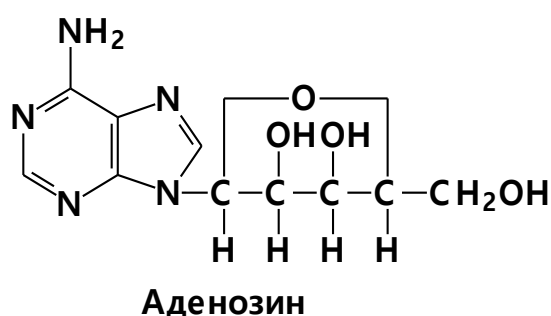
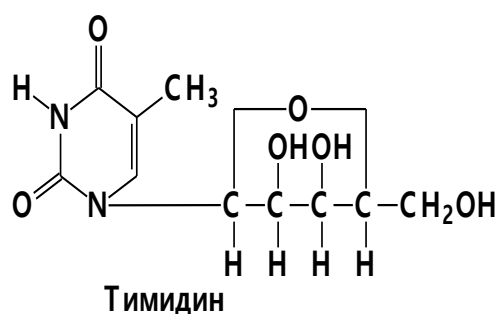


Pirimidin va uning hosilalari.

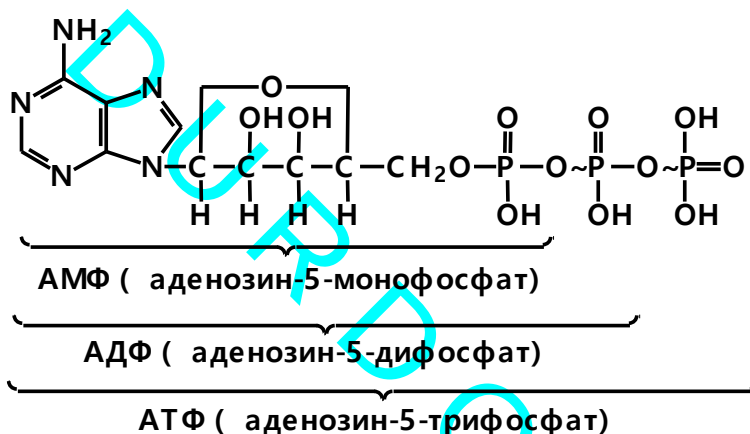
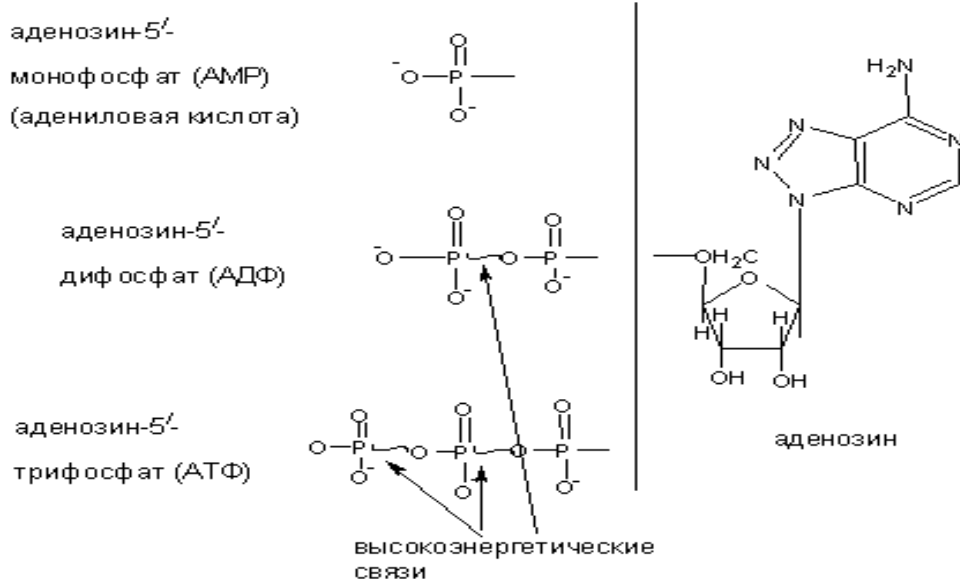


Azot asoslari. Purin va pirimidin asoslari.

Nuklein kislotalar tarkibida ko'rsatilgan azot asoslaridan tashqari yana minor komponentlari uchraydi ular t-RNK tarkibida: digidrourastil, psevdouridin, ksantin, gipoksantin, astetilstitozin va orot kislotalar uchraydi. DNK tarkibida qisman 5-metilstitozin va 6-metiladeninlar bor. Metillanish asosan, DNKning replikatsiyasidan so'ng hosil bo'ladi. Metillangan asoslar DNK ni "o'zini" DNK aza fermentidan saqlaydi. Notabiiy asoslardan 7-metilguanozin, 1-metil-2-amino-6-okso-purin, 6-dimetilaminopurinlar u-RNK va nukleozidlar tarkibida borligi aniqlangan.[Valixanov M.N,Biokimyo,2008]



Nukleozidlar



Нуклеотидлар. Аденозиннинг 3- mono-, di- i trifosfonуклеотлари.

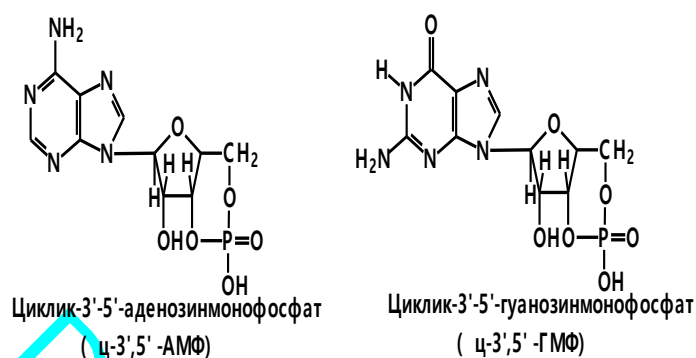
Нуклеозиддифосфат ва нуклеотидтрифосфат tarkibidagi fosfat kislotalari bir-birlari bilan yuqori potensial energiyaga ega bo'lgan anhidrid bog'larini orqali bog'lanib, ularni **makroerglar** deb ataladi. Makroergli ribonukleotidtri-fosfatlar RNK va DNKlarning biosintezida dastlabki substrat hisoblanadi.

Hujayra metabolizmida ATF markaziy o'rin egallab oksidlanishi, substratli va fotosintetik fosforlanish reaksiyalarining mahsuli bo'lib, organizmda akkumulyatorlik vazifasini o'taydi. Har qanday biologik jarayonlarda energiya manbai sifatida ATF xizmat qiladi. ATF dan tashqari bo'lgan trifosfatlar ham muayyan biologik vazifalarni bajaradilar. Jumladan, GTF oqsilning translyatsiyasida, UTF uglevodlar sintezida va StTF esa glisterofosfolipidlar biosintezida ishtirok etadilar.

Molekulyar mikrobiologiya

Nukleotidlarning molekulyar og'irligi 330 ga teng. Bakteriofagdagı nuklein kislotasining molekulyar massasi $1,9 \cdot 10^6$ Da. Demak, tarkibida 5760 nukleotid qoldig'i bor (900000:330).

Hujayrada oddiy nukleotidlardan tashqari yana siklik -3',5'-adenil va siklik 3',5' guanil kislotalar ham uchraydi:



Siklik nukleotidlar biologik faol moddalar bo'lib, hujayraga tashqaridan keladigan xabarlar (gormon, neyromediator va boshqa) uchun vositachilik rolini bajaradilar. Ular siklaza fermentlari yordamida sintezlanib, faolliklari esa har xil effektorlar, jumladan, gormonlar orqali boshqariladi.

Nuklein kislotalarning tuzilishi

Nuklein kislota molekulari nukleotidlarning polimerlanishi natijasida hosil bo'lgan polinukleotidlar zanjiridan iborat. Nukleotidlar qoldig'i bir-biri bilan fosfat kislota yordamida birikadi. Fosfat kislota har doim bir nukleotid tarkibidagi riboza (dezoksiriboza)ning uchinchi C-atomi bilan, ikkinchi nukleotid tarkibidagi riboza (dezoksiriboza)ning beshinchi C-atomi bilan murakkab efir bog'lari orqali bog'lanadilar. Buni quyidagi chizmada ko'rish mumkin.

Yuqoridagi polinukleotidlarning o'zaro bog'lanish tizimiga asosan ular qutblangan bo'lib, bir tomoni 5'-COOH guruhi bo'lsa, ikkinchi tomoni esa 3'-OH guruhi bo'ladi.

DNKning makromolekulyar strukturasi

Oqsillarga o'xshash DNK ham birlamchi, ikkilamchi va uchlamchi strukturaga ega.

DNK ning birlamchi strukturasi

Dezoksiribonuklein kislota barcha tirik organizmlarda va ayrim viruslarda mavjud. U genetik (irsiy) axborotlarni o'zida saqlab, uni avloddan-avlodga uzatishda bevosita ishtirok etadi. DNK

molekulasining birlamchi strukturasida irsiy belgilar rejalashtirilgan, ular birin-ketin joylashgan dezoksiribonukleotidlar qatoridan iborat. DNK tarkibida to'rt xil dezoksiribonukleotid bo'lib, oqsildagi aminokislotalar sonidan kam bo'lsa ham ularning ketma-ket qator soni oqsildan uzun bo'ladi.

Bakteriofaglar DNK sining nukleotid qatori unikal, ya'ni bir marta uchrab, boshqa qaytarilmaydi. Ayrim organizmlarda DNKdagi nukleotidlarning ketma-ketligi unikal bo'lsa ham, ayrim qismlarida qaytariladigan nukleotid qatori bir necha marta uchraydi (t-RNK va u-RNKlarning kodlovchi qismlari) jumladan, bakteriyalarda. Eukariot genomlarda DNKning 60%ni strukturali, ya'ni oqsil sintezini belgilovchi qismlar tashkil qiladi. Hayvon DNKsining 10-25%ini tashkil qiluvchi bo'limlar qaytariladigan nukleotid qatoridan iborat bo'lib, ular ribosom, t-RNK, gistonlar, immunoglobulinlarning genlaridan iborat. Ular DNK molekulasida bir gen ikkinchisi bilan ketma-ket joylashib, ularni **qaytariluvchi tandemlar** deyiladi. Ya'ni bir gen ikkinchi gendan speyzer (inglizcha spaser-oraliq) orqali ajraladilar.

Qaytariladigan nukleotid qatorlari, ularni satelit (kichik-sayyor) qismlaridir, bular xromosomaning sentromer qismida joylashib, uning bo'linishida va o'zaro bog'lanishida ishtirok etadi.

Tabiiy manbalardan ajratib olingan DNKlarning nukleotid tartibini o'rganish natijasida AQSh olimi Chargaff va rus akademigi A.N.Belozerskiylar qator miqdoriy qonuniyatlarni aniqladilar. Bu qonuniyatlar quyidagicha ifodalanadi:

1. DNK molekulasidagi purin asoslari, adenin va guanin molyar konstantratsiyasini yig'indisi pirimidin asoslari-sitozin va timinning molyar konstantratsiyasi yig'indisiga teng:

$$\text{Pur}=\text{Pir yoki } A+G/S+T=1$$

2. Adenin molyar konstantratsiyasi timinnikiga, guaninniki esa sitozinga teng: $A=T$, $G=S$ yoki $A/T=1$; $G/S=1$;

3. DNK zanjiridagi 6-aminoguruhli asoslar miqdori 6-ketoguruhli asoslar miqdoriga teng, ya'ni adenin va sitozin molyar konstantratsiyalarining yig'indisi guanin va timin molyar konstantratsiyalari yig'indisiga teng:

$$A+S=G+T$$

‘Guanin bilan sitozin molyar konsentratsiyalari yig'indisining adenin bilan timinning (DNK molekulasida yoki uratsil RNK da)

Molekulyar mikrobiologiya

molyar konsentratsiyalari yig'indisining nisbati turli manbalardagi nuklein kislotalarda turlicha bo'ladi. Bu spetsifiklik koeffitsienti deb ataladi va

$G+S/A+T(U)$ shaklida ifodalanadi.

Agar, $G+S/A+T$ ning qiymati birdan kam bo'lsa, bunday DNK AT tipga, agar uning qiymati birdan katta bo'lsa, GS tipga kiritiladi.

Yuksak o'simliklar va hayvonlar DNKsi AT tipga mansub, zamburug'lar, suvo'tlar va bakteriyalarning DNKsi ko'pincha GS tipga mansub. Bu ko'rsatkichlarni o'simlik, hayvon va mikroorganizmlarni taksonomik qatorini aniqlashda foydalanish mumkin.

1953 yili D.Uotson va F.Kriklar quyidagi ilmiy ma'lumotlarga asosan DNKning modelini taklif qilishgan:

1. DNK 3'-5' –fosfodiefir bog'lari orqali bog'langan nukleotidlarning biopolimeridir.
2. DNK tarkibidagi nukleotidlar Chargaff qoidasiga bo'ysunadilar.
3. DNK molekulasi spiral shaklidagi struktura bo'lib, birdan ortiq polinukleotid zanjiridan iborat bo'lishi mumkin.
4. DNK molekulasining strukturasini vodorod bog'lari orqali stabil mustahkam holatda bo'ladi.

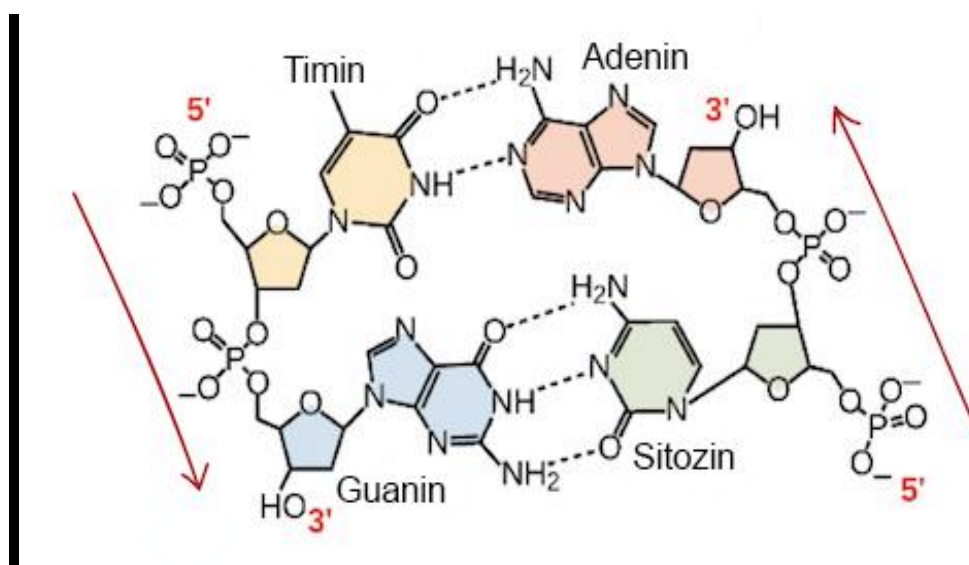
DNK ning ikkilamchi strukturasini

DNK ning nukleotid tarkibi to'g'risidagi analitik ma'lumotlar asosida Uotson bilan Krik 1953 yilda DNK molekulasining qo'sh spirallarini bir-biriga o'ralgan tuzilishi to'g'risidagi g'oyani taklif etdi. Keyinchalik bu nazariya eksperimental tasdiqlandi. DNKning ikkilamchi strukturasini muvofiqlashtiradigan asosiy omillar quyidagicha: A va T o'rtalaridagi vodorod bog'lari bo'lib, bu juftlikda ikkita bo'ladi. G va S juftligida esa vodorod bog'lari uchta. Azot asoslarini komplementar (bir-birini to'ldiruvchi) deyiladi.

Komplementar juft azot asoslari A-T va G-S lar faqat katta-kichik o'lchami bir xil bo'lishi bilan birgalikda, ularning shakli ham bir xilda bo'ladi.

Qo'sh spiralli strukturaning o'zagi fosfat va dezoksiriboza guruhidan tashkil topgan. U fazoviy o'qqa nisbatan o'ngga buralish xususiyatiga ega. Spiralning ichki qismiga azot asoslari u fazoviy o'qqa nisbatan perpendikulyar joylashgan. Qo'sh spiraldagi har bir zanjir o'zaro antiparalel, ya'ni uning kimyoviy tuzilishi bir-biriga qarama-

qarshi holda shakllanadi. Bir zanjirdagi bog' 5'-3' shaklida bo'lsa, ikkinchisida, aksincha 3'-5' fosfat ko'rinishda bo'ladi.



DNK ning komplementar asoslari. (A-T, G-S asoslar o'rtasidagi vodorod bog'lari)

RNK molekulasining struktura va funksiyalari

Har qanday hujayrada RNK miqdori DNKga nisbatan 5-10 marta ko'p uchraydi. RNKning asosiy funksiyasi translyatsiya jarayonida genetik axborotni oqsil tiliga aylantirishda, ayrim holatlarda endonukleazalik vazifani va har xil bosqichlarda genlarning ekspressiyasida ishtirok etadi. Ayrim viruslarning (retrovirus, ko'pchilik hayvon, o'simlik va xasharot viruslari) genomi bir yoki qo'sh zanjirli RNK molekulasidan iborat.

RNKning turlari. Har xil hujayralarda quyidagi RNK xillari uchraydi: ribosoma (r-RNK), transport (t-RNK) va informatsion (i-RNK). Ko'pchilik hujayralarda yana kichik yoki sitoplazmatik RNK (s-RNK), eukariotlarda kichik yadroviy RNK (y-RNK) mavjud.

Hamma RNKning 80-85% ni r-RNK, 10%ni 100 xil t-RNK xabar beruvchi RNK – 5% ni, kichik yadroviy, sitoplazmatik va hali vazifasi noma'lum bo'lgan RNKlar 2% ni tashkil qiladi. Hozirgi kunda ko'pchilik RNK, jumladan, t-RNK, r-RNK, i-RNK va y-RNKning birlamchi strukturalari, ulardagi asosiy qonuniyatlar har xil organizmlarda aniqlangan (1-jadval).

Tabiiy RNKlarning aksariyatlari birlamchi strukturali, bir qator poliribonukleotid zanjiridan iborat. Bir qatorli RNK zanjirining ayrim

Molekulyar mikrobiologiya

qismlarida xuddi oqsillarga o'xshash ikkilamchi strukturalar hosil qilishi mumkin. Poliribonukleotid qo'sh zanjirlar qatoridagi o'zaro antiparallel Uotson-Krik juftliklari (AU va GS) asosida shakllanadi. Qo'sh zanjirli RNK molekulasida GU juftliklari ham tez-tez uchrab turadi. RNK molekulasining qo'sh zanjirli qismlari komplementar va bir tekislikdagi kimyoviy bog'lar orqali stabil holatga keladi. RNKning ayrim qismlari azot asoslari o'rtasidagi hosil bo'ladigan kuchli bog'lanishlar asosida spirallashgan konformatsiyaga ega bo'ladi.

1-jadval
ASOSIY RNK TURLARI

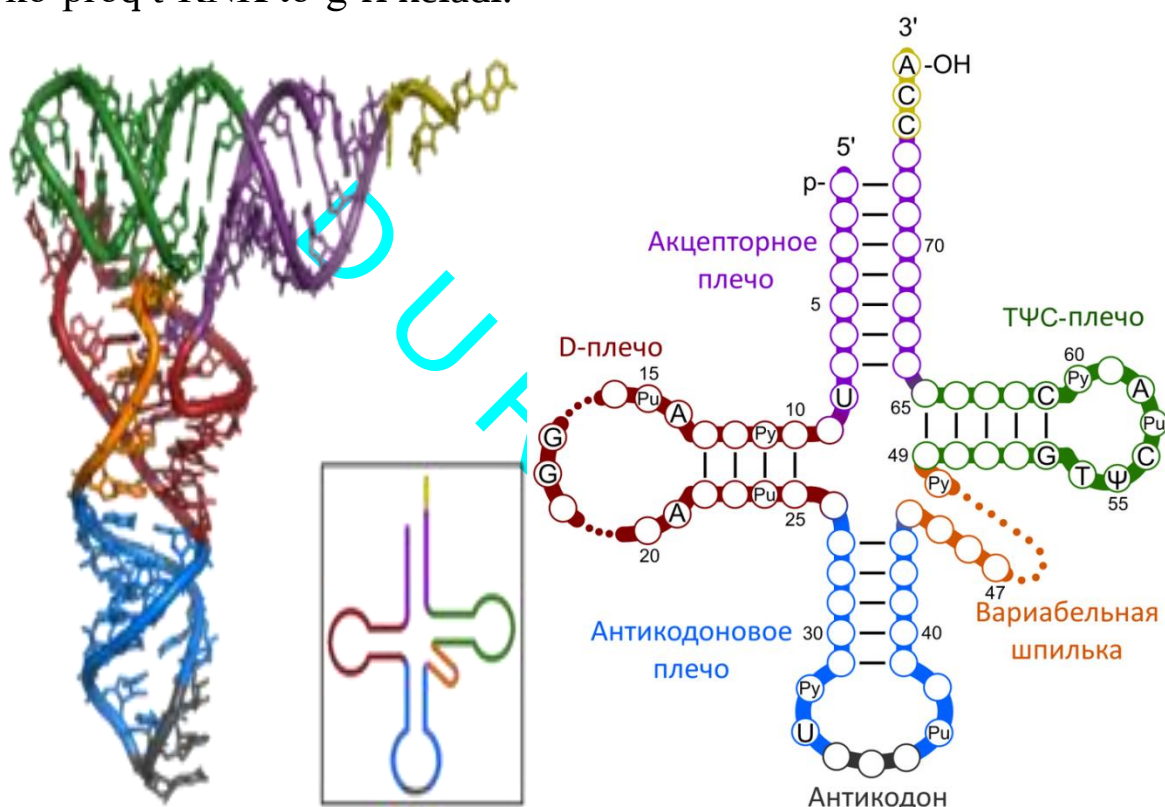
№	RNK turlari	Hujayradagi o'rtacha miqdori	Nukleotidlarning o'rtacha soni	Tarqalishi
1.	Transport RNK (tRNK)	80-100	75-90	P.E.
2.	Ribosom 5 S RNK (rRNK)	1-2	120	P.E.
3.	Ribosom 5,8 S RNK (rRNK)	1	158	E.
4.	Ribosom 16S RNK (rRNK)	1	1600	P.
5.	Ribosom 23S RNK (rRNK)	1	3200	P.
6.	Ribosom 18S RNK (rRNK)	1	1900	E.
7.	Ribosom 28S RNK (rRNK)	1	5000	E.
8.	Informatsiya RNK (iRNK)	Ming atrofida	O'zgarib turadi	P.E.
9.	Geterogenli yadroviy RNK (gy RNK)	Ming atrofida	O'zgarib turadi	E.
10.	Kichik stitoplazmatik RNK (ks RNK)	Bir necha o'n atrofida	90-330	P.E.
11.	Kichik yadroviy RNK (ky RNK)	Bir necha o'n atrofida	58-220	E.

* P – prokariotlar, E - eukariotlar

S – Svedberg birligi (sedementativ konstantasi)

Transport RNK

Transport RNKning asosiy vazifasi aminokislotalarning faollanishida, ularni ribosomalarga tashilishida ishtirok etishidir. T-RNK teskari transkripsiyada tomizg'i-zatravka (praymer) sifatida ham xizmat qiladi. t-RNK tarkibida 70-90 nukleotid qoldig'i hisoblanib, molekulyar massasi 25000 atrofida. Mazkur RNK asosan hujayra suyuqligida uchrab, uning ikkilamchi strukturasi "beda bargi"ni eslatadi. Hujayrada har bir aminokislota uchun bir, ikki yoki undan ko'proq t-RNK to'g'ri keladi.



Transport RNKning umumiy tuzilishi. tRNK ning ikkilamchi tuzilishi sxemasi beda bargi shaklida. Doiralar nukleotid qoldiqlarini ko'rsatadi; chiziqlar asosiy juftlarni bildiradi; nuqtalar qo'shimcha nukleotidlar mavjud bo'lishi mumkin bo'lgan pozitsiyalarni ko'rsatadi. O'zgarmas asoslar mos belgilar bilan ko'rsatiladi, bu yerda A - adenin, T - timin, G - guanin, C - sitidin, D –digidrouridil, TΨS-psevdouridil "Pu" - purin asosini, "Pir" - pirimidin asosini anglatadi. Nukleotidlar standart tarzda raqamlangan va antikodon 34, 35 va 36 nukleotidlar soniga mos keladi.

T-RNKlar qanday aminokislotalarni tashilishiga qarab t-RNK^{val}, t-RNK^{ley} va hokazo shaklida yoziladi. Ko'pchilik t-RNKlarning oxirigi

Molekulyar mikrobiologiya

5'- tomoni guanin, ikkinchi aksteptori 3'- uchi esa trinukleotid StStA bilan yakunlanadi.

Transport RNKning ikkilamchi strukturasi to'rt yoki beshta qo'sh zanjirli shaxobcha va bir necha tugunchalardan iborat. T-RNK tarkibida aksteptor, antikodon, digidrouridil (D), psevdouridil (TΨS) qismlari va yana qo'shimcha shaxobchalarni tutadi. Ma'lumki, t-RNK aksteptor qismi StStA nukleotid qoldiqlaridan iborat bo'lib, adenindagi ribozaning gidroksil guruhiga aminokislota bog'lanadi. Transport RNK bilan aminokislotaning bog'langan birikmasini amioatsil – t-RNK (aatRNK) deb ataladi. Ular oqsil sintezida adaptorlik funksiyani bajarib, uch harfli kodonni 20 harfli (aminokislotali) polipeptid zanjiriga aylantiradi.

Transport RNKning antikodonli tugunchasi o'ziga xos uchta nukleotiddan tashkil topgan triplet bo'lib, u i-RNKdagi kodon bilan bog'lanishida ishtirok etadi. Psevdouridinli tuguncha (TΨS) t-RNKda yettita nukleotiddan tuzilgan bo'lib, tarkibida psevdouridin azot asosini tutadi. TRNKning mazkur qismi ribosom bilan bog'lanishida qatnashadi.

Transport RNK tarkibida 8-12ta nukleotid qoldig'idan tashkil topgan, digidrouridinli (D) qism ham mavjud. Ushbu tuguncha amioatsil-tRNK-sintetaza fermenti bilan bog'lanadi. Transport RNK tarkibida qo'shimcha tugunchalar ham mavjud. Ular ko'proq tRNKlarni guruhlariga ajratishida belgi sifatida xizmat qiladi. Transport RNKlarning 75% birinchi guruhlariga kirib, ulardagi qo'shimcha tugunchalar 3-5 juft asoslaridan iborat. Ikkinchi guruhdagi tRNKlar 13-21ta juft azot asoslarini tutib, ulardagi tugunchalar aksariyat bir-birlari bilan bog'lanmaydilar.

Transport RNKning fazoviy shakli tirsaksimon-bukilgan uchlamchi strukturaga ega. Azot asoslarining 60% metillangan holda bo'ladi.

Ribosom RNK

Yuqori molekulyar ribosom RNK ribonukleotid zarrachalarining asosiy strukturasi bo'lib, ribosomalaridagi 30-40S va 50-60S subbirliklarning shakllanishida bevosita ishtirok etadi. Ribosom RNK translyatsiya jarayonida i-RNK va amioatsil-tRNK bilan bevosita aloqada bo'ladi.

Ribosom RNKning molekulyar massasi katta bo'lib (35000 – 1000000), tarkibida 100-3100ta nukleotid qoldig'idan iborat. Mazkur

RNKning ikkilamchi strukturasi deyilganda polinukleotid zanjirning bukilgan spiralli qismlari tushuniladi. Ribosom RNKning uchlamchi strukturasi tayoqcha yoki dumaloq-doira shaklida bo'lib, tashqi tomoni oqsillar bilan o'ralgan.

Kichik molekulali 5S rRNK oqsillar bilan birgalikda ribosomaning subbirliigi bo'lib, peptidiltransferazali markaz bilan oqsil tabiatli (EF-G) domenlar o'rtasida vositachi bo'lib xizmat qiladi. Ribosom RNKning tarkibida azot asoslaridan guanin va sitozinlar oddiy nukleotidlarga nisbatan ko'p miqdorda bo'ladi. Yuqori molekulali RNKning ikkilamchi strukturasi qo'sh zanjirli qismlar va tugunchalar uchraydi. Hamma ribosom RNKlar 5S-RNKdan tashqari hujayraning yadrochasida shakllanadi. Yadrochada yuqori molekulali RNK va oqsillar ishtirokida ribosoma hosil bo'ladi. Ribosomadagi oqsillar gistonlarga o'xshash asosli xususiyatga ega bo'lib, strukturali va fermentativ funksiyani bajaradi.

Ribosomalar endoplazmatik to'ring ustki qismi, stitoplazma, yadrocha, mitoxondriya, xloroplastlarda uchraydi. Ular ikkita subbirliklardan tashkil topgan. Hajmi va molekulyar massasi bo'yicha ribosomalar uch guruhga bo'linadi:

1. 70S ribosom prokariotlarga tegishli bo'lib, 30S va 50S subbirliklardan tashkil topgan.

2. 80S ribosom eukariotlarga xos bo'lib, 40S va 60S birliklardan iborat.

3. Mitoxondriya va xloroplastlarda bo'ladigan ribosomalar bo'lib, ular 70Sni tashkil qiladi.

80S ribosomning kichik birligi bir molekula RNK (16S) va 23 xil oqsil molekulasidan tashkil topgan. Katta birlikda esa, uch xil RNK (5S, 16S, 23S) va 50 ga yaqin oqsil molekulasidan iborat. Ribosoma oqsillari ribosomaning strukturasi mustahkamlashda va fermentativ vazifani bajarishda ishtirok etadilar. Ribosomada kichik va katta birliklar o'zaro magniy ionlari orqali bog'lanadilar. Ribosomada ikkita jo'yak (ariqcha) bo'lib, biri m-RNK ni bog'lashda, ikkinchisi esa polipeptid zanjirini uzaytirishda xizmat qiladi. Bular tashqari, ribosomada ikkita markaz joylashgan. Birini amioatsil (A-markaz), ikkinchisi peptidil (P-markaz) bo'lib, ular oqsil sintezini amalga oshirishda xizmat qiladi.

Informatsion RNK

RNK ning uchinchi turi informatsion RNK (i-RNK) yoki vositachi m-RNK (mesenjer) deb ataladi. RNK ning bu turi umumiy RNK ning 5% ini tashkil etadi. U ham sitoplazmada va yadroda uchraydi, nukleotid tarkibi bo'yicha DNK molekulasini muayyan bir qism nukleotidlarning nusxasi hisoblanadi. Bu RNK DNK molekulasidagi axborotni oqsil sintezlaydigan orgonoid-ribosomalarga olib boradi. I-RNKning molekulyar massasi bir millionga yaqin bo'lib, ularning nukleotid tarkibi sintezlanayotgan oqsilning molekulyar og'irligiga qarab har xil bo'ladi. I-RNK ning sintezlanishi yadroda boshlanib, so'ng sitoplazmaga o'tib ribosomaga o'rtnashadi va oqsil sintezida qolip (matritsa) rolini bajaradi.

Informatsiya RNK bir necha qismlardan tashkil topib, uning informativ qismi oqsil sintezida matritsa vazifasini bajaradi. Informativ bo'lmagan qismi poliadenin fragmentlaridan tashkil topgan (50-400 nukleotid qoldig'idan iborat). I-RNK molekulasidagi poli A yonida 30 nukleotiddan tashkil topgan akseptor qismi bo'lib, u ribosoma bilan bog'lanishda ishtirok etadi. Molekulaning 5' oxirida alohida struktura bo'lib, uni KEP (inglizcha sar-qalpoq) deb ataladi. U 7-metil guanozintrifosfat bo'lib, RNKni ferment ta'siridan saqlab, translyatsiyada ishtirok etadi. I-RNK molekulasidagi noinformativ qismi, molekulani bir me'yorda turishini ta'minlaydi. Informatsiya RNKning sintezi yadrodan boshlanib, sitoplazmada yakunlanishiga **RNK ning yetilish jarayoni** deyiladi.

HUJAYRALARDA IRSIY AXBOROT AMALGA OSHIRILISHI REPLIKATSIYANING MOLEKULAR ASOSLARI

Hujayrali organizmlarning genetik rejasi DNK molekulasida nukleotid qatori sifatida yozilgan bo'lib, uning nasldan-naslga bexato o'tishini mazkur molekula o'z-o'zidan ko'payishida ta'minlaydi. DNK-qolipida (matritsasida) ushbu molekulaning ikki martadan ko'payish jarayonini replikasiya deb ataladi. DNK molekulasidagi irsiy belgilar hujayradan-hujayraga va keyingi avlodlarga berilishida uning o'zi xatosiz ko'payishi lozim. Biologik makromolekulalarning matritsali sinteziga DNK replikasiyasi misol bo'ladi. DNK replikasiyasi azot asoslarining (purin, pirimidin) komplementar tizimi asosida sodir bo'ladi. Replikatsiya reaksiyasining ketishi uchun bir zanjirli DNK-

matritsa, dezoksinukleozidtrifosfatlar, fermentlar, magniy ionlari, oqsil omillari bo'lishi zarur.

DNK replikatsiyasi yarim konservativ xarakterga ega, ya'ni yangidan hosil bo'lgan DNK molekulasidagi polipeptid zanjirining faqat bittasi sintezlanadi, ikkinchisi esa tayyor holda dastlabki, ona DNKdan o'tadi. Yangi sintezlanayotgan DNK tarkibidagi nukleotidlarning ketma-ket joylanishi – qolip sifatida bajarayotgan DNK tomonidan belgilanadi.

DNK replikatsiyasida polimerizatsiya dezoksiribozaning 3'-tomonidan o'sib boradi. Dezoksitrifosfat DNK-matritsasining oxirgi monofosfatli dezoksinukleotidga bog'lanishida DNK-polimeraza amalga oshirib, pirofosfat ajraladi. Muhitdagi ferment pirofosfataza pirofosfatni monofosfatlargacha ajratib yuborganligi uchun mazkur reaksiya qaytalama bo'lmaydi. DNK replikatsiyasining oxirida bir zanjirli molekuladan ikki zanjirli molekula davriy ravishda sintezlanadi. Reaksiyaning xarakterli tomoni shundan iboratki, sintezlanayotgan molekula ona DNK zanjirining aynan o'zidir.

DNKning replikatsiyasida ko'p miqdorda oqsil-fermentlar ishtirok etganliklari uchun mazkur tizim murakkab, samarali replikativ harakatdagi jarayon hisoblanadi. DNKning replikatsiyasi 5'→3' tomoniga matritsa asosida DNK polimeraza fermenti ishtirokida sodir bo'ladi. DNKning sintezlovchi ferment har soniyada 50ta nukleotid eukariotlarda, bakteriyalarda esa 500 dezoksinukleotidlarni polimerlash xususiyatiga ega.

Hujayralarning bo'linishida DNK-matritsadan nusxa olish o'ta aniqlikni talab qiladi. Mazkur jarayonni korreksiya qilish DNK-polimeraza nukleotidlarni komplementarlik tizimi asosida amalga oshiradi. Mobodo, polimerizatsiya jarayonida hatolik yuz bergan bo'lsa replikatsiya to'xtatiladi. DNK zanjiriga komplementarlikka mos kelmagan nukleotid ulangan bo'lsa ferment orqali darhol polimerdan ajratiladi. DNK replikatsiyasidagi hatolik yo'q darajada bo'lib, masalan, ichak tayoqchasidagi DNKning o'z-o'zidan ko'payish davomidagi hatolik $10^{-9} - 10^{-10}$ darajasiga teng. DNK – molekulasining replikatsiyasi uchun ferment DNK-polimeraza va albatta zatravka (tomizg'i) yoki praymer (inglizcha zatravka) zarur ekanligi isbotlangan.

Replikatsiyaning initsiatsiyasida ribonukleozidtrifosfatlardan tashkil topgan qisqa molekulali RNK-zatravka zarur bo'lib, bu omilni DNK-praymaza fermenti sintezlaydi. Praymaza fermenti

Molekulyar mikrobiologiya

hujayralardagi har xil RNKlarni sintezida ishtirok etadi. RNK-praymer sintezlangandan so'ng DNK- polimeraza replikatsiyani davom ettiradi. Yangi sintezlangan DNK zanjirining oxiri 5'-tomonida ribonukleotidlarni tutadi. Keyinchalik qisqa praymerlar o'rnini DNKning segmentlari egallaydi.

DNK molekulasi antipararell bo'lganligi uchun polimeraza fermenti polinukleotid zanjirini faqat bir tomonga 5'→3'ga uzaytirib boradi. Replikativ ayrining harakati davomida polimeraza 5'→3' va 3'→5' tomonlariga bir vaqtda sintez reaksiyasini olib borolmaydi. Demak, DNK molekulasining faqat bitta zanjiri to'liq sintezlanib boradi. Qarama-qarishi tomondagi DNK zanjirida kichik fragmentli (1000-2000 nukleotid qoldiqlari prokariotlarda va 100-200 nukleotid qoldiqlar eukariotlarda) nukleotidlar, ya'ni Okazaki fragmentlari sintezlanadi.

Sintezlanayotgan DNK molekulasining to'liq qismini yetakchi, ikkinchisi esa Okazaki fragmentlaridan tashkil topgan zanjirni "orqada qoluvchi" deb ataladi. Bunday qisqa fragmentlarning sintezi RNK-zatravka ishtirokida davom etadi. Mazkur DNK sintezini uzilgan yoki yarim uzilgan replikatsiya deb ataladi. Ma'lum vaqtdan so'ng RNK-zatravkalar (praymerlar) ajraladi. Bo'sh qismlar DNK-polimeraza fermentlari orqali nukleotidlar bilan to'ldiriladi, kichik fragmentlar esa DNK ligaza fermentlari orqali "orqada qoluvchi" zanjirlar o'zaro choklanadi. Shunday qilib, nukleotidlar orasidagi fosfodiefir bog'lari DNK ligaza fermentlari orqali shakllanadi.

Nativ DNK bispiral holatda bo'ladi. Komplementar holatda o'z-o'zidan ko'payish uchun qo'sh spiral ikkiga ajralishi lozim. DNKning ikki zanjirga yechilishi muayyan qismlardan boshlanadi. Qo'sh zanjirni bir-biridan ajratishda ferment xelikaza - DNKga bog'liq ATF-aza bajaradi. Energiyani esa ATFni gidroliz qilinishidan foydalanadi. Xelikaza fermenti doira shaklidagi oltita subbirlikdan tashkil topgan struktura. Mazkur ferment harakatda bo'lib, ATF ishtirokida DNKni replikativ ayriga ajratib boradi.

Bir zanjirli DNK molekulasi uzunasi bo'ylab SSB-oqsillari (Single Strend Proteins) bilan bog'langan holda bo'ladi. E.colining SSB-oqsili tetramerli (molekula massasi 88000 Da), yuqori darajadagi assemetrik molekula bo'lib, tarkibida dikarbon aminokislotalari ko'p uchraydi. Oqsil bir zanjirli DNK molekulasi bilan kooperativ holda bog'lanadi. Xelikaza fermenti orqali qo'sh zanjirli DNKdan bir zanjirli

molekulalarni hosil bo'lishida SSB-oqsillari polinukleotid zanjirlarni CTABillashtirib, molekulada hosil bo'lishi mumkin bo'lgan DNKning ikkilamchi strukturasi shakllanishiga yo'l qo'ymaydi. SSB-oqsillari DNK-polimeraza fermentini faollantirib, uning ish faoliyatini aniqlashtiradi. Eukariotlarda bunday oqsillarga yadroga replikativ xususiyatli proteinlar kirib, ularni A (RrA) belgi bilan belgilanadi.

DNK molekulasida avtonomli replikatsiya xususiyatiga ega bo'lgan qismlar bo'lib, bu bo'lakni replikon deb ataladi. Replikon DNKning o'z-o'zidan ko'payishi uchun kerakli genlarni tutib, regulyatorlik xususiyatiga ham ega. DNKdagi replikon qismdan replikatsiya boshlansa shu joyni replikator deb ataladi.

Eukariot hujayralarda replikatsiyaning boshlanishi DNKning ko'p nuqtalarida bo'lib, ularning masofasi taxminan 20 ming nukleotid qoldig'idan iborat. Eukariot xromosomalar polireplikonli tuzilishga ega. Replikatsiyaning initsiatsiyasi ma'lum nuqtadan ikki tomonlarga harakat qilib, qo'shni replikativ ayriqlar bir-birlari bilan qo'shilguncha davom etadi. To'liq shakllangan xromosoma kichik sintezlangan DNK zanjirlarining o'zaro qo'shilishidan shakllanadi.

Prokariot organizmlardagi replikatsiya

Mazkur jarayon ichak tayoqchalarida o'rganilgan. DNK replikatsiyasida oqsillar - fermentlar va ularning funksiyalari yaxshi tadqiq qilingan. Bu jarayonda uch xil DNK polimeraza - I, -II va -III ishtirok etishi aniqlangan.

DNK-polimeraza I 1958 yilda Artur Kornberg tomonidan aniqlangan, bir zanjirli polipeptid bo'lib, multifunksional faollikka ega bo'lgan ferment. U bir zanjirli DNK molekulasi bilan bog'lanib, bir vaqtda bispiralli zanjirning fosfodiefir bog'i uzilgan joyga ham ta'sir qilish qobiliyatiga ega. Mazkur ferment DNKning sintezi va fosfodiefir bog'larini gidroliz qila oladi.

DNK polimeraza-I ekzonukleazali xususiyatga ega bo'lib, xromosomadagi DNKning replikatsiya va reparatsiyasida katta rol o'ynaydi. Ushbu fermentning sintezi genomda mutatsiya yoki bir kimyoviy omil orqali to'xtatilgan bo'lsa, genomning replikatsiyasida asoslarning o'rnini almashib qolishi aniqlangan. Sintezlanayotgan DNKning shakllanishida DNK-polimeraza-I asosiy o'rinni egallaydi.

DNK-polimeraza-II bir zanjirli polipeptid bo'lib, polimerazalik xususiyatiga ega. Mazkur ferment bir zanjirli DNK bilan bog'lanmay,

Molekulyar mikrobiologiya

ko'proq qo'shzanjirli dezoksiribonukleotid (DNK) molekulalari orasidagi bo'shliqlarni to'ldirib turadi. DNK-polimeraza-II DNK molekulasini reparatsiyasida ham ishtirok etadi.

DNK-polimeraza-III bakteriyalarning replikatsiyasida asosiy rol o'ynaydi. DNK-polimeraza-III multifermant kompleksining asosiy omili bo'lib, replikativ ayrining elongatsiyasi, RNK-praymerlarining uzayishi va Okazaki fragmentlarining sintezida bevosita ishtirok etadi.

DNK-polimeraza-III o'ndan ortiq subbirliklardan (α , β , γ , δ va x.k.) tashkil topgan. Replikatsiyani ferment to'liq xoloferment holatida amalga oshiradi. Elongatsiyaning orqada qoluvchi zanjirini to'ldirishda mazkur ferment DNK-polimeraza-I bilan birgalikda faoliyat ko'rsatadi.

DNK-polimeraza-III elongatsiyada yetakchi zanjirni 50 000 nukleotidgacha sintezlaydi. Mazkur ferment har soniyada 500 nukleotidni zanjir holatiga keltiradi. Bu jarayon DNK-matritsa asosida sodir bo'ladi.

E.coli DNKsining replikatsiyasi 2'5 juft azot asosli zanjirning ori C qismidan boshlanadi. Mazkur bo'limlarning bir qismi 13 juft, ikkinchisi esa to'qqiz juft qaytariladigan azot asoslaridan iborat.

Initsiatsiya jarayonida uchraydigan asosiy polipeptid Dna –A oqsili deb ataladi. Dna – A oqsili bir nechta molekuladan tashkil topgan. Ushbu oqsil DNKning nukleotidlari qaytariladigan va A-T juftlarga boy qismlardan DNKning replikatsiyasini boshlaydi. Mazkur initsiatsiyada ATF va gistonli oqsillar ham ishtirok etadi.

Ikkita geksamerli Dna V-oqsillari DNK zanjiriga bog'lanib, ularni yechilishida xelikaza (helix - spiral) sifatida xizmat qiladi. Bir juft azot asoslarini bir-biridan ajratish uchun ikki molekula ATF sarflanadi.

DNKning bir-biridan ajralgan zanjirlariga bir necha molekula SSB oqsillari mustahkam bog'lanib, qaytadan komplementar juftlar hosil qilishga yo'l bermaydi.

Initsiatsiyada plazmatik membrana ishtirokida DNK molekulasi metilaza yordamida metillanadi. Aksariyat metillanish joylari DNKni ori S qismlarida kuzatiladi. E.colining DNKsida ko'p miqdorda GATS nukleotid qatorlari ko'p joylarda qaytariladi. DNKdagi replikativ ayrining boshlanishi bilan qisqa vaqt ichida zanjirlarning metillanishi boshlanadi. Ona zanjiridagi oriC qismi metillanib, yangi sintezlangan DNK molekulasi metillanmaydi. DNKning metillangan qismi plazmatik membrana bilan bog'lanib, yangi sintezlangan zanjir esa bog'lanmaydi. DNK ning oriC qismi plazmatik membranadan ajralishi

bilan yangi sintezlangan zanjirlar ham metilaza yordamida metillanib, replikatsiyaning initsiatsiyasini qaytarilishi uchun Dna A-oqsili bilan bog'lanadi.

Prokariotlarda xelikazaga ferment DNK-giraza (topoizomeraza oilasidan) yordam beradi. Giraza initsiatsiyada bir vaqtda ikkita vazifani bajaradi. Birinchidan giraza DNKning bir zanjirida bir-biridan ajralgan bo'laklar hosil qilsa, ikkinchidan bu ferment burama harakatning bir necha bosqichida navbatdagi zanjirni to'liq shakllantiradi. Mazkur ferment faqat DNKni doira shaklidagi harakatni ta'minlab qolmasdan, balki, uni yo'nalishini ham belgilaydi. Fermentning bu xususiyati xuddi shu jarayonlar tufayli ikkiga ajralib - yechilgan DNK molekulasida replikatsiyali pufakcha hosil bo'lib, u esa o'z navbatida ikkita replikativ ayriga shakllanadi. DNKning replikatsiyasi ikkala replikativ ayrilarda sodir bo'lib, ularning harakati qarama-qarshi tomonga bo'linganligi uchun ikkita molekulani antiparallellik tizimini ta'minlaaydi.

DNKning yangi sintezlanayotgan zanjiri 5'→3' tomoni bo'ylab harakat qiladi. Initsiatsiya praymerning sintezlanishi bilan yakunlanadi (prayer qisqa 10-60 ribonukleotidlardan tashkil topib, DNK molekulasida komplementar asosda sintezlanadi). Prayerining shakllanishi DNKga bog'liq RNK-polimeraza yoki praymaza orqali sintezlanadi.

Prayer esa DNK-polimeraza-III uchun zarur bo'lib, ribonukleotidning oxirgi 3'-ON guruxi DNK sintezida zatrovka sifatida hizmat qiladi.

DNK replikatsiyasining elongatsiyasi ATFga bog'liq xelikaza fermenti qo'sh zanjirli DNKni ikkiga ajratishdan boshlanadi. Hosil bo'lgan bir zanjirli DNK molekulasi SSB-oqsillari bilan kooperativ holda bog'lanadi. DNK-polimeraza III replikativ ayrining yetakchi zanjirini sintezlab boradi. Ona zanjirning ikkinchisida praymasoma sintez tomon harakatda bo'ladi. Vaqti-vaqti bilan praymasoma tarkibidagi praymaza (oqsil Dna G) RNK-zatrovkani orqada qoluvchi zanjir uchun sintezlaydi. Xoloferment DNK-polimeraza-III RNK-zatrovka yordamida Okazaki fragmentlarini (1-2 ming nukleotid) sintezlab boradi.

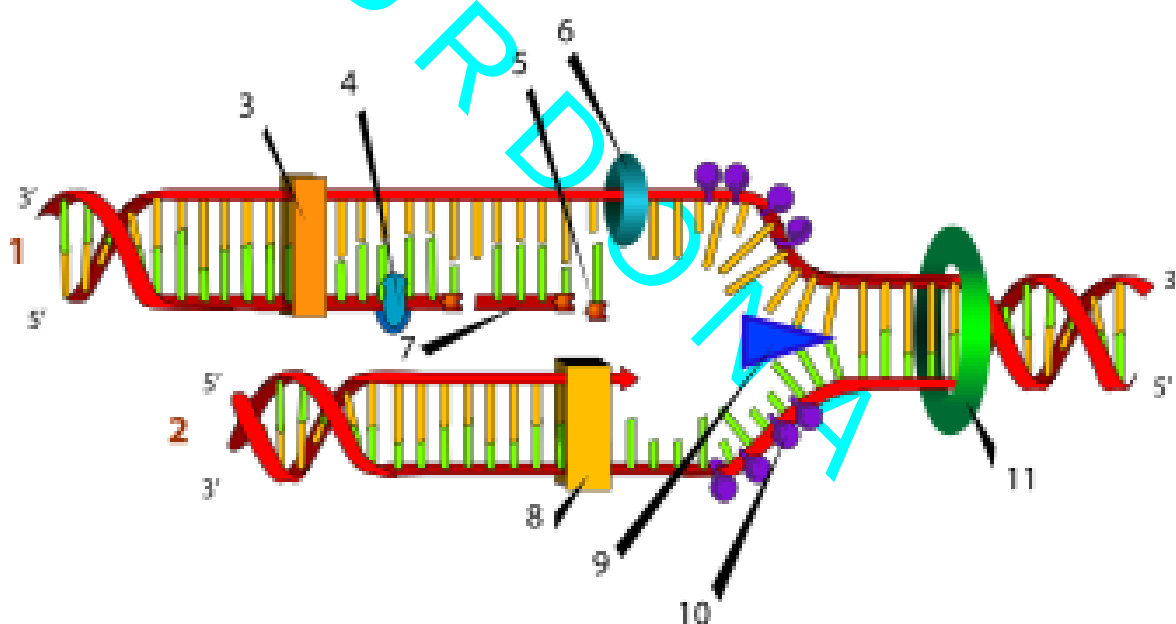
Okazaki fragmentlaridagi RNK sigmentlarini 5'-oxiridan DNK-polimeraza I qirqib, o'rtadagi Okazaki fragmentlaridagi bo'shliqni ham

Molekulyar mikrobiologiya

DNK-polimeraza-I to'ldirib turadi. Zanjirdan RNK ajralgandan so'ng dezoksipolinukleotid oralarini DNK-ligaza kimyoviy bog'laydi.

DNK-polimeraza-III xoloferment bo'lganligi uchun, qo'shimcha oqsil ishtirokida dimer hosil qiladi. Shuning hisobiga DNK dagi boshlovchiva orqada qoluvchi zanjirlarning replikatsiyasi bir vaqtda sodir bo'ladi. Etakchi zanjirdagi antiparallellik halaqit bermaslik uchun "orqada qoluvchi" DNK zanjirida o'ziga xos tuguncha shakllanadi. Aynan shu tuguncha tufayli orqada qoluvchi qo'sh zanjirli DNK ga aylanadi.

DNK sintezining terminatsiyasi matritsani nukleotidlar orqali to'ldirilishi bilan yakunlanadi. E.colining xromosomasidagi ikkita replikativ ayrilarda terminatsiyali qismlar borligi aniqlangan. Ular taxminan 20 juft nukleotidlardan tashkil topib, shu qismlarni Ter (terminus) deb ataladi. Mazkur nuqtalarda replikatsiyali pufakchalar birlashadi. Sintezlangan DNK zanjirlari ligaza fermentlari ishtirokida har qaysi matritsaga bog'lanib, DNK shakllanadi.



Replikatsiya jarayonining sxematik tasviri: (1) kechikuvchi zanjir, (2) yetakchi zanjir, (3) DNK-plimeraza (Pol α), (4) DNK-ligaza, (5) RNK-praymer, (6) praymaza, (7) Okazaki fragmentlari, (8) DNK-polimeraza (Pol δ), (9) xelikaza, (10) bir zanjirli DNKn bog'laydigan oqsillar, (11) topoizomeraza

Eukariotlardagi replikatsiya

Eukariot organizmlardagi DNKning replikatsiyasi prokariotlardagi jarayonga o'xshashdir. Eukariotlarda ham prokariotlarga o'xshash

replikatsiya bir vaqtda qo'sh zanjirda davom etadi. Eukariotlardagi replikatsiya birligini replikon deb atalib, uning o'lchami 50-120 mkm atrofida bo'ladi. Sut emizuvchilarning hujayralarida 10 000 dan 100 000 gacha replikonlar uchraydi.

Eukariotli hujayralarda bir necha xildagi DNK-polimerazalar faoliyat ko'rsatadi. Yadrodagi xromosomaning replikatsiyasida DNK-polimeraza- α va DNK-polimeraza- δ (delta) ishtirok etadi. DNK-polimeraza tarkibi bir nechta bir xil subbirliklardan iborat. DNK-polimeraza α -3'-5'-ekzonukleazalik xususiyatiga ega bo'lmaganligi uchun replikatsiyani aniq nazorat qila olmaydi. Taxminlarga qaraganda, DNK-polimeraza- α "kechikuvchi" zanjirlardagi Okazaki fragmentlari uchun praymerlarni sintezlaydi.

Eukariotlardagi DNK sintezining asosiy fermenti DNK-polimeraza-delta hisoblanadi. Mazkur fermentning stimulyatori (rag'batlantiruvchisi) proliferativli yadroviy antigen oqsilidir. Ushbu oqsil hujayralardi ma'lum miqdorda borligi aniqlangan. DNK-polimeraza delta 3'-5'-ekzonukleazalik faolligiga ega bo'lib qo'sh zanjirlar bo'lmish "yetakchi" va "kechikuvchi" makromolekulalarni sintezlashda ishtirok etadi.

Eukariotlarda polimerazalardan yana DNK-polimeraza- β bo'lib, u DNK-polimeraza-deltani o'rnini bosa oladi. Jumladan, reparatsiyada DNK-polimeraza replikatsiyali ayrini xuddi DNK-polimeraza-Iga o'xshash "kechikuvchi" zanjirda Okazaki fragmentlaridagi praymerni uzilishida ishtirok etadi. Hujayrada polimerazalardan yana bir turi DNK-polimeraza- γ (gamma) bo'lib, u mitoxondriyalarda nukleotidlarning polimerizatsiyasini amalga oshiradi.

Inson genomining replikatsiyasi uchun sakkiz soat vaqt kerak bo'ladi. E. coli ning replikatsiya tezligi bir sekundda mingta nukleotid polimerizatsiya uchrasa, eukariotlarda bu jarayon o'n marta sekin ketadi. Ya'ni bir sekundda 100 juft azot asoslari polikondensatsiyalanadi. Har bir replikon bir soatda sintezlanadi. Eukariot organizmlarda replikatsiya tezligini sekin bo'lishi oqsil ishtirokida nukleosomalarning shakllanishi bilan bog'liq bo'lishi mumkin. Prokariot organizmlardagi DNK-polimerazalar eukariotlarga nisbatan bir necha barobar faol ekanligi aniqlangan.

Telomeralar

Xromosomalarning oxirigi qismini telomerazalar (yunoncha "telos" – oxirigi, "meros" - qism) deb atalib, genetik axborotni o'zida

Molekulyar mikrobiologiya

tutmaydigan dezoksiribonukleotidlar mavjud. Xromosomaning bu bo'lagi replikatsiyaning to'g'ri ketishini va DNKni endonukleaza fermentlaridan muhofaza qiladi. Xromosomaning mazkur molekulasidagi nukleotidlar tandemli (ketma-ket qatorlari) ko'p marta qaytariladigan bo'limlardan iborat. Ketma-ket qatori qaytariladigan nukleotidlarning soni aksariyat oltitadan iborat bo'lib, xromosomaning bu qismi 20 tadan 70 ga qaytarilishi mumkin. Telomerlarning strukturasini CTABil holda saqlab turishda maxsus oqsillar ishtirok etadi. Qaytarilovchi telomerlardagi nukleotidlar qatori turg'un-konservativ bo'lib, umurtqalilarda TTAGGG, hamma hashorotlarning xromosoma yakuni TTAGG, ko'pchilik o'simliklarning telomerlari TTAGGG ketma-ketlik bilan tamomlanadi. Telomerlar turg'un bo'lganligi uchun xromosomani oxirigi qismi boshqa DNK bo'laklari bilan bog'lanmaydi.

DNKning o'z-o'zidan ko'payishida yetakchi zanjir 5'-oxiri to'liq replikatsiyaga uchraydi, orqada qoluvchi molekulaning so'ngi 3'-qismida Okazaki fragmentini hosil qiluvchi RNK-praymer joylashganligi uchun mazkur bo'lim replikatsiyaga uchramaydi. Shu qismdan RNK-praymer ajralgandan so'ng, DNK molekulasining ko'rsatilgan bo'limi navbatdagi replikatsiyada o'z-o'zidan ko'paymaydi. Demak, sintezlanayotgan zanjirning oxirigi 5' tomonidan qisqarib boradi.

Ma'lumki, DNK sintezini RNK-praymer ishtirokida DNK-polimeraza fermenti amalga oshiradi. RNK-praymer o'lchami 10-30 ta nukleotiddan iborat bo'lgan oxirigi bo'lim har replikatsiyasida qisqarib borishi kerak. Xromosomaning replikatsiyasidagi bu jarayon ya'ni sintezlanayotgan molekulaning oxiridan qisqarib borishi genetik axborotni yo'qolishiga yoki buzilishga sababchi bo'lishi mumkin. Ayrim vaqtlarda hujayra faoliyatida mazkur jarayonni kuzatish mumkin. Bunday patologiyani oldini olishda hujayrada maxsus fermentlar bo'lib, ularni telomerazalar deb ataladi. Ular replikatsiya jarayonida telomerning oxiri 3' tomoniga ketma-ket nukleotidlarni ulab, to'ldirib turadi. Telomeraza fermentlarining o'ziga xos xususiyatlari bo'lib, ular DNK-matritsa asosida teskari transkriptaza tizimi bo'yicha sintezlangan RNKdan foydalanadi. RNK-matritsa telomeraza tarkibiga kirib DNK telomerining oxiri bo'lagi bilan gibridlanib uni navbatma-navbat nukleotid fragmentlari bilan to'ldirib turadi.

Shunday qilib, telomeraza xromosomaning oxirigi qismi bo'lgan telomeralarni qaytariladigan nukleotidlarni sintezlash asosida o'lchamini ta'minlab, yakuniy replikatsiyani amalga oshirib turadi. Telomeraza faolligini pasayishi yoki yo'qolishi hujayra bo'linishida telomeralarni navbatma-navbat qisqarishiga olib keladi. Ma'lum vaqtda bu jarayon telomerli kompleksni buzulishiga sababchi bo'lib, bu o'z navbatida rejalashtirilgan hujayra o'limiga olib keladi. Demak, telomeralarning o'lchami hujayra hayotini belgilaydigan hisoblovchi omil desa bo'ladi.

Har hil hujayralarning hayotiy davomligi har xil bo'ladi. Embrional o'zak hujayralarida telomeraza faolligi yuqori bo'lganligi sababli telomerning uzunligi bir xil holatda bo'lganligi uchun, ular doim ko'payish va to'xtovsiz bo'linish xususiyatiga ega. Oddiy hujayralarida telomeraza faolligi past bo'lgan uchun telomeralar sekin qisqarib boradi. Somatik hujayralarda mazkur fermentning faolligi yo'q bo'lganligi uchun har hujayra bo'linganda telomeralar qisqarishi "xayfliq chegarasiga", ya'ni hujayralarni senessens (qarib qolishi) holatiga aylanadi.

TRANSKRIPSIYANING MOLEKULAR ASOSLARI

DNK-replikatsiyasida RNKning sintezlanishiga transkripsiya deb ataladi. RNKning nukleotidi DNKdagi bitta zanjirning dezoksiribonukleotid qatoriga komplementar bo'ladi. Juft zanjirli DNK molekulasi bittasida RNKning transkripsiyasi ketadi. Mazkur zanjirni kodlovchi deb, ikkinchisini esa kodlamaydigan genlar deb ataladi.

Transkripsiya birliklarni operon (prokariotlarda) yoki transkripton (eukariotlarda) qismlari bo'lib, aynan shu bo'limlarda yana regulyator va strukturali vazifasini bajaruvchi nukleotidlar ham joylashadi.

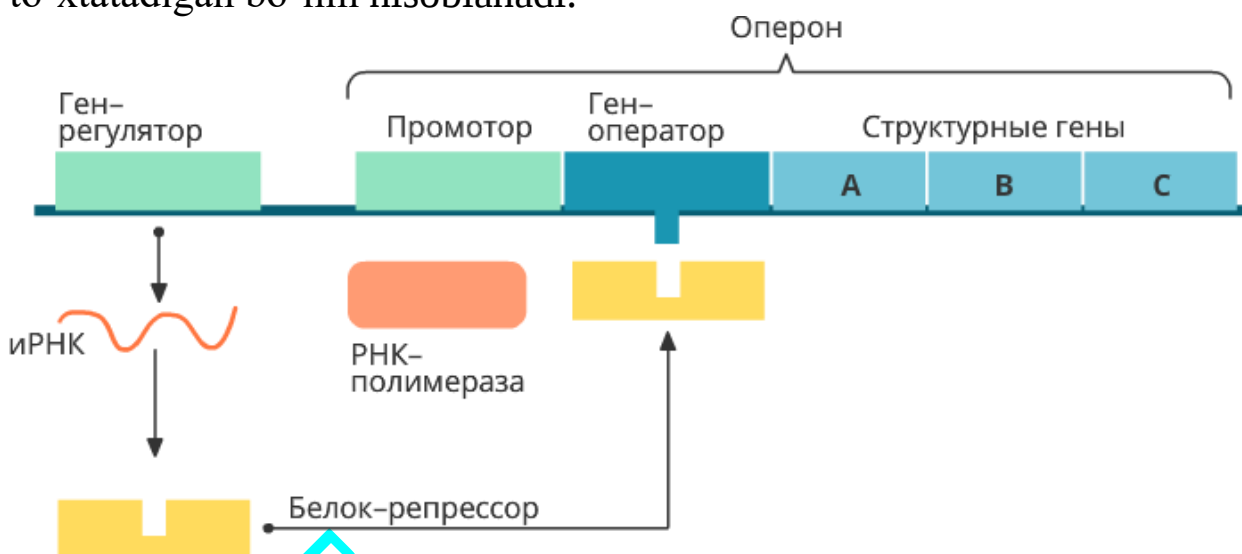
Promotor deyilganda transkripsiyaning initsiatsiyasida RNK-polimeraza fermentining DNKga bog'lanadigan joyi hisoblanadi. Jumladan, *E.coli*ning $\sim 8 \cdot 10^6$ darajali nukleotidlarga ikki ming promotor to'g'ri keladi.

Gen-operator (eukariotlarda faollanadigan bo'lim) deb ataluvchi qismlarga regulyatorli oqsillar – repressorlar bog'lanadigan DNKning bo'lagidir.

Strukturali genlar o'z ichiga ma'noli qismlar – ekzonlarni va ma'nosiz bo'limlar – intronlarni qamraydi.

Molekulyar mikrobiologiya

Terminator DNKning shunday nukleotid qatoriki, transkripsiyani to'xtatadigan bo'lim hisoblanadi.



Transkripsiya jarayonida ishtirokm etadigan qismlar.

Transkripsiyani boshlanishi uchun RNK-polimeraza DNK molekulasidagi promotorni topib u bilan bog'langandan so'ng mazkur jarayon boshlanadi. Prokariot va eukariotlardagi promotorlarning funksional nukleotid qatorlari aniqlangan. Bakteriyalardagi promotorda ikkita nukleotid bloki funksional vazifani bajaradi. Birinchisini Pribanov (TATAAT nukleotid qatorli) bloki bo'lib, u 5'-tomonining oxirida joylashgan. Ikkinchi blok (TTGASA qatoridan iborat) promotorning o'rtalarida bo'ladi.

Eukariotlardagi promotorlarda ham bir juft funksional bloklar bo'lib, birinchisi Xognes (TATAAA) qatori RNK sintezi yaqinroq joyda, ikkinchi blok (SAAT) promotorning o'rta qismida joylashgan. Transkripsiya eukariotlarda DNKning enxanserli deb ataluvchi maxsus qismlari orqali boshqarilib turadi. Bu jarayonda o'ziga xos oqsillar sintezlanib, ular transkripsiyani jadallashtiradi. Promotorlarning samaradorligi ularning nukleotid qatoriga va DNK bilan bog'lanuvchi regulyatorli oqsillarga bog'liq.

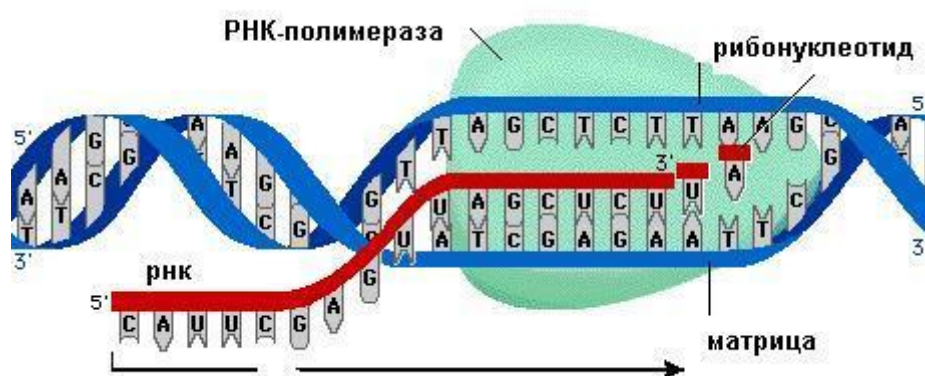
RNK sintezining terminatsiyasi DNK molekulasidagi uzun AT-qatorli nukleotidlar belgilaydi. Ularni DNKdagi terminator yoki stop – belgisi deyiladi. Prokariotlarda r–omilli oqsillar terminatsiyada RNK molekulasini DNK – matritsasiidan ajratadi.

Transkripsiya omillari quyidagicha:

1. DNK-matritsa (qolip) bo'lishi kerak. DNK-matritsa uchun DNK o'zi qisman denaturatsiyaga uchragan, qo'sh zanjir bo'lmagan holda bo'lishi lozim. Transkripsiya replikatsiyadan farqli o'laroq DNKning fragmentlarida sodir bo'ladi.

2. Substratlar zarur. Ular to'rt xil ribonukleozidtrifosfatlar (ATF, GTF, StTF, UTF) bo'lib, makroerg bog'larning uzilish hisobiga transkripsiya amalga oshadi.

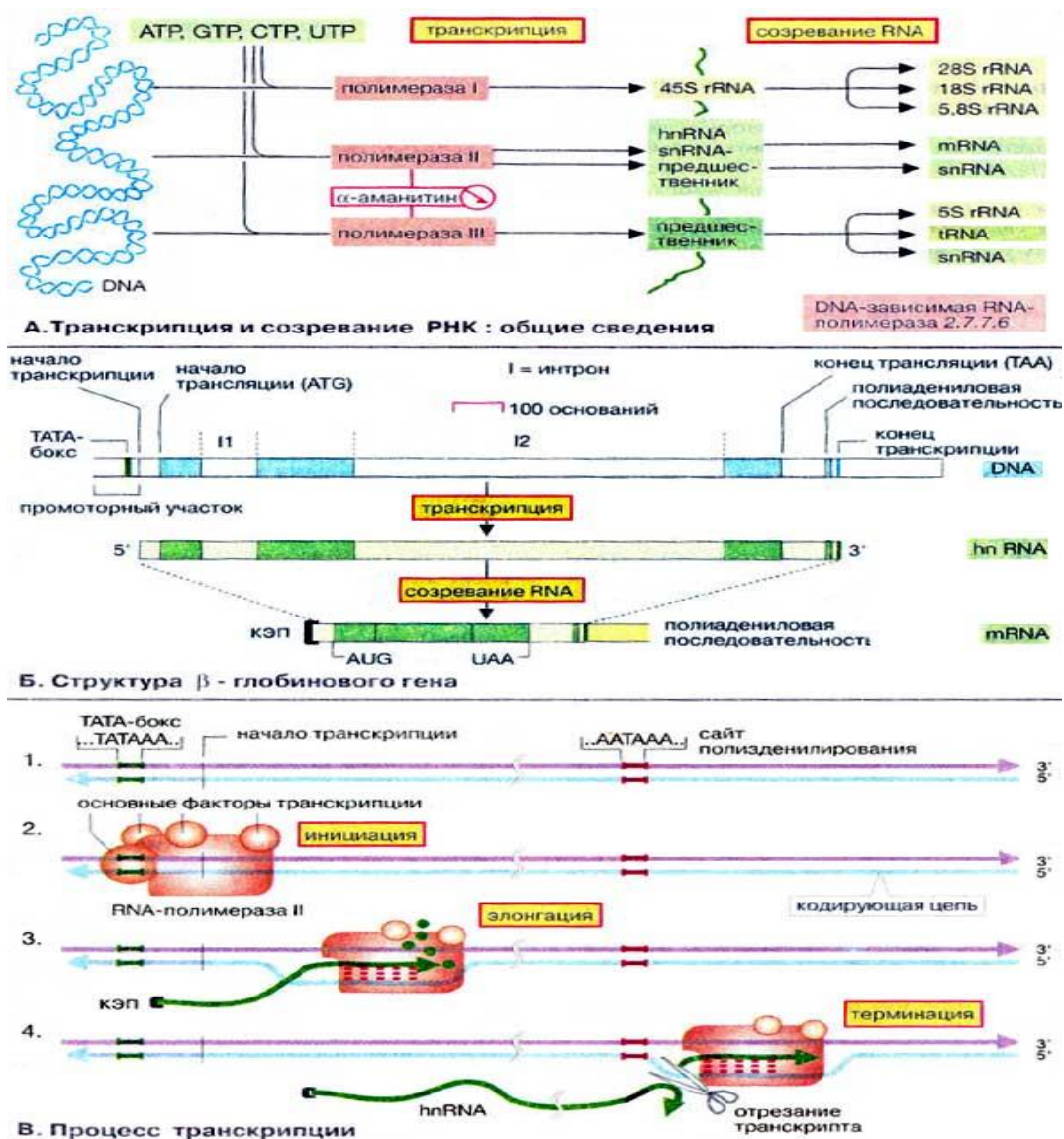
Transkripsiya jarayoni DNKga bog'liq RNK-polimeraza fermenti ishtirokida sodir bo'ladi. RNKni sintezlanishi uchun ikki zanjirli DNK yechilib, uning bitta makromolekulasida qisqa masofali transkripsiyani boshlovchi "pufakcha" shakllanadi.



Prokariotlarda transkripsiya DNKning taxminan 17 juft nukleotidlar masofasidagi qismida sodir bo'ladi. DNK molekulasi qo'sh zanjirli bo'lganligi uchun transkripsiyani amalga oshiruvchi "pufakcha" harakatining oldingi qismida musbatli supero'ram orqasida esa manfiylik supero'ramlar hosil bo'ladi.

Prokariotlarda iRNK, t-RNK va r-RNKlarning sintezi bir xil RNK-polimeraza fermentlari orqali amalga oshadi. Mazkur fermentlarni molekula soni E.coli hujayrasida yetti mingtagacha boradi. Bakteriyalar orasida yaxshi o'rganilgan RNK polimeraza E.colining fermenti hisoblanadi. Transkripsiya jarayoni va unda qatnashadigan fermentlar prokariotlarda yetarlicha tadqiq qilingan. E.coli hujayralaridagi RNK-polimeraza murakkab oqsil bo'lib, bir necha subbirliklardan tashkil topgan. Mazkur ferment tarkibida ikkita alfa zanjir, bitta beta- va bitta beta-shtrix zanjirlar va sigma – molekulalarni tutadi. Hammasi bo'lib besh xil subbirliklardan tashkil topgan. Xoloferment RNK-polimeraza bakteriya operonining promotor qismini topib, transkripsiya boshlovchi initsiatsiyani boshlashda bevosita uning subbirliklari ishtirok etadi.

Molekulyar mikrobiologiya



Transkripsiya jarayoni borishi mexanizmi.

Eukariot hujayralarda uch xil yadroviy RNK-polimeraza-I, -II, -III turlari tadqiq qilingan. RNK-polimeraza-I yadrochada bo'lib r-RNKni sintezida, RNK-polimeraza-II i-RNK hosil bo'lishida, RNK-polimeraza-III esa t-RNK va 5S-rRNK biosintezini amalga oshiradi.

RNKning sintezi uch bosqichdan (initsiatsiya, elongatsiya va terminatsiya) iborat. RNK transkripsiyasining initsiatsiyasi RNK-polimerazaning sigma subbirligi orqali DNKdagi promotor qismini topib, u bilan bog'lanadi. DNK molekulasida sintezlanayotgan RNK ning nukleotid qatori taxminan sakkiztaga etganda fermentdagi sigma subbirlilik xolofermentdan ajralib, navbatdagi RNK-polimeraza bilan

bog'lanadi. Yangi sintezlanayotgan RNK molekulasining oxiri 5'- va 3'- tomonlari bilan yakunlanadi.

Transkripsiyaning initsiatsiyasida fermentning DNKdagi promotorni topa bilishi katta ahamiyat kasb etadi. Chunki promotor RNK sintezi uchun DNKning matritsa bo'ladigan joyi aniqlanadi. RNK- polimeraza DNKdagi 5'- TATATT - 3'- bo'lgan qismni Pribanov boksi deb atalib, xuddi shu joydan promotor boshlanadi. DNKning aynan shu qismlarida A-T xildagi mustahkam bo'lmagan vodorod bog'lari bo'lganligi uchun qo'sh zanjirning ochilishi oson kechadi. Zanjirning qisqa ochilgan joyidan RNKning sintezi komplementar asosda (A-U, G-S) boshlanadi.

Transkripsiya bosqichining elongatsiyasida RNK-polimeraza RNK zanjirini 5' — 3'- yo'nalishi bo'yicha DNK-matritsa asosida sintezlanadi. Elongatsiyaning tezligi sekundiga 50 nukleotidlarni bog'lashdan iborat.

Transkripsiyada nukleotidlarning joylanishida hatoliklar ham sodir bo'ladi. 10^{10} juft nukleotidlarga bitta xatolik ehtimolligi mavjud. Aksariyat xatolik kodonning uchinchi nukleotidga to'g'ri keladi, kodlanishning "asldan chekinish" xususiyati bo'lganligi uchun, mazkur xatolikning biologik ahamiyati jiddiy bo'lmaydi.

RNK molekulasining elongatsiyasi RNK-polimeraza fermentining DNK matritsadagi terminirlovchi nukleotid qatoriga borguncha davom etadi. Xuddi joyda RNK molekulasining uzayishi to'xtab, transkript va RNK-polimeraza DNK-matritsadan ajraladi. Terminatsiya jarayonida vodorod bog'lari bilan bog'langan vaqtinchalik juftlik -DNK-RNK gibridlar bir-birlaridan ajraladilar.

DNK molekulasidagi transkripsiyani to'xtatuvchi zanjirni terminator deyiladi. U yer o'ziga xos nukleotid qatorini tutib-stop-belgilovchi joy deb nomlangan. Prokariot terminatorlarida qo'sh zanjirli palindrom deb ataluvchi qismlar mavjud. Palindromli nukleotid qatorlari ikkita qarama-qarshi tomonli nukleotidlar bir xil joylashadi.

5' – GGTASS – 3'

3' – SSATGG – 5'

Shunday qaytariladigan nukleotidlar qatori RNK sintezida "shpilkalarni" yoki DNKda esa o'zaro kesishgan ikki chiziqdan iborat – xochlarni shakllanishiga sababchi bo'ladi. Bunday shpilkalar terminatorlik vazifasini o'tab, ular tarkibida G-S juftlari ko'p uchraydi. DNK molekulasidagi promotordan terminatorgacha bo'lgan masofani

Molekulyar mikrobiologiya

transkriptonlar deb ataladi. Ta'kidlash lozimki, DNK molekulasi hammasi transkripsiyada ishtirok etmay, balki, ma'lum qismlari qatnashadi.

Informatsion RNKning transkripsiyasi boshqa RNKlarning sintezidan o'ziga xosligi bilan farqlanadi. Birinchidan, eukariotlarda i-RNKning 5'- tomoni "kep" (qalpoqcha) shakllanib, RNK – polimeraza-II ishtirokida 7-metil guanozinni bog'laydi. Informatsiya RNKning bunday modifikatsiyasi ekzonukleaza fermentlarining ta'siridan saqlanishga qaratilgan bo'lsa, qo'shimcha yana i-RNKni stitoplazmagacha ko'chirilishiga va ribosoma bilan bog'lanishiga yordam beradi. Ikkinchidan ferment poli-A-polimeraza i-RNKning ikkinchi 3'-tomonini poliadenirlaydi. Informatsiya RNKning poliA qismi yangi sintezlangan transkriptonlarni CTABil xolatiga keltirib, translyatsiyada o'ziga xos vazifani bajaradi.

Transkripsiya jarayonida bitta emas, bir nechta RNK-polimeraza fermentlari ishtirok etadi. Ular DNK molekulasini bo'ylab ketma-ket harakat qiladilar. Mazkur fermentlar orasidagi masofa taxminan 300-500 nukleotid qatoriga teng. Shu sababdan transkripsiya konveyr asosida ishlab, bir vaqtda bir nechta xil to'liq shakllanmagan RNKlar (pre-RNK) hosil bo'ladi.

Eukariot organizmlarda transkripsiya jarayoni to'liq shakllanmagan i-RNK, r-RNK va t-RNKlarni sintezlaydi.

Shakllanmagan (pre-i-RNK) RNKning uzunligi shakllangan i-RNKga nisbatan bir necha marta ko'p bo'ladi. Bunday to'liq bo'lmagan RNKning molekula tarkibi besh-o'ntadan 20 mingga yaqin nukleotid bo'lib, bunday zanjirlar variabellik xususiyatiga ega bo'ladi. Mazkur molekulalarning tarkibida har xil transkriptlar, jumladan, speyserlar-kodlanishda qatnashmaydigan nukleotid qatorlari bo'lib, ular strukturali va regulyatorlik vazifalarini o'taydilar.

To'liq bo'lmagan transkriptlarning 5'- tomonida "kep" – (qalpoqcha) va 3' – oxirida esa poli A-fragmentlari bo'lmaydi. Aksariyat, hamma eukariotli pre-i-RNKlar to'liq shakllanganda bir molekula bo'lib, faqat bitta polipeptid zanjirni sintezi haqida axborot saqlaydi. Mazkur qoidadan istisno tariqasida gistonli pre-i-RNKni keltirish mumkin.

Eukariot organizmlarda gistonli genlar uzun, bitta molekula pre-i-RNK sintezlanib, tarkibida beshta giston oqsilini tutuvchi axborot saqlanadi. Mazkur pre-i-RNK to'liq shakllanganda ular beshta alohida

gistonli i-RNKga ajraladi. Takidlash lozimki, hamma shakllangan i-RNKlar eukariotlarda monosistronli bo'lib, tarkibida faqat bitta polipeptid zanjiri va uning strukturasi haqida ma'lumot uzatadi.

Shakllanmagan 45S RNK keyinchalik uch xil r-RNK-18S-, 5,8S- va 28S- r-RNK ajraladi. Mazkur uch turli r-RNKlar klasteri DNKdan bir butun zanjir sifatida transkribirlanadi. Ular keyinchalik speyser orqali ajralib, intron ismlari bo'lmaydi.

Transport RNKning shakllanmagan molekulasini bir zanjirdan iborat bo'lib, birlamchi transkripti "beda bargi" sifatida hosil bo'ladi. Shunday holatdagi molekulada akseptorli tugunchasi (SSA) va antikodon qismi shakllanmaydi.

Transkripsiya jarayonida hosil bo'lib, shakllanmagan RNK molekulari funksional holatga aylanishi uchun ular presessing va splaysing orqali yetilishlari zarur bo'ladi. Genetik mahsulotning o'zi va har xil RNKlarning shakllanishida metillanishi, atsetillanishi, fosforlanishi va differensial splaysingi bo'lishi aniqlangan. Metilaza fermenti orqali DNK molekulasidagi sitozin 5-metilsitozinga aylanadi. Genomdagi DNKning metillanishi uning konformatsiyasini o'zgarishiga sababchi bo'lib, o'z navbatida transkripsiya jarayoniga ta'sir qiladi.

Transkripsiya jarayonini boshqaruvchi omillardan yana biri genomdagi giston oqsillarini atsetilirlanishidir. Mazkur reaksiya gistonatsetiltransferaza orqali amalga oshadi. Atsetil-koenzim A dan atsetil qoldig'ini ferment gistondagi lizin aminokislotaga uzatadi, natijada ulardagi musbat zaryadlar keskin kamayib, transkripsiya jarayonini boshlanishi yengillasadi. Agar giston atsetilirlanmasa transkripsiya kuzatilmaydi. Atsetilirlanish jarayoni DNK bilan giston orasidagi bog'larni bo'shashtirib, genlarga ta'sir qiluvchi transkripsiyani boshqaruvchi oqsillar ishini yengillashtiradi. Aksincha, deatsetilirlanish xromatin strukturasi mustahkamlab, transkripsiya faoliyatini to'xtatadi. Atsetilirlanish jarayoni qaytalama bo'lib, giston oqsillaridagi lizin qoldiqlariga bog'liq, ular esa oqsillar domenidagi amino guruhlarini tutgan molekulalarda joylashgan.

Transkripsiya jarayonini faollantirish omillaridan yana biri genomning fosforlanishidir. ATFga bog'liq fosforlanish gistonlardagi serin aminokislotaning radikali orqali amalga oshadi. Hosil bo'lgan fosfoserin muhitda manfiy zaryadlarni ko'paytirish hisobiga DNK bilan giston o'rtasidagi bog'lar mustahkam bog'lar bo'lmaydi. Natijada

Molekulyar mikrobiologiya

nukleosomalar tarkibidagi zich joylashgan DNK molekulalari orasidagi masofalar kengayib, transkripsiya jarayonining initsiatsiyasi va elongatsiyasi uchun sharoit paydo bo'ladi.

RNK molekulasining protsessingi va splayingsi

Transkripsiya jarayonida uch turdagi "birlamchi transkriptlar" yoki ularni shakllanmagan (pre-RNK) deb ataluvchi RNKlar hosil bo'ladi. Ularga shakllanmagan i-RNK-geterogenli yadroviy RNK (pre-i-RNK yoki gyaRNK), eukariotlarda yetilmagan r-RNK (pre-r-RNK) bo'lib, uning tarkibida 5,8S- RNK, 18S- RNK va 28S- RNK, prokariotlarda esa 5S-, 16S- hamda 23S- RNK tutuvchi ribonuklein kislotalar kiradi. Shakllanmagan RNKlardan yana biri pre-t-RNK sintezlanadi. Ko'rsatilgan pre-RNKlar operonning nusxalari bo'lib, tarkibida ma'noli (informativ) va ma'nosiz (noinformativ) qismlardan iborat. Transkripsiyaning yakunlovchi jarayonida funksional faol shakllangan RNKlarni hosil bo'lish tizimini protsessing deb ataladi.

RNKlarning protsessing faoliyatida ma'nosiz yoki noinformativ qismlarni kesilishi, informativ bo'lgan nukleotidlarni bir-birlariga ulanish jarayonini splayingsing deb ataladi. Ribonuklein kislotalarning splayingsi ulardagi 5'- va 3'- tomonlari orqali amalga oshadi.

Pre-i-RNKdagi noinformativ qismlarini ajratishda ribonukleaza yoki ribozimlar ishtirok etadi. RNKdagi intron yoki ma'nosiz qismlarni kesilishida kichik yadroviy (kyaRNK)larning ahamiyati katta ekanligi aniqlangan. Splayingsing jarayonida kichik yadroviy RNK birlamchi transkriptlarga DNKdagi zanjrlarga o'xshash komplementar bog'lanadi. Mazkur reaksiyalarda birlamchi transkriptlar o'ziga xos burilib tugunchalar hosil qiladi. Tugunchalarning o'zaro ferment yordamida yaqinlashuvi natijasida intron qismlar kesilib ekzonli nukleotidlar bir-birlari bilan ligaza fermentlari orqali bog'lanadilar. Ta'kidlash lozimki, kichik yadroviy RNKlar ekzonlarni bir-birlariga yaqinlashtirishda vaqtinchalik matritsalik vazifasini bajarib splayingsingni muayyan joyda bexato bajarilishini ta'minlaydilar. Ma'lumki, birlamchi RNK-transkriptlar (jumladan, kyRNK) oqsillarga o'xshash katalitik xususiyatga ega bo'lib, ularni ribozimlar deb atalgan. Ularning katalitik xususiyatlari oqsillar bilan birikib, ribonukleoproteinli kompleks hosil qiladilar. Ularni splayosomalar deb ataladi.

Hujayra yadrosida i-RNKning 5'- va 3'- tomonlari muayyan modifikatsiyaga uchraydi. Informatsiya RNKning oxiridagi 5'- tomoniga oligonukleotid bog'lanadi. Habar beruvchi RNKning mazkur

bo'lagini yuqorida ko'rsatilganidek "kep" (cap) yoki qalpoqcha deb ataladi. Ushbu qism ikki-uch metillangan nukleotidlardan, qalpoqchani so'ngi azot asoslari esa 7-metilguanozindan iborat bo'ladi. Informatsiya RNKning "qalpoqchasi" makromolekulani mustahkamlashda, fosfataza, nukleaza fermentlaridan himoya qilishda va yana i-RNKni ribosoma bilan bog'lanishda, bevosita ishtirok etadi.

Informatsiya RNK 3'-tomoni esa har doim poli-A-polimeraza fermenti ta'sirida poliadenilli nukleotidlar qatori shakllanadi. Mazkur qator 50-200 nukleotidlardan iborat bo'ladi. Poliadenilli "dum" ning i-RNKdagi funksiyasi aniq emas. Taxmin qilinishicha bu qism ham i-RNKni fermentlar ta'siridan himoya qiladi. Shakllangan i-RNK oqsil bilan birik informofer shaklida stitoplazmadagi ribosomaga transport qilinadi.

Splaysingni biologik ahamiyati keng ma'noda bo'lib, ekzonlar soni RNK molekulasida bir nechta bo'lsa, ular har xil variant-kombinatsiyalarda bir-biri bilan bog'lanishi mumkin. Yana shuni ta'kidlash kerakki, RNKdagi ekzonlar muayyan vaziyatlarda intron vazifasini o'tashi mumkin. Shunday kombinatsiya asosida i-RNKning shakllanishini "alternativli splaysing" deb ataladi. Demak, shunday xulosa qilish mumkinki, i-RNKdagi intron, ekzon qismlarining biror bo'laklari ortiqcha bo'lmay har xil oqsil sintezida informatsion RNKlar hillarini ko'paytirmay bir molekulani bir necha variantda foydalanish imkonini beradi.

Eukariot organizmlarning genlari intronlar tufayli uzun bo'lib, prokariotlar esa ular uzun bo'lmay, tekis holda bo'ladi. Intronlarning tarkibi turg'un bo'lib, ularning boshlang'ich azot asoslari G-S bo'lib, A-U orqali yakunlanadi.

Prokariot va eukariot hujayralarda ribosom RNKning sintezi umumiy birlamchi transkript (pre-r-RNK) sifatida hosil bo'ladi. Ribosom RNKning protsessingi yadrochada kechadi. Bakteriyalarda 30S- shakllanmagan RNKdan 16S, 23S va 5S RNKlar, eukariotlarda esa 45S pre-r-RNK dan 18S, 28S, 5,8S RNKlar hosil bo'ladi. Sintezlangan 45S RNK fermentlar ta'sirida modifikatsiyaga uchrab, shakllangan 18S, 5,8S va 28S – r-RNKga aylanadi. Boshlanishda 100ta nukleotidlar 2'-gidroksil orqali metillanadilar. Uridin azot asoslaridan 100 qoldig'i izomerlanib psevdouridina o'tadi. Yadrochadagi metillanish asosidagi protsessingda 5,8S –r-RNK va 28S –r-RNKlar ribosom oqsili bilan bog'lanib katta subbirlikdagi 60S-r-RNK

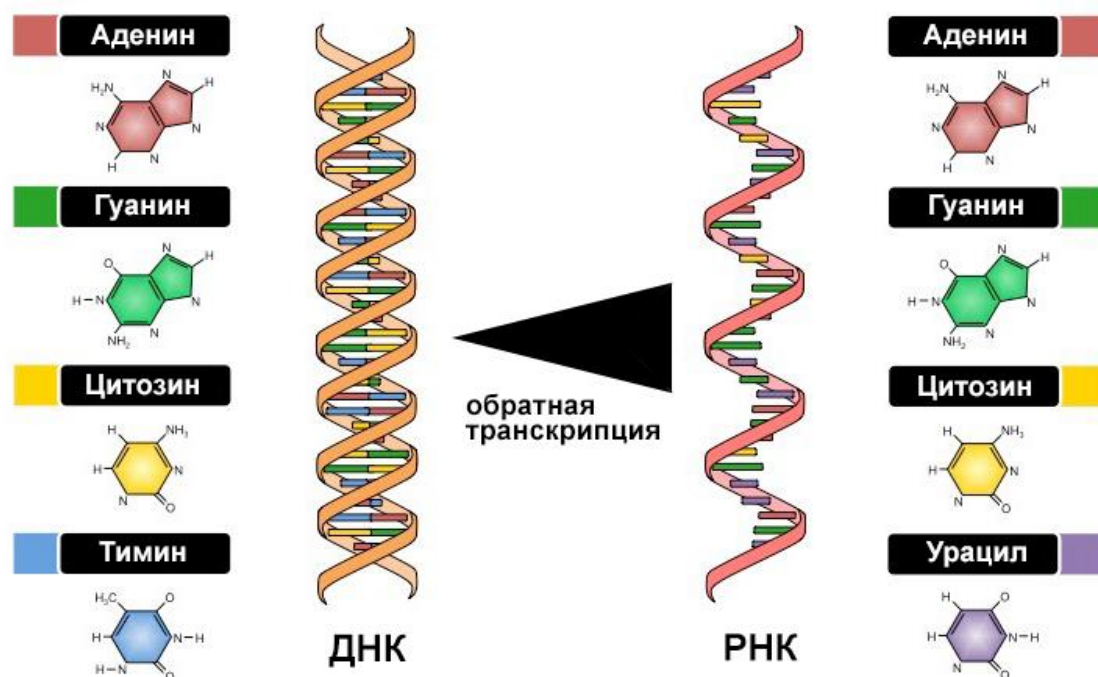
Molekulyar mikrobiologiya

shakllanadi. Oqsillar bilan bog'langan 18S-r-RNK esa kichik ribosom subbirligiga aylanadi. 5S RNK esa alohida sintezlanadi. Transport RNK boshlanishida katta molekula sifatida shakllanmagan holda sintezlanadi. Transport RNK ham bir nechta kichik molekulalardan hosil bo'ladi. Spetsifik ribonukleaza fermentlari tufayli t-RNK molekulasi nukleotid qatorida protsessing jarayoni kuzatiladi. Keyinchalik t-RNK molekulasidagi nukleotidlarning alkilirlanib o'ziga SSA tripletini 3'-tomoniga bog'laydi. Mazkur qism keyinchalik, aminokislotalar bog'lovchi akseptorlik nukleotid qatoriga shakllanadi. Shakllanmagan t-RNK ning metillanishi yadroda, SSA-tripletini bog'lanishi esa sitoplazmada amalga oshadi.

Teskari transkripsiya

Hayvonlarni kasallantiruvchi ayrim viruslar tarkibida RNK tutib, ularni retroviruslar deb ataladi. Mazkur viruslar tarkibida Zn^{2+} atomini tutuvchi RNKga bog'liq DNK-polimeraza fermentiga egadirlar. Bunday fermentlarni teskari transkriptaza yoki revertazalar deb ataladi. Bunday fermentlar uch turdagi katalitik faollikni o'zlarida tutadilar:

1. RNKga bog'liq DNK-polimerazalik (ya'ni RNK molekulasida DNK zanjirini sintezlaydi) xususiyati;
2. Ribonukleazalik sifatiga ega (RNK-molekulasini nukleotidlarga ajratadi);
3. DNKga bog'liq DNK-polimerazalik funksiyasi bor (DNK-matritsasida komplementar ikkinchi zanjir DNKni sintezlaydi)



Тeskari transkripsiya jarayoni.

DNK sintezi uchun virus RNKsi matritsa vazifasini o'taydi DNK sintezi uchun praymer bo'lishi zarur. Kasallikning boshlang'ich bosqichida virus tarkibida t-RNK sintezlanib, virusdagi RNKning 3'-tomoniga komplementar vodorod bog'lari orqali bog'lanadi. DNKning sintezi 5'-3' yo'nalishi bo'yicha polimerazalik reaksiya asosida sodir bo'ladi.

Teskari transkriptaza fermenti 3'-5'- yo'nalishidagi ekzonukleaza faolligiga ega emas. Shuning uchun DNK sintezidagi nukleotidlar joylanishi qatoridagi xatolik juda kam bo'lib, 20000 nukleotidan birga teng. Viruslardagi RNK asosida DNKning sintezlanish tizimini amalga o'ta aniqlik bilan amalga oshiruvchi fermentlar retrovirus genomiga xos xususiyatdir.

Virus orqali kasallangan hujayrada birinchi navbatda RNK-DNK kompleksli molekula, keyingi bosqichda esa teskari transkriptaza ta'sirida gibriddli molekuladan RNK ajratilib nukleotidlarga parchalanadi. So'ngi bosqichli reaksiyada hosil bo'lgan DNK matritsada komplementar asosida qo'sh zanjirli DNK sintezlanadi. Natijada genomda hosil bo'lgan DNK onkogen sifatida faoliyat ko'rsatadi. Mazkur DNKning bir qismi eukariot hujayraning genomiga bog'lanib, uzoq vaqt, xatto bir necha avlodlarda tinch, ekspressiyaga uchramagan holda bo'lishi mumkin. Lekin, ma'lum sharoitda, ijtimoiy, fiziologik, kimyoviy, fizikaviy omillar ta'sirida virusdagi genlar

Molekulyar mikrobiologiya

(onkogenlar) faol holatga o'tib replikatsiyaga uchraydilar. Ayrim holatlarda esa ko'rsatilgan viruslar oddiy hujayralarni rakli to'qimalarga aylantirishlari ham mumkin.

Yuqoridagi bayon qilingan fikrlar asosida molekulyar biologiyaning zamonaviy tahliliga suyangan holda quyidagi postulatlarini xulosa sifatida qabul qilish mumkin:

DNK → RNK → Oqsil, irsiy axborot oqimi DNK matritsasida DNK sintezlanadi (replikatsiya), DNK matritsasida RNK sintezlanadi (transkripsiya), RNK molekulasida oqsilni sintezlanishi (translyatsiya), RNK matritsasida ayrim viruslarda RNK replikatsiyasi sodir bo'lib, va nihoyat RNK matritsasida DNKning sintezi teskari transkripsiya (retroviruslar) jarayonlarini tirik hujayrada kuzatish mumkin.

TRANSLYATSIYANING MOLEKULAR ASOSLARI

Zamonaviy tabiatshunoslik fanining ikkita muhim muammolaridan biri-tirik hujayrada oqsillar biosintezidir. Ikkinchisi esa noorganik tabiatda insoniyat uchun kelgusida energiya ajratish elementar zarralarning fizikaviy tadqiqoti asosida amalga oshishi mumkin. Tirik tabiatda hayotiy jarayonlarni boshqarish oqsillarni o'rganish asnosida sodir bo'ladi.

Organizmning tiriklik belgisi muayyan oqsil yoki oqsillar kompleksi orqali namoyon bo'ladi. Jonzotlarning biologik belgilari quyidagi generatsiya asosida amalga oshadi:

DNK → RNK → OQSIL → BELGI

Ma'lumki, sochimiz va terimizning rangi melonin degan pigmentga bog'liq bo'lib, albinoslarda u bo'lmaydi. Melanin sintezi oqsil – ferment tirozinazaga bog'liq. Mazkur oqsilning mutatsiyasi yoki inaktivatsiyasi albinoslarning paydo bo'lishiga sababchi bo'ladi. Oqsillarga bog'liq bunday jarayonlarni organizmda juda ko'p kuzatish mumkin.

Oqsillar biosintezini to'liq aniqlash irsiyat qonunlarini tadqiq qilish, organizmlarni o'sish va rivojlanishini boshqarish, turli xil irsiy kasalliklar sabablarini aniqlash, davolash va boshqa bir qator muammolarni hal qilishga imkon yaratadi.

Oqsillar sintezi organizmda intensiv ravishda amalga oshadi. Odam jigarida 10 kun davomida oqsillarning yarmi yangilanadi. Qon zardobida 20-30 kunda oqsillar almashinadi. Har kun inson tanasida

100 g oqsil sintezlanishi lozim. Bir kunda odam qonida 8 g gemogloblin, 23 g jigar oqsili va 32 g mushak oqsillari sintezlanib turadi.

Hujayrada oqsillarning sintezi xuddi nuklein kislotalardek, matritsa (qolip) asosida amalga oshadi. Mazkur jarayon murakkab va bir necha bosqichlardan iborat. Oqsillarning biosintezi oqsil sintezlovchi muayyan tizim bo'lib, uning tarkibiga quyidagi strukturalar kiradi:

- ribosomalar-nukleoprotein zarralari bo'lib, tarkibida 60% ribosom RNK va 40% oqsil mavjud. Uzunligi 160Å, diametri 250Å, molekulyar massasi 1 mln. Bir qancha ribosomlar to'plami poliribosoma yoki polisomalar deb ataladi;
- matritsa RNK;
- transport RNK;
- oqsil sintezidagi bosqichlar bo'lmish initsiatsiya, elongatsiya, terminatsiya va translyatsiya jarayonlarini amalga oshiruvchi oqsillar va fermentlar;
- proteinogenli aminokislotalar;
- amioatsil-t-RNK larni hosil qiluvchi amioatsil-t-RNK-sintetaza fermentlari;
- makroergli nukleozidtrifosfatlar ATF va GTF;
- Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+ ionlari.

Oqsil biosintezida 200 dan ortiq makromolekulalar ishtirok etadi. Bular oqsillar va nuklein kislotalari bo'lib, faqat aminokislotalarni faollashtirish va tashilishi uchun 100 ta makromolekulalar zarurligi aniqlangan. Ribosoma 60 xil makromolekuladan tashkil topib, translyatsiyada 10 dan ortiq oqsil turlari ishtirok etadi.

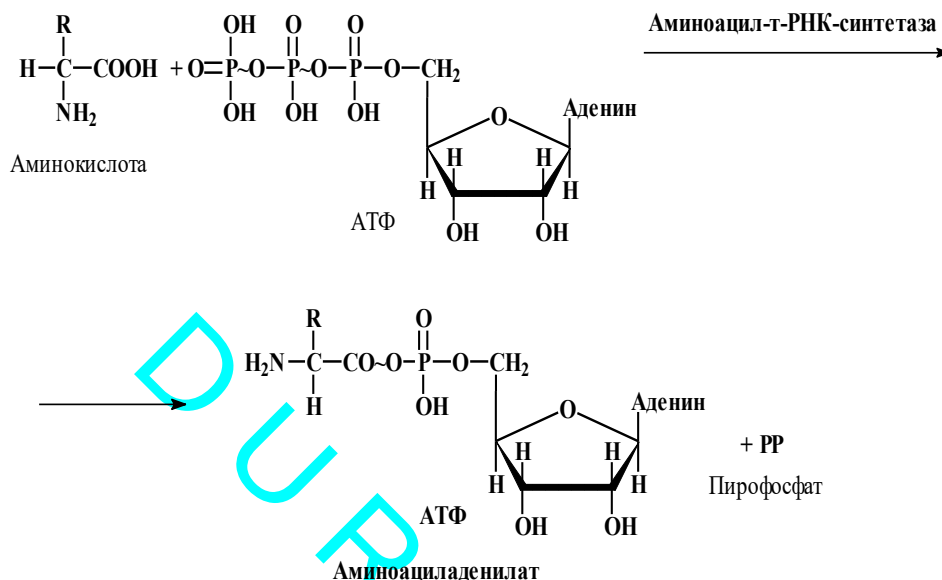
Aynan ribosomalarda jonsiz molekula bo'lgan nuklein kislota jonli oqsillarga aylanadi. Demak, ribosomalarda kimyo biologiyaga shakllanadi.

Aminokislotalarning faollashuvi va rekognitsiyasi

Hujayra sitoplazmasida aminokislotalar erkin holatda bo'lmay, balki amioatsil-t-RNK ko'rinishida bo'ladi. Aminokislotalarning bu holati ularni metabolitik jarayonlardan saqlanishini va oqsil sintezini boshlab berishga qaratilgan. Aminokislota-t-RNK kompleksi aminokislotalarni faollantirishga va uni maxsus t-RNK ni topib, birlashishini (rekognitsiya) ta'minlaydi. Mazkur jarayon amioatsil-t-RNK-sintetaza (ARS-aza) fermenti ishtirokida sodir bo'ladi. Bu

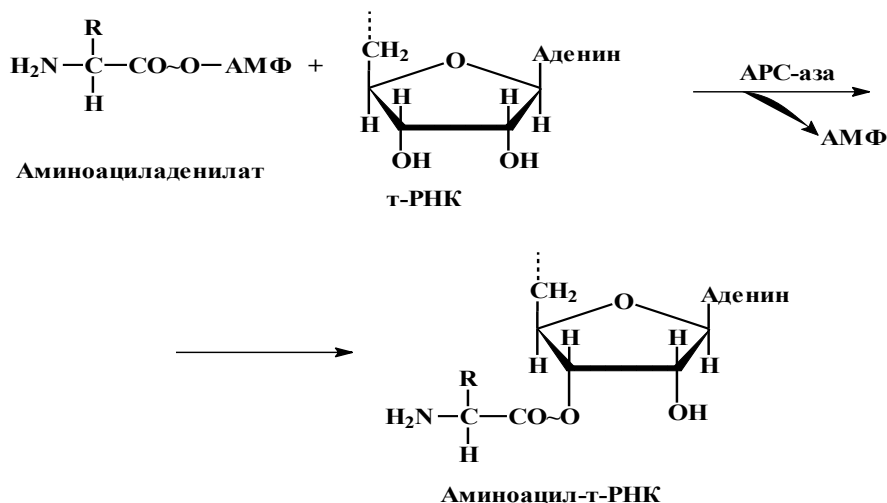
Molekulyar mikrobiologiya

fermentlarda ikkita faol markaz bo'lib, biri maxsus t-RNK uchun bo'lsa, ikkinchisi esa muayyan aminokislota mo'ljallangan bo'ladi. Shunday qilib, hujayrada 20 dan kam bo'lmagan ARS-azalar borligi aniqlangan. Aminokislotalar ribosomaga borib, peptidlar hosil qilguncha bir necha bosqichlardan o'tishi zarur:



Formuladan ma'lumki, aminoatsiladenilat aminokislotaaning angidridi, fosfor kislotasining qoldig'i adenzin-5-fosfatdan iborat. Angidrid bog'ini hosil qilishda kislorodning donori sifatida aminokislota karboksil guruhi xizmat qiladi. Angidrid holatdagi aminoatsiladenilatlar juda osonlik bilan keyingi reaksiyalarga kirishadi. Har bir aminokislota o'ziga xos ARS-azalari borligi yuqorida ta'kidlangan edi. Ushbu reaksiya yana pirofosfat ham hosil bo'ladi. Hujayra suyuqligida pirofosfataza fermenti borligi tufayli pirofosfat tezda gidrolizga uchraydi. Shuning uchun, aminoatsiladenilatni hosil bo'lishi qaytalama bo'lmasdan, bir tomonlama reaksiya.

Aminokislota keyingi bosqichida aminoatsiladenilatdagi qoldig'i t-RNK ning oxirgi qatoridagi adeninga tegishli ribozadagi 3^l-uglerod atomiga bog'lanadi.



Uzoq vaqtlar davomida aminoatsil guruhi faqat adenindagi ribozaning 3^I- uglerod atomiga bog'lanadi, deb kelar edik. Keyinchalik ma'lum bo'lishicha, shunday vazifani ribozadagi 2^I-uglerod atomi ham bajarishi mumkin ekanligi aniqlandi. Jumladan, fenilalanin, leytsin va izoleytsinlar qoldiqlari ribozaning 2^I-uglerod atomidagi gidroksil guruhiga ARS-aza orqali bog'lanadi. Serin va treonin aminokislotalari ribozaning 3^I-uglerod atomiga bog'lanadilar. Tirozin va sisteinlar esa ribozaning 2^I-va 3^I-uglerod atomidagi gidroksilga bog'lanadilar. Amioatsil-t-RNK ribozaning 2^I-uglerod atomidan 3^I-uglerod atomiga va teskari tomonga ko'chirilishi mumkin.

Hosil bo'lgan amioatsil-t-RNK o'z aminokislotasini ribosomaga yetkazib, u yerda peptidlanish jarayoni ketadi. Hujayrada oqsilning sitoplazmatik sintezi aminokislotaaning faollashishi, transport RNK bilan bog'lanishi va ribosomaga ko'chirilishidan iborat:

Oqsillarning biosintezi oqsil sintezlovchi mikrofabrika bo'lmish ribosomalarda sodir bo'ladi. Ribosomalar ko'p komponentli oqsil sintezlovchi tizimni o'zida qamrab, genetik informatsiyani to'liq o'qilishi va realizatsiyasini bexato amalga oshiradi. Ribosomalar katalitik xususiyatga ega bo'lib, peptid bog'larini hosil qilib, peptidil-t-RNK ni mexanik ravishda ko'chirilishini ham ta'minlaydi. Ular o'zlarining asosiy vazifalari oqsillarni sintezlashdan tashqari, ribosomalar xususiy biogenezlarni ham amalga oshiradi.

Hujayrada oddiy holatda ribosomalar faol bo'lmay, subbirliklari birga assotsiatsiya holatida bo'lmay, ajralgan ko'rinishda bo'ladilar. Transkripsiya jarayonida hosil bo'lgan i-RNK ribosomaga

Molekulyar mikrobiologiya

bog'langandan so'ng u faol holatiga o'tadi. Ribosomalar faol holatda oqsillarni genetik kod asosida sintezlaydi.

Genetik kod

“Kod” yoki “Shifr” degan so'zga duch kelsangiz, harbiylardagi razvedkachi va josuslarning sirli xatlari va belgilari ko'z oldingizga keladi. Umuman olganda, har qanday savodli odam har doim rang-barang kodlarning muayyan kalitlar bilan ochilishini ishtirokchisi bo'ladi.

Bizning xatimiz ham kod bo'lib, ayrim belgi- -harflar ma'lum tovushlarga mos keladi. Xuddi shunga o'xshash DNK dagi nukleotidlar harf bo'lsa, oqsildagi aminokislotalar tovush vazifasini bajaradi. Masalan, “A” tovushi maxsus harf orqali belgilanib, boshqa tovushlar ham shunga o'xshash harflar orqali ifodalanadi.

Nuklein kislotalar nukleotidlardan, oqsil esa aminokislotalardan tashkil topgan:

$n^1-n^2-n^3\ldots\ldots n^m$ nuklein kislota

$\alpha_1-\alpha_2-\alpha_3\ldots\ldots\alpha_n$ oqsil

Oqsildagi aminokislotalarning ketma-ket joylanish tartibi, nuklein kislotalardagi nukleotidlarning muayyan joylashgan o'rniga bog'liq. Nuklein kislotalardagi nukleotid o'rnini o'zgarsa, oqsildagi aminokislota qatori ham o'zgaradi. Ko'pchilikka ma'lumki, Morze alifbosi orqali xabarlar va telegrammalar shaharlardan shaharlarga uzatiladi. Morze alifbosining harflari qisqa va uzun belgilardan, ya'ni nuqta, tirelardan iborat. Masalan, A harfi •— belgisi, B esa — bilan belgilanadi. Shartli belgilarni yig'indisi kodga misol bo'ladi. Bu yerda ham harflarning ko'rinishi nuqta, tirelarning joylanishiga bog'liq. Yuqoridagi misollarga asosan bir ob'jektning ko'rinishi (oqsildagi aminokislotalarning joylanishi, Morze alifbosi bo'yicha harflarning ko'rinishi) ikkinchisining (nuklein kislotalardagi nukleotidlarga, Morze alifbosidagi nuqta, tirelarga) bog'liq bo'lsa, kibernetikada kodlanish tizimi deyiladi.

Sintezlanadigan oqsil molekulasidagi aminokislotalarning joylanish tartibi to'g'risidagi informatsiya DNK molekulasidagi ‘ xil mononukleotidlar yordamida ifodalanishiga genetik kod deb ataladi.

DNK molekulasidagi nukleotidlar soni faqat ‘ ta bo'lganligi uchun bitta nukleotid yagona aminokislota ifoda eta olmasligi ma'lum. Xuddi shunga o'xshash, ikkita nukleotiddan tashkil topgan juft to'plami

ham (dupletli) 20 ta aminokislotani ifodalash uchun kifoya qilmaydi. Shuning uchun G.Gamov (AQSh) genetik kod 3 ta nukleotid to'plamidan (tripletli koddan) tashkil topgan bo'lishi kerak degan g'oyani ilgari suradi. Ingliz olimi F.Krik kod hosil bo'lishida 3 ta nukleotid qatnashishi mumkinligini nazariy hisoblab, triplet kodini kodon deb atashni taklif etgan. 1961 yilda M.Nirenberg o'z shogirdlari bilan birgalikda sintetik polinukleotid matritsa-poliuridin kislotadan foydalanib, triplet kodini tasdiqlagan. Bunday matritsa E.coli hujayra shirasi yordamida faqat polifenilalaninni sintezlashi kuzatilgan. Polistitidil esa poliprolinni, poliadenil esa polilizinni sintezlar ekan. Shu sababli UUU tripleti finilalaninni, SSS prolinni, AAA lizinni kodlashini aniqlangan.

Tajribalar tufayli, oqsil tarkibida uchraydigan barcha aminokislotalarni ifodalovchi tripletlar aniqlandi. Keyinchalik F. Krik ularni juftlab, shu asosda genetik kod lug'atini tuzdi.

Ikkinchi harf

		U	C	A	G		
Birinch harf	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G	Uchinchi harf
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

Genetik kod jadvali.

Rasmda keltirilgan 64 ta tripletlar oqsil sintezini boshlovchi va tugallanishini ta'minlovchi tripletlar borligi aniqlandi. Bir aminokislotani ifodalovchi tripletlar bir-biriga o'xshash bo'ladi.

Molekulyar mikrobiologiya

Masalan, valin aminokislotasini ifodalovchi tripletlarning barchasi GU dupleti bilan boshlangan. Bunday hollarda kod tripletlar yordamida ifodalansa ham, lekin aminokislotalarning ifodalovchi informatsiya faqat boshlang'ich ikkita nukleotidda mujassamlashtirilgan bo'ladi.

Kodon bilan antikodon bog'lanishining diqqatga sazovor tomonlari borligi aniqlangan. Jumladan, kodondagi birinchi va ikkinchi azot asoslari antikodondagi nukleotidlar bilan komplementar azot asoslari o'rtasida mustahkam bog'lar orqali bog'lanadi. Kodondagi uchinchi azot asoslari esa antikodondagi azot asoslari o'rtasida bog' mustahkam bo'lmaydi va ularning o'zaro komplementar bo'lishi ham shart emasligi aniqlangan. Shunday jarayonni ma'noga ega bo'lmagan moslashuv mexanizmi yoki azot asoslari o'rtasidagi tebranish fenomeni deyiladi. Shunday yuritmaga asosan, antikodondagi urastil kodondagi faqat adenin bilan bog'lanmasdan, guanin orqali ham kimyoviy bog'lanadi. Antikodondagi guanin kodondagi sitozin va urastil bilan ham bog'lanishi mumkin. Bunday hodisa shuni ko'rsatadiki, bir necha kodonlar bitta aminokislotani ifodalashni bildiradi. -jadvaldan bilish mumkinki, bir necha aminokislotalar ikkita va undan ko'proq antikodonlar bilan ifodalanishi mumkin. Faqat ikkita aminokislotametionin va triptofanlar bitta kodonlar orqali kodlanadi. Qolgan aminokislotalar uchun kodonlar soni ikkitadan (arginin va stistein uchun) oltitagacha (leytsin va serin uchun) bo'lishi mumkin.

Bitta aminokislotaning bir necha triplet yordamida ifodalanishini genetik kodning "asldan chekinishi, ayniganligi" hodisasi deb ataladi. Mazkur hodisaning biologik ma'nosi shundan iboratki, oqsil sintezini yengillashtirishda t-RNK ni i-RNK dan tez ajralishini va mutatsiyaning zarar yetkazuvchi ta'siriga turg'unlikni oshirishni ta'minlaydi

Ma'lum bo'lishicha, barcha tirik organizmlarda mikroorganizmlardan tortib odamlargacha genetik kodning faoliyati bir xil, universal ekanligi aniqlangan. Yuqoridagi ma'lumotlarga asosan genetik kodning asosiy xususiyatlarini quyidagicha ifodalash mumkin:

- genetik kod triplet bo'lib, bitta aminokislotani uchta nukleotid kodlaydi;
- triplet kodlari faqat bitta aminokislotani ifodalaydigan o'ziga xos, spetifik xususiyatga ega;
- bitta aminokislotaga bir nechta tripletlar orqali kodlanadigan "asldan chekinish" xususiyatiga ega;
- genetik kod barcha tirik organizmlar uchun bir xil-universaldir.

- barcha organizmlarda kod chiziqli, bir tomonlama va bir-birini qoplamaydi. Genetik informatsiyaning boshlanishi va oxirgi nuqtalariga ega;
- genetik kodning asosiy qismi tinish belgilariga ega emas. Triplet kodlar o'rtasida ularni bir-biridan ajratuvchi nuqta, vergul, tirelar bo'lmaydi.

Translyatsiyaning initsiatsiyasi

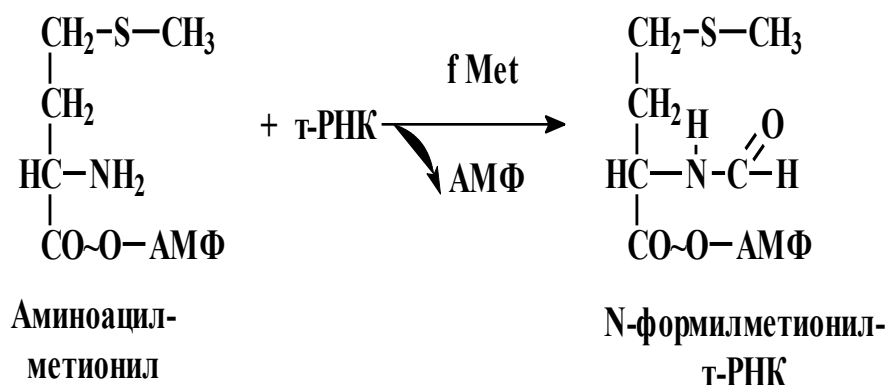
Oqsil sintezlovchi mikrofabrika bo'lmish ribosomalar DNK dan genetik axborot i-RNK (kod) va oqsil sifatidagi omillarni qabul qilgandan so'ng, murakkab jarayon bo'lgan oqsil sintezini boshlang'ich bosqichi boshlanadi.

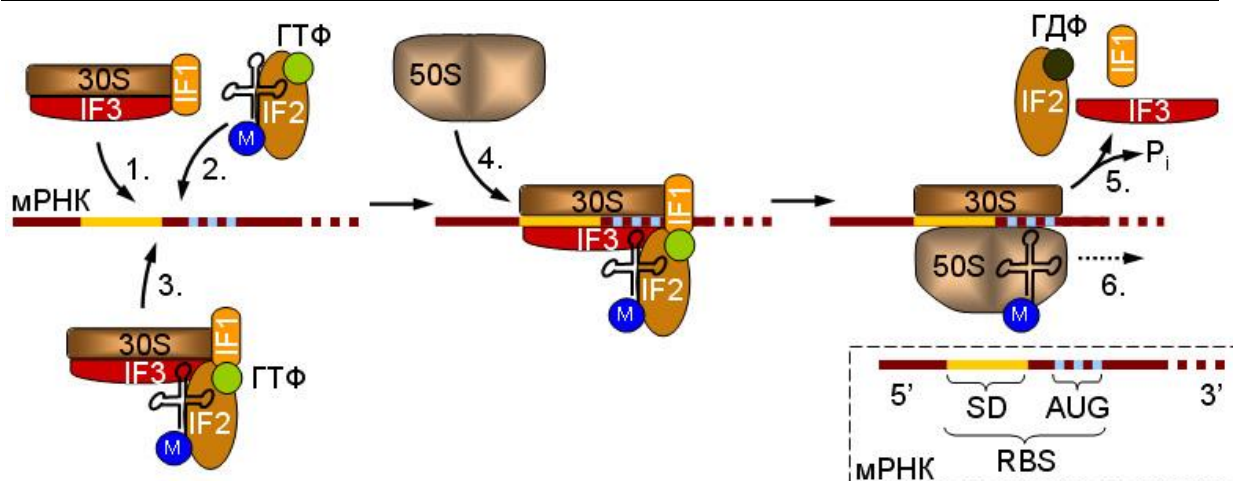
To'liq ribosoma hosil bo'lganda uning tarkibida ikkita translyatsiya markazlari--donorli (peptidil, R-markaz) va akseptorli (amioatsil, A-markaz) markaz shakllanadi (-rasm).

Oqsil sintezining initsiatsiyasi kichik inistirolovchi komplekslarning hosil bo'lishidan boshlanadi. Shakllangan kichik kompleks katta inistirolovchi kompleks bilan bog'lanadi. Ularning tarkibi quyidagicha: ribosomlar, i-RNK, amioatsil-t-RNK, inistirolovchi oqsil omillari (IF₁, IF₂, IF₃) va GTF lardan iborat.

Eukariot hujayralarda inistirolovchi aminokislota metionin bo'lib, u t-RNK bilan bog'langan bo'ladi. Prokariotlarda bunday vazifani formilmetionin bajarib, u fMet-t-RNK^{fMet} kompleks holatida bo'ladi. Shuningdek i-RNK molekulasida maxsus inistirolovchi kodonlar borligi aniqlangan.

Prokariotlarda inistirolovchi kodonlar sifatida AUG, GUG, ayrim vaqtlarda UUG lar bo'lib, ular translyatsiyaning initsiatsiyasida t-RNK dagi 3ⁱ-UAS antikodon bilan bog'lanadi.





Prokariotlarda translyatsiya jarayonining initsiatsiya bosqichi sxemasi.

Dastlabki bosqich kichik ribosoma subbirligini (30S) mRNA bilan bog'lanishini o'z ichiga oladi. Bu ikki yo'l bilan sodir bo'lishi mumkin: birinchisi ribosoma bo'linmasi (1) ni o'z ichiga olgan kompleks dastlab mRNAga biriktiriladi, so'ngra tRNA IF2 va GTP (2) bilan kompleksda unga tortiladi yoki ikkinchi yo'li 30S subbirligi dastlab tRNA bilan bog'lanadi va shundan keyingina mRNAda o'tiradi (3). Katta (50S) ribosoma bo'linmasi (4) hosil bo'lgan kompleksga keladi, boshlang'ich omillar 30S bo'linmasidan ajralib chiqadi, bu GTP ning IF2 oqsili (5) tomonidan gidrolizlanishi bilan kechadi va yig'ilgan ribosoma zanjirni uzaytira boshlaydi. (6). Pastki o'ng burchakda prokariotik mRNAning initsiatsiya joyining diagrammasi berilgan. Molekulaning 5' va 3' uchlari belgilangan. RBS-ribosoma bog'lanish joyi; SD-Shayna-Dalgarno ketma-ketligi; AUG- boshlang'ich kodonyoki initsiatsiya kodoni

Translyatsiyaning initsiatsiyasi oqsil sintezining asosiy yo'nalishi bo'lib, aminokislotalarni birin-ketin bog'lanishlari i-RNK dagi reja asosida sodir bo'ladi. Prokariotlarda inistirlash kompleksini hosil bo'lishi quyidagi navbat bo'yicha ketadi:

- 30S ribosoma IF₃ bilan bog'lanadi;
- 30S-IF₃ kompleksiga initsiatsiya faktori IF₁ bog'lanib, kichik initsiatsiya kompleksi shakllanadi;
- bir vaqtning o'zida fMet-t-RNK^{fMet}, GTF va IF₂ lar bilan assostiatsiya hosil qilishi, ikkinchi kichik initsiatsiya kompleksining shakllanishiga sababchi bo'ladi;

- 30S-IF₁-IF₃kompleksi i-RNK ning 5' tomonidagi initsiatsiya kodoni bilan bog'lanadi. Hosil bo'lgan 30S-IF₁-IF₃-i-RNK kompleksi keyinchalik R-markazga aylanadi.

Ikkita kichik initsirlovchi komplekslarning o'zaro qo'shilishidan quyidagi katta struktura shakllanadi: 30S-IF₁-IF₂-IF₃-i-RNK-fMet-RNK^{fMet}-GTF. Mazkur kompleks 50S ribosom bilan bog'lanib, faol oqsil sintezlovchi tizimni shakllantiradi. Ribosoma tarkibiga kiruvchi 30S va 50S subbirliklar o'zaro bog'langandan so'ng, peptidil va amioatsil markazlar to'liq shakllanadi. Shunday holatda R-markazda i-RNK ning initsirlovchi kodonida komplementar bog'langan fMet-t-RNK^{fMet} bo'lib, amioatsil markazda esa navbatdagi aminokislotaning kodoni to'g'ri keladi.

To'liq shakllangan ribosomada polipeptidning hosil bo'lishi va uning uzunasiga ko'payish jarayoni sodir bo'ladi. Bu jarayonda GTF va yana oqsil tabiatli uchlik elongatsiya omili ishtirok etadi. Ular prokariotlarda quyidagicha belgilanadi: EF-T_i, EG-T_s va EG-G yoki ularni qisqa belgilar orqali ham ifodalash mumkin: T_i, T_s va G. Elongatsiya omillaridan T_i, GTF va stitoplazmadagi amioatsil-t-RNK bilan bog'lanadi. Bir necha qismdan tashkil topgan kompleks to'liq ribosomadagi A-markazga ko'chiriladi. Bu yerda i-RNK dagi kodon, t-RNK tarkibidagi antikodon bilan bog'lanadi. T_i oqsil omili gidrolizlaydigan GTF-aza xususiyatiga ega. Demak, oqsil omillari amioatsil-t-RNK ni i-RNK dagi maxsus kodonga bog'lashda va ribosomani i-RNK bo'ylab harakatini ta'minlaydi. 50S ribosoma tarkibidagi oqsil-ferment peptidiltransferaza polipeptid zanjirini uzaytirishda ishtirok etadi.

Translyatsiyaning elongatsiyasi

Elongatsiya bosqichi uch qismdan iborat. Birinchi bosqichda ta'kidlanganidek, amioatsil-t-RNK i-RNK dagi kodon bilan amioatsil markazga oqsil omillari orqali bog'lanadi.

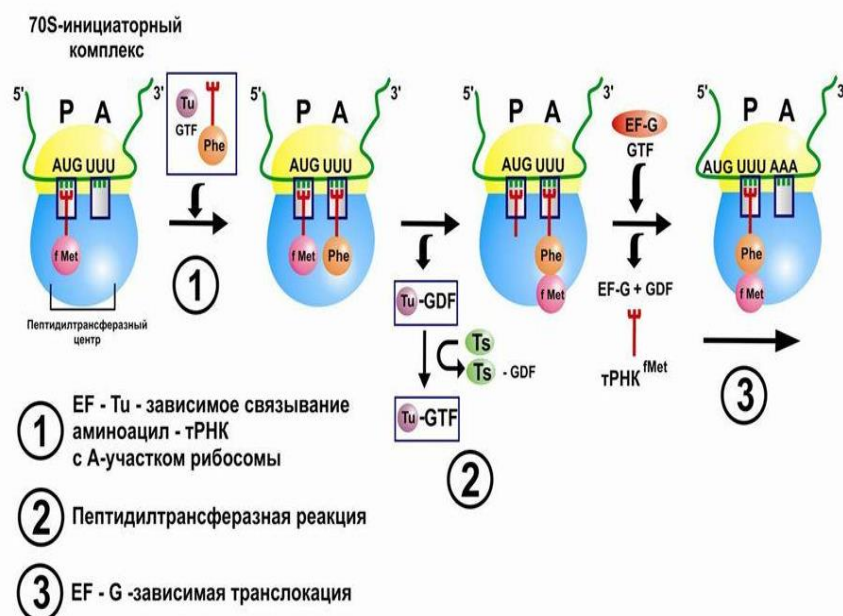
Ikkinchi qismda ikkita aminokislota qoldiqlari peptidiltransferaza fermenti ishtirokida peptid bog'i hosil bo'ladi. Avval R-markazda turgan N-formilmetionin-t-RNK^{fMet} dagi murakkab efir bog'i uzilib, N-formilmetionil A-markazdagi t-RNK tarkibidagi amioatsilning amino

Molekulyar mikrobiologiya

guruhiga bog'lanib, peptid bog'i hosil bo'ladi. Bu jarayonni peptidiltransferaza amalga oshiradi. Mazkur ferment ta'sirida peptidil markazda erkin t-RNK^{fMet} qolib, amioatsilda esa dipeptidil-t-RNK hosil bo'ladi.

Elongatsiyaning yakunlovchi uchinchi bosqichida bir nechta siljishlar ribosomada yuz beradi. To'liq ribosoma i-RNK bo'ylab bitta kodonga siljiydi. Shunday harakat asosida ribosoma tashqarisida AUG kodoni va t-RNK^{MET} lar chiqib qoladi. Peptidil markazga dipeptidil-t-RNK ko'chirilib, amioatsil markaz esa yangi amioatsil-t-RNK ni qabul qilishga tayyor turadi. Elongatsiyaning uchinchi bosqichi biologik harakat har doim maqsadga muvofiq bo'lishligiga misol bo'lib, bu jarayonni translokastiya deb ataladi. Har bir translokastiyadan so'ng ribosoma yangi elongatsiyani boshlashga tayyor turadi.

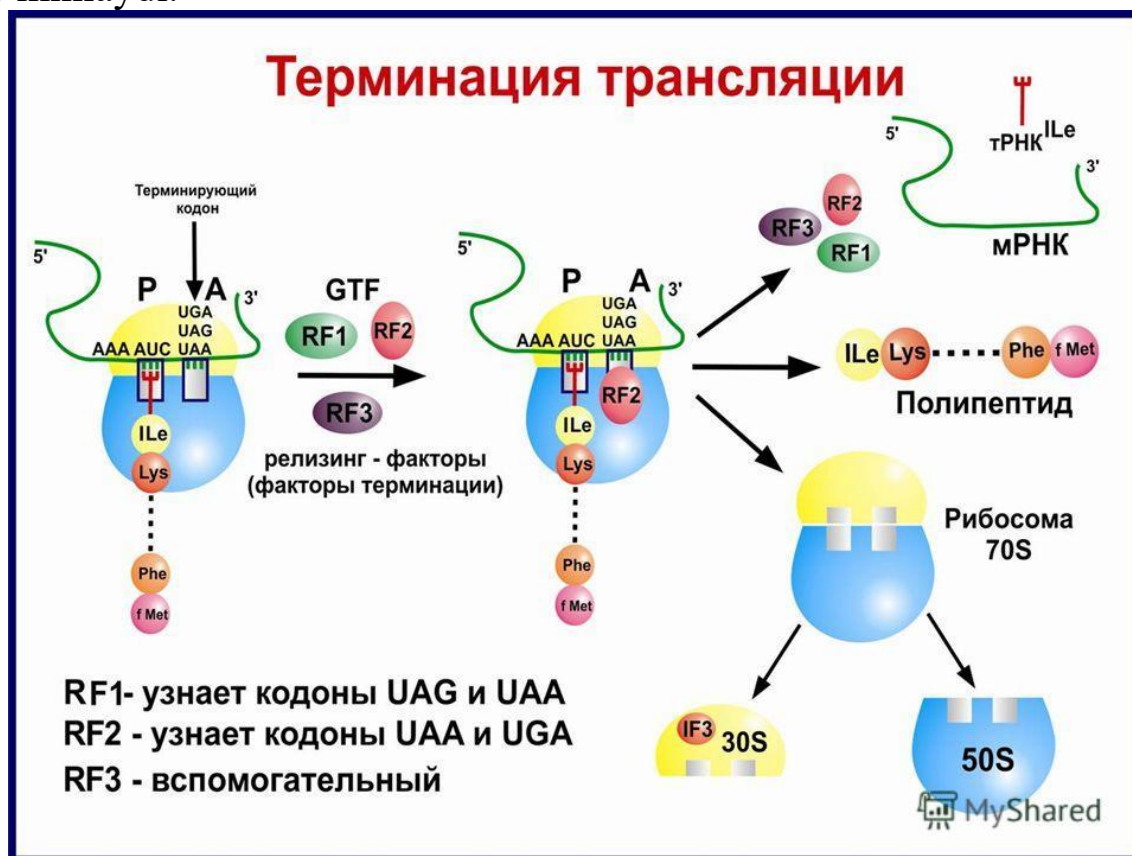
RNK informatsiyada qancha ma'noli kodonlar bo'lsa, elongatsiya shuncha takrorlanadi. Elongatsiyaning ishlash prinsipi xuddi kiyim tikadigan mashinaning mokusiga o'xshaydi. Uning borishi va qaytishi materialni choklab boraverganidek, ribosomadagi harakat ham davriy ravishda peptid bog'ini uzaytirishni ta'minlaydi. -rasmda ribosomada oqsilning matritalsali sintezi ko'rsatilgan:



Ribosomada oqsil biosintezi (elongatsiya bosqichi)

Polipeptid zanjirining terminatsiyasi

Terminatsiya jarayonida sintezlangan polipeptid zanjiri ribosomadan ajraladi. Bu jarayonni oqsil tabiatli omillar va ferment peptidilesteraza bajaradi. Terminatsiya bosqichini GTF energiya bilan ta'minlaydi.



Oqsil biosintezida terminatsiya bosqichi.

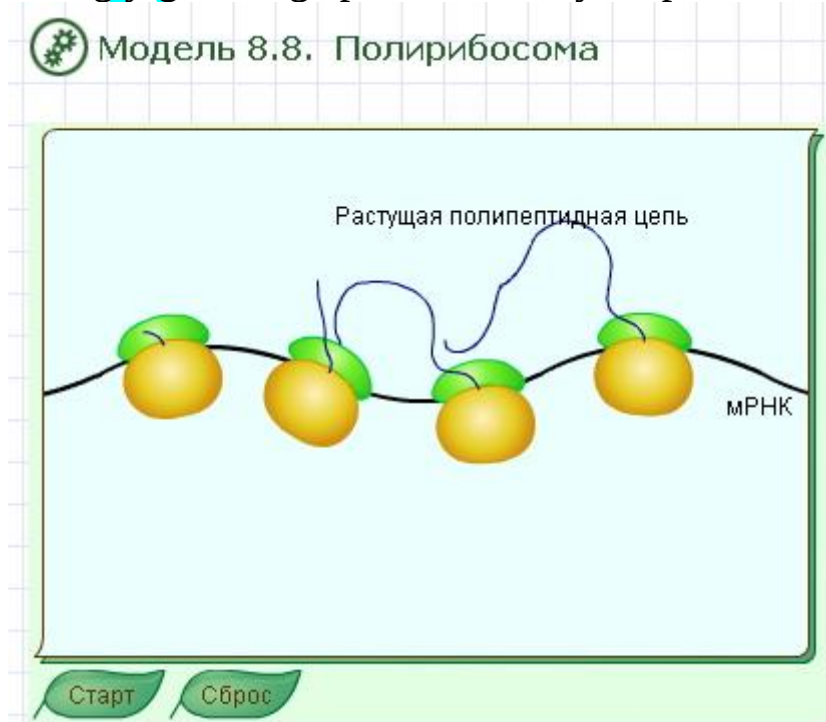
Informatsiya RNK molekulasida axborot uzatmaydigan kodonlar bo'lib, ularni ma'nosiz yoki terminatorlar deb ataladi. Shunday STOP-kodonlarga UAA, UAG, UGA tripletlar kiradi. Mazkur kodonlarning t-RNK dagi antikodonlari bilan komplementar holda bog'lanmaydilar. Shuning uchun, ribosoma shu kodonlarga etganda oqsil sintezi to'xtaydi. A-markazga $\alpha\alpha$ -t-RNK o'rniga terminatsiyaga sabab bo'luvchi oqsillar RF₁ va RF₂, qo'shimcha yana RRF (Ribosome release factor) omillarining bog'lanishi ham peptid bog'larini hosil bo'lishini nihoyasiga yetkazadi.

GTF bilan bog'langan relizin-omil va peptidiltransferaza fermenti ta'sirida polipeptid bilan oxirgi t-RNK o'rtasidagi murakkab efir bog'i uziladi. Terminatsiyaning yakunlovchi bosqichida oqsil sintezlovchi kompleks dissotsiatsiyaga uchrab, ribosoma, i-RNK, t-RNK, yangi

Molekulyar mikrobiologiya

sintezlangan peptid va terminatsiyada ishtirok etuvchi oqsil omillari bir-birlaridan ajraladilar.

Hujayrada oqsillarning biosintezi yetarli miqdorda energiya bilan ta'minlanganida sodir bo'ladi. Bitta polipeptid zanjirining sintezida sarf bo'ladigan energiya miqdorini hisoblash mumkin: Aminokislotani faollashtirish uchun bitta ATF gidrolizlanganda AMF hosil bo'ladi, bu ikkita makroerg sarflanishi bilan barobar. Initsiatsiyada bitta makroerg GTF, elongatsiyada ikkita GTF sarflanadi (bitta GTF $\alpha\alpha$ -t-RNK li ribosomani A-markazga yetkazadi, ikkinchi GTF esa translokatsiyada ishtirok etadi). Yakunlovchi terminatsiyada yana bir molekula makroerg GTF sarf bo'ladi. Oqsil sintezining translyatsiyasida i-RNK bir vaqtda bir necha ribosomlarni genetik axborot bilan ta'minlaydi. Ribosomalarning yig'indisiga poliribosoma yoki polisoma deb ataladi.



Poliribosoma.

Poliribosomada sintezlangan oqsil bir nechta nusxada bo'lib, polipeptid zanjirining qayta sintezlanishiga hojat qolmaydi. Polisom kompleksining hajmi i-RNK molekulasiga bog'liq. Informatsiya RNK molekulasi bir nechta ming nukleotid qoldig'idan iborat bo'lsa, ribosomalar kompleksi 50-100 atrofida bo'ladi. Ribosomada oqsilning sintezi tez sur'atlarda davom etib, har soniyada yuzlab aminokislotalar bir-birlari bilan bog'lanadilar.

Nazorat savollari:

1. Nuklein kislotalarning kashf qilinishi haqida tushuncha bering.
2. DNK va RNK tuzilishi, vazifalari haqida aytib bering.
3. Hujayrada irsiy axborot tashilishi deganda nimani tushunasiz?
4. Replikatsiya jarayoni qanday bosqichlardan iborat va ularni tushuntirib bering.
5. Transkripsiyaning molekulyar asoslari haqida tushuncha bering.
6. Prokariotlarda transkripsiya jarayoni qanday kechadi?
7. Eukariotlarda transkripsiya jarayoni qanday sodir bo'ladi?
8. RNK molekulasi protsessingi va splaysingi
9. Genetik kod nima?
10. Translyatsiya jarayonini molekulyar asoslari haqida ma'lumot bering.

2-MAVZU. MIKROORGANIZMLARDAN NUKLEIN KISLOTALAR AJRATISH**Reja:**

1. Marmur usuli bo'yicha xromosoma DNKsini ajratish
2. CTAB usuli orqali DNK ajratish.
3. Ishqoriy lizis usuli orqali kichik hajmli kulturadan plazmid DNKni ajratish (Miniprep usuli)

Tayanch so'z va iboralar: DNK va RNK ajratish usullari, Marmur usuli, Maniatis, CTAB, Mini prep usuli.

Nuklein kislotalarni ajratib olish va tozalash mikroorganizmlarning biokimyosi, genetikasi va molekulyar biologiyasidagi asosiy jarayonlardan biridir. Asosiy bosqich - bu deproteinizatsiya (oqsillarni olib tashlash va inaktivatsiya qilish), bu ko'p hollarda nuklein kislotalarni fenol va / yoki xloroform va izoamil spirti aralashmasi bilan suvli eritmalarda ekstraksiya qilish orqali amalga oshiriladi.

Fenol ekstraksiyasida nuklein kislotalar suvli fazada qoladi, oqsillar esa fenol va suv qatlamlari orasidagi interfazada to'planadi. Hujayra ekstraktidan nuklein kislotalarni dastlabki izolyatsiya qilishda ko'pincha 37 ° C da proteinaz K (50 mkg / ml) kabi proteolitik fermentlar bilan mahalliy oqsillarning dastlabki gidrolizi qo'llaniladi va

shundan keyingina nuklein kislotalarni organik erituvchilar bilan ekstraksiya qilish amalga oshiriladi.

KICHIK HAJMDAGI MIKROORGANIZM KULTURASIDAN MARMUR USULI BO'YICHA XROMOSOMA DNKSINI AJRATISH.

Bu usul mikroorganizm hujayralaridan xromosoma DNKsini ajratib olishning eng samarali va keng tarqalgan usullaridan biridir. Marmur xromosomali DNKni izolyatsiya qilish usulining juda ko'p sonli modifikatsiyalari mavjud bo'lib, ular asosan DNKni tozalashning yakuniy darajasida farqlanadi. Nuklein kislotalarning eritmalaridan oqsillarni olib tashlash fenol (kuchli organik erituvchi) yoki fenol aralashmasi: xloroform (1: 1), so'ngra xloroform aralashmasi: izoamil spirti (24: 1) bilan bir marta ekstraksiya qilish orqali amalga oshiriladi. Nuklein kislotalar suvli fazada qoladi. Ikkita organik erituvchidan foydalanganda, tajriba namunasini deproteinizatsiya qilish maksimal samaradorlik bilan davom etadi. Xloroform oqsillarni denaturatsiya qiladi va izoamil spirti ekstraksiya paytida ko'pikni kamaytiradi, suvli va organik fazalarni aniq ajratishni ta'minlaydi. Shuni ta'kidlash kerakki, fenol oqsillarni yaxshi denaturatsiya qiladi, lekin RNK aza faolligini to'liq ingibirlamaydi, bundan tashqari, unda poliy (A) ning uzoq ketma-ketligini o'z ichiga olgan RNK molekulalari eriydi. Xloroform RNKazani inaktivatsiya qiladi va xloroform: izoamil spirti (24:1), aralashmasidan foydalanilganda, oxirgi ekstraksiya paytida fenol qoldiqlari nuklein kislotalari preparatidan chiqarib tashlanadi. Xloroform qoldiqlarini navbat bilan cho'ktirish DNK preparatini etanol bilan yuvish orqali yo'qotiladi. Etanol bilan cho'ktirish DNKni konsentratsiyalash va nuklein kislotalarni kichik molekulyar og'irlikdagi hujayra birikmalaridan ajratish uchun eng ko'p ishlatiladigan, miqdoriy, tez va samarali usuldir. DNK agregatlari bir valentli kationlarning o'rtacha konsentratsiyasi mavjudligida etanol (-20°C dan -70°C gacha past haroratlarda) hosil bo'ladi. Buning uchun ko'pincha DNK eritmasiga natriy atsetat, natriy xlorid, litiy xlorid yoki ammoniy atsetat eritmaları qo'shiladi (oxirgi konsentratsiyalar mos ravishda 0,25-0,3 M; 5 M).

Kerakli reaktiv va asboblari

- tuzli EDTA eritmasi: (0,15 M NaCl; 0,01 M Na_2EDTA ; pH 8,0;)

- 10% natriy dodesil sulfat eritmasi;
- 5 M natriy perxlorat eritmasi;
- TE buferi
- fenol TE buferi (pH 8,0) bilan muvozanatlangan va tarkibida 0,1% 8-gidroksixinolin va 0,2% -merkaptoyetanol mavjud. Qorong'i shishada 4°C haroratda bir oydan ko'p bo'lmagan muddatda saqlangan;
- xloroform aralashmasi(24: 1 nisbatda izoamil spirti bilan aralashtirilgan) Xona haroratida germetik yopiq idishda muddatsiz saqlanishi mumkin;
- 96%li muzli etanol eritmasi
- RNKaza eritmasi(10mg/ml)

Ishning bajarilishi:

1. 5-10 ml kechqurungi (12-14 soat) hujayra kulturasini 4°C da 20 daqiqa davomida 8000 ay/min stol sentrifugasida sentrifuga qilish orqali to'planadi va supernatant olib tashlanadi.

2. Bakterial cho'kmani 0,95 ml EDTA fiziologik eritmasida qayta suspenziya qilinadi, 100 mkl 10% natriy dodesil sulfat (SDS) qo'shiladi va darhol naychani teskari aylantirib aralashtiriladi. To'liq hujayra parchalanishi uchun vaqti-vaqti bilan aralashtirish orqali 60 °C da (30 daqiqadan ko'p bo'lmagan) qo'shimcha inkubatsiya tavsiya etiladi. Suspenziyani xona haroratiga qadar sovutib olinadi.

3. 250 mkl 5 M natriy perxlorat qo'shiladi (yakuniy konsentratsiya 1 M bo'lguncha). Muz ustida 60 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi (tavsiya etiladi, lekin shart emas).

4. 600 mkl xloroform:izoamil spirti (24 : 1) aralashmasi qo'shiladi, 30 daqiqa davomida sekin chayqab, namunani deproteinlashdan keyin emulsiya hosil bo'lguncha aralashtiriladi.

5. Namunani sentrifugada 8000 ay/daq 4°C da 10 minut sentrifuga qiling va keyin yuqori suvli fazani yangi Probirkaga o'tkaziladi.

6. DNKni 2 hajmli muzdek sovuq 96% etanol (2,5 ml) yordamida sekin aralashtirib (Probirkani 3-5 marta ag'darib), DNK cho'kmaguncha -20°C da 30-60 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi. (yoki 4°C da bir kechada) Namunani 16500 ay/min da 4°C da 5-10 daqiqa sentrifuga qilinadi. Ehtiyotkorlik bilan supernatantni to'kib tashlab, mikropipetka bilan probirkaning pastki qismidan va devorlaridan etanol qoldiqlari olib tashlanadi va ochiq trubkani teskari burab, DNK cho'kmasini havoda 5-10 daqiqa davomida quritiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

7. Qisman RNKsiz DNK preparatini 0,4 ml TE bufer eritmasida (pH 8,0) eritib yuboriladi. Bunday tozalash darajasiga ega bo'lgan DNK allaqachon an'anaviy polimeraza zanjiri reaksiyasida (PCR) shablon sifatida ishlatilishi mumkin. DNK preparatini 4°C da saqlab qo'yiladi.

8. Yakuniy kontsentratsiyasi 50–100 mkg/ml bo'lguncha 20 mkl RNKaza eritmasidan (DNKaza yo'q!) qo'shiladi va reaksiyani yakunlash uchun namunani 37°C da 3–60 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi. RNKaza eritmasini namunaga qo'shishdan oldin uni qaynoq suv hammomida 10 daqiqa davomida qizdirish tavsiya etiladi (oz miqdorda DNaza inaktivatsiyasi uchun).

9. Qolgan RNK fragmentlarini xromosoma DNKsidan ajratish uchun DNK namunasiga TE buferi bilan muvozanatlangan 0,5 ml fenol qo'shiladi. Undan so'ng 0,5 ml xloroform:izoamil spirti qo'shiladi va emulsiya hosil bo'lguncha probirkani teskari aylantirib aralashtiriladi.

10. Namunani sentrifugada xona haroratida 3-5 daqiqa davomida 15,700 ay/minda sentrifuga qilinadi va keyingi ish uchun mikropipetka bilan yuqori suvli fazani (DNK o'z ichiga olgan) ehtiyotkorlik bilan yangi probirkaga olib qo'yiladi. Agar pastki organik, oraliq (oqsillar mavjud) va yuqori suvli fazalar yetarlicha yaxshi ajratilmasa, sentrifugani 5 daqiqa davomida yanaqayta takrorlanadi.

11. DNK ekstraktsiyasini xloroform:izoamil spirti aralashmasi bilan yana ishlov beriladi (DNK namunasi hajmiga teng hajmda qo'shiladi) va suvli faza tanlanadi (~0,4 ml).

12. DNKni sekin, ammo yaxshilab aralashtirish bilan 2 hajmli muzdek 96% etanol yordamida cho'ktiriladi. Keyin cho'kma hosil bo'lguncha -20 ° C da 30-60 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi.

13. Namunani sentrifugada 15700 ay/min da 4°C da 5-10 minut sentrifuga qilinadi.

14. Supernatantni ehtiyotkorlik bilan olib tashlanadi, mikropipetka bilan probirkaning pastki devorlaridan supernatant qoldiqlari olib tashlanadi va ochiq trubkani teskari burab, havoda etanol bilan cho'ktirilgandan keyin to'plangan DNK cho'kmasini 5-10 daqiqa davomida quritiladi (DNK cho'kmasini haddan tashqari quritishdan ehtiyot bo'lish kerak.)

15. Olingan DNK cho'kmasini 100 mkl TE buferida (pH 8,0) yoki H₂Oda probirkani muloyimlik bilan teskari aylantirib eritib yuborish kerak. DNKazalarni inaktivatsiya qilish uchun namunani 65 ° C da 10 daqiqa davomida inkubatsiya qilishga ruxsat beriladi. DNK preparatini

4°C da saqlanadi. Izolyatsiya qilingan xromosoma DNK kontsentratsiyasini spektrofotometrik usul bilan o'lchash mumkin. 10 mkl preparatni olib, uni 0,8% agaroz gelida elektroforez orqali tekshirib ko'riladi.

CTAB usuli orqali DNK ajratish.

Foydalanilgan reaktivlar:

1. Suyuq azot;
2. 2x CTAB ekstraksiya buferi;
3. 10x CTAB\NaCl buferi;
4. Cho'ktiruvchi CTAB buffer;
5. 24:1 nisbatdagi xloroform:izoamil spirt aralashmasi;
6. High-salt TE buffer;
7. Izopropanol spirti;
8. 70 % li etanol;
9. TE (10:1 mM) buferi.

1-jadval

CTAB usulida ishlatiladigan buferlarni tarkibiy qismlari

2x CTAB ekstraksiya buferi: 300 ml			
1.	100 mM Tris pH-8,0;	1M Tris pH-8,0	30 ml
2.	200 mM EDTA pH-8,0	0,5 M EDTA pH-8,0	12ml
3.	1,4 M NaCl	NaCl	24,5448 g
4.	2% CTAB	CTAB	6 g
10x CTAB\NaCl buferi: 100 ml			
1.	0,7MNaCl;	NaCl	4,1 g
2.	10 % CTAB;	CTAB	10 g
Cho'ktiruvchi CTAB buffer: 100 ml			
1.	50 mM Tris pH-8,0;	1M Tris pH-8,0	5ml
2.	10 mM EDTA pH-8,0;	0,5 M EDTA pH-8,0	2ml
3.	2% CTAB	CTAB	1g
High-salt TE buffer: 200 ml			
1.	10 mM Tris pH-8,0;	1M Tris pH-8,0	2ml
2.	0,1mM EDTA pH-8,0;	0,5 M EDTA pH-8,0	40ml
3.	1M NaCl;	NaCl	11,68 g

Molekulyar mikrobiologiya

TE (10:1 mM) buferi: 50 ml			
1.	10 mM Tris pH-8,0;	1M Tris pH-8,0	0,5ml
2.	1mM EDTA pH-8,0;	0,5 M EDTA pH-8,0	0,1ml

Ishning bajarilishi:

1. Probirkadagi o'sgan kulturadan 2 ml plastik probirkaga solinadi va 5 daqiqada 13000 ayl/min sentrifugalanadi, yuqoridagi suyuqlik to'kiladi va steril distillangan 1,5 ml suv solinib, yaxshilab aralashtirib, yana yuqoridagidek sentrifuga qilinib suv bilan yuviladi. Steril distillangan suv bilan yuvish ishlari 3 marta takrorlanadi. Suv bilan yuvish natijasida oziqa muxit qoldiqlari va bakteriya tomonidan ishlab chiqarilgan ba'zi moddalardan xalos bo'linadi.

2. 2 ml li Probirkaga 2x CTAB ekstraksiya buferidan 750 mkl probirkaga solinadi va vorteksda aralashtirilib 30-40 daqiqa davomida 65°C li haroratda inkubatsiyalanadi (vaqti-vaqti bilan vorteksda aralashtirilib turiladi).

3. Probirkadagi namuna ustiga teng hajmda (750 mkl) 24:1 nisbatdagi xloroform:izoamil spirt aralashmasi solinadi va u 5 daqiqa davomida qo'l yordamida yaxshilab aralashtiriladi. So'ngra 5 daqiqa davomida 10000 ay/minda sentrifugalanadi.

4. Yangi 2ml li plastik probirkaga suyuq fazali yuqori qismi o'lchab olinadi (600 mkl) va ustiga 0,1 hajmda (60 mkl) 65°C li haroratdagi 10x CTAB ekstraksiya buferi solinadi va u 5 daqiqa davomida aralashtiriladi. So'ngra teng hajmda (660 mkl) 24:1 nisbatdagi xloroform:izoamil spirt aralashmasi qo'shiladi va 2 daqiqa davomida vorteksda aralashtirilib, 5 daqiqa davomida 10000 ay/daq sentrifugalanadi.

5. Yangi probirkaga suyuq fazali yuqori qismi o'lchab olinadi (500 mkl) va unga teng hajmda cho'ktiruvchi CTAB buferi solinadi va 5 daqiqa davomida DNK cho'kishi uchun qo'yiladi va 3 daqiqaga 14000 ay/daq sentrifugada cho'ktiriladi.

6. Suyuq qismi to'kib tashlanib, unga 500 mkl High-salt TE buferi qo'shiladi (DNK cho'kmagan hollarda 25 daqiqa davomida 65° C li haroratda inkubatsiya qilinadi). Shu tariqa DNK eriguncha davom ettiriladi.

7. Probirkadagi namunaga 0,6 hajmda (300 mkl) izopropanol spirti qo'shiladi va 5 daqiqa davomida xona haroratida DNK cho'kishi uchun

qo'yiladi. So'ngra 15 daqiqa davomida 14000 ay/daq sentrifugada cho'ktiriladi.

8. Suyuq qismi to'kib tashlanib, unga 1 ml 70 % li etanol qo'shiladi va probirkadagi DNK 5 daqiqa davomida sekin aralashtirib yuviladi. So'ngra 5 daqiqa davomida 14.000 ay/daq cho'ktiriladi va spirt to'kib tashlanadi.

9. 8 - bosqich yana bir marotaba takrorlanadi.

10. Cho'kma 30-60 daqiqa davomida xona haroratida quritiladi.

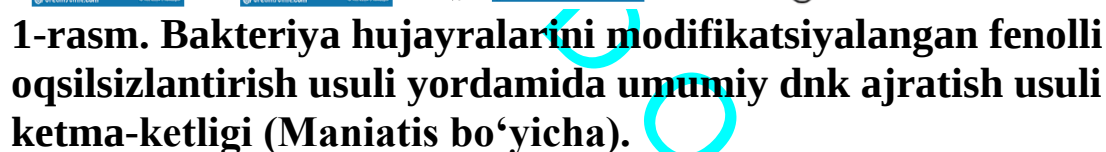
11. Probirkadagi DNK cho'kmasi 100 mkl TE (10:1) buferida eritiladi.

12. DNK namunalari -20°C haroratda muzxonada saqlanadi (-rasm).

**BAKTERIYA HUYAYRALARINI
MODIFIKATSIYALANGAN FENOLLI OQSILSIZLANTIRISH
USULI YORDAMIDA UMUMIY DNK AJRATISH USULI
(MANIATIS BO'YICHA).**

Foydalanilgan reaktivlar:

1. Tris-HCl - 2 M (pH-8,0);
2. EDTA -0,5M (pH-8,0);
3. Glyukoza 2 M;
4. Lizotsim (fermenti) ;
5. SDS - 20%;
6. Proteinaza K - 10 mg/ml;
7. Natriy atsetat - 3M pH-5,3;
8. 1 M li (pH-8,0) Tris-HCl bilan to'yintirilgan fenol eritmasi;
9. 24:1 nisbatdagi xloroform\izoamil spirt aralashmasi;
10. tris-HCl (1 M, pH-8,0) bilan to'yintirilgan fenol eritmasi;
11. 96 % li etanol;
12. TE (10:1 mM) buferi.



1. 1.5 ml plastik probirkaga kolbada o'sgan kulturadan 1 ml solinadi va 5 daqiqada 13000 ay/daq sentrifugada cho'ktiriladi, ortiqcha suyuqlik to'kib, shu ish yana takrorlanadi (agarda kultura biomassasi kam bo'lgan xolatda) va dozator yordamida tepa suyuqlik qismi olib tashlanadi. So'ngra cho'kmani steril distillangan 1 ml suv solinib, yaxshilab aralashtirib, yana yuqoridagidek sentrifuga qilinib suv bilan yuviladi. Steril distillangan suv bilan yuvish ishlari 3 marta takrorlanadi. Suv bilan yuvish natijasida oziqa muxit qoldiqlari va bakteriya tomonidan ishlab chiqarilgan ba'zi moddalardan xoli bo'linadi.

58

3. So'ngra ustiga oxirgi konsentratsiyasi 2 % li bo'lgan SDSeritmasidan solinadi va yaxshilab qo'l bilan chayqatiladi. Keyin ustiga proteinaza K fermentidan oxirgi konsentratsiyasi 0,2 mg/ml solinib, termostatga 65⁰C ga 30 daqiqaga termostatga qo'yiladi.

4. Keyin ustiga oxirgi konsentratsiyasi 0,3 M bo'lgan natriy atsetat pH-5,3 eritmadan qo'shiladi va biroz chayqatilib muzga +4⁰C ga 30 daqiqaga qo'yiladi.

5. So'ngra 13000 ay/daq tezlikda 10 daqiqa davomida sentrifugada cho'ktiriladi.

6. Probirkaning ustki qismi yangi plastik probirkaga o'tkaziladi va uning ustiga tris-HCl (1 M, pH-8,0) bilan to'yintirilgan fenol eritmasidan teng xajmda qo'shiladi va qo'l yordamida 3-4 daqiqa aralashtiriladi. Aralashma 13000 ay/daq tezlikda 10 daqiqa sentrifugalanadi. Aralashma 2 fazaga ajralgandan so'ng uning yuqori qismi yangi plastik probirkaga olinadi.

7. 6 -jarayon yana bir marta takrorlanadi.

8. Ustki qismi yangi plastik probirkaga o'lchangan holda ehtiyotkorlik bilan olinadi va suyuqlikka teng miqdorda xloroform:izoamil spirtidan (24:1) qo'shiladi. 3-4 daqiqa qo'l yordamida aralashtirilib, 13000 ay/daq tezlikda 10 daqiqa sentrifuga qilinadi. Aralashma 2 fazaga ajralgandan so'ng uning yuqori qismi yangi plastik probirkaga olinadi.

9. 8 -jarayon yana bir marta takrorlanadi.

10. Ustki qismi yangi plastik Probirkaga o'lchagan holda ehtiyotkorlik bilan olinadi va ustiga oxirgi konsentratsiyasi 0,3 M bo'lgan natriy atsetat pH-5,3 eritmasidan solinadi va 30 daqiqa muzga qo'yiladi.

11. So'ngra 13000 ay/daq tezlikda 10 daqiqa davomida sentrifugada cho'ktiriladi.

12. Probirkaning ustki qismi toza Probirkaga olinib, ustiga 2,5 baravar ko'p hajmda 96% li etanol spirtidan qo'shiladi va -20⁰S ga muzlatkichga 1 sutkaga qo'yiladi.

13. Muzlatkichdan olinib 13000 ay/daq tezlikda 10 daqiqa sentrifuga qilinib, ustki supernatant qismi to'kib tashlanadi.

14. Keyin ustiga 100 mkl TE buferidan solib eritiladi va -20 oS haroratda saqlanadi.

PLAZMID DNKNI AJRATISH.

Plazmid DNKni tez ajratish uchun bir qator yuqori takrorlanadigan, tez va ko'p qirrali usullar qo'llaniladi, ularning barchasi uchta asosiy bosqichdan iborat: bakteriyalarning ko'payishi va hujayralardagi plazmidlarning amplifikatsiyasi, bakterial biomassani yig'ilishi va hujayra lizisini yig'ish, plazmid DNKni tozalash. Tozalash jarayoni E. coli xromosoma DNKsi va plazmid DNK o'rtasidagi ikkita asosiy farqdan foydalanadi: 1) bakteriyalarning xromosoma DNKsi genetik ma'lumotni uzatish uchun vektor sifatida ishlatiladigan plazmid DNKdan bir necha baravar katta va 2) xromosoma DNKsining asosiy qismi chiziqli molekulalar bo'laklari sifatida ajratilgan, plazmid DNKning ko'p qismi esa kovalent yopiq dumaloq molekulalar shaklida bo'ladi. Plazmid DNKni izolyatsiya qilish va tozalashning ko'p usullari cho'kma bosqichlarini o'z ichiga oladi, bunda lizislangan hujayralar bo'laklari tomonidan ushlangan xromosoma DNKning uzun zanjirlari preparatdan chiqariladi. Plazmid DNKni izolyatsiyalash jarayonida xromosoma DNK molekulalaridagi vodorod bog'larining ko'p qismi ham uziladi (qizdirilganda yoki pH 12,5 gacha bo'lgan ishqoriy eritmalarida saqlanganda), halqada komental ravishda yopiq plazmid DNKning komplementar zanjirlari buzilmagan holatda qoladi. Neytral pH ni sovutish yoki tiklash jarayonida plazmid DNKning yopiq dumaloq molekulalari yana tabiiy konformatsiyani (renatura) oladi, ammo xromosoma DNKsi bunday qilmaydi. E.coli qaytarilmas denaturatsiyaga uchraydi.

ISHQORIY LIZIS USULI ORQALI KICHIK HAJMLI KULTURADAN PLAZMID DNKNI AJRATISH (MINIPREP USULI)

Bu usul ishqor va natriy dodesil sulfat (SDS) bilan bakteriya hujayralarining lizisini o'z ichiga oladi. Bu E. coli ning turli shtammlaridan plazmid DNKni ajratib olishning eng keng tarqalgan usullaridan biri bo'lib, yuqori natija beradi.

Kerakli reaktiv va eritmalar:

- steril LB muhiti (Luria-Bertani) tegishli antibiotik bilan.
- Quyidagi tarkibdagi TGE eritmasi (I eritmasi) (100 ml uchun): 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 (2,5 ml 1 M Tris- HCl, pH 8,0); 50 mM glyukoza (2,5 ml 2 M glyukoza);
- 10 mM EDTA, pH 8,0 (2,0 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0); steril deionlangan suv bilan 100 ml gacha yetkazib olinadi.

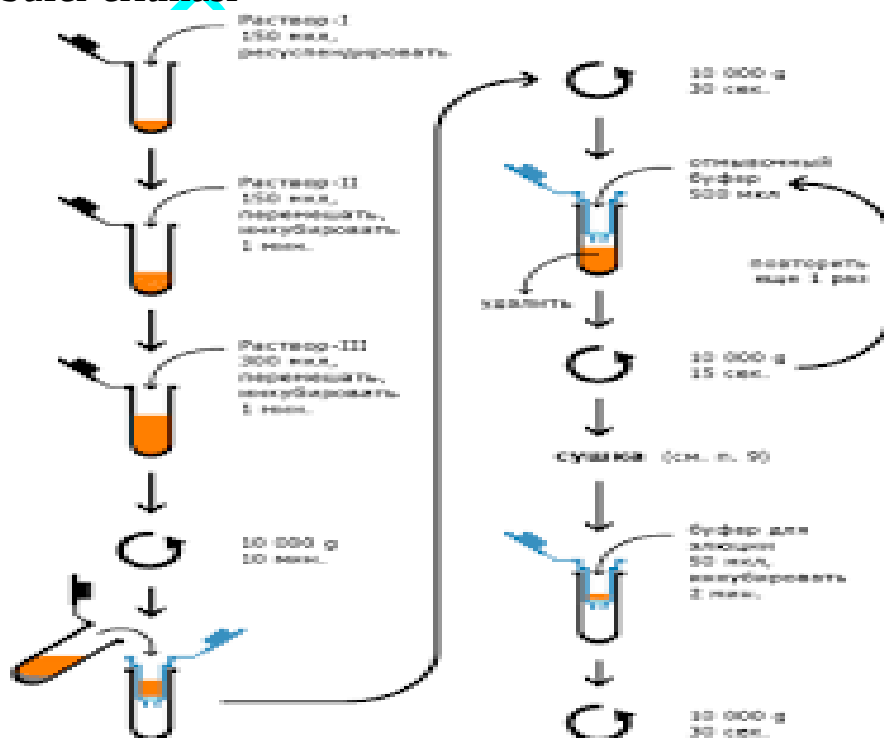
Eritma 4 °C haroratda saqlanadi. Mikroorganizm hujayralarining eng samarali lizisi uchun tajribadan oldin quruq lizotsimni (2-5 mg / ml) kerakli hajmdagi TGE eritmasida eritib yuborish kerak. Shuni yodda tutish kerakki, lizotsimning ta'siri pH 8 dan past bo'lsa kamayadi.

- quyidagi tarkibdagi II eritmasi: 0,2 M NaOH (2 M yoki 10 M NaOH eritmasidan tayyorlangan); 1% natriy dodesil sulfat (10% SDS dan suyultiriladi). Lizis qiladigan eritmani tajribadan oldin yangi tayyorlagan yaxshi, lekin uni xona haroratida mahkam yopiq plastik idishda saqlash mumkin;

-eritma III (3 M kaliy/5 M asetat)

-96% etanol, 70% etanol;

-TE bufer eritmasi



2-rasm. Ishqoriy lizis usuli orqali plazmid DNKsini ajratish.

Ishning bajarilishi:

1. Plazmid DNKsi ajratilishi kerak bo'lgan mikroorganizmning alohida o'sgan koloniyasini tish cho'pchasi yoki steril avtomatik pipetka uchi bilan 5 ml LB muhiti va tegishli antibiotik solingan (antibiotikka chidamli gen tutgan plazmid DNK) shisha probirkaga o'tkaziladi. Plazmidni ko'paytirish uchun 37 ° C da 8-16 soat davomida kuchli aralashtirish (200-300 ay/min) bilan kultivatsiya qilinadi.

2. Mikrosentrifuga naychasiga 1,5 ml kultura yig'iladi. Qolgan kultura hajmini 4 ° C da saqlanadi.

Molekulyar mikrobiologiya

3. Biomassani 4°C da 1-3 minut davomida 15700 ay/min da stol usti sentrifugasida sentrifugalash orqali yig'ib olinadi. Kultural suyuqlikni mikropipet bilan iloji boricha yaxshilab olib tashlang. Plazmidlarni ajratish steril bo'lmagan holda amalga oshiriladi.

4. Hujayra qoldig'ini kuchli aralashtirish yoki pipetlash orqali tajribadan oldin lizosim qo'shilgan 100 mkl muzli TGE bufer eritmasida (eritma I) aralashtirib turing. Xona haroratida 5-10 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

5. Tezda 200 mkl yangi tayyorlangan eritma II ni (sovutilmagan) qo'shing, darhol Probirkani 3-5 marta silkitmasdan ehtiyotkorlik bilan ag'darib, tarkibini aralashtiring (xromosoma DNKsini ezib tashlamaslik uchun). Probirkani muz ustiga 5 daqiqaga (yoki yopishqoq va shaffof hujayrali lizat hosil bo'lguncha) qo'ying.

6. 150 mkl muzli neytrallashtiruvchi eritma III qo'shing, eritmaning yopishqoqligi pasayguncha va oq cho'kma (xromosomal DNK-oqsillar-SDS komplekslari) hosil bo'lguncha Probirkani teskari aylantirib, ehtiyotkorlik bilan silkiting. Naychani 10-15 daqiqa davomida muz ustiga qo'ying (har 3 daqiqada kolbani aylantirib aralashtiramiz, cho'kindining katta qismlarini parchalash uchun bir yoki ikki marta silkiting).

7. Stol usti sentrifugada 15700 ay/min 4°C da 10-15 daqiqa sentrifuga qiling. Xromosoma DNKsining ko'p qismi, SDS oqsillari va hujayra bo'laklari probirka tubida zich cho'kma hosil qiladi.

8. Plazmid DNKni o'z ichiga olgan shaffof supernatantni (~450 mkl) dekantatsiya qilish yo'li bilan yangi mikrotsentrifuga probirkasiga o'tkazing, so'ng o'rnatilmagan bo'laklarni tish pichog'i bilan ehtiyotkorlik bilan olib tashlang yoki paxta momig'i bilan kichik ustun orqali filtrlang.

9. Fenol/xloroform (1:1; pH 7,0-8,0) aralashmasidan 1 hajm (450 mkl) qo'shing, emulsiya hosil bo'lguncha Probirkani teskari aylantirib, ehtiyotkorlik bilan aralashtiring. Xona haroratida 5-10 minut davomida 15,700 ay/min da stol usti sentrifugada sentrifuga qiling. Yuqori suvli fazani (tarkibida nuklein kislotalar bo'lgan) mikropipet bilan yangi mikrotsentrifuga Probirkasiga ehtiyotkorlik bilan o'tkazing, faza chegarasidan yoki fenol qatlamidan material izlari qolmasligi kerak. Suvli fazani teng hajmdagi xloroform (50 mkl) bilan qayta ekstraksiya qiling va suvli fazani yangi mikrotsentrifuga Probirkasiga o'tkazing.

10. Plazmid DNKni cho'ktirish uchun 2 hajm (900 mkl) 96% etanol qo'shing, chayqatish orqali yaxshilab aralashtiring va aralashmani xona haroratida 2-5 daqiqa davomida inkubatsiya qiling. Mikroorganizm hujayralaridan nuklein kislotalarni eng yuqori mahsuldorlikka ajratib olish uchun

96% muzdek sovuq etanoldan foydalanish va -20°C da bir soat davomida inkubatsiya qilish orqali erishiladi.

11. Xona haroratida 10 daqiqa davomida 15,700 ay/daq sentrifugada sentrifuga qiling. Supernatantni mikropipet bilan ehtiyotkorlik bilan va yaxshilab olib tashlang.

12. Cho'kmani 1 ml 70% etanol bilan yuving, chayqatib, xona haroratida 10 minut davomida 15,700 ay/min da sentrifuga qiling. Plazmid DNK cho'kmasini fenol va xloroform izlaridan 70% li etanol bilan uch marta yuvish orqali tozalanadi.

13. Supernatantni mikropipet yordamida iloji boricha ehtiyotkorlik bilan olib tashlang (shundan keyin etanol izlarini olib tashlash uchun 30 soniya davomida qo'shimcha sentrifuga qilish tavsiya etiladi). Plazmid DNK cho'kmasini havoda yoki vakuumli evaporatorda 5-10 daqiqa davomida quriting.

14. Plazmid DNKni 50 mkl TE bufer eritmasida (pH 8,0) yoki suvda chayqatish orqali eritib yuboring. Bufer eritmasiga DNKazasiz RNKaza (20 mkg/ml) qo'shilishi mumkin. Plazmid DNKni oqsillar va nuklein kislotalardan maksimal darajada tozalash uchun seziy xloridning etidiy bromid bilan zichlik gradiyentida muvozanatli sentrifugalash amalga oshirilishi mumkin.

Oqsillardan tozalangan izolyatsiyalangan plazmid DNK preparatini -20°C da saqlash mumkin. Biroq, ko'plab protokollar preparatni muzlatish-eritish paytida DNK molekulalarida ("niklar" deb ataladigan) mumkin bo'lgan bir zanjirli uzilishlarni oldini olish uchun keyingi transformatsiyaga mo'ljallangan plazmidlarni 4°C da saqlashni tavsiya qiladi.

Nazorat savollari:

1. Mikroorganizmlardan DNK ajratishni qanday usullarini bilasiz?
2. Marmur usuli bo'yicha xromosoma DNKsini ajratishda nimalarga e'tibor berish kerak?

3. Marmur usuli orqali DNK ajratishni ketma-ketligini aytib bering.
4. CTAB usuli orqali DNK ajratish qanday vaziyatlarda ishlatiladi?
5. CTAB usuli va Marmur usulini farqlarini sanab bering.
6. Plazmid DNKsini ajratishni qanday usullarini bilasiz?
7. Ishqoriy lizis usuli qanday tartibda bajariladi?

Adabiyotlar

1. Attal J., Puissant C., Houdebine L.M. An improvement of a rapid method using Qiagen columns to purify plasmids // *Biotechniques*. 1990. V. 8. P. 269—271.
2. Beld M., Sol C., Goudsmit J., Boom R. Fractionation of nucleic acids into singlestranded and double-stranded forms // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2618—2619.
3. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513—1523.
4. Borodina T.A., Lehrach T., Soldatov A. K DNA purification on homemade silica spin-columns // *Anal. Biochem.* 2003. V. 321. P. 135—137.
5. Chakrabarti A., Sitaric S., Ohi S. A procedure for large-scale plasmid isolation without using ultracentrifugation // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1992. V. 16. P. 211—215.
6. Cheng L, Li T. Y., Zhang Y. Rapid preparation of total nucleic acids from *E. coli* for multi-purpose application // *Biochem. Mol. Biol.* 2004. V. 37. P. 351-355.
7. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 581—585.
8. Cryer D.R., Eccleshall R., Marmur J. Isolation of yeast DNA // *Methods Cell Biol.* 1975. V. 12. P 39-44.
9. Ehrt S, Schnappinger D. Isolation of plasmids from *E. coli* by boiling lysis // *Methods Mol. Biol.* 2003. V. 235. P 79-82.
10. Engebrecht J., Brent R., Kaderbhai M.A. Minipreps of plasmid DNA // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. Ch. 1, unit 1.6.
11. Feliciello I., Chinali G. A modified alkaline lysis method for the

preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli* // Anal. Biochem. 1993. V. 212. P 394-401.

12. Fiore M.F., Moon D.H., Tsai S.M., Lee H., Trevors J. T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria // J. Microbiol. Methods. 2000. V. 39. P 159-169.

13. Gallagher S. Quantitation of nucleic acids with absorption spectroscopy // Curr. Protoc. Protein. Sci. 2001. V. 5: appendix 4K.

14. Holmes D.S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // Anal. Biochem. 1981. V. 114. P. 193—197.

Huang Y.H., Leblanc P., Apostolou Y., Stewart B., Moreland R.B. Comparison of Milli-Q PF plus water with DEPC-treated water in the preparation and analysis of RNA // Nucleic Acids Symp. Ser. 1995. V 33. P 129-133.

15. Jarrell K.F., Faguy D., Hebert A.M., Kalmokoff M.L. A general method of isolating high molecular weight DNA from methanogenic archaea (archaeobacteria) // Can. J. Microbiol. 1992. V. 38. P 65-68.

16. Lee S. Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. 1990. V. 9. P. 676—679.

17. Lev Z. A procedure for large-scale isolation of RNA-free plasmid and phage DNA without the use of RNase // Anal. Biochem. 1987. V. 160. P. 339—336.

18. Liou J.T., Shieh B.H., Chen S.W., Li C. An improved alkaline lysis method for miniprep of plasmid DNA // Prep. Biochem. Biotechnol. 1999. V. 29. P. 49—54.

19. Mak Y.M., Ho K.K. An improved method for the isolation of chromosomal DNA from various bacteria and cyanobacteria // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 4101—4102.

Nuyts S., van Mellaert L., Lambin P., Anne J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 44. P 235-238.

3-MAVZU. AGARozALI VA POLIAKRILAMIDLI GEL-ELEKTROFOREZ, UNING TURLARI.

Reja:

1. Elektroforez haqida tushuncha
2. Elektroforezda ishlatiladigan asbob-uskunalar
3. Agarozali gel elektroforez
4. PAAG elektroforez

Tayanch soʻz va iboralar: DNK va RNK vizual aniqlash uchun agarozali va PAAG elektroforez, elektroforezda qoʻllaniladigan uskunalar, buferlar va boʻyoqlar.

Mazkur usul yordamida biologik naʼmunalaridan ajratilgan DNK ni deteksiya qilish va PZR mahsulotining nukleotidlar ketma-ketligi sonini aniqlash uchun qoʻllaniladi. Genom DNK sini deteksiya qilishda 1-0.8% li agarozali geli ishlatiladi. PZR mahsulotining nukleotidlar sonini aniqlash uchun PZR fragmenti uzunligiga qarab, 1-3 % gacha boʻlgan agarozali gelidan foydalaniladi.

Asosiy qismlar:

1. Elektroforez kamerasi;
2. Elektr quvvat manbai;
3. Gelni quyish uchun plastinka.

Foydalaniladigan reaktivlar:

1. Agarozali;
2. 0.5x TBE buferi yoki 1xTAE (Tris: Sirka kislotasi: EDTA) buferi;
3. Etidium bromid;
4. Brom-fenol koʻk boʻyogʻi;
5. Ksilensianol;
6. 30% li glitserin;
7. DNK namunasi;
8. Deionlashtirilgan yoki distillangan steril suv.



1-rasm. Gel elektroforez o'tkazish qurilmasi. Ishlab chiqaruvchi: Edvotek™ 5063

Qo'shimcha kerak bo'ladigan uskunalalar:

1. Mikroto'qlinli isitgich;
2. Avtopipetka;
3. Tarozi;
4. Translyuminator (Gellarni xujjatlashtiradigan tizim, WiseDos);
5. Kolbalar.

Ishning bajarilishi:

1. Eng avvalo 100 ml 1 % li agarozaga gelini tayyorlab olinadi. Buning uchun tarozida 1g agarozani tortib olib, 100 ml 1x TAE buffer bilan aralashtirib olinadi. Kolbani ustiga 1 % agarozaga deb yozib qo'yiladi.

2. So'ngra mikroto'qlinli isitgichda eritiladi va sovutilib 40 °C bo'lganida unga avtopipetkada tortib olingan 7 mkl etidium bromid solinadi. Xona temperaturasida biroz sovutiladi.

3. Tayyor bo'lgan agarozaga gelini plastinkaga quyiladi. Chuqurchalar hosil bo'lishi uchun o'zining maxsus plastik qovurg'alari o'rnatiladi. Gel qotgunicha kutiladi. Qotgandan so'ng plastik qovurg'alar olib tashlandi va chuqurchalar (quduqchalar) hosil bo'ladi. Qovurg'alar yopishmasligi va oson ko'chishi uchun pipetkada ozgina bufer quyiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

4. Plastinkada qotgan agarozani plastinkasi bilan olib elektroforez kamerasiga qo'yiladi. Kamerani ichi TAE buferi bilan to'ldirilgan bo'ladi va chuqurchalar to'liq qoplanishi kerak.

5. Gelga namunani solish uchun bo'yoq tayyorlab olinadi. Endi shisha oynachaning ustiga avtopipetka yordamida sal avval tayyorlangan bo'yoqdan 3 mkl olib oyna ustiga tomchilab solinadi.

6. So'ng oldindan ajratib olingan, muzlatgichda -20°C li haroratda saqlanayotgan DNK namunasi kerakli xajmda Probirkalardan avtopipetka yordamida olinadi. Oynachaning ustidagi tomchilarni ustiga quyib aralashtiriladi. Aralashtirish holati 2-3 marta qaytariladi, so'ng kameradagi chuqurchalarga namunalar tartibi bo'yicha solinadi. Tarkibida glitserin bo'lganligi sababli tomchi namunalar o'zi sirg'alib chuqurchalarga joylashib oladi.

7. Kamerani qopqog'i yopiladi, elektr simlari zaryadiga mos ravishda to'g'rilab ulanadi va quvvat manbai yoqiladi. Gel elektroforez usulida genom DNK sini deteksiya qilish uchun 120 Vt li elektr zaryadida 30 daqiqa mobaynida bajarilsa, PZR mahsulotini nukleotidlar sonini aniqlash uchun 120 Vt li elektr toki ta'sirida 40 daqiqa davomida amalga oshiriladi.

8. Gelda qisqa DNK bo'lagi, katta DNK bo'lagiga nisbatan tezroq harakat qiladi. Natijani ko'rish uchun elektr quvvat manbai o'chiriladi va ehtiyotkorlik bilan qo'lqoplar yordamida gel olinadi. Ustidagi buffer to'kiladi va transelyuminatorga plastinkasiz gelning o'zi qo'yiladi.

9. Transelyuminatorda ultrabinafsha nurlari yordamida etidium bromid qo'shilgan DNK namunalarini ko'rish mumkin bo'ladi.

POLIAKRILAMID GELDA DNK ELEKTROFOREZI

Poliakrilamid gellarida (PAAG) DNKning vertikal elektroforezi asosan uzunligi 1 tpo dan kam bo'lgan chiziqli DNK fragmentlarini aniqlash va izolyatsiya qilish uchun ishlatiladi. Gellarda tahlil qilinadigan bo'laklarning o'lchamiga qarab turli xil konsentratsiyali poliakrilamid (2,5 dan 20% gacha) bo'lishi mumkin. Misol uchun, 12% TLE poliakrilamid geli 40-200 nukleotidlarning DNK qismlarini samarali ajratish uchun ishlatiladi. 20% poliakrilamid gelida faqat 6 ta asosdan iborat bo'lgan va bir nukleotidda farq qiladigan bo'laklarni ajratish mumkin.

Ushbu usuldan foydalanganda DNK fragmentlari poliakrilamid gelida harakatlanadi, bu o'zaro yuqori tarkibli bog'lanishga ega bo'lgan

inert matritsadir. PAAG akrilamid va bns-akrilamidning sopolimerizatsiyasi jarayonida hosil bo'ladi, bu akrilamidning chiziqli polimerlarini o'zaro bog'lash uchun ishlatiladi. Qoidaga ko'ra, gel tajribadan oldin monomerlarni polimerizatsiya qilish yo'li bilan tayyorlanadi. Poliakrilamid "tarmog'idagi" hujayralar hajmi akrilamid konsentratsiyasi va geldagi akrilamid va bis-akrilamid o'rtasidagi nisbat bilan belgilanadi.

Poliakrilamid gellari ajratgichlar bilan ajratilgan ikkita shisha plastinka orasiga quyiladi va DNK bo'laklari gelning vertikal holatida ajratiladi.



2-rasm. Poliakrilamidli gel elektroforez o'tkazish uskunasi. Eco-Mini sistemasi.

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- Quyidagi tarkibdagi 12% TAE-poliakrilamid geli (har biri 6 ml dan ikkita gel tayyorlash uchun): 40% akrilamid (38,7 g akrilamid va 1,3 g N,N'-metilen bms-akrilamidni 60 ml da suvda 37 ° C da eritib yuboring, keyin Milli-Q standart suv bilan 100 ml ga keltiring) - 3,6 ml; 10x TAE bufer eritmasi - 1,2 ml; 10% ammoniy persulfat (PSA) eritmali 1x TAE buferi - 0,1 ml; TEMED (N,M,H',M'-tetrametiletillenamin) - 20 mkl; suv bilan 12 ml gacha qilinadi. TEMED polimerizatsiya initsiatorlari va ammoniy persulfat gelni quyishdan oldin darhol qo'shiladi.

Eslatma. Akrilamid juda zaharli birikma (neyrotoksin) bo'lib, teriga tez kirib boradi. U bilan ishlashda qo'lqop va himoya niqobidan

Molekulyar mikrobiologiya

foydalanishni unutmang! Akrilamid eritmasi qorong'i joyda 4 ° C haroratda saqlanishi mumkin (bir necha oy davomida barqaror). Ammoniy persulfatning suvli eritmasi beqaror va 4 ° C da ikki haftadan ko'p bo'lmagan muddatda saqlanishi mumkin. TEMED yoqimsiz hidga ega.

Jadval

Poliakrilamid gel tarkibi

Komponentlar	Poliakrilamid gel %				
	3,5 %	5,0 %	8,0%	12,0%	20,0%
1	2	3	4	5	6
40%li akrilamid,ml	4,40	6,25	10,00	15,00	25,00
Deionli suv, ml	40,18	38,33	34,58	29,58	19,58
10x TAE buferi eritmasi,ml	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
10%-li ammoniy persulfat	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Umumiy hajm, ml	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Chiziqli DNK bo'laklarini samarali ajratish diapazoni	90-1000	80-500	60-400	40-200	5-100

Metodika

1. Gel quyish uchun shisha plastinkalar (tashqi va ichki) tayyorlanadi. Plastinkalar avval iliq detergent (masalan, DSH) eritmasida yaxshilab yuvilishi kerak, so'ngra shisha plastinkalarni qo'lqop bilan ushlab turib distillangan suv va etanol bilan yuvilishi kerak. Elektroforez kyuvetasi, qisqichlar va teflon lunka hosil qiluvchi taroq ham yaxshilab yuvilishi va xona haroratida quritilishi kerak.

Akrilamid eritmasiga TEMED qo'shgandan so'ng, darhol gelni aralashtiramiz va shisha plastinkalar va yon qismlar orasidagi bo'shliqqa ehtiyotkorlik bilan quyiladi. Gelga havo pufakchalari kirmasligi uchun taroq yuqoridan joylashtiriladi(buning uchun taroq

burchak ostida kiritilishi kerak) va gelning oqishini oldi olinadi. Taroq tishlarining asoslari shisha plastinkaning yuqori qismidan bir oz yuqorida bo'lishi kerak. Akrilamid xona haroratida taxminan 45-60 daqiqada polimerlanadi. Taroqni ehtiyotkorlik bilan olib tashlanadi va gelda hosil bo'lgan gribyonkalarni suv bilan yuviladi. Polimer bilan o'ralgan PAAT plastinkalari bir necha hafta davomida 4 ° C da saqlanishi mumkin.

2. Gel polimerizatsiya qilingandan so'ng, shisha plastinkalarni qisqichlar bilan elektroforez kyuvetasiga mahkamlanadi va kamerani elektroforez bufer eritmasi (1x TAE) bilan to'ldiriladi, gel ostida to'plangan havo pufakchalarini mikropipetka bilan ehtiyotkorlik bilan olib tashlanadi. Silikon moy bilan tizimning mahkamligini ta'minlash uchun rezina qistirmani ozgina yog'lash kerak.

3. Elektroforez bufer eritmasini lunkalarga ehtiyotkorlik bilan qo'shiladi, shunda DNK bo'laklari aniq va bir tekis bo'ladi. Bufer qatlami ostidagi har bir lunkaga 2,5 mkl tarkibida glitserin bo'lgan bo'yoq (Fermentas, Litva) bilan aralashtirilgan 25 mkl DNK namunasi qo'llanadi. Masalan, 50 bp DNK Ladder (0,1 mg/ml, Litvaning "Fermentas" kompaniyasi tomonidan ishlab chiqarilgan.), har bir lunkaga 5 mkl miqdorida kiritilgan. Poliakrilamid gelning sig'imi 0,5 x 0,2 sm o'lchamdagi lunkaga 1 mkg gacha DNKni qo'llash imkonini beradigan darajada katta (oligonukleotidlarni tahlil qilishda har bir lunkaga 0,5 dan 5 mkg preparat qo'shiladi).

4. 1x TAE buferida -140-200 V (standart kuchlanish 1-8 V/sm, ba'zan 30 V/sm gacha) elektroforezni poliakrilamid gel elektroforez qurilmasi - masalan, BioRad Power Pac 300 yoki BioRad Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, AQSh yordamida amalga oshiring. Anod elektrodi (+) elektroforez kamerasining pastki qismiga ulanishi kerak. 12% denaturatsiyalanmaydigan PAATda ksilen bo'yog'i 60-70 bp ga mos keladigan belgiga, bromofenol ko'k esa 20-25 bp belgisiga o'tadi.

5. Elektroforezdan so'ng kyuvetadan gel bilan shisha plastinkalarni ehtiyotkorlik bilan olib tashlanadi va gelni pastki shisha plastinka bilan birga etidiy bromid eritmasiga (0,5 mkg/ml) 1x TAE bufer eritmasiga 10-45 daqiqa davomida ehtiyotkorlik bilan bo'yash uchun joylashtiriladi. (sekin silkitish mumkin), so'ngra 5-7 daqiqa davomida suvda yuvib tashlanadi.

6. Ultrabinafsha nurlar ostida (250-270 nm) etidiy bromid bilan bo'yalgandan keyin gel tahlil qilinadi va gel suratga olinadi. Shuni

Molekulyar mikrobiologiya

ta'kidlash kerakki, poliakrilamid etidiy bromidning fluoressensiyasini so'ndiradi, shuning uchun poliakrilamid gellarida elektroforez uchun ruxsat chegarasi har bir chiziqda 10 ng DNK ni tashkil qiladi.

MAKSAM-GILBERT USULI ORQALI POLIAKRILAMID GELDAN DNKNI AJRATISH

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- quyidagi tarkibdagi elyutsiya uchun bufer eritmasi: 0,5 M ammoniy asetat; 1 mM EDTA; pH 8,0;
- 96% va 70% etanol;
- 3 M natriy asetat (pH 5,2);
- TE bufer eritmasi (pH 8,0)

Metodika

1. Poliakrilamid gel elektroforezi o'tkaziladi, gelni etidiy bromid bilan bo'yab, ultrabinafsha nurlar ostida kerakli DNK bo'lagini topiladi.

2. Bo'lakni steril skalpel yoki ustara bilan tezda kesib olinadi. Gelning kesilgan qismini steril (alkogol bilan ishlangan) stakanga o'tkaziladi va gel mayda bo'laklarga bo'linadi. Ularni steril pinset bilan mikrotsentrifuga probirkasiga joylashtiriladi va 1 hajmli elyutsiya buferi qo'shiladi.

3. 37°C da 12 soat davomida aylantirish yoki chayqatish yo'li bilan inkubatsiya qilinadi.

4. Namunani 10000 ay/min da 20 daqiqa davomida 20°C da sentrifuga qilinadi. Poliakrilamid gel qo'shib ketmaslik uchun supernatantni mikropipetka bilan ehtiyotkorlik bilan yig'ib olinadi.

5. Cho'kмагаa 0,5 hajmli elyutsiya buferi qo'shiladi, yaxshilab silkitib yana sentrifuga qilinadi. Har ikki sentrifugadan so'ng supernatant suyuqliklari qo'shiladi.

6. Eritmani filtrlash orqali poliakrilamid gelning qolgan qismlari olib tashlanadi, so'ngra DNKni 96% etanol bilan cho'ktiriladi.

7. DNKni 200 mkl elyutsiya buferida eritib, 25 mkl 3 M natriy asetat qo'shiladi va yana DNKni 96% etanol bilan cho'ktiriladi.

8. Cho'kmani 70% etanol bilan yuviladi, keyin vakuumda yoki havoda 10-15 daqiqa quritiladi va kichik hajmdagi (1P–50 mkl) TE bufer eritmasida (pH 8,0) eritib yuboriladi. Spektrofotometrda DNK konsentratsiyasi aniqlanadi va preparatni -20°C da saqlanadi.

Ўумепамыпа

1. Auger L.T., Saunders G.F. A simplified procedure for eluting mRNA from agarose gels // Anal. Biochem. 1977. V. 79. P. 338—348.

2. Bames W.M. Plasmid detection and sizing in single colony lysates // Science. 1977. V. 195. P 393-394.

3. Brody J.R., Kern S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis ///mal. Biochem. 2004. V. 333. P. 1 — 13.

Garfin D.E. Electrophoretic methods // Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research / Eds. J.A Glasei, M.P. Deutscher. San Diego: Academic Press, 1995. P. 53—109.

Nazorat savollari

1. Elektroforezning qo'llanilishi haqida ma'lumot bering.
2. Elektroforez turlarini sanab bering.
3. Agarozali gel elektroforez qilish ketma-ketligini aytib bering.
4. PAAG elektroforez nima maqsadda ishlatiladi?
5. PAAG elektroforez bajarilish ketma-ketligini aytib bering.
6. Agarozali gel elektroforez va PAAG elektroforez o'xshash va farqli tomonlarini ayting.

4-MAVZU. MIKROORGANIZMLARDA PLAZMID DNK TARKIBI VA TRANSFORMATSIYA HODISASI

Reja:

1. Plazmidalar haqida umumiy tushuncha
2. Plazmid DNKning tuzilishi va turlari
3. Plazmidalarning vazifalari
4. Transformatsiya hodisasi

Tayanch so'z va iboralar: Mikroorganizmlar uchun plazmid DNK ahamiyati va tuzilishi, plazmidalarning turlari, plazmid DNK sini gen muhandisligida qo'llanilishi.

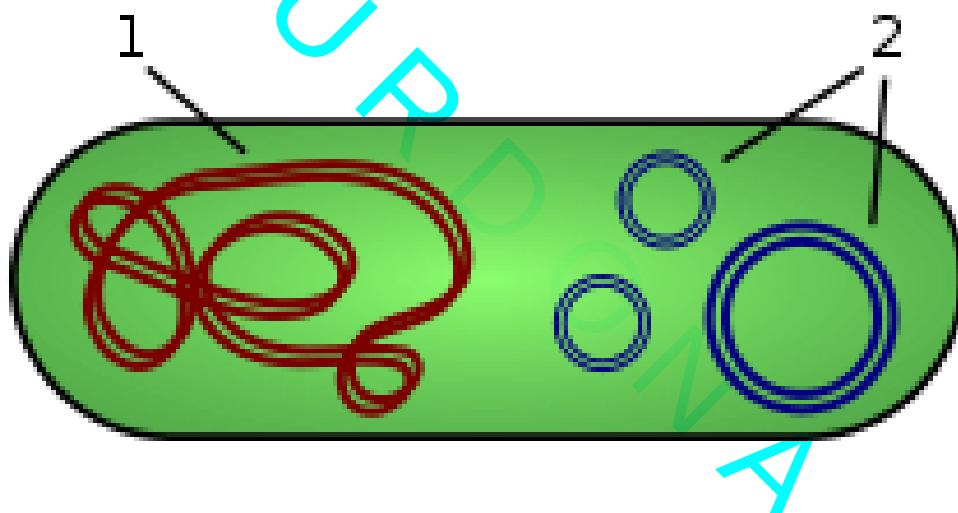
Plazmidlar xromosomalardan alohida ajratilgan va avtonom replikatsiyaga qodir bo'lgan kichik DNK molekulalaridir. Plazmidlar asosan bakteriyalarda, shuningdek, ba'zi eukariotlarda (zamburug'lar va yuqori o'simliklarda) uchraydi. Ko'pincha plazmidlar ikki zanjirli

Molekulyar mikrobiologiya

dumaloq molekulalardir. Ko‘payish qobiliyatiga qaramay, plazmidlar, viruslar kabi, tirik organizmlar hisoblanmaydi.

Plazmid o‘lchamlari 1000 dan 400-600 000 ta asosiy juft (bp) gacha. Ba’zi plazmidlar hujayrada bir yoki ikki nusxada, boshqalari esa bir necha o‘nlab miqdorda bo‘ladi. Hujayrada turli sinf plazmidlari birga yashashi mumkin.

Tabiatda plazmidlar odatda bakteriyalarning atrof-muhitga moslashish qobiliyatini oshiradigan genlarni o‘z ichiga oladi (masalan, antibiotiklarga chidamliligini ta’minlaydi). Ko‘pincha ular bir xil turdagi, jins, oila va hatto bakterial va o‘simlik hujayralari o‘rtasida bir bakteriyadan boshqasiga ko‘chirilishi mumkin, shuning uchun gorizontal genlarni uzatish vositasidir. Plazmidning hujayraga o‘tishi ikki yo‘l bilan amalga oshirilishi mumkin: kon’yugatsiya jarayonida mezbon hujayraning boshqa hujayra bilan bevosita aloqasi yoki transformatsiya, ya’ni tashqi muhitdan ekzogen DNKni tutib olish.



-rasm. Bakteriya hujayrasi ichidagi xromosoma DNKsi (1) va plazmida (2)

Sun'iy plazmidlar DNKni klonlashda vektor sifatida ishlatiladi va ularning replikatsiya qilish qobiliyati tufayli xo‘jayin hujayrasida rekombinant DNK replikatsiyasi amalga oshadi.

Plazmidlarning kattaligi har xil. Agar eng kichik plazmidlar 2 mingdan kam asos juftlarini o‘z ichiga olsa, u holda megaplazmidlar deb ataladiganlar yuz minglab asosiy juftlarni (odatda 600 minggacha) o‘z ichiga oladi. Bunday holda, megaplazmid va minixromosoma o‘rtasida aniq chegara chizish allaqachon qiyin. Ba’zi bakteriyalar turlari bir vaqtning o‘zida juda ko‘p turli plazmidlarni o‘z ichiga olishi mumkin, shuning uchun ularning umumiy genetik materiali

bakteriyaning o'zidan kattaroqdir. Misol uchun, simbiotik tuproq bakteriyasi *Sinorhizobium meliloti* o'lchamlari 3,65, 1,68 va 1,35 million bp bo'lgan 3 replikonni o'z ichiga oladi.

Ko'p nusxada hujayrada joylashgan kichik plazmidlar bakterial xromosomadan mustaqil ravishda ko'payadi. Muayyan sharoitlarda bakterial xromosoma ko'pa olmaydi, shunda plazmidlar faol ravishda ko'payadi va ularning soni ortadi.

Bu hodisa plazmid DNKni izolyasiyalashda qo'llaniladi. Masalan, F-plazmidni o'z ichiga olgan megaplazmidlar hujayrada bir yoki ikkita nusxa ko'rinishida bo'ladi. Ularning replikatsiyasi bakterial xromosoma replikatsiyasi kabi boshqariladi va genomik DNKning duplikatsiyasi boshlanganda megaplazmid ham replikatsiya qilishni boshlaydi

Ko'pgina hollarda plazmidlar avtonom bo'lsa-da, ularning ba'zilar mezbon bakteriyaning genomik DNKsiga qo'shilishi va ma'lum sharoitlarda yana ajralib chiqishi, ba'zan hatto genomik DNK parchalarini ham o'zlari bilan olib ketishi mumkin. Bunday plazmidlar epizomalar deb ataladi.

Aksariyat plazmidlar dumaloq molekulalardir, lekin chiziqli plazmidli bakteriyalarning ko'plab misollari ma'lum. Chiziqli plazmidlar dumaloq xromosomalarda bo'lmagan oxirgi replikatsiya mexanizmini talab qilganligi sababli, bu plazmidlar odatda chiziqli xromosomalarni o'z ichiga olgan bakteriyalarda topiladi (garchi bu qoidadan istisnalar ma'lum bo'lsa ham)

Doiraviy plazmidlar bir nechta topologik konfiguratsiyaga ega bo'lishi mumkin, bu DNK girazalari va topoizomerazalarning qarama-qarshi ta'sirining nisbati bilan ta'minlanadi. Odatda plazmid DNK kovalent yopiq o'ralgan halqa shaklida bo'ladi. Agar DNK zanjirlaridan biri uzilib qolsa, u holda o'ralgan plazmid oddiy halqaga aylanadi, u elektroforez paytida agaroz geli orqali super o'ralgan shaklga qaraganda sekinroq o'tadi.

Agar DNKning ikkala zanjiri ham uzilishga uchrasa, u holda chiziqli shakl hosil bo'ladi. Bundan tashqari, gomologik rekombinatsiya tufayli plazmid monomerleri dimerlarga birlashishi mumkin, ular kattaligi tufayli elektroforez paytida agaroz gelidagi monomerlarga qaraganda sekinroq o'tadi. Elektroforez jarayonida turli shakldagi plazmidlarning agaroz-gel orqali turlicha o'tish tezligi fenomeni ularni elektroforetik ajratish uchun ishlatiladi (1-jadval)

Ayrim DNK plazmidalarining xarakteristikasi**1-jadval**

Plazmida nomi	Xo'jayin organizm	Plazmida razmeri (ming.juft)	Plazmidalar shakli	Hujayrada plazmida nusxalari soni
pUB110	Bacillus subtilis	2,3	Halqali	20—50
ColE1	Escherichia coli	6,6	Halqali	10—30
lp25	Borrelia burgdorferi	24,2	Chiziqli	1—2
pNOB8	Sulfolobus sp.a	41,2	Halqali	2—'0
F	Escherichia coli	99,2	Halqali	1—2
SCP1	Streptomyces coelicolor	350,0	Chiziqli	4
pSymA	Sinorhizobium meliloti	1354,2	Halqali	2—3

Plazmidalar tuzilishi

Replikatsiya qilish uchun har qanday plazmid quyidagi elementlarni o'z ichiga olishi kerak:

- replikatsiyaning boshlanish nuqtasi (ori);
- replikatsiyaning struktura genlari (rep);
- plazmidning nusxalanishi uchun javob beradigan genlarni o'z ichiga olgan lokusi
- bo'linish vaqtida qiz hujayralar o'rtasida plazmidlarning tarqalishini nazorat qiluvchi juft genlar;
- nusxa raqamini saqlash uchun mas'ul bo'lgan ccd determinantlari

Plazmidalarda Ori saytlari soni har xil. Plazmid ColE1da bitta va R6K plazmidasida uchtaga ega. Qoidaga ko'ra, agar bir nechta ori sayti mavjud bo'lsa, asosan ulardan biri ishlaydi, qolganlari esa asosiysi buzilgan taqdirda saqlanadi.

Rep genlari ori bilan bog'lanib, plazmid replikatsiyasining boshlanishida ishtirok etadigan oqsillarni (Rep) kodlaydi. Ammo genlarning asosiy qismi bakteriyaning genomik DNKsida joylashgan. Turli plazmidlarning Rep oqsillari turli xil aminokislotalar ketma-

ketligi va tuzilishiga ega, ammo kichik plazmidlar pPF1, pGL3, pPBS1, pBLX va pPB1 Rep oqsillarining ketma-ketligi 98% bir xil. Rep genlari umuman yo'q plazmidlar ham mavjud.

Ko'p lokus hujayradagi plazmid nusxalari soniga salbiy ta'sir ko'rsatadigan bir yoki ikkita genni o'z ichiga oladi. Tekshirishlarda ushbu lokusda replikatsiya kelib chiqishiga yaqin bo'lgan beshta takrorlanish topildi. repE oqsili bu takrorlanishlarga bog'lanadi, shuning uchun u ori bilan o'zaro ta'sir qila olmaydi, bu replikatsiya boshlanishiga to'sqinlik qiladi.

Par genlar (ingliz tilidan partition so'zidan olingan) ona hujayraning bo'linishi paytida plazmid nusxalarini qiz hujayralar o'rtasida taqsimlash uchun javobgardir. F-plazmida lokus taxminan 3 ming bp dan iborat va ikkita genni o'z ichiga oladi: parA va parB genining oqsil mahsuloti yordamchi rol o'ynaydi. ccd determinantlari, aslida, toksin-antitoksin tizimi bo'lib, bo'linish paytida plazmidni meros qilib olmaydigan hujayralar o'ladi. Turli plazmidlar yuqorida aytib o'tilganlarga qo'shimcha ravishda boshqa strukturaviy genlarni ham o'z ichiga olishi mumkin.

Plazmidalarning vazifalari

Ko'pgina plazmidlar o'z egalariining fenotipida sezilarli o'zgarishlarga olib kelmaydi, bunday plazmidalar sirli yoki yashirin deb ataladi. Boshqalari esa, aksincha, mezbon hujayrada uning muayyan atrof-muhit sharoitida omon qolishiga yordam beradigan xususiyatlarning namoyon bo'lishi uchun javobgardir va bu plazmidlarsiz bakteriyalar nobud bo'ladi yoki ularning o'sishi sekinlashadi.

Plazmidlar bakteriya hujayrasida turli funktsiyalarni bajarishi mumkin. Antibiotiklarga qarshilik genlarini o'z ichiga olgan plazmidalar- eng ko'p o'rganilgan plazmidlardir. Ular R-plazmidlar yoki R-omillar (inglizcha qarshilik - barqarorlik) deb ataladi. Qarshilik genlarining o'zi juda xilma-xildir: penitsillinni yo'q qiladigan plazmid bilan kodlangan b-laktamazalardan tortib, tetratsiklinning hujayralarda to'planishiga to'sqinlik qiluvchi membrana oqsillarigacha. Bakteriyalar populyatsiyalarida rezistentlik plazmidlarining tez tarqalishi tufayli antibiotiklarga chidamlilik muammosi tobora keskinlashib bormoqda.

Antibiotiklarga qarshilik genlarini tashuvchi plazmidlarning shakllanishida genlarning bir plazmidan ikkinchisiga yoki bakterial xromosomadan plazmidga o'tishini ta'minlovchi transpozonlar muhim

Molekulyar mikrobiologiya

rol o'ynaydi. R-omil transduksiya va normal hujayra bo'linishi paytida uzatiladi. Ba'zi R-plazmidlar bakteriyalarning kon'yugatsiyasi paytida o'tkazilishi mumkin, ya'ni ular konyugativdir. R-plazmidlarni turli turlar, avlodlar va hatto oilalardagi bakteriyalar o'rtasida o'tkazish mumkin. Masalan, Pseudomonadaceae oilasiga mansub *Pseudomonas* bakteriyalarida ampitsillin, tetratsiklin va kanamitsinga chidamlilik uchun mas'ul bo'lgan RP1 plazmid Enterobacteriaceae oilasiga mansub *E. coli* ga yuqishi mumkin.

Ko'pgina plazmidlar odatda faqat yaqin organizmlar uchun zararli bo'lgan mikroblarga qarshi xususiyatlarga ega oqsillarni kodlovchi genlarni o'z ichiga oladi. Misol uchun, *E. coli* ning ayrim shtammlari *E. coli* ning boshqa shtammlari hujayralarini o'ldiradigan oqsillarni ishlab chiqaradi. Ushbu oqsillar kolitsinlar deb ataladi va ularning hosil bo'lishiga qodir bo'lgan shtammlar kolitsinogen deb ataladi. Kolitsin genlari plazmidlarda (Kol-plazmidlar) joylashgan va xuddi shu plazmidlarda ularni hosil qiluvchi hujayralardagi kolitsinlardan himoya qiluvchi genlar mavjud.

O'tkazilishi

Plazmidalar bakterial hujayra tomonidan boshqa hujayra bilan to'g'ridan-to'g'ri aloqada (konyugatsiya) yoki atrof-muhitdan ko'chirib o'tkazish (transformsiya) orqali olinishi mumkin. Plazmidalarni bakteriyalardan olishning asosiy usuli - konyugatsiya. Bu jarayon 1946 yilda E. Tatum va J. Lederberg tomonidan *E. coli* da tasvirlangan va keyinchalik konyugatsiya boshqa bakteriyalarda, jumladan *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella* va *Pseudomonas* da aniqlangan. Ikki hujayra o'rtasidagi aloqa plazmidaga xos jinsiy pili orqali amalga oshiriladi.

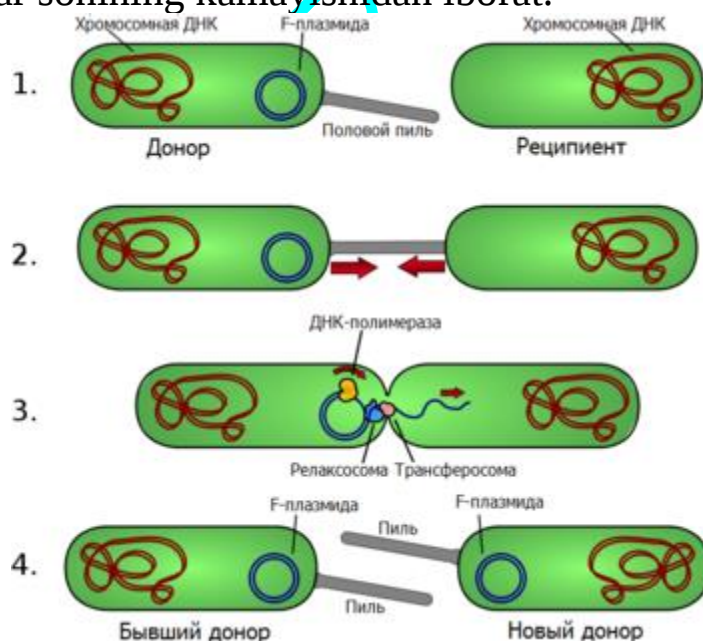
O'zi tarqalishi uchun konjugatsiyani boshlaydigan plazmidlar konyugativ deb ataladi. Bir hujayradan ikkinchisiga o'tishda ular ba'zan o'zlari bilan konjugativ bo'lmagan plazmidlarni yoki genomik DNK nusxasini olib ketishadi. Konyugatsiya jarayonining umumiy sxemasi quyidagicha: Dastlab oqsil pili yordamida bakteriyalar o'rtasida aloqa o'rnatiladi. Donor hujayradagi plazmidaning DNK zanjirlari ajraladi, ulardan biri retsipient hujayraga o'tadi, shundan so'ng ikkala zanjirlar o'ziga komplementar zanjirlar hosil qilishadi va plazmidlar yana ikki zanjirli bo'ladi. Eng yaxshi ma'lum bo'lgan konyugativ plazmid F-plazmid yoki F-omildir. F plazmid uzunligi 100 kb ga yaqin

epizomadir. U replikatsiya ($oriV$) va uzilish nuqtasi ($oriT$)ning o'ziga xos kelib chiqishiga ega.

F-plazmida barcha konyugativ plazmidalar singari, boshqa bakteriyalar pililarining hujayra devoriga biriktirilishiga to'sqinlik qiluvchi oqsillarni kodlaydi. Boshqa genetik ma'lumotlarga qo'shimcha ravishda, F plazmid bitta operonda tashkil etilgan tra va trb lokuslarini olib yuradi. Ular tarkibidagi genlar konyugatsiya jarayonining turli jihatlarini uchun javob beradi: pilin sintezi va jinsiy pili yig'ilishi, genetik materialning uzatilishini boshlash va tartibga solish, $oriT$ lokusida sinish ($razriv$) va DNK zanjirining ochilishi kabilardi.

Tra lokus boshqa F-plazmidaga o'xshash konyugativ plazmidalarda ham mavjud; u konyugativ uzatishning kelib chiqishi va konyugatsiya uchun zarur bo'lgan oqsillarni kodlaydigan 20 ta genni o'z ichiga oladi.

O'linga olib keladigan zigoz deb ataladigan narsa ham ma'lum bo'lib, u bitta retsipientga ko'plab DNK o'tkazish ko'priklarining shakllanishi tufayli son jihatdan ustun bo'lgan donor hujayralar qabul qiluvchi hujayralar soniga nisbatan aralashtirilganda hayotiy transkonyugantlar sonining kamayishidan iborat.



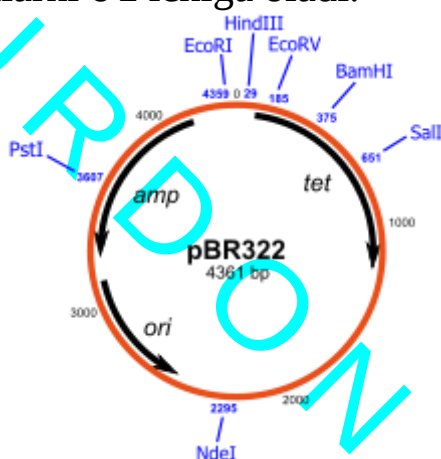
3-rasm. Bakteriyalarda konyugatsiyaning sxematik tasviri. 1. Donor hujayra jinsiy pili chiqaradi. 2. Pili ikki hujayrani bir-biriga bog'lab, qabul qiluvchi hujayraga yopishadi. 3. Harakatlanuvchi plazmida bir zanjirli uzilish sodir bo'ladi va DNKning bir zanjiri retsipient hujayraga o'tadi. 4. Ikkala hujayra ham plazmidning ikkinchi DNK zanjirini

Molekulyar mikrobiologiya

tugatib, ikki zanjirli dumaloq plazmidni tiklaydi va jinsiy pili hosil qiladi. Endi ikkala hujayra ham to'laqonli donordir

Plazmidalarni ishlatilishi

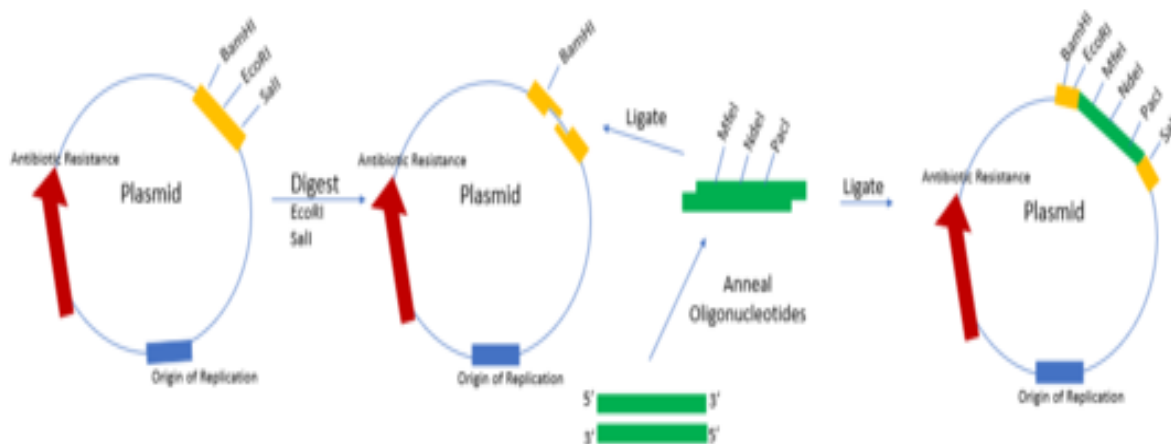
Tadqiqot faoliyatida plazmidlardan foydalanish juda katta ahamiyatga ega. Sun'iy plazmidlar gen muhandisligida maqsadli kodlash qismlari kiritilgan vektor sifatida faol qo'llaniladi. Bakteriya hujayralarida bunday plazmidlarni ko'paytirish orqali juda ko'p miqdorda kerakli oqsil hosil qilish mumkin. Masalan, hozirda insulin shu tarzda olinadi. Vektor sifatida foydalanish uchun mo'ljallangan sun'iy plazmidlar sotuvda mavjud bo'lib, ular har doim replikasiyaning kelib chiqishini, ba'zi antibiotiklarga qarshilik ko'rsatadigan genlarni (plazmidni olgan bakterial hujayralarning antibiotik muhitida tanlash uchun) va turli restriksiyalovchi endonukleazalari tomonidan ta'sir qiladigan bir nechta saytlarni o'z ichiga oladi.



4-rasm. Klonlash vektori sifatida birinchilardan bo'lgan pBR322 plazmidining sxematik diagrammasi. Amp va tet genlari mos ravishda ampitsillin va tetratsiklinga qarshilik uchun javobgardir, replikasiyaning kelib chiqishi ori sifatida belgilanadi va cheklash joylari ko'k rang bilan belgilanadi.

DNK fragmentini kiritish plazmid va fragmentni restriksiyalovchi ferment bilan ishlov berish va keyinchalik ularni ulash orqali amalga oshiriladi. Oddiy vektorlarga uzunligi 15 kilobazagacha bo'lgan fragmentlarni kiritish mumkin. Boshqa vektorlar, masalan, kosmidlar (bakteriofag l cos lokusni o'z ichiga olgan plazmidlar), fagemidlar deb ham ataladigan plazmidlar (f1 replikasiyasining kelib chiqishini o'z

ichiga olgan fag plazmidlar), bakterial va xamirturushli sun'iy xromosomalarga katta hajmli DNK fragmentlarini kiritish mumkin.



5-rasm. Plazmidga kerakli DNk fragmentini kiritish sxemasi

Turli tadqiqotchilar tomonidan yaratilgan plazmid ketma-ketliklarini Addgene, BCCM/LMBP va NCBI ma'lumotlar bazasi kabi ommaviy ma'lumotlar bazalarida topish mumkin. Kerakli xususiyatlarga ega sun'iy plazmidlarni yaratish uchun ko'plab bioinformatika dasturlari va vositalari yaratilgan. Ulardan foydalanib, siz restriksiya joylarini topishingiz va plazmid ketma-ketligini qo'shimchalar bilan olishingiz mumkin, ya'ni "virtual klonlash" ni amalga oshirish uchun. Bunday vositalarga misollar: ApE, Clone Manager, GeneConstructionKit, Geneious, Genome Compiler, LabGenius, Lasergene, MacVector, pDraw32, Serial Cloner, SnapGene, VectorFriends, Vector NTI va WebDSV kabilardir.

Plazmidlar gen terapiyasi uchun istiqbolli vosita hisoblanadi, chunki ular bemor hujayralarida yetishmaydigan oqsillarni ifodalashi mumkin. Plazmidlarda genomni tahrirlash vositalarini kodlovchi genlarni, masalan, ruh barmoq domenlarini o'z ichiga olgan nukleazalar va CRISPR/Cas tizimining komponentlari: Cas9 oqsili va yo'naltiruvchi RNK hujayralarga yetkazilishi mumkin.

Bakteriyalarga qiyin parchalanadigan substratlarni parchalashga imkon beruvchi plazmidlar bioremediatsiyada qo'llanilishi mumkin. Plazmidlar vaksinalar va yangi preparatlar yaratishda, shuningdek, biologik faol moddalarni sintez qiluvchi organizmlar mahsuldorligini oshirishda keng qo'llaniladi.

Transformatsiyaning ahamiyati. O'tgan asrning yigirmanchi yillarning oxirida hujayra yadrosidagi xromosomada

Molekulyar mikrobiologiya

dezoksiribonuklein kislota ko'p miqdorda topilishiga chuqur e'tibor bera boshlandi. Avvalo gistoximiyaviy fyolgen reaksiyasi (fuksin sulbit kislota bilan qizil rang hosil qilish)dan foydalanib, DNK xromosomalarda, RNK sitoplazmada joylanishi aniqlandi. Xuddi shu yillar irsiy belgilarning nasldan-naslga o'tishi xromosomalarda joylashgan genlarga bog'liq ekanligini tasdiqlovchi faktlar irsiyatning xromosoma nazariyasi uzil-kesil qabul qilinishiga olib keladi.

Transformatsiya - DNK molekulasi bakterial hujayra tomonidan tashqi muhitdan yutilishi jarayoni. Transformatsiyaga qodir bo'lishi uchun hujayra barkamol bo'lishi kerak, ya'ni DNK molekulalari hujayra membranalari orqali unga kirib borishi kerak. Transformatsiya molekulyar biologiya va genetik muhandislikda faol qo'llaniladi.

Shuni ta'kidlash kerakki, "transformatsiya" atamasi faqat bakterial hujayralarga tegishli. Chet DNKning eukariotik hujayralarga kirishi transfeksiya deyiladi.

Griffits tajribasi. Shuning bilan birga genlar fermentlarni idora qilishi, ya'ni bioximiyaviy jarayonlarni boshqarishi haqida ko'plab ma'lumotlar to'plana boshlandi. Mana shu yillar ingliz olimi Fred Griffits pnevmokokklarning kasallik qo'zg'atmaydigan turi hujayralarni ularning kasallik qo'zg'atadigan, lekin qaynatish yo'li bilan o'ldirilgan, ya'ni kasallik qo'zg'atish qobiliyatini yo'qotgan hujayralari bilan qo'shib kalamush tanasiga kirgizilsa, kasallik paydo bo'lishini kuzatdi. Bu tajriba bakterianing bir turiga xos xususiyat (kasallikni qo'zg'atish) uning nobud qilingan hujayrasidan ikkinchi turiga o'tib, uning tirik hujayralarni o'zgartirishini tasdiqladi. Bu hodisa mikroblar transformatsiyasi deb atalib, nobud qilingan hujayrada tirik hujayrani o'zgartira oladigan qandaydir omil (transformatsiya chaqiruvchi faktor) mavjud degan xulosa tug'ilishiga sabab bo'ladi.

Bu faraz keng tadqiqot qilinib kelsa ham, transformirlovchi agentning ximiyaviy tabiati deyarli yana 10 yilgacha noma'lum bo'lib qoldi. Faraz etilgan faktorni tozalash va uning ximiyaviy tabiatini aniqlash ustida olib borilgan tadqiqotlar 1944 yil ulug' kashfiyotga olib keldi. Mana shu yili amerikalik olim Evveri o'zining kasbdoshlari Mak Leod va Mak Kartilar bilan 10 yillik ishlari yakunini e'lon qildi. Bu mashhur maqolada pnevmokokklarning bir turini ikkinchi turga aylantiradigan modda DNK ekanligi haqida xabar berildi. Demak, DNK belgini tashuvchi molekula, chunki nobud qilingan pnevmokokklarning

kasallik qo'zg'atish xususiyati DNK molekulasiga va DNK ta'sirida bu xususiyat tirik, lekin kasallik qo'zg'atish xususiyatida mahrum bakteriyalarga uzatiladi va hujayra ko'payganda nasldan-naslga o'tadi. Shubhasiz bu kashfiyot tufayli molekulyar biologiya poydevoriga salmoqli xissa qo'shdi.

Nazorat savollari

1. Plazmidalar nima va ularning mikroorganizmlardagi ahamiyati?
2. Plazmidalar klassifikatsiyasi haqida aytib bering.
3. Plazmidalarning strukturasi nimalardan tuzilgan?
4. Plazmidalarning vazifalarini sanab bering.
5. Plazmidalarni transformatsiyadagi ahamiyati?
6. Transformatsiya jarayonini yoritib bering.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Гигани О. Б. Плазмиды. — М.: РУСАЙНС, 2017. — 154 с. — ISBN 978-5-4365-1976-0.
2. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. — СПб.: Издательство Н-Л, 2010. — 718 с. — ISBN 978-5-94869-105-3.
3. Jeremy W. Dale, Simon F. Park. Molecular Genetics of Bacteria. — 4th Edition. — Chichester, West Sussex; Hoboken, N. J.: John Wiley & Sons, Ltd, 2004. — ISBN 0-470-85084-1.

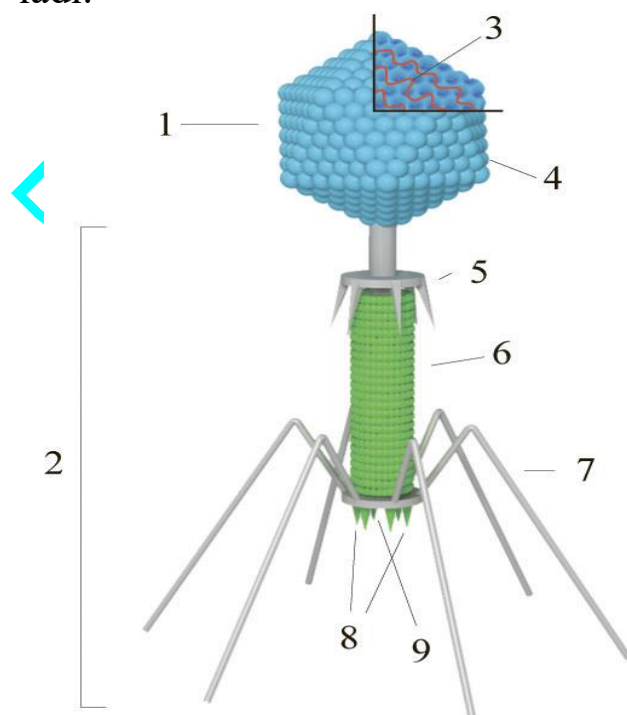
5-MAVZU. BAKTERIOFAGLARNING TUZILISHI, LITIK SIKLI VA TABIATDAGI AHAMIYATI.

Reja:

1. Bakteriofaglar haqida umumiy tushuncha
2. Bakteriofaglar tuzilishi
3. Litik sikl jarayoni
4. Lizogeniya hodisasi

Tayanch soʻz va iboralar: Faglar tuzilishi va litik sikl jarayoni, virulent va moʻtadil faglar, bakteriya genlarini faglarining DNK si yordamida tashilishi, repressor genlari va lizogeniya hodisasi.

Bakteriofaglar (bakteriyalar va yun. phagos – yemiruvchi) – bakteriyalarni yutib, yemirib, yoʻq qilib yuboradigan viruslar; bakteriyalar kushandasi. 1917-yil fransuz olimi F. D.Erell bakterial filʼtrlardan oʻtib keta oladigan, eritish qobiliyatiga ega mavjudotlarga "bakteriofag" deb nom bergan. N. F. Gamaleya bu jarayonni birinchi boʻlib kuzatgan (1898). Mikroorganizmlar bor joyda bakteriofaglar ham albatta boʻladi.



1-rasm.T4 bakteriofagining tuzilishi:

1 - bosh; 2 - dum; 3 - nuklein kislota; 4 - kapsid; 5 - "yoqa"; 6 - dumning oqsil qoplami; 7 - dum fibrillasi; 8 - boshqalar; 9 - bazal plastinka.

Bakteriofaglar bakteriya hujayrasiga oʻsimtasi bilan yopishib oladi (adsorbsiya), soʻngra boshchasidagi narsa hujayra ichiga kirib borib, yangi fag zarrachalarini hosil qiladi. Oqibatda hujayra yemirilib (lisis), yangi bakteriofaglar atrofga ajraladi. Virulentli va moʻtadil (simbiotik) bakteriofaglar farq qilinadi. Birinchisi hujayralarni yemirib (lisis) yangi zarrachalar hosil qiladi. Boshqalari hujayra ichiga kirsam ham uni eritib yubormaydi (profag). Moʻtadil fag tutgan bakteriyalar lizogen

bakteriyalar deyiladi. Bakteriofaglarning ayrimlari g'oyat spetsifik xususiyatga ega, ya'ni mikrobnining faqat bir turiga ta'sir ko'rsatadi (monofag). Boshqa bakteriofaglar har xil turdagi hujayralarni eritib yuboradi (polifag). Mikroblarning o'zgaruvchanligi va evolyutsiyasida bakteriofaglar muhim ahamiyatga ega. Hamma bakteriofaglar oqsil va nuklein kislotalardan tashkil topgan bo'lib, shu kislotalar turiga qarab, DNK. va RNK tutuvchi bakteriofaglarga bo'linadi. Bakteriofaglar shifobaxsh va kasalliklarning oldini oluvchi vosita sifatida ham qo'llaniladi. Yuqumli kasalliklar (dizenteriya, ich terlama va boshqalar)ga tashhis qo'yishda, bemor organizmidan ajratib olingan bakteriya xilini aniqlashda ham bakteriofaglardan foydalaniladi. O'simliklarda turli kasallik qo'zg'atuvchi (fitopatogen) bakteriyalarni yemiruvchi bakteriofaglar ham ma'lum. Ekin maydonlaridagi tuproqda va ariq suvlarida ba'zi patogen mikroblarning bakteriofaglari topilgan. Ekishdan oldin urug'likni turli kasalliklarga qarshi dorilash tajribasi bakteriofaglardan ekiladigan urug'larni yuqumsizlantirishda foydalanish mumkinligini ko'rsatdi.

Bakteriofag tuzilishi

Bakteriofaglar kimyoviy tuzilishi, nuklein kislota tipi, morfologiyasi va xarakteri bilan bakteriyalarga o'zaro ta'siri bilan farqlanadi. Faglar razmeri jihatidan mikroblar hujayralaridan yuzlab va minglab marta kichikdir. Oddiy fag zarrasi (virion) bosh va dum qismidan iborat. Dumning uzunligi odatda boshning diametridan 2-4 baravar kattadir. Boshida genetik material mavjud - bir yoki ikki zanjirli RNK yoki transkriptaza fermenti faol bo'lmagan DNK, oqsil yoki lipoprotein qobig'i bilan o'ralgan - hujayradan tashqarida genomni saqlaydigan kapsiddan iborat. Nuklein kislota va kapsid birgalikda nukleokapsidni tashkil qiladi. Bakteriofaglar bir yoki ikkita maxsus oqsilning bir nechta nusxalaridan yig'ilgan ikosaedral kapsidga ega bo'lishi mumkin. Odatda burchaklar oqsilning pentamerlaridan iborat bo'lib, har bir tomonning tayanchi bir xil yoki shunga o'xshash oqsilning geksamerlaridan iborat. Bundan tashqari, faglar sharsimon, limonsimon yoki pleomorf shaklida bo'lishi mumkin. Dum yoki o'simta, oqsil naychasi - boshning oqsil qobig'ining davomi, dumning tagida genetik materialni kiritish uchun energiyani qayta tiklaydigan ATFaza mavjud. Qisqa jarayonli, o'simtasiz va filamentli bakteriofaglar ham mavjud. Boshi dumaloq, olti burchakli yoki novdasimon, diametri 45–140 nm. O'simta qalinligi 10-40 nm va

Molekulyar mikrobiologiya

uzunligi 100-200 nm. Bakteriofaglarining ba'zilari yumaloq, boshqalari ipsimon, o'lchami 8×800 nm. Nuklein kislota ipining uzunligi buralgan holatda bo'lgan boshning kattaligidan bir necha baravar katta va 60-70 mikronga etadi. O'simta mushak oqsillariga o'xshash kontraktil oqsillarni o'z ichiga olgan qobiq bilan o'ralgan ichi bo'sh naychaga o'xshaydi. Bir qator viruslarda g'ilof qisqarib, tayoqning bir qismini ochib qo'yadi. O'simta oxirida ko'pgina bakteriofaglar bazal plastinkaga ega bo'lib, undan ingichka uzun filamentlar cho'ziladi, bu esa fagning bakteriyaga biriktirilishini osonlashtiradi.

Fag zarrachasidagi oqsilning umumiy miqdori 50-60%, nuklein kislotalar 40-50% ni tashkil qiladi. Faglar, barcha viruslar kabi, hujayra ichidagi parazitlardir va mustaqil ko'payish qobiliyatiga ega emaslar. Ular tegishli xostda o'zlarining ko'payishlarini boshlash uchun barcha ma'lumotlarni o'z ichiga olgan bo'lsa-da, ularda energiya ishlab chiqarish uchun mexanizm va oqsilni sintez qilish uchun ribosomalar yetishmaydi. Ma'lum bo'lgan fag genomlarining o'lchami bir necha mingdan 498 ming juftigacha o'zgarib turadi (batsillalarni yuqtiruvchi G fagning genomi). Bakteriofag va bakteriya hujayrasi o'rtasidagi o'zaro ta'sirning tabiatiga ko'ra, virulent va mo'tadil faglar ajralib turadi. Virulent faglar soni faqat litik sikl orqali ko'payishi mumkin. Hujayra bo'linishidan keyin mo'tadil bakteriofaglar profag holatida bo'ladi (lizogen sikl).

Bakteriya hujayrasi bilan o'zaro ta'sirning dastlabki bosqichlari mo'tadil va virulent bakteriofaglar uchun bir xil. Bakteriofaglar bakteriya hujayrasi yuzasida fagga xos retseptorlarga birikadi. Fagning dumi uning oxirida joylashgan fermentlar (asosan lizotzim) yordamida hujayra membranasini lokal darajada eritib, qisqaradi va boshdagi DNK hujayra ichiga yuboriladi, bakteriofagning oqsil qobig'i esa tashqarida qoladi.

Litik sikl boshlanganda, zararlangan DNK hujayra metabolizmining to'liq qayta tuzilishiga olib keladi: bakterial DNK, RNK va oqsillarning sintezi to'xtaydi. Fag nuklein kislotasi replikatsiya qiladi. Bakteriofag DNK replikatsiyasi yarim konservativ mexanizm bo'yicha sodir bo'ladi va o'zining DNK polimerazalari ishtirokida amalga oshiriladi. Bakteriofag DNK o'zining transkriptaza fermenti yordamida transkripsiyalana boshlaydi, u bakteriya hujayrasiga kirgandan so'ng faollashadi.

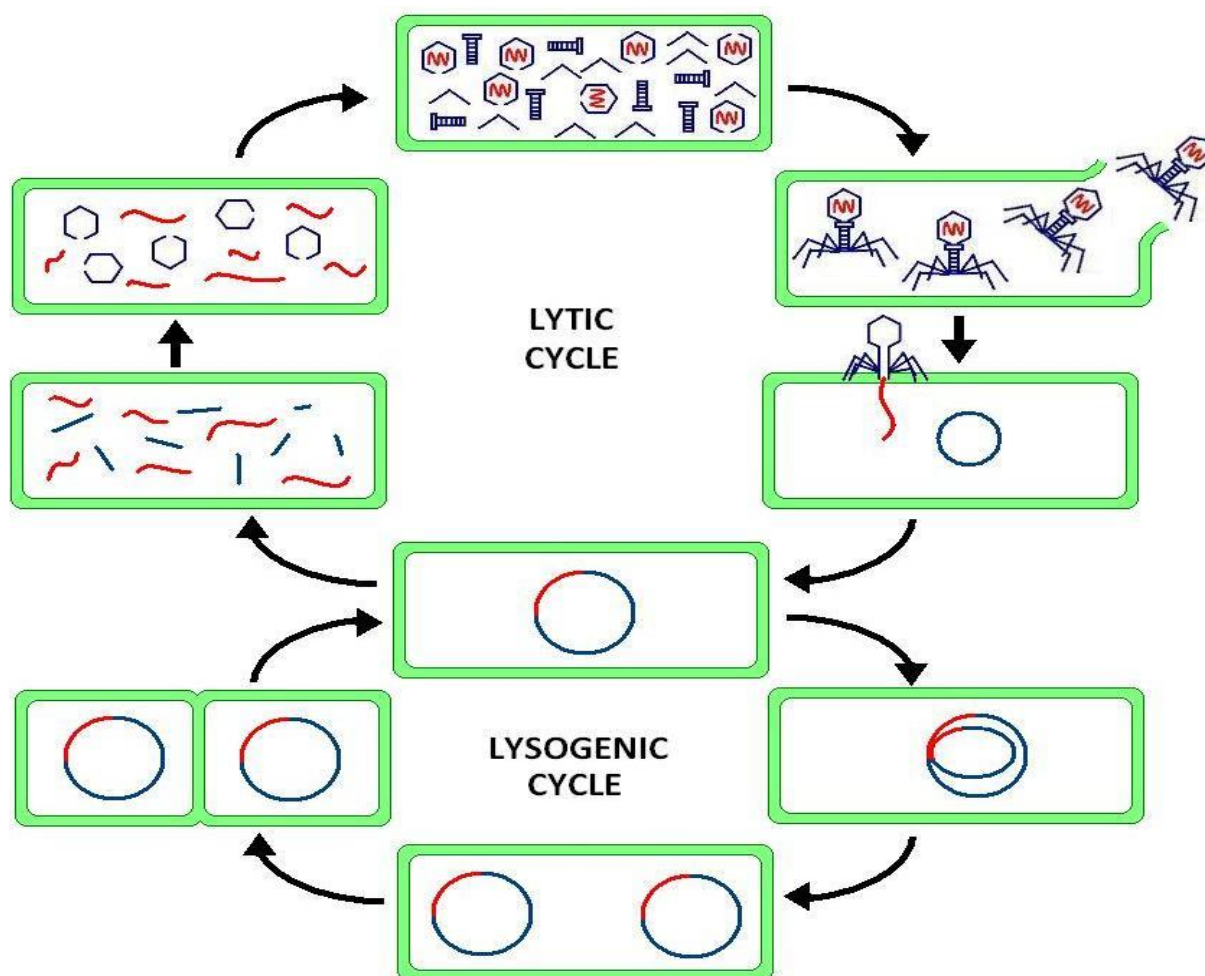
Birinchi bo'lib, xo'jayin hujayrasining ribosomalariga kiradigan erta, keyin kech mRNKlar sintezlanadi, ular mos ravishda erta (DNK polimerazalari, nukleazalar) va kech bakteriofag oqsillari (kapsid va dum oqsillari, lizozim, ATFaza va transkriptaza fermentlari) sintezlanadigan joyda hosil bo'ladi. Kech oqsillar sintezi va DNK replikatsiyasi tugallangandan so'ng, yakuniy jarayon sodir bo'ladi ya'ni fag zarrachalari yetiladi yoki fag DNKsining oqsil qobig'i bilan birikmasi va yetuk yuqumli fag zarralarining shakllanishi ro'y beradi.

Bu jarayonning davomiyligi bir necha daqiqadan bir necha soatgacha davom etishi mumkin. Keyin hujayra lizisi sodir bo'ladi va yangi yetuk bakteriofaglar ajralib chiqadi.

Lizogen sikl boshlanganda fagning genetik materiali xo'jayin hujayraning genetik sistemasi bilan teskari ta'sir o'tkazadi, xromosomaga integratsiyalanadi yoki plazmid sifatida qoladi. Shunday qilib, virus genomi xo'jayin DNKsi va hujayra bo'linishi bilan sinxron ravishda ko'payadi va bu holatdagi bakteriofag profag deb ataladi. Profagni o'z ichiga olgan bakteriya, ma'lum sharoitlarda yoki o'z-o'zidan, litik siklni amalga oshirish uchun rag'batlantirilgunga qadar lizogenik bo'ladi. Lizogeniyadan lizizga o'tish lizogen induksiya yoki profag induksiyasi deb ataladi.

Fag induksiyasiga induksiyadan oldingi xo'jayin hujayraning holati, shuningdek, induksiya vaqtida mavjud bo'lgan ozuqa moddalari va boshqa sharoitlar kuchli ta'sir ko'rsatadi. Yomon o'sish sharoitlari lizogen yo'lni qo'llab-quvvatlaydi, yaxshi sharoitlar esa lizing reaksiyasiga yordam beradi. Spontan induksiya holatlari ma'lum. Inoviridae oilasidan mo'tadil faglar xo'jayin hujayralarining o'limiga olib kelmasdan barqaror ko'payish qobiliyatiga ega.

Bakteriofaglarning o'ta muhim xususiyati ularning o'ziga xosligidir: bakteriofaglar ma'lum bir turning kulturasini lizis qiladi, bundan tashqari, har xil turdagi bakteriyalarda parazitlik qiladigan ko'p valentli bakteriofaglar mavjud bo'lsa-da, tur ichidagi variantlarni lizis qiluvchi tipik bakteriofaglar mavjud. Quyida bakteriofaglarning sikllariga to'liqroq to'xtalib o'tamiz.



2-rasm. Litik va lizogen sikl

Litik sikl

Litik sikl yoki litik infeksiya (ing. Lytic cycle) bakteriofagning hayot siklining bir turi bo'lib, bakterial hujayra zararlagandan so'ng, virus o'zini ko'paytiradi va keyin xo'jayin hujayrani o'ldiradi.

Litik sikl davomida fagning genomik DNKsi (yoki RNK) xo'jayin hujayraga kiradi, bu yerda virus genlarining transkripsiyasi va uning genetik materialining replikatsiyasi sodir bo'ladi, shuningdek, kapsid oqsillari va boshqa virusli oqsillar, shu jumladan virusning bir qismi bo'lgan yetilgan virion sintezlanadi. Oxir-oqibat, hujayraning lizisi sodir bo'ladi, u yerdan yangi hosil bo'lgan virus zarralari chiqadi.

Litik sikldan farqli o'laroq, lizogen sikl davomida fag o'z genomini bakteriya genomiga kiritadi va har bir hujayra bo'linishi bilan ikki baravar ko'payadi (virusning hayot aylanishining bu bosqichi profag deb ataladi), ya'ni u darhol xo'jayin hujayrasini o'ldirmaydi. Ko'pgina faglar litik sikldan lizogen siklga o'tishi mumkin va aksincha.

Mexanizmi

Litik fagning yuqumli siklini erta davrga (virus genomining hujayra ichiga kirishidan uning replikatsiyasigacha bo'lgan voqealar) va kech davrga (hujayra lizisiga replikatsiya boshlanganidan va fag zarralari chiqarilgandan keyin) bo'lish mumkin.

Dastlabki bosqichda virus genomining replikatsiyasida ishtirok etadigan fermentlarning faol sintezi mavjud. Bu fermentlarga nukleotid polimerazalar, rekombinatsiya fermentlari va ba'zi hollarda fag DNKsini o'zgartiruvchi fermentlar kiradi.

Fag RNK yoki DNKning faol replikatsiyasi natijasida fag genomining ko'plab nusxalari zararlangan bakterial hujayra sitoplazmasida to'planib, ular bir-biri bilan rekombinatsiyaga kirishadi.

Kechki bosqichda oqsillar sintezlanadi, ular keyinchalik fag zarralarining bir qismiga aylanadi. Murakkab kapsidlarni yig'ish uchun yordamchi oqsillar kerak bo'ladi, ular ham fag genomi tomonidan kodlangan, ammo virionga kiritilmagan.

Keyinchalik, kelajakdagi viruslarning boshlari va dumlari yig'iladi va bu vaqtda fag genomining replikatsiyasi eng yuqori tezligiga yetadi. Nihoyat, genomning nusxalari bo'sh boshlarga kiradi va dumlar ham qo'shiladi. Xo'jayin bakteriya parchalanadi va fag zarralari chiqariladi

Regulyatsiyasi

Litik siklni tartibga solish kaskadda, ya'ni siklning ma'lum bir bosqichida hosil bo'lgan oqsillarda amalga oshiriladi, keyingi bosqich genlarining ekspressiyasiga bevosita yoki bilvosita ta'sir qiladi. Zararlanish siklining boshida ifodalangan erta genlarni ajratadi. Ular ko'p emas va o'rta genlar deb ataladigan ekspressiyani faollashtirib, siklning keyingi bosqichiga o'tishni indutsirlaydi.

Ba'zi hollarda, o'rta genlarning shakllanishi faollashganda, erta genlar o'chirilishi yoki ekspressiyasi davom etishi mumkin.

Erta va o'rta genlar tufayli genom replikatsiyasi va kech genlarni ekspressiyasi uchun zarur bo'lgan hamma narsa ta'minlanadi: σ -omil, replikatsiya fermentlari va boshqa oqsillar.

Oraliq genlarning mahsulotlari (xususan, σ -omil) virionlarning shakllanishi va yig'ilishi uchun zarur bo'lgan oqsillarni o'z ichiga olgan kech genlarning ifodalanishini nazorat qiladi.

Litik sikl regulyator oqsillari yangi promotorlardan yangi genlarning ifodalanishini boshlashi yoki xo'jayin hujayraning RNK polimerazasini to'xtatishni oldini olishi mumkin.

Molekulyar mikrobiologiya

Transkripsiya bosqichida fag yangi σ -omil hosil bo'lishini boshlashi mumkin, buning natijasida RNK polimeraza yangi promotorlar to'plamini taniy boshlaydi yoki yangi RNK polimeraza hosil bo'ladi.

Litik siklni tartibga solishda antiterminatsiya muhim rol o'ynaydi. Erta yoki o'rta genlar orasida oqsil sintezi faollashishi mumkin – antiterminatsiya omili RNK polimeraza transkripsiyasini erta genlardan tashqari davom ettirishga imkon beradi.

λ fagda u pN bilan belgilanadi. Fagning yana bir antiterminator oqsili λ , pQ, u ham erta genlar qatoriga kiradi, RNK polimeraza kech genlarning transkripsiyasiga o'tishga imkon beradi.

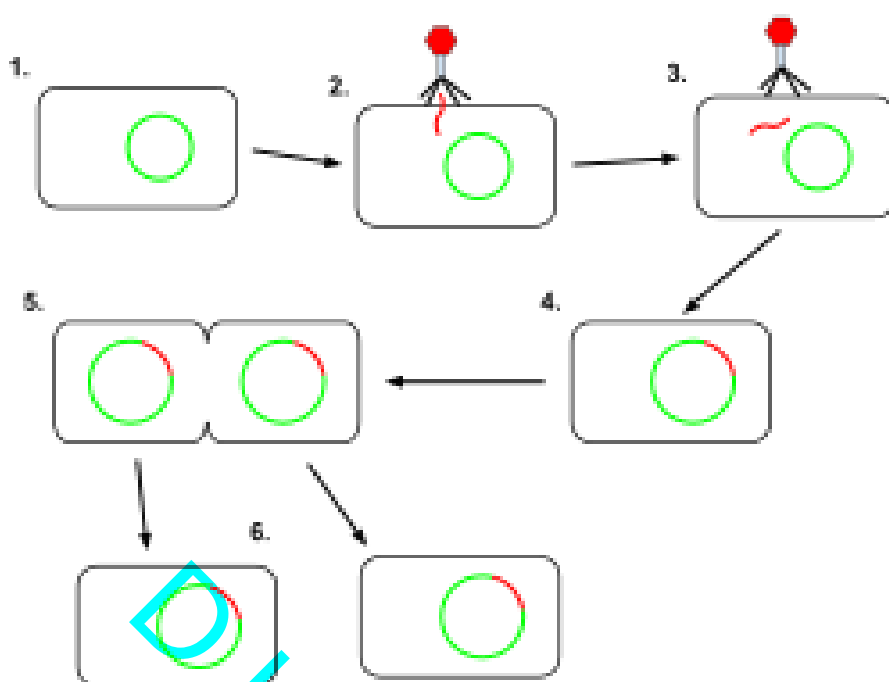
Qizig'i shundaki, bu holda fag I DNKsi halqa shaklida yopiladi, shuning uchun kech genlar bitta uzluksiz transkripsiya birligini hosil qiladi.

Fag I dagi litik va lizogen sikl o'rtasidagi muvozanat ikkita oqsilga bog'liq: lizogenez uchun zarur bo'lgan repressor va Cro proteini, ularsiz to'liq litik sikl mumkin emas. Bu oqsillar erta bosqichda ham litik, ham lizogen sikl davomida sintezlanadi. Bu ikki oqsil ma'lum bir operator bilan bog'lanish uchun raqobatlashadi.

Agar lizogeniyaga o'tish uchun zarur bo'lgan cII oqsili Croga qarshi ta'sir qiladigan darajada repressor ishlab chiqarishni rag'batlantirishi mumkin bo'lsa, u holda lizogeniya saqlanib qoladi, aks holda fag litik dasturga o'tadi.

Lizogen sikl

Lizogen sikl yoki lizogeniya - bakteriofag hayot siklining bir turi bo'lib, fag o'z genomini bakteriya genomiga kiritadi va har bir hujayra bo'linishi bilan ikki baravar ko'payadi (virusning hayot aylanishining bu bosqichi profag deb ataladi). litik sikldan farqli o'laroq, xo'jayin hujayrasini darhol o'ldirmaydi.



3-rasm. Lizogen sikl sxemasi.

1 bakterial hujayra, uning DNKsi yashil rangda ko'rsatilgan. 2 - bakteriofag hujayraga yopishadi va uning ichiga DNK ni kiritadi (qizil rangda ko'rsatilgan). 3 - fag DNKsi bakteriya sitoplazmasida suzadi. 4 - Fag DNKsi bakteriyaning genomik DNKsiga integratsiyalashib, profagga aylanadi. 5, 6 - profag hujayra genomida qoladi, hujayra bo'linishi paytida u bilan ikki baravar ko'payadi.

Lizogen hayot aylanishiga ega bo'lgan faglar mo'tadil deyiladi. Ko'pgina faglar litik sikldan lizogen siklga va aksincha lizogen sikldan litik siklga o'tadi.

Lizogeniya litik sikl bloklanganda boshlanadi. Shunday qilib, fag λ dagi litik va lizogen sikl o'rtasidagi muvozanat ikkita oqsilga bog'liq: lizogenez uchun zarur bo'lgan repressor va Cro oqsiliga, ularsiz to'liq litik siklni iloji yo'q.

Bu oqsillar erta bosqichda ham litik, ham lizogen sikl davomida sintezlanadi. Bu ikki oqsil ma'lum bir operator bilan bog'lanish uchun raqobatlashadi. Lizogenezga o'tish uchun zarur bo'lgan cII oqsili croga qarshi ta'sir qiladigan darajada repressor ishlab chiqarishni rag'batlantirishi mumkin bo'lsa, u holda lizogeniya saqlanib qoladi, aks holda fag litik dasturga o'tadi.

Molekulyar mikrobiologiya

Bu cI geni tomonidan kodlangan repressor oqsil bo'lib, lizogeniyani qo'llab-quvvatlaydi va O_L va O_R asosiy operatorlari bilan bog'lanib, litik siklning dastlabki genlarining transkripsiyasini bloklaydi, oqsil mahsulotisiz litik siklni iloji yo'q. Operatorlarga ulanish uchun repressor dimer shaklda bo'lishi kerak.

Bundan tashqari, lizogeniyani saqlab qolish uchun uning dimerlarining mavjudligi zarur. Repressor DNK bilan spiral-burilish-spiral motivi yordamida bog'lanadi va repressor dimerlari operator bilan hamkorlikda bog'lanadi.

Lizogen fag bakterial hujayrani bir xil immunitetga ega bo'lgan faglar tomonidan zararlanishga qarshi immunitet hosil qiladi. Immunitet uchastkasi - bu chap va o'ng operatorlar, cI va cro genlarini o'z ichiga olgan DNKning bir qismidir.

λ repressorning operatorlarga ulanishi bir vaqtning o'zida litik siklni bloklaydi va repressorning o'zi sintezini qo'llab-quvvatlaydi. U O_L operatori bilan bog'lanadi va N genining transkripsiyasini bloklaydi, bu litik fazaga o'tishga yordam beradi va repressorning O_R ga bog'lanishi nafaqat Cro genining transkripsiyasini bloklaydi, balki transkripsiya uchun ham repressorni kodlaydigan cI geni zarurdir.

To'liq lizogen siklning rivojlanishi uchun cII va $cIII$ genlarini ekspressiyasi kerak. Ularning oqsil mahsulotlari RNK polimeraza uchun lizogenez oqsillarini kodlovchi genlarning transkripsiyasini boshlashi uchun zarur; bundan tashqari, $cIII$ cII ni parchalanishdan himoya qiladi.

Repressor o'z sintezini ta'minlash uchun zanjir hosil qilganda, fag DNKsi bakteriyaning genomik DNKsiga to'g'rilanadi. To'g'rilanish *int* genining oqsil mahsuloti tomonidan ta'minlanadi, u ham lizogen regulatsiya davriga kiradi.

Nazorat savollari

1. Bakteriofaglar haqida umumiy tushuncha bering.
2. Bakteriofaglar qanday qismlardan tashkil topgan?
3. Bakteriofaglarning qanday hayotiy shakllari bor?
4. Bakteriofaglarning litik siklini aytib bering.
5. Bakteriofaglarda lizogeniya hodisasi qanday kechadi?
6. Litik sikl va lizogeniyaning o'zaro o'xshash va farqli tomonlarini sanab bering.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Сергей Головин Бактериофаги: убийцы в роли спасителей Архивная копия от 10 июня 2017 на Wayback Machine // Наука и жизнь. — 2017. — № 6. — С. 26-33
2. Перейти обратно:^{1 2 3 4 5 6 7} Летаров А. В. Современные концепции биологии бактериофагов. — М.: ДеЛи, 2019. — 384 с. — ISBN 978-5-6042712-4-7.
3. Перейти обратно:^{1 2 3} Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H (2011). “Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference?”. *Bacteriophage*. **1** (3): 174—178. DOI:10.4161/bact.1.3.16591. PMID 22164351.
4. Перейти обратно:^{1 2 3 4 5 6 7 8 9 10} А.В. Летаров. История ранних исследований бактериофагов и рождение основных концепций вирусологии (рус.) // Биохимия : журнал. — 2020. — Т. 85, № 9. — С. 1189–1212. — doi:10.31857/S0320972520090031.
5. ↑ Twort FW (1915). “An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses”. *The Lancet*. **186** (4814): 1241—1243. DOI:10.1016/S0140-6736(01)20383-3.
6. d'Hérelles F (1917). “Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques”. *Comptes Rendus Academie des Sciences Paris*. **165**: 373—375.
7. Перейти обратно:^{1 2 3} Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления. — Тифлис: Издательство Тифлисского Государственного Университета, 1935.
8. Перейти обратно:^{1 2} Félix d' Hérelle. Autobiographie de Félix d'Hérelle 1873-1949. — Paris, DL 2017. — 1 v. (XXIX-347 p.) с. — ISBN 978-2-86728-015-3, 2-86728-015-X.
9. Muller HJ (1922). “Variation due to change in the individual gene”. *The American Naturalist*. **56** (642): 32—50.
10. Lwoff A (1953). “Lysogeny”. *Bacteriological Reviews*. **17** (4): 269—337. DOI:10.1128/br.17.4.269-337.1953. PMID 13105613.
11. Summers WC (2012). “The strange history of phage therapy”. *Bacteriophage*. **2** (2): 130—133. DOI:10.4161/bact.20757. PMID 23050223.
12. McCallin, S. Clinical Trials of Bacteriophage Therapeutics // *Bacteriophages* / S McCallin, H Brüssow. — Cham : Springer, 2017. — doi:10.1007/978-3-319-40598-8_38-1.

13. Atterbury, RJ. The Use of Bacteriophages in Veterinary Therapy // Bacteriophages / RJ Atterbury, PA Barrow. — Cham : Springer, 2019. — doi:10.1007/978-3-319-40598-8_32-1.

14. Перейти обратно:^{1 2} Ackermann HW (2003). “Bacteriophage observations and evolution”. *Research in Microbiology*. **154** (4): 245—251. DOI:10.1016/S0923-2508(03)00067-6. PMID 12798228.

15. Hendrix RW (2002). “Bacteriophages: evolution of the majority”. *Theoretical Population Biology*. **61** (4): 471—480. DOI:10.1006/tpbi.2002.1590. PMID 12167366.

16. Suttle CA (2005). “Viruses in the sea”. *Nature*. **437** (7057): 356—361. DOI:10.1038/nature04160. PMID 16163346.

17. Перейти обратно:^{1 2} Weinbauer MG (2004). “Ecology of prokaryotic viruses”. *FEMS Microbiology Reviews*. **28** (2): 127—181. DOI:10.1016/j.femsre.2003.08.001. PMID 15109783.

18. Shkoporov AN, Hill C (2019). “Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome”. *Cell Host & Microbe*. **25** (2): 195—209. DOI:10.1016/j.chom.2019.01.017. PMID 30763534.

19. Шестаков С. В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий. *Экологическая генетика* 2007. — Т. 5. — № 2. — С. 12-24.

Litik va lizogen sikl uchun

- Кребс Дж., Голдштейн Э., Килпатрик С. Гены по Льюину. — М.: Лаборатория знаний, 2017. — 919 с. — ISBN 978-5-906828-24-8.

- Jeremy W. Dale, Simon F. Park. *Molecular Genetics of Bacteria*. — 4th Edition. — John Wiley & Sons, Ltd, 2004. — ISBN 0-470-85084-1.

6-MAVZU. MIKRORGANIZMLARDA FAGLAR YORDAMIDA IRSIY AXBOROTNI TASHISHDA TRANSDUKSIYA VA KONYUGATSIYA HODISASI.

Reja:

1. Fag transduksiyasi orqali genetik materialni o'tkazilishi
2. *E.coli* hujayralariga t4 transduksiyasi
3. Konyugatsiya natijasida genetik axborotni o'tkazilishi
4. Bakteriya hujayrasiga konyugatsiya orqali genetik axborotni o'tkazishni ketma-ketligi

Tayanch so'z va iboralar: Irsiy axborotni tashishda fag DNKsini ishtiroki. Kon'yugatsiya xodisasi va uning tabiatdagi ahamiyati.

Fag transduksiyasi orqali genetik materialni o'tkazilishi

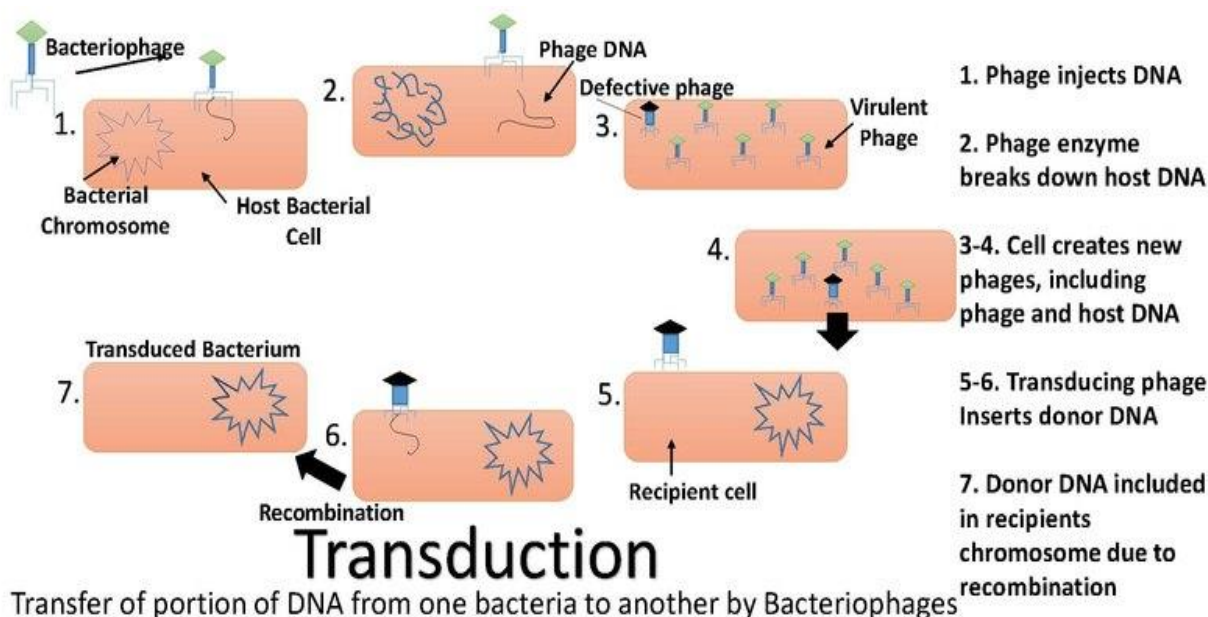
Transduksiyaning ikki turi mavjud – maxsus(spesifik) va umumiy. Maxsus (spesifik) transduksiyada faqat integratsiyalangan profagga ulangan donorning genetik belgilarini o'tkazish mumkin.

Maxsus transduksiyani amalga oshiradigan faglar, fag genomining hududlarini almashtirgan donorning genetik materialining qismlarini o'z ichiga oladi.

Maxsus (spesifik) transduksiyaga misol sifatida gal⁺ xususiyatlari *E.coli*ga uzatilishini keltirish mumkin. Umumiy transduksiya deganda, uning determinantlari xromosoma, plazmid yoki profagda joylashganligidan qat'i nazar, har qanday donorlik xususiyatining o'tkazilishi tushuniladi. Bunday holda, umumiy transduksiyada ishtirok etadigan faglarning shakllanishi fag o'rniga donor genetik materialining tasodifiy qadoqlanishi bilan birga keladi.

Bunday zarracha bilan infitsirlangan retsipient hujayra, normal fag zarralari bilan bir vaqtning o'zida bir nechta infeksiya bo'lmasa, faqat donorning genetik materialini oladi, lekin fagnikini emas.

Retsipient hujayraga kirib, donorning genetik ma'lumotlarini rekombinatsiya yo'li bilan retsipient hujayraning genetik ma'lumotlarini almashtiradi (agar u xromosoma kelib chiqishi bo'lsa) yoki avtonom ravishda mavjud bo'ladi (ekstraxromosomal DNK transduksiyasida).



1-rasm. DNKni bakteriya hujayrasiga bakteriofaglar orqali o'tkazilishi

E. COLI HUJAYRALARIGA T4 TRANSDUKSIYASI

Umumiy transduksiyaning amalga oshirish uchun T4 litik bakteriofagining mutant shakli T4GT7 qo'llaniladi.

Ushbu yondashuvning afzalligi ma'lum bir fagning fag zarralariga (120 kb gacha) to'planishi mumkin bo'lgan DNKning kattaroq o'lchamidir, bu bir vaqtning o'zida bir-biridan uzoqda joylashgan genetik markerlarni o'tkazish imkonini beradi.

Bundan tashqari, T4 bakteriofagini qo'llash bilan ba'zi genlarning transduksiya chastotasi P1 bakteriofagidan foydalanishga qaraganda yuqori bo'lishi kerak.

Shuni ta'kidlash kerakki, T4GT7 fag keng doiradagi xo'jayin organizmlarda ko'payish qobiliyatiga ega va bu xususiyat genetik tajribalarda faol qo'llaniladi.

T4GT7 fag yordamida genetik markerni donor shtammidan *E. coli* ning retsipient shtammiga transduksiya o'tkazish tartibi quyida keltirilgan:

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- steril LB va Xottinger muhiti
- agar shaklida selektiv muhit (masalan, minimal muhit M9);
- quyidagi tarkibdagi steril MC eritmasi: 0,1 M $MgSO_4$ va 5 mM $CaCl_2$;
- steril 0,9% NaCl eritmasi;

- steril 1 M natriy sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) eritmasi;
- xloroform.

Ishni bajarilishi:

A. Donor shtammida T4-lizat olish

1. 5 ml suyuq LB muhitida donor shtammining kulturasini o'stiriladi. Sheykerda (240 ay/min) 37 °C da 12-14 soat davomida inkubatsiya qilinadi.

2. 200 mkl tungi kulturani 2 ml suyuq LB muhiti bo'lgan mikrobiologik probirkaga o'tkaziladi, so'ngra probirka kachalkaga qo'yiladi (240 ay/min) va kulturani 29 °C da logarifmik o'sish fazasining o'rtasiga mos keladigan zichlikda o'stiriladi.

3. 200 mkl LB suyuq muhitini 6 ta steril mikrobiologik probirkaga quyib va unga 20 mkl yetishtirilgan kultura qo'shiladi.

4. T4GT7 fag suspenziyasini mikrosentrifuga probirkalarida 0,9% li NaCl eritmasi bilan 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 marta suyultiriladi. Har bir fag suyultirilganidan keyin 100 mkl dan kultura probirkalariga qo'shiladi (oxirgi probirkaga fag qo'shilmaydi, bu probirka nazorat hisoblanadi) va fagni bakteriya hujayralariga adsorbsiya qilish uchun xona haroratida 20 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi.

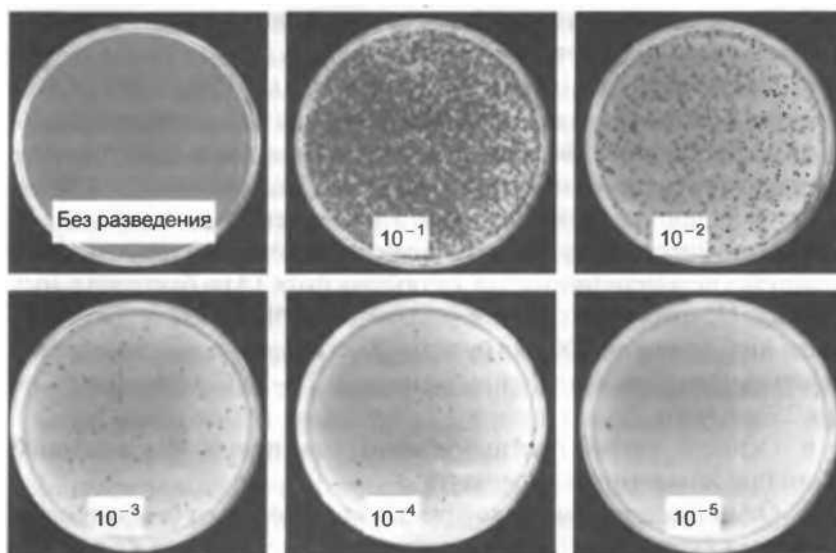
5. Tayyorlanadi: Pastki qatlam sifatida agarlangan Xottinger muhiti solingan Petri chashkalari va 15 ml eritilgan "yuqori" agar solingan 1-2 mikrobiologik probirka. "Yuqori" agar quyidagi tarzda tayyorlanadi: 50-60 °C gacha qizdirilgan steril mikrobiologik probirkaga 10 ml Xottinger bulyoni va 5 ml agarlangan (1,2%) Xottinger muhiti aralashtiriladi.

6. Infeksiyalangan kulturali probirkalarga 2 ml "yuqori" agar qo'shiladi

(45 °C suv hammomida qilgan ma'qul), aralashtiriladi va darhol agar muhiti solingan Petri idishlariga quyiladi.

7. Chashkalarni termostatda 30-37 °C haroratda 8-12 soat davomida qopqoqlarini yuqoriga ko'tarib inkubatsiya qilinadi.

8. Chashkalarni tekshiriladi. Ulardan fag suspenziyasining shunday suyultirilgan variantini tanlab olinishi kerakki, bunda fag blyashkalari bakteriyalarni maysazor(gazon) kabi deyarli to'liq qoplagan bo'lishi kerak.



2-rasm. T4 bakteriofagining suyultirilgan blyashkalardagi ko'rinishi

9. Agarning yuqori qatlamini steril shpatel bilan ehtiyotkorlik bilan ikkita mikrosentrifuga probirkasiga yig'iladi. Ularning har birida suspenziya hajmi 500 mkl dan oshmasligi kerak. Probirkalarga 400 mkl 0,9% li NaCl eritmasi va 100 mkl xloroform qo'shiladi, 30-60 soniya davomida vorteksda kuchli aralashtiriladi va xona haroratida 20 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi.

10. Probirkalarni 12000 ay/min da 15 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi.

11. Ehtiyotkorlik bilan 500 mkl yuqori faza olinadi va yangi mikrotsentrifuga probirkalariga o'tkaziladi. Ularga 50 mkl xloroform qo'shiladi, aralashtiriladi va sentrifuga yana bir bir takrorlanadi.

12. Yuqori fazadan 400 mkl to'planadi va namunalar bitta mikrosentrifuga probirkasiga to'planadi. Bakteriyalarning ko'payishini oldini olish uchun unga bir necha tomchi xloroform qo'shiladi va bu shtammning T4-lizati sifatida 4 °C da saqlanadi.

B. T4-lizat yordamida transduksiya

1. 5 ml LB suyuq muhitda retsipient shtammining kulturasini o'stiriladi. Sheykerda (240 ay/min) 37 °C da 12-14 soat davomida inkubatsiya qilinadi.

2. 2 ml tungi kulturani steril mikrosentrifuga probirkasiga o'tkaziladi va hujayralarni sentrifugalash yo'li bilan probirkaga solinadi (xona haroratida 5 daqiqa davomida 5000 ay/min).

3. Supernatant to'kib tashlanadi va hujayralarni 0,6 ml steril MS eritmasida qayta suspenziya qilinadi.

4. Fagolizatning 0,9% li NaCl eritmasida ikki xil suyultirish (1:10 va 1:100) namunalari tayyorlanadi. 200 mkl hujayra suspenziyasi va triptofan (50 mkl 1 mg/ml eritma) solingan mikrosentrifuga probirkalariga 10 mkl fagolizat qo'shiladi. T4 fagning adsorbsiyasi ozuqa muhitida triptofan mavjudligiga bog'liq.

5. T4 fagni bakteriya hujayralariga adsorbsiya qilish uchun namunalarni xona haroratida 30 daqiqa davomida aralashtirmasdan inkubatsiya qilinadi. Ba'zi usullar inkubatsiyadan so'ng probirkalarga 500 mkl Xottinger bulonini qo'shishni, namunalarni chaykatgichga o'tkazish va 250 ay/min tezlikda 2-3 soat davomida 29-30 °C da inkubatsiyani davom ettirishni tavsiya qiladi.

6. Xona haroratida 5 minut davomida 5000 ay/min sentrifugalash orqali hujayralar cho'ktiriladi.

7. Adsorbsiyalanmagan fagni olib tashlash uchun hujayralarni fiziologik suv bilan yuviladi.

8. Hujayra suspenziyasini selektiv agar muhitiga sepib ekiladi. Idishlarni termostatga joylashtiriladi va alohida koloniyalar paydo bo'lguncha 37°C da inkubatsiya qilinadi.

Konyugatsiya natijasida genetik axborotni o'tkazilishi

Konyugatsiya - bu hujayra vositachiligida gen o'tkazishning bir turi bo'lib, donor hujayradan bakterial xromosomadan avtonom ravishda ko'payadigan yoki integratsiyalangan maxsus konyugativ plazmidga ega bo'lishini talab qiladi.

Konyugativ plazmidlarning o'ziga xos xususiyati shundaki, ularda hujayra yuzasida genital vorsinkalarni shakllanishini aniqlaydigan va / yoki boshqaradigan, donor hujayraning retsipient hujayrasi bilan fizik kontaktga kirishishi uchun zarur bo'lgan *tra* genlarini o'z ichiga oladi va konyugativ plazmid molekulasini uzatishining boshlang'ich nuqtasi bo'lib hisoblanadi.

Konyugativ plazmidlar asosan manfiy gramm bakteriyalarga xosdir. Ular o'zlarining DNKlarini ko'chirishlari va ko'paytirishlari mumkin bo'lgan juda cheklangan miqdordagi xo'jayin hujayralariga ega. Biroq, istisnalar mavjud. Masalan, *Pseudomonas* bakteriyalaridan ajratilgan RP4 plazmidi *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Shigella* manfiy-

Molekulyar mikrobiologiya

gramm hujayralarida ko'chiriladi va barqaror saqlanadi. DNK ning retsipient hujayraga to'g'ridan-to'g'ri o'tkazilishi konyugativ plazmidning mobilizatsiya xususiyatlari bilan ta'minlanadi.

Konyugatsiyani o'tkazishga qodir plazmidlar ichida eng yaxshi o'rganilgani *E. coli* ning fertillik omili (F-omil). IncFI nomuvofiqlik guruhining bu kam nusxadagi konyugativ plazmidi F+ donorining sitoplazmasida avtonom holda (erkin F epizomi) ham, integral holatda ham (Hfr shtammi, "yuqori chastotali rekombinatsiya"dan) mavjud bo'lishi mumkin.

Donorning genetik materiali ifodalangan retsipient hujayralar transkonyugantlar deb ataladi. Ammo shuni yodda tutish kerakki, genetik materialning donordan qabul qiluvchiga (retsepientga) o'tishi qisman bo'ladi, chunki xromosomani o'tkazish paytida uning o'z-o'zidan uzilishi sodir bo'ladi.

Shuni ta'kidlash kerakki, konyugativ mobilizatsiyalanadigan plazmidlar donor hujayralardan retsipient hujayralarga o'zlarining o'tkazilishini amalga oshirish bilan bir qatorda, ba'zi konyugativ bo'lmagan plazmidlarni bir bakteriyadan boshqasiga o'tkazishning o'ziga xos jarayonida ishtirok etishi mumkin (va ko'pchilik rekombinant DNK bilan ishlashda ishlatiladigan plazmidlar konyugativ xususiyatga ega emas).

Bunday plazmidlarning o'ziga xos xususiyati ularning DNKsini konyugativ plazmidning uzatish tizimi orqali o'tkazishni ta'minlaydigan opt-lokus deb ataladigan joyning mavjudligidir (oriT - konyugativ plazmidning ma'lum bir nuqtasi, undan plazmid o'tkaziladi va donor xromosomasi Hfr shtammlari holatida boshlanadi).

Bunday plazmidlarga misol sifatida IncQ nomuvofiqlik guruhining konyugativ bo'lmagan vektori RSF1010 bo'lib, u keng ko'lamli bakteriyalarga mobilizatsiya qilinishi mumkin.

Konyugativ bo'lmagan plazmidlarni qabul qiluvchi hujayralarga o'tkazish ham konyugativlar bilan birga amalga oshirilishi mumkin, ya'ni bu holda ular bir nechta replikonlarni birlashtirgan yagona DNK molekulasini tashkil qiladi (masalan, pBR guruhining vektorlari shunday uzatiladi).

Shunday qilib, konyugativ bo'lmagan plazmid mobilizatsiyasidan foydalanib, plazmidni boshqa vositalar bilan o'zgartirish qiyin bo'lgan retsipient hujayralarga aylantirish mumkin.

Konyugatsiya suyuq muhitda, agar muhiti yuzasida yoki agar muhiti yuzasiga joylashtirilgan g'ovak diametri 0,22-0,45 mkm bo'lgan membrana filtrlarida amalga oshirilishi mumkin.

Oxirgi ikkita usul hujayralar o'rtasida ancha yaqin aloqani ta'minlaydi va agar ishlatiladigan plazmidlar qisqa pilini hosil bo'lishini aniqlansa bu (masalan, P-mos kelmaydigan guruh plazmidlari) afzallik beriladi. Konyugatsiya uzilish usuli genetik tahlil uchun keng qo'llaniladi, masalan, yaqin bog'langan genlarni tahlil qilish va intragen xaritalashda genetik belgilar orasidagi rekombinatsiya chastotalarini aniqlash, xromosomadagi genlar ketma-ketligini ularning transmissiya gradienti bo'yicha aniqlash va xaritalashda keng qo'llaniladi.

Quyida taklif qilingan usuldan tur ichidagi, turlararo va turkumlararo kesishish vaqtida fenotipik belgilarning konyugativ o'tkazilishini o'rganish uchun foydalanish mumkin.

Tajriba - bu konyugatsiya uchun qulay sharoitda donor va retsipient hujayralarini aralashtirish, ma'lum vaqtdan keyin bu jarayonni to'xtatish va keyin donor va qabul qiluvchining xususiyatlariga ega bo'lgan transkonyugantlarni ajratish. Misol tariqasida, biz donor shtammining antibiotik xloramfenikolni o'z ichiga olgan muhitda o'sish qobiliyatini nalidiksik kislotaga chidamli retsipient hujayralariga genetik o'tkazilishini ko'rib chiqamiz.

Nalidiksik kislotadan selektiv vosita sifatida foydalanish qo'shimcha afzalliklarga ega ekanligini unutmang, chunki bu birikma DNK konyugatsiyasini barqaror ravishda ingibitsiya qiladi.

Ishni bajarilishi:

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- steril muhit LB suyuq va agarlangan (1,2%) shaklda

Quyidagi tarkibdagi "yuqori" agar: oldindan

- 50°C gacha qizdirilgan mikrobiologik probirkada 10 ml suyuq LB muhiti va 5 ml agarlangan (1,2% agar) LB muhitini aralashtiramiz;

- steril 0,9% NaCl eritmasi;

- xloramfenikol (ish konsentratsiyasi 30 mg / ml);

- nalidiksik kislota (ish konsentratsiyasi 50 mg / ml).

1. Donor va retsipient shtamlarni tungi kulturalarini o'stirish.

2. 10 ml suyuq LB muhiti bo'lgan tegishli mikrobiologik probirkalarga har bir kulturadan 100 mkl qo'shiladi. Probirkalarni silkitgichga qo'yiladi (240 rpm, 37 ° C) va kulturalar o'sishning

Molekulyar mikrobiologiya

logarifmik bosqichining o'rtasiga mos keladigan zichlikka yetguncha o'sadi.

3. Ota-ona shtammlar ishlatiladigan selektiv moddalar kontsentratsiyasiga sezgir ekanligiga ishonch hosil qilish uchun kulturalarning kichik alikvotlarini (50-100 mkl) selektiv muhitga solinadi va selektiv muhitda koloniya hosil qilishga qodir ekanligi tekshiriladi.

Konyugativ juftlarning mumkin bo'lgan maksimal sonini aniqlash uchun donor shtammining yashovchan hujayralari soni taxmin qilinadi (retsipient shtammining hujayralari aniq ko'p olinadi), donor suspenziyasining o'n marta suyultirilgani LB muhitli Petri idishlariga ekiladi.

4. 250 mlli Erlenmeyer kolbasini suv hammomiga shunday joylashtiriladiki, vannadagi suv darajasi kolba tiqinchasidan bir oz past bo'lishi kerak. Vanna 37 °C ga qadar qizdiriladi.

5. Kolbaga 9 ml retsipient kulturasidan solinadi. Hammom haroratiga yetguncha 5-7 daqiqa ushlab turiladi, so'ngra 1 ml donor kulturasini qo'shiladi. Donor va retsipient hujayralari yengil harakat bilan aylantirib aralashtiriladi.

6. Kolba 1 soat davomida inkubatsiya qilinadi. Bu vaqt davomida vaqti-vaqti bilan (odatda 5-10- yoki 15 minutlik oraliqda) donor va retsipient hujayralar aralashmasidan namunalar olinadi, so'ngra suyultiriladi va 100-150 mkl miqdorsa selektiv ozuqa bo'lgan petri chashkaga gazon qilib ekiladi. selektiv muhitni o'z ichiga olgan vosita uchun, 30 daqiqagacha bo'lgan konyugatsiya davomiyligi bilan, rekombinant hosil bo'lish chastotasini tirik donor shtammi hujayralar soniga nisbatan foiz sifatida aniqlash uchun 10^2 - 10^3 , uzoqroq jarayon bilan – 10^1 - 10^4 gacha bo'lgan yakuniy suyultirishni amalga oshiring.

7. Chashkalarni termostatda 37 °C da agar yuzasida alohida koloniyalar (transkonyugantlar) paydo bo'lguncha inkubatsiya qiling.

8. Hosil bo'lgan transkonyugantlar (rekombinantlar)da ikkala fenotipik ota-ona belgilarining mavjudligini ularning ikkala selektiv agent (xloramfenikol va nalidiks kislota) bo'lgan muhitda o'sish qobiliyatini tekshiring.

Nazorat savollari

1. Bakteriofaglar orqali irsiy axborot qanday usullar orqali amalga oshiriladi?
2. Transduksiya jarayoni nima?
3. Konyugatsiya jarayoni nima?
4. Bakteriofag yordamida irsiy axborotni transduksiya orqali o'tkazilishi bosqichlari haqida tushuncha bering.
5. Irsiy axborotni kopnyugatsiya orqali o'tkazilishi bosqichlari haqida tushuncha bering.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Ackermann H. Ж, Krisch H.M. A catalogue of T4-type bacteriophages // Arch. Virol. 1997. V. 142. P. 23[^]*9-2345.
2. Dul J.L., Drexler H. Transcription stimulates recombination. Generalized transduction of Escherichia coli by phages T1 and T4 // Virology. 1988. V. 162. P. 471—477.
3. Firth N., Ippen-Ihler K., Skurray R. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation // Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. / Eds. F.C. Neidhardt et al. Washington, D.C.: ASM Press, 1996. P. 2377-2401.
4. Goldberg R., Bender R., Streicher S. Direct selection for P1 - sensitive mutants of enteric bacteria // J. Bacteriol. 1974. V 118. P. 810—814.
5. Gormley E, Davies J. Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from Escherichia coli to Streptomyces lividans and Mycobacterium smegmatis // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 6705-6708.
6. Ippen K., Shapiro J., Beckwith J. Transposition of the lac region to the gal region of the Escherichia coli chromosome: isolation of lambda-lac transducing bacteriophages // J. Bacteriol. 1971. V 108. P. 5-9.
7. Kutter E., Guttman B., Carlson K. The transition from host to phage metabolism after T4 infection II Molecular Biology of Bacteriophage T4 I Eds. J.D. Karam et al. Washington, D.C.: ASM Press, 1994. P. 343—346.
8. Miller E.S., Kutter E., Mosig G., Arisaka F., Kunisawa T., Ruger W. Bacteriophage T4 genome // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 86—156.

9. Plakidou S., Moffat K.G., Salmond G. P.C., Mackinnon G. Convenient transduction of *recA* with bacteriophage T4GT7 // J. Bacteriol. 1984. V. 159. P. 1072—1073.

10. Rao V.B., Thaker V., Black L.W. A phage T4 in vitro packaging system for cloning long DNA molecules // Gene. 1992. V. 113. P. 25-33.

11. Samuels A., Lanka E., Davies J. Conjugative junctions in RP4-mediated mating *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 2709-2715.

12. Thome C. Transduction in *Bacillus thuringiensis* // Appl. Environ. Microbiol. 1978. V. 35. P. 1109-1115.

13. van Alstyne D., Simon M. Division mutants of *Bacillus subtilis*: isolation and PBS1 transduction of division-specific markers // J. Bacteriol. 1971. V. 108. P. 1362—1379.

14. Wall J., Harriman P. Phage P1 mutants with altered transducing abilities for *Escherichia coli* // Virology. 1974. V. 59. P. 532—544.

15. Wilson G.G., Young K.K. Y, Edlin G.J., Königsberg W. High-frequency generalized transduction by bacteriophage T4 // Nature. 1979. V. 280. P. 80-82.

16. Young K.K., Edlin G.J. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction // Mol. Gen. Genet. 1983. V. 192. P. 241-246.

7-MAVZU. TABIIY VA SUN'IY MUTATSIYA HODISASI.

Reja:

1. Mutatsiya haqida umumiy tushuncha
2. Mutatsiya turlari
3. Genom mutatsiyalari
4. Xromosoma mutatsiyalari
5. Kimyoviy agentlar yordamida mutagenez

Tayanch soʻz va iboralar: Tabiatda mutatsiya hodisasi, mutatsiyaning kimyoviy, fizik, biologik turlari, irsiy nuqtali mutatsiya va uning ahamiyati.

Mutatsiya – bu DNK tarkibini tashkil etuvchi nukleotidlar ketma-ketligining tashqi omillar ta'sirida o'zgarish xodisasiga aytiladi.

Irsiy o'zgaruvchanlik genotipik o'zgaruvchanlik deb ham nomlanadi. Uni kombinativ va mutatsion o'zgaruvchanliklarga ajratiladi. Kombinativ o'zgaruvchanlik. Bunda genlar tuzilishi o'zgarmaydi, genotipda yangi genlar majmuasi hosil bo'ladi. Jinsiy ko'payuvchi organizmlarda kombinatsion o'zgaruvchanlikning quyidagi mexanizmlari mavjud:

1. Meyozda xromosomalarning mustaqil taqsimlanishi;
2. Otalanish jarayonida xromosomalarning tasodifiy to'plami hosil bo'lishi;
3. Krossingover natijasida genlar rekombinatsiyalanishi.

Jinssiz ko'payuvchi mikroorganizmlarda kombinativ o'zgaruvchanlikning o'ziga xos mexanizmlari: transformatsiya va transduksiya mavjud.

Mutatsion o'zgaruvchanlik-irsiy axborotning tuzilishi va miqdori o'zgarishi natijasida kelib chiqadi. Mutatsiyalarning sababiga ko'ra spontan va indutsirlangan mutatsiyalarga ajratiladi. Qanday hujayralarda va hujayraning qaysi qismida o'zgarishlarga qarab generativ, somatik, yadro (xromosoma) va sitoplazmatik mutatsiyalar farq qilinadi. Fenotip o'zgarishiga qarab: ko'rinadigan (morfologik, fiziologik) va bioximiyaviy mutatsiyalar mavjud. Organizmning hayot faoliyatiga ta'siriga qarab: letal, yarimletal, shartli letal, steril, neytral, kuchaytiruvchi mutatsiyalar mavjud.

Irsiy axborotning qanday tuzilish darajasida o'zgarishiga qarab: genom, xromosoma va gen mutatsiyalari tafovut etiladi (poliploidiya).

Genom mutatsiyalari

Genom mutatsiyalari - xromosomalar sonining o'zgarishiga bog'liq o'zgarishlaridir. Ular ikki xil bo'ladi.

I. Genomning butunligicha kamayishi (gaploidiya) yoki ko'payishi (poliploidiya) bilan boradigan mutatsiyalar II. Ayrim xromosomalar soni o'zgarishlari (aneuploidiya yoki geteroploidiya) bilan boradigan mutatsiyalar. I tipdagi genomning butunligicha o'zgarishlaridan poliploidiya ko'proq uchraydi. Poliploidiya o'simliklarda ko'p uchraydi, ularning hosildorligini oshiruvchi omillardan biri hisoblanadi. Hayvonlarda poliploidiya deyarli uchramaydi, chunki

Molekulyar mikrobiologiya

ularning yashovchanligi susayadi, bunday organizmlar steril bo'ladi. Lekin hayvonlarda ayrim somatik hujayralarda (jigar, mushak, suyak — tog'ay hujayralari) poliploidiya kuzatilishi mumkin. Poliploidiya mexanizmlari:

1. Meyozda gametogenezdagi xromosomalar ajralishi buzilishi.
2. Somatik hujayralarda mitoz tugallanmay qolishi natijasida ko'p xromosomal ko'p DNK saqlovchi (politeniya, poliploidiya) va ko'p yadroli hujayralar hosil bo'lishi.
3. Poliploidiyani mitozni to'xtatuvchi moddalar (kolxitsin) ta'sirida sun'iy hosil qilish mumkin.

II. Genom mutatsiyalarining ikkinchi xili aneuploidiya yoki geteroploidiyadir. Bunda xromosomalar to'plamida qandaydir xromosomaning kamayishi yoki ortishi kuzatiladi. Agar gomolog xromosomalardan bittasi kamaysa monosomiya ($2n - 1$), bitta gomolog xromosoma ortiq bo'lsa trisomiya ($2n + 1$), gomolog xromosomalar soni ikkidan ko'proq ortsa polisomiya ($2n + n$) deyiladi. Aneuploidiyalar autosomalarda ham va geterosomalarda ham kuzatilishi mumkin. Aneuploidiyalar meyoza ayrim xromosomalar ajralishini buzilishi natijasida kelib chiqadi. Xromosomalar ajralishi buzilishlari somatik hujayralarda mitozda ham kuzatilishi mumkin. Buning natijasida mozaik (xromosomalar soni har xil) hujayralar hosil bo'ladi.

Xromosoma mutatsiyalari

Xromosoma mutatsiyalari - xromosomalarning tuzilishini o'zgarishi natijasida kelib chiqadi. Ular xromosoma aberratsiyalari deb ham ataladi. Bu mutatsiyalarda xromosomalarda genlar soni va lokalizatsiyasi (joylashishi) o'zgaradi. Ular xromosoma ichi va xromosomalalararo mutatsiyalarga bo'linadi.

Xromosomalar ichi mutatsiyalariga, inversiya, duplikatsiya va deletsiya misol bo'ladi, xromosomalalararo mutatsiyalarga esa — translokatsiya misol bo'ladi.

Gen mutatsiyalari (transgenatsiyalar). Hujayrada replikatsiya va reparatsiya jarayonlari buzilishi natijasida kelib chiqadi.

DNK molekulasida mutatsiyalar kelib chiqishni uch xil asosiy mexanizmlari mavjud: 1. Mutagen birikma azotli asoslarga o'xshash bo'lsa u normal nukleotid o'rniga joylashib olishi mumkin. 2. Mutagen DNKga joylashmasdan, azotli asosni o'zgartirishi mumkin. Natijada replikatsiya jarayoni buziladi. 3. Mutagen bir yoki bir nechta azotli

asosning tuzilishini buzib yuborishi natijasida replikatsiya mumkin bo'lmay qoladi. Mutagenlar ta'sirida kelib chiqqan mutatsiyalarni hujayrada tuzatish mexanizmlari mavjud bo'lib, bu jarayonni reparatsiya deb ataladi.

Reparatsiya uch bosqichda amalga oshiriladi: 1.Replikatsiya boshlanguncha DNKning o'zgargan qismi fermentlar yordamida kesib tashlanadi va normal azotli asoslar bilan tiklanadi. 2.Replikatsiya jarayonida yuqoridagi o'zgarishlar replikatsiya davrida amalga oshiriladi. 3. Replikatsiyadan keyin oqsillar, fermentlar faolligi o'zgarishi yo'li bilan amalga oshiriladi.

Mutatsiyalarning moslanuvchanlikda ahamiyati sharoitga qarab, vaqt o'tishi bilan o'zgarishi mumkin. Avval zararli bo'lgan mutatsiyalar yangi sharoitda foydali bo'lib qolishi mumkin. Mutatsiyalarning ko'pchiligi resessiv bo'lib geterozigota holatda nasldan naslga o'tadi va irsiy o'zgaruvchanlik zaxirasini hosil qiladi. Mutatsiyalar evolutsiyaning elementar materiali va omili hisoblana- di. Tabiiy tanlash natijasida ayni sharoit uchun selektiv (foydali) ahamiyatga ega bo'lgan, o'sha sharoitga organizmlar moslashuvini ta'minlovchi mutatsiyalarga ega organizmlar saqlanib qoladi.

Mutatsiyalar, ya'ni. genetik materialdagi irsiy o'zgarishlar muhim biologik hodisadir, chunki ular genlarni uzatish mexanizmlari bilan bir qatorda tirik organizmlarning irsiy o'zgaruvchanligini ham ko'rsatadi.

Bakteriyalarning mutant shtammlarini o'rganish hujayrada sodir bo'ladigan jarayonlarni molekulyar darajada o'rganishni sezilarli darajada osonlashtiradi. Mutatsiyalarni xaritalashning zamonaviy usullari ma'lum bir fenotip uchun mas'ul bo'lgan gen yoki hatto genlar guruhini lokalizatsiya qilish imkonini beradi. Bundan tashqari, mutatsiyalarning yetarli to'plamining mavjudligi biokimyoviy yo'l bilan boradigan fermentativ bosqichlarni aniqlashni osonlashtiradi va yangi biosintetik va regulyator tizimlarni aniqlash va tavsiflash imkonini beradi.

Mutatsiyalar natijasida o'zgargan oqsillarni o'rganish ularning fazoviy tuzilishini aniqroq bilish va substrat yoki effektor molekulasini bog'lash uchun mas'ul bo'lgan oqsil molekulasining hududlarni aniqlash imkonini beradi. Mutatsiyalar antibiotiklar, aminokislotalar yoki vitaminlar ishlab chiqaradigan shtammlar kabi foydali xususiyatlarga ega mikroorganizmlarni tanlash uchun asos bo'lib xizmat qiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

Mikroorganizmlar populyatsiyasida mutantlar normal hujayra jarayonlari (rekombinatsiya, replikatsiya va reparatsiya), shuningdek, atrof-muhit omillari ta'siri natijasida o'z-o'zidan paydo bo'lishi mumkin. Biroq, spontan mutatsiyalar natijasida har qanday muayyan mutantning paydo bo'lish chastotasi ancha past.

Olingan mutatsiya populyatsiyadan mutant hujayralarni tanlash imkonini beruvchi o'ziga xos fenotipga ega bo'lganda, bunday noyob hodisalarni aniqlash qiyin emas. Afsuski, bunday tanlovni o'tkazishni har doim ham iloji yo'q.

Ushbu muammoni hal qilish uchun hujayralarni maxsus kimyoviy, fizik yoki biologik vositalar bilan ta'sir ettirish orqali mutatsiyalar keltirib chiqarishga erishiladi, bu esa mikroorganizmlar populyatsiyasidagi mutantlar ulushini oshiradi.

Kimyoviy mutagenlarga misol sifatida nitrozoguanidin, gidroksilamin, 5-bromuratsil va 2-aminopurin kiradi, ular kodonda bir purin/pirimidin asosini boshqasi bilan almashtirishda mutatsiyaga olib keladi (tranzitsiya).

Bakteriyalarni ionlashtiruvchi nurlanish (xromosomaning parchalanishiga olib keladi) yoki ultrabinafsha (pirimidin asoslarini dimerizatsiya qiladi) bilan nurlantirish mos ravishda deletsiya va inversiyaga (DNK segmentining 180° ga aylanishi) yoki deletsiya, tranzitsiya va transversiyalarga (kodonlarning purin asosini pirimidin asosiga yoki aksincha pirimidin asosini purin asosiga almashtirish) olib keladi.

Transpozitsiya qiluvchi faglar, masalan, DNKga integratsiyalashgan bakteriofaglar va mutator genlar (DNK replikatsiyasi va tiklanish jarayonlarini buzadigan) ko'pincha biologik mutagenlar rolini o'ynaydi.

Turli mutagenlar turli xil ta'sir va samaradorlik mexanizmlariga ega bo'lganligi sababli, ularning tanlash olinishi kerak bo'lgan mutatsiya turiga qarab belgilanadi. Mikroorganizmlarning har xil turlari va hatto shtammlari mutagenlarning ma'lum konsentratsiyasini va samarali induktsiyalangan mutagenez uchun o'ziga xos sharoitlarni talab qiladi. Shuning uchun tajribadan oldin mutagen omil konsentratsiyasi (dozasi) va ta'sir qilish vaqtiga qarab hujayraning omon qolish egri chiziqlarini tashkil qilish kerak.

Mutatsiyalarning namoyon bo'lishi uchun replikatsiya sodir bo'lishi va mutatsion o'zgarish yangi sintez qilingan DNK molekulasida

o'rnatilishi kerak. Fenotipik jihatdan mutatsiya ma'lum vaqtdan so'ng (segregatsiya lag davri) o'zini namoyon qiladi, bu davrda transkripsiya va translatsiya jarayonlari sodir bo'ladi. Yangi belgining paydo bo'lishi uchun populyatsiyada bir nechta hujayra bo'linishi sodir bo'lishi kerak (fenotipik lag davri deb ataladi); buning uchun mutagen bilan ishlov berilgan hujayralar suspenziyasi bir muncha vaqt o'stiriladi.

Mutantlarni tanlashga kelsak, mikrobiologiyada bir nechta klassik usullar qo'llaniladi. Selektiv muhitga ekish orqali to'g'ridan-to'g'ri fenotip bo'yicha tanlash, indikator muhitidan foydalangan holda bilvosita tanlash usuli (substratdan foydalanish uchun indikator yoki xromogen substrat bilan, masalan, X-da1) va bilvosita tanlash usuli keng qo'llaniladi.

Populyatsiyadagi auktrof mutant hujayralar ulushini oshirish uchun ko'pincha penitsillinli mutantlarini boyitish usuli qo'llaniladi, bu esa mutagen bilan ishlov berilgan kulturani minimal muhitda o'stirishda faol o'sadigan yovvoyi tipdagi prototrof hujayralarni sezilarli darajada yo'q qiladi. penitsillin (antibiotik hujayra devori peptidoglikan sintezini podavlat(подавляет) qiladi).

Gen muhandisligi usullarining rivojlanishi uning vositalaridan nukleotidlar ketma-ketligining qat'iy belgilangan joylarida genetik materialning yo'naltirilgan o'zgarishi uchun foydalanish va shunga mos ravishda belgilangan pozitsiyalarda kerakli aminokislotalarni o'z ichiga olgan oqsillarni olish imkonini berdi. Ushbu yondashuv saytga yo'naltirilgan mutagenez deb ataladi. Masalan, o'rganilayotgan gen M13 bakteriofagiga asosidagi vektorning ikki zanjirli shakliga kiritiladi va fag DNK ning bir zanjirli shakli maxsus praymer yordamida ko'chiriladi, uning yordamida nuqtali mutatsiya qilinadi.

E. coli ga hujayra transformatsiyasidan so'ng, ikki zanjirli M13 fag DNKsini kerakli mutatsiyaga ega genni olib yuruvchi fag zarralarini aniqlash, mutant genni ekspressiyalovchi vektorga kiritish, oqsilni sintez qilish va uning faolligini o'lchash uchun ishlatiladi. Plazmidlar yoki PZR yordamida genlarga o'zgartirishlar kiritish ham mumkin.

Nukleotidlar ketma-ketligida oldindan rejalashtirilgan o'zgarishlarni amalga oshirish imkoniyati hujayra fermentlarining ishlash tamoyillarini batafsil o'rganish, ularning mutant shakllarini yaratish va o'rganish imkonini beradi. Saytga yo'naltirilgan mutagenez genlar ekspressiyasini tartibga solishning murakkab tizimini o'rganish

uchun ham ajralmas bo'lib, bu jarayonda xromosomaning u yoki bu qismining rolini aniqlashga yordam beradi.

KIMYOVIY AGENTLAR YORDAMIDA MUTAGENEZ

Mikroorganizmlar genetikasida mutatsiyalarni qo'zg'atish uchun ishlatiladigan bir qator kimyoviy vositalar keng qo'llaniladi. Bu birikmalarga nitrozoguanidin, etilmetansulfonat (guanidin alkillanishini keltirib chiqaradi), gidroksilamin (sitozinning dezaminlanishiga olib keladi), 2-aminopurin va 5-bromuratsil (DNK replikatsiyasida xatoliklarni keltirib chiqaruvchi asosiy analoglar), akridin bo'yoqlari (asoslar orasidagi DNK replikatsiyasida interkalatsiya keltirib chiqaradi) kiradi. Biz quyida nitrozoguanidin yordamida mutatsiyalarni hosil qilish ko'rsatmasini (protokolini) taqdim etamiz.

Kimyoviy birikmalarning mutagen ta'siri asosan nuqtali mutatsiyalarning paydo bo'lishi bilan bog'liq. Hujayra suspenziyasini kimyoviy mutagen bilan ishlov berish shartlari katta ahamiyatga ega: uning konsentratsiyasi, ta'sir qilish muddati, muhitning pH darajasi va boshqalar.

Ko'pchilik kuchli kanserogen va toksik ta'sirga ega bo'lgan kimyoviy mutagenlar bilan ishlaganda xavfsizlik choralariga rioya qilish kerak - talabalar rezina qo'lqopda, mo'rili shkafda ishlashingiz va mutagen eritmalarini xavfli chiqindilar sifatida utilizatsiya qilishingiz kerak.

E. coli HUJAYRALARIDA NITROZOGUANIDIN BILAN MUTATSIYA INDUKSIYASI

N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (NG) bakteriyalar genetikasida keng qo'llaniladigan kuchli kimyoviy mutagendir, chunki u hujayra o'limiga olib kelmaydigan dozalarda yuqori chastotada mutatsiyalarni keltirib chiqaradi. NG hujayralari kulturasini qayta ishlashda 20% gacha auksotrof mutantlar (ya'ni, o'sish uchun zarur bo'lgan birikmalarni sintez qilish qobiliyatini yo'qotganlar) olinishi mumkin.

50-100 mM sitrat buferidagi nitrozoguanin eritmaları (pH 5,5) tajribadan oldin darhol tayyorlanishi kerak. Qoida tariqasida, kultura

o'sishining eksponensial bosqichidagi hujayralar NG bilan 30 daqiqa davomida 20-100 mkg / ml yakuniy konsentratsiyada ishlov beriladi.

Bu mutagen, asosan, replikatsiya vilkalarida alkillanish hisobiga asos o'rnini almashtiradi, shuningdek NG kichik deletsiya hosil qilishiga ham dalillar bor. NG sabab bo'lgan mutatsiyalarning tarqalishini o'rganish shuni ko'rsatdiki, DNK replikatsiya hududi bu mutagen ta'siriga xromosomaning qolgan qismiga qaraganda ancha sezgir. NG ning bu xususiyati ko'pincha qo'sh almashtirishlarning shakllanishiga olib keladi, bu esa usulning sezilarli kamchiligi hisoblanadi. Biroq, har bir tajribada bunday mutatsiyalarning paydo bo'lish darajasini nazorat qilish mumkin. Mutagenning ta'siri odatda 50-100 mM fosfat bufer eritmasi, pH 7,0 qo'shilishi bilan to'xtatiladi.

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- steril LB muhiti
- quyidagi tarkibdagi sitrat bufer eritmasi (0,5 l uchun): 10,5 g limon kislotasi; 4,4 g NaOH; Eritma 2 M NaOH bilan pH i 5,5 ga keltiriladi;
- quyidagi tarkibdagi fosfat bufer eritmasi (0,5 l uchun): 6,8 g KH_2PO_4 ; 1,16 g NaOH; 2 M NaOH ni pH 7,0 ga keltiriladi;
- NG eritmasi (nitrozoguanidin konsentratsiyasi — sitrat bufer eritmasida 1 mg/ml miqdorda). Diqqat! NG xavfli kanserogen moddadir, u bilan qo'lqop bilan ishlash kerak;
- steril 0,9% NaCl eritmasi.

Metodika

A. NG ta'sirida optimal sharoitlarni tanlash, omon qolish egri chiziqlarini qurish(построение).

1. Mutatsiyaga uchragan bakteriya shtammining bir koloniyasini 5 ml LB muhiti solingan mikrobiologik shisha probirkaga soling. Probirkani kachalkaga qo'ying va 37 ° C va 240 ay/min tezlikda bir kechaga (12-14 soat) kultivatsiya qiling.

2. 40 ml suyuq LB muhiti solingan Erlenmeyer kolbasiga 4 ml tungi kultura solinadi. Kulturani logarifmik o'sish fazasining o'rtasiga qadar 37 ° C va 240 ay/minda o'stiring.

3. Xona haroratida (steril) 5 minut davomida 5000 g sentrifugalash orqali hujayralarni cho'ktiring. Supernatantni tashlang.

Molekulyar mikrobiologiya

4. Hujayralarni steril sitrat bufer eritmasi bilan yuving. Buning uchun hujayra cho'kmasini 40 ml sitrat bufer eritmasida qayta suspenziya qiling. Xona haroratida 5 minut davomida 5000 g sentrifuga qiling. Supernatantni tashlang.

5. Hujayralarni 40 ml sitrat bufer eritmasida qayta suspenziya qiling. 5 ml suspenziyadan 8 ta steril mikrobiologik probirkaga soling. Ularni 37 ° C haroratda suv hammomiga joylashtiring.

6. Har bir kolbaga 200 mkl NG eritmasi qo'shing. Vaqt ajrating.

7. Muayyan vaqtdan keyin vannadan bitta probirkani oling. Hujayralarni 1-2 minut davomida 12000 g da sentrifuga qiling, bir hajm fosfat buferi bilan yuving va 5 ml fosfat buferida qayta suspenziya qiling. Namunalar 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 daqiqadan keyin olinadi.

8. Har bir kolbadagi hujayra suspenziyasi suyultirmalarini LB agar muhiti solingan Petri idishlariga seping. Dastlabki 30 daqiqada olingan namunalardan 100 mkl 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} va 10^{-5} suyultirishlardan emlanadi. Qolgan namunalar 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} va 10^{-4} suyultirishlardan 100 mklga ekilgan.

9. Idishlarni termostatga joylashtiring va kechasi 37 ° C da inkubatsiya qiling.

10. Chashkalarda o'sgan bakteriya koloniyalari sonini hisoblang. Amaldagi suyultirishga asoslanib, NG bilan ishlov berishning har bir davri uchun tirik hujayralar sonini aniqlang.

11. NG bilan ishlov berish vaqtiga qarab kulturaning omon qolish(выживаемости) egri chizig'ini tuzing. Omon qolish(выживаемости)darajasi 50% bo'lgan vaqt oralig'ini (T-50) aniqlang.

B. NG tomonidan mutatsiya induksiyasi

1. Mutatsiyaga uchragan bakteriya shtammining bir koloniyasini 5 ml LB muhiti solingan mikrobiologik probirkaga soling. Probirkani kachalkaga qo'ying va 37 ° C va 240 ay/min tezlikda bir kechaga (12-14 soat) o'stirishga qo'ying.

2. 10 ml suyuq LB muhiti bo'lgan mikrobiologik probirkaga 1 ml tungi kultura qo'shing. Probirkani kachalkaga qo'ying va kultura logarifmik o'sish fazasining o'rtasiga yetguncha ($\sim 2 \times 10^9$ hujayra/ml) 37°C va 240 ay/min da inkubatsiya qiling.

3. Xona haroratida (steril) 5 minut davomida 5000 g sentrifugalash orqali hujayralarni cho'ktiring. Supernatantni to'kib tashlang.

4. Hujayralarni sitrat buferi bilan yuving. Buning uchun hujayra qoldig'ini 10 ml sitrat bufer eritmasida qayta suspenziya qiling. Xona haroratida 5 minut davomida 5000 g da sentrifugalash orqali hujayralarni cho'ktiring. Supernatant suyuqlikni to'kib tashlang.

5. 10 ml sitrat bufer eritmasida hujayralarni qayta suspenziya qiling. 5 ml hujayra suspenziyasini ikkita steril mikrobiologik probirkaga o'tkazing.

6. Bitta probirkaga 200 mkl NG eritmasidan qo'shing, ikkinchi (nazorat) probirkaga NG qo'shmang. Probirkalarni suv hammomiga (37 ° C) joylashtiring va oldingi bosqichda belgilangan T-50 vaqt oralig'ida inkubatsiya qiling.

7. Har bir probirkaning tarkibini steril sentrifugali stakanga o'tkazing. 5 minut davomida 5000 g da sentrifugalash orqali hujayralarni cho'ktiring. Supernatantni to'kib tashlang.

8. NG dan hujayralarni yuvish. Buning uchun ularni ikki marta teng hajmdagi fosfat bufer eritmasi bilan yuving, hujayra cho'kmasini sentrifugalash orqali yig'ing.

9. Har bir variantdan hujayralarni 10 ml LB suyuq muhitda qayta suspenziya qiling va tun davomida 37°C va 240 ay/min da inkubatsiya qiling.

10. 5000 g da 5 minut davomida sentrifugalash orqali hujayralarni cho'ktiring. Hujayralarni bir xil hajmdagi fiziologik eritma bilan yuving.

11. Hujayralarni 500 mkl fiziologik eritmaga qayta suspenziya qiling va suspenziyalarni selektiv agar muhiti bilan Petri idishlariga ko'chiring.

12. NG bilan ishlov berilgan hujayra kulturalari bilan alohida koloniyalar paydo bo'lguncha (12-24 soatdan keyin) idishlarni termostatda 37 ° C da inkubatsiya qiling.

Nazorat savollari

1. Mutatsiya nima?
2. Qanday mutatsiya xillari bor?
3. Genom mutatsiyalari haqida tushuncha bering.
4. Xromosoma mutatsiyalari qanday vaqtda sodir bo'ladi?
5. Qanday kimyoviy mutagenlarni bilasiz?
6. E. coli hujayralarida nitrozoguanidin bilan mutatsiya induksiyasi qanday tartibda olib boriladi?

Foydalanilgan adabiyotlar

1. *Bramucci M., Nagarajan I* Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3948—3953.
2. *Cerda-Olmedo E., Hanawalt P., Guerola N.* Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the *Escherichia coli* chromosome // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 705-719.
3. *Court D., Sawitzke J., Thomason L.* Genetic engineering using homologous recombination // Annu. Rev. Genet. 2002. V. 36. P. 361—388.
4. *Datsenko K., Wanner B.* One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000. V. 97. P. 6640-6645.
5. *Deng W.P., Nickoloff J.A.* Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site // Anal. Biochem. 1992. V. 200. P. 81—88.
6. *Geisselsoder J., Witney F., Yuckenberg P.* Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis // Biotechniques. 1987. V. 5. P. 786—791.
7. *Glickman B.* 2-Aminopurine mutagenesis in *Escherichia coli* // Basic Life Sci. 1985. V. 31. P. 353-379.
8. *Hayashi K., Nakazawa M., Ishizaki Y., Hiraoka N., Obayashi A.* Regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. P. 7617-7631.
9. *Herlitze S., Koenen M.* A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction // Gene. 1990. V. 91. P. 143—147.
10. *Ho S., Hunt H., Horton R., Pullen J., Pease L.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction // Gene. 1989. V. 77. P. 51-59.
11. *Hutchinson F., Stein J.* Mutagenesis of lambda phage: 5-bromouracil and hydroxylamine // Mol. Gen. Genet. 1977. V. 152. P. 29—36.
12. *Karlinsey J.E.* X-Red genetic engineering in *Salmonella enterica* serovar typhimurium // Methods Enzymol. 2007. V. 421. P. 199—209.
13. *Kirchhoff F., Desrosiers R.C.* Random mutagenesis of short

target DNA sequences via PCR with degenerate oligonucleotides // Methods Mol. Biol. 1995. V 57. P. 323-333.

14. Kunkel T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985. V. 82. P. 488-492.

15. Kunkel T.A., Bebenek K., McClary J. Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA// Methods Enzymol. 1991. V. 204. P. 125—139.

16. Lamberg A., Nieminen S., Qiao M., Savilahti H. Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of *in vitro*-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 705—712.

17. Landt O., Grunert H.-P., Hahn U. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction // Gene. 1990. V. 96. P. 125—128.

18. Lawrence C., Gibbs P., Borden A., Horsfall M., Kilbey B. Mutagenesis induced by single UV photoproducts in *E. coli* and *yeast*// Mutat. Res. 1993. V. 299. P. 157—163.

19. Lesic B., Rahme L.G. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa* // BMC Mol. Biol. 2008. V. 4. P. 9—20.

20. Muniyappa K., Radding C. The homologous recombination system of phage lambda Pairing activities of beta protein // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 7472—7478.

8-MAVZU. GEN MUHANDISLIGI FERMENTLARI.

Reja:

1. Fermentlarning asosiy guruhlari
2. Restriktazalar
3. Polimerazalar
4. Teskari transkriptaza
5. Ligazalar
6. Terminal transferaza
7. Restriksiyalash endonukleazalari

8. Fosfatazalar

9. Telomeraza

Tayanch soʻz va iboralar: Restriktazalar, DNK-polimerazalar, teskari transkriptaza yoki revertazalar, DNK-ligaza, ishqoriy fosfatazalar, nukleazalar.

Gen muhandisligi nisbatan yaqinda, nuklein kislotalaridagi nukleotidlar ketma-ketligini aniqlashning samarali usullari ishlab chiqilgandan keyin molekulyar biologiya bilan shugʻullanuvchi mutaxassislarning nazariga tushgan. Bir hujayrali sodda jonivorlar (xususan, tetraximenning kiprikli infuzoriyasi) tadqiqotlarning dastlabki obyektlari boʻlgan, chunki yadro va xromosoma apparatining qurilishi boʻyicha ular bir necha oʻn minglab xromosomalarni va shundan kelib chiqqan holda bitta hujayrada koʻplab fermentlarni oʻz ichiga oladi.

Hayvonlar va oʻsimliklarning in vitro hujayralarini yetishtirish usullarining yaratilishi asrimiz eksperimental biologiyasining eng katta yutuqlaridan biri boʻldi. Bu usul yordamida odamning turli-tuman toʻqimalaridagi hujayralarni xuddi bakteriyalar yoki boshqa bir hujayrali organizmlar kabi maxsus tanlangan oziqlantirish muhitlarida yetishtirish mumkin. Odamning koʻplab yetishtirilgan hujayralari dastlab saraton oʻsmalari hujayralaridan olingan. Bu hujayralar yetishtirish paytida cheklanmagan miqdorda boʻlinishi mumkin (shuning uchun ham ular immortalizatsiya qilingan yoki oʻlmas hujayralar deb ataladi). Biologlar optimal sharoitlarda odamlar va jonivorlarning normal hujayralari ham cheksiz koʻp miqdorda boʻlinishi mumkinligiga (yetishtirishda ham, organizmda ham) uzoq vaqtlar mobaynida ishonib kelganlar.

Organizmlar xromosomalardagi genlarda saqlanadigan maʼlumotlarni oʻrganish va bu maʼlumotlarga tashqi aralashuv yoʻli bilan oʻzgarishlar kiritish mumkinligi toʻgʻrisidagi farazni birinchilardan boʻlib rus olimi A.M. Olovnikov ilgari surgan.

Kunlardan bir kun Rossiya fanlar akademiyasining biokimyoviy fizika instituti xodimi Aleksey Matveevich Olovnikov metroda elektropoyezdni kutib oʻtirgan. Xeyflikning tajribalari toʻgʻrisidagi fikrlar tinchlik bermayotgan olim oʻychan qiyofada boʻlgan va birdaniga xomush boʻlib qolgan.

Xuddi relslar ustida yurib borayotgan poyezd kabi DNK-polimeraza fermenti DNK molekulasi bo'ylab harakatlanadi va ulardan nusxa oladi. Biroq agar poyezd harakatni oxirgi stantsiyadan emas, biror-bir o'rtadagi stantsiyadan boshlasa, u holda nusxalar ikki baravar qisqa bo'ladi, ya'ni, genetik kodning hammasi yangidan yaratilmaydi. Agar bu muntazam ravishda sodir bo'lsa, demak genetik material kamayadi. Vaqt o'tishi bilan xromosomalarning tugallanish uchastkalari – telomerlar aynan shu sababga ko'ra kalta bo'lib qoladi. Demak gen muhandisligi yordamida genlarga tashqi aralashuv yo'li bilan yo'qolgan genetik materialni tiklashga, genlarni qayta qurishga, o'zgartirishga va yangilashga urinib ko'rish mumkin. Olovnikov elektropoyezdga ulgurmay qolishiga salgina qolgan, lekin uning bu kashfiyoti shu narsaga arzirdi...

Bir qator fermentlar faoliyati natijasida hujayralar xromosomalarning telomer uchastkalarining uzunligi ortadi yoki doimiy darajada saqlanib turadi, shu tariqa hujayra xromosomalarning tugallanish qismlaridagi replikatsiya tanqisligining o'rni to'ldiriladi va hujayralar cheklanmagan muddat davomida bo'linish imkoniga ega bo'ladi. Bu fermentlarni tadqiq qilish davomida (quyida tasvirlab berilishicha RNK tarkibiy qismidan va oqsil tarkibiy qismidan tarkib topgan) ma'lum bo'lishicha, RNK tarkibiy qismi amalda barcha hujayralarda doimiy darajada ekspresslanadi. Fermentlar faolligini induksiylash uchun oqsil tarkibiy qismining ekspressiyasi zarur bo'ladi, shu sababli oqsil tarkibiy qismi fermentlarning katalitik tarkibiy qismi deb yuritiladi. Fermentlar katalitik tarkibiy qismi genining sun'iy ravishda induksiylangan ekspressiyasi (gen muhandisligi usuli yordamida genni kiritish yo'li bilan) hujayrani immortal (o'lmas), ya'ni cheksiz uzoq muddat bo'linadigan qilib qo'yadi, shu tariqa hujayra uchun Xeyflik chegarasi bekor qilinadi.

FERMENTLARNING ASOSIY GURUHLARI.

Gen muhandisligi – molekulyar genetikaning avlodi bo'lib, o'zining dunyoga kelishida genetik enzimologiya va nuklein kislotalar kimyosi oldida qarzdordir, chunki fermentlar molekulyar almashtirishlar (manipulyatsiyalar) mexanizmining asosi bo'lib hisoblanadi. Agar hozirgi kunda biz hujayralar va hujayrali organizmlar bilan mikromanipulyatorlar (mikroalmashtirgichlar) yordamida ishlash imkoniyatiga ega bo'lsak, DNK va RNK makromolekulalari bilan

Molekulyar mikrobiologiya

ishlashda hech qanday – hatto eng kichik mikrojarrohlik asboblari ham yordam bera olmaydi. Xo'sh, bunday holatda nima qilmoq kerak – qanday yo'l tutish lozim bo'ladi?. Bu o'rinda “tig’ (skalpel)”, “qaychi” va “tikish iplari” vazifasini fermentlar bajaradi.

Faqat fermentlarga DNK zanjirida nukleotidlarning ma'lum bir ketma-ketliklarini topishi, u yerdagi molekulani “qirqishi” va aksincha, DNK zanjiridagi bo'shliqni (teshikni) bekitishi mumkin. Bu fermentlar hujayra bo'linishida DNK replikatsiyasi (ikkilanish – ikki baravar ko'payish), DNK zanjirlaridagi shikastlanishlar reparatsiyasi (reparatsiya – molekulalar butunligini tiklash), genetik ma'lumotlarni hisobga olish hamda hujayra ichida yoki bir hujayradan ikkinchi hujayraga genetik ma'lumotlarni ko'chirib o'tkazish bo'yicha vazifalarni (funktsiyalarini) bajarish bilan hujayralar ichida qadim zamonlardan buyon ishlab keladi. Gen muhandisining vazifasi – qo'yilgan vazifalarni bajara oladigan fermentni, ya'ni nuklein kislotasining ma'lum bir uchastkasi (bo'lagi) bilan ishlay oladigan fermentni tanlay bilishdan iborat.

Shuni qayd qilib o'tish joizki, gen muhandisligida qo'llaniladigan fermentlar turlar bo'yicha o'ziga xoslikdan mahrum, shu sababli gen muhandisligi mutaxassisi har qanday kelib chiqishli DNK tarkibiy qismlarini – bo'laklarini (fragmentlarni) o'zi tanlagan ketma-ketlikda birlashtirishi (uyg'unlashtirishi) mumkin. Bu esa gen muhandisligiga jonli tabiat tomonidan turlar orasiga qo'yilgan to'siqlarni yengib o'tishga va turlar o'rtasida chatishtirish ishlarini amalga oshirishga imkon beradi.

Rekombinatsiyalangan DNK larni tuzishda (konstruktsiyalashda) qo'llaniladigan fermentlarni bir nechta guruhlariga ajratish mumkin.

- DNK fragmentlarini (tarkibiy qismlari – bo'laklarini) hosil qilishda yordam beruvchi fermentlar (restriktazalar);

- DNK matritsasida DNK ni sintezlaydigan fermentlar (polimerazalar) yoki RNK matritsasida DNK ni sintezlaydigan fermentlar (teskari transkriptazalar);

- DNK fragmentlarini (tarkibiy qismlari – bo'laklarini) birlashtiruvchi fermentlar (ligazalar);

- DNK tarkibiy qismlari – bo'laklarining tugallanish qismlari tuzilishini (strukturasini) o'zgartirishni amalga oshirishga imkon beruvchi fermentlar.

RESTRIKTAZALAR.

Restriktazalar (restriksiyalash endonukleazalari, restriksiya endonukleazalari) – DNK molekulasida (restriksiya saytlarida) ma'lum bir nukleotidlar ketma-ketliklarini tanib oluvchi va bu ketma-ketliklarga hujum qiluvchi fermentlardir.

1953 yildayoq boshqa shtamm hujayrasiga kiritilgan (masalan, V shtammi DNK si S shtammi hujayrasiga) ma'lum bir E. coli shtammining DNK lari hech qanday genetik faollikni namoyon qilmasligi aniqlangan, chunki ular juda tez kichik bo'laklarga – tarkibiy qismlarga ajralib ketadi. 1966 yilda bu hodisa xo'jayin DNK ning o'ziga xos modifikatsiyasi (o'zgarishlarga tortilish natijasida takomillashuvi) bilan bog'liq ekanligi ko'rsatib berilgan – u o'zgarishlarga tortilmagan (modifikatsiyalanmagan) DNK da mavjud bo'lmagan bir nechta metillashgan asoslarni o'z ichiga oladi, bunda metillanish (asoslarga metil guruhining qo'shilishi) replikatsiya (ikki martaga ko'payish) yakunlangandan keyin sodir bo'ladi. Bakteriya aynan shu modifikatsiya (o'zgarishlarga tortilish) tipi bo'yicha "o'zga kelib chiqishli" bo'lgan – hujayraga bostirib kirgan har qanday DNK dan o'z DNK sini farqlay olish qobiliyatiga ega. Bunda "belgilash" ga DNK-metilaza deb ataluvchi modifikatsiyalash metillovchi fermentlari mas'ul bo'ladi. Modifikatsiyalashdagi farqlar o'zga kelib chiqishli DNK ni tegishli saytlardan metil guruhlarining yo'qligini bilib oluvchi restriksiyalaydigan fermentlar ta'siriga nisbatan sezuvchan qilib qo'yadi.

Bakteriyalarda restriksiyalash va modifikatsiyalash tizimlari (sistemalari) juda keng tarqalgan, bu tizimlarning amalda mavjudligi rezident (xo'jayin) DNK ni o'zga kelib chiqishli ketma-ketliklar bilan ifloslanishdan himoyalashda juda muhim rol o'ynaydi. Metillashmagan DNK ni ajratib yuborgan restriktaza 1960 yilda Mezelson va Yuan tomonidan ajratib olingan. Bu ferment DNK ning ma'lum bir ketma-ketligiga nisbatan nihoyatda ixtisoslashgan bo'lgan, u molekulalarni maxsus o'ziga xos bo'lmagan boshqa joyda – tanib olish uchastkalaridan biroz naribroqda ajratib yuborgan. Oradan ko'p o'tmasdan, 1970 yilda Smit va Vilkoks Haemophilus influenzae dan DNK ning qat'iy belgilangan ketma-ketligini (Hind III) ajratib oluvchi birinchi restriktazani ajratib olishga muvaffaq bo'lganlar. Har xil bakteriyalar o'z DNK larini har xil belgilashlari sababli restriktazalar ham har xil ketma-ketliklarni tanib olishlari lozim. Va haqiqatan ham

Molekulyar mikrobiologiya

o'shandan buyon 150 dan ortiq restriksiya saytlarini (DNK ni ajratib yuborish o'rinlarini) tanib oladigan restriktazalar ajratib olingan.

POLIMERAZALAR.

DNK polimeraza birinchi marta 1958 yilda Kornberg va uning hamkasblari tomonidan *E. coli* dan ajratib olingan. *E. coli* DNK-polimeraza (Pol I) qo'sh zanjirli halqali DNK molekulalari bilan bog'lanmaydi. Biroq bunday molekulalar denaturatsiyalansa va bir zanjirli shakllar hosil qilinsa, u holda bir zanjirli shakllar bilan polimeraza bu uchastkalarining uzunligiga proporsional bo'lgan miqdorlarda – taxminan har 300 nukleotid qoldig'iga bitta molekula miqdorida bog'lanadi. Pol I DNK qo'sh spiralining bir zanjirli uchastkalari bilan 3'-gidroksilli va 5'-fosfatli bir zanjirli uzilish joylarida, shuningdek DNK qo'sh zanjirli molekulalarining tugallanish joylarida bog'lanadi.

Ferment molekulyar og'irligi 103 kDa bo'lgan monomer polipeptid zanjiridan tarkib topgan va 3 domenli tuzilishga (strukturaga) ega. Har bir domen o'zining fermentativ faolligiga: 5'-3' polimeraza, 3'-5' ekzonukleaza va 5'-3' ekzonukleaza faolligiga ega.

1. 5'-3' polimeraza faolligi. Ushbu reaksiyaning amalga oshishi uchun bir zanjirli DNK-matritsasi va shu zanjir uchastkasiga hamrohlik qiluvchi tarkibiy qism – 3'-OH tugallanish qismli praymer (zatravka) bo'lishi zarur.

2. 3'-5' ekzonukleaza faolligi. Ushbu faollik bir zanjirli yoki qo'sh zanjirli DNK ni 3'-OH tugallanish qismidan gidrolizlaydi. 3'-5' nukleaza DNK ning faqatgina juftlashmagan uchastkalaridagi diefirli bog'lanishlarni ajratadi. Ma'lumki, polimerazali reaksiyalarda o'sib borayotgan zanjirga hamrohlik qilmaydigan nukleotidning ma'lum bir chastota bilan qo'shilishi ehtimoli mavjud. Biroq polimeraza bunday nukleotid qo'shilishidan hosil bo'lgan noto'g'ri juftlashgan tugallanish qismiga nukleotidni qo'sha olmaydi. Shu paytda 3'-5' ekzonukleaza yordamga yetib keladi, u noto'g'ri juftlashgan nukleotidni olib tashlaydi va olib tashlangan noto'g'ri juftlashgan nukleotid o'rniga oldinda borayotgan to'g'ri nukleotid qo'shiladi. 3'-5' ekzonukleotik faollik DNK sinteziga teskari yo'nalishda namoyon bo'ladi. Shunday qilib, DNK-polimerazaning 3'-5' ekzonukleaza faolligi matritsa tomonidan yo'naltirilgan polimerlanishning aniq bajarilishida muhim rol o'ynaydi. Berilgan ekzonukleazaning samaradorligi yoki

aylanishlar soni optimal (eng maqbul) shart-sharoitlarda polimeraza faolligiga ega bo'lgan subbirlilikning aylanishlar sonidan 2% ni tashkil qiladi.

3. 5'-3' ekzonukleaza faolligi. Ushbu faollik qo'sh zanjirli DNK zanjirlaridan birini erkin holda bo'lgan 5'- tugallanish qismidan boshlab degradatsiyalaydi. 3'-5' ekzonukleazadan farqli ravishda 5'-3' ekzonukleaza qo'sh zanjirli DNK molekulasining faqatgina juftlashgan uchastkalaridagi diefirli bog'lanishlarni ajratadi. Bundan tashqari 3'-5' nukleaza bir paytning o'zida faqat bitta nukleotidni uzib oladi, 5'-3' nukleaza esa erkin holda bo'lgan 5'-tugallanish qismidan bir paytning o'zida o'ntagacha qoldiq uzunligidagi (gidroliz mahsulotining 20% i atrofida) oligonukleotidlarni qirqib olishi mumkin. Nukleazali ajratib olishlarning tezligi ushbu reaksiya bilan bir paytning o'zida sodir bo'ladigan polimerlanish reaksiyasining tezligiga bog'liq ravishda ortadi. Bunda DNK gidrolizlanishidan hosil bo'lgan mahsulotlar tarkibidagi oligonukleotidlarning nisbiy miqdori ham ortadi.

Fermentativ faollikning bunday uyg'unligi E.coli DNK-polimerazasiga DNK in vivo shikastlanishlarini reparatsiya qilishda (tiklashda) muhim o'ringa ega bo'lish imkonini beradi. H-tugallanish domeni aminokislota qoldiqlaridan tarkib topgan qo'shni sirtmoq bilan birikkan bo'ladi va proteolitik fermentlar yordamida undan osongina ajraladi. Qolgan qism qo'shfunksional (ikki vazifali) bo'ladi, chunki u polimerazadan va 3'-5' ekzonukleazadan tarkib topgan. U Klenov (uni tasvirlab bergan mualliflardan birining familiyasi) fragmenti (tarkibiy qismi) deb atalgan. Klenov fragmentidan odatda qo'sh zanjirli DNK larning ko'pincha restriktazalar bilan generatsiyalanadigan bir zanjirli 5'-tugallanish qismlarini to'mtoq holga kelguncha qurib bitkazish uchun, bir zanjirli DNK da ikkinchi zanjirni sintezlash uchun, shuningdek qo'sh zanjirli DNK molekulalarida bir zanjirli 3'-tugallanish qismlarini gidrolizlash uchun foydalaniladi

TESKARI TRANSKRIPTAZA.

Teskari transkripsiyadan RNK-matritsani DNK ning hamrohlik qiluvchi zanjiriga transkripsiyalash uchun foydalaniladi. Genomlari bir zanjirli molekulalar bilan taqdim qilingan retroviruslarni (qayta takrorlanuvchi viruslarni) o'rganishda shu narsa aniqlanganki, retrovirus hujayra ichidagi rivojlanish jarayonida o'z genomining xo'jayin hujayra xromosomalariga qo'sh zanjirli DNK ko'rinishida

Molekulyar mikrobiologiya

integratsiyalanishi bosqichini bosib o'tadi. 1964 yilda Temin virus uchun maxsus ferment – RNK-matritsada hamrohlik qiluvchi DNK ni sintezlaydigan ferment mavjudligi to'g'risidagi farazni ilgari surgan. Bunday fermentni ajratib olishga qaratilgan hatti-harakatlar va nihoyat muvaffaqiyat keltirgan – 1970 yilda Temin Mizutani bilan birgalikda va ulardan mustaqil ravishda Baltimor Raus sarkomasi virusining hujayradan tashqaridagi virionlar preparatida qidirilayotgan fermentni topganlar. Ushbu RNK – DNK-polimeraza bog'lanishi teskari transkriptaza yoki revertaza atamasi bilan nomlangan.

Qushlar retroviruslarining revertazasi boshqalarga qaraganda nisbatan mufassalroq o'rganilgan. Bu retroviruslarda har bir virion taxminan 50 tacha ushbu ferment molekulasini o'z ichiga oladi. Teskari transkriptaza ekzimolyar miqdorda mavjud bo'lgan ikkita subbirlikdan – a subbirlik (65 kDa) va b subbirlikdan (95 kDa) tarkib topgan. Teskari transkriptaza hech bo'lmaganda uchta fermentativ faollikka :

1. Matritsa sifatida RNK dan ham, DNK dan ham foydalanadigan DNK-polimerazasi faolligiga
2. RNK-DNK gibridi tarkibida RNK ni, biroq bir yoki ikki zanjirli RNK ni emas, gidrolizlaydigan N RNKaza faolligiga;
3. DNK-endonukleaza faolligiga ega bo'ladi.

Birinchi ikkita faollik virus DNK sini sintezlash uchun zarur, endonukleaza esa, aftidan, xo'jayin hujayra genomiga virus DNK sini integratsiyalash uchun zarur. Tozalangan teskari transkriptaza DNK ni RNK matritsada ham, DNK-matritsada ham sintezlaydi. Revertazaga sintezni boshlash uchun, xuddi boshqa polimerazalar kabi, qisqa qo'sh zanjirli uchastka (praymer) zarur. RNK ning ham, DNK ning ham bir zanjirli segmenti praymer vazifasini o'tashi mumkin, ular reaksiya jarayonida DNK ning yangidan sintezlanadigan zanjiri bilan kovalent bog'lanishli bo'lib qoladilar.

Teskari transkriptazadan ko'proq matritsa RNK sini hamrohlik qiluvchi DNK ga transkripsiyalash uchun foydalaniladi. Teskari transkriptaza reaksiyasi maxsus tanlangan shart-sharoitlarda, RNKaza faolligiga ega bo'lgan kuchli ingibitorlardan foydalanish yo'li bilan amalga oshiriladi. Bunda RNK maqsadli molekulalarining to'liq o'lchamli DNK nusxalarini olishga muvaffaq bo'linadi. Teskari transkripsiyada praymer sifatida poli (A)-tarkibli RNK matritsani o'z ichiga olgan oligo (dT) dan, 3'- poli (A) tugallanish qismlariga ega bo'lmagan RNK molekulalari uchun esa – o'rganilayotgan RNKning

3'-tugallanish qismiga hamrohlik qiluvchi, kimyoviy yo'l bilan sintezlab olinadigan oligonukleotidlardan foydalaniladi. RNK-matritsada DNK ning hamrohlik qiluvchi zanjiri sintezlangandan va RNK yemirilgandan keyin (odatda ishqor bilan ishlov berish qo'llaniladi) DNKning ikkinchi zanjirini sintezlashga kirishiladi. Bunda revertazaning hamrohlik qiluvchi bir zanjirli DNK ning 3'-tugallanish qismida praymer vazifasini (funktsiyasini) bajarishi mumkin bo'lgan o'z-o'ziga hamrohlik qiluvchi shpilkalarni (to'g'nag'ichlarni) hosil qila olish xususiyatidan foydalanishi mumkin bo'ladi.

Ushbu jarayonda hamrohlik qiluvchi DNK ning birinchi zanjiri matritsa vazifasini o'taydi. Ushbu reaksiya revertaza bilan ham, E.coli DNK-polimeraza bilan ham katalizatsiyalanishi mumkin. Shu narsa aniqlanganki, bu ikkita fermentning uyg'unlashuvi hamrohlik qiluvchi DNK ning to'laqonli ikki zanjirli molekulalarini olish imkoniyatini oshiradi. Sintezlash jarayoni tugagandan keyin hamrohlik qiluvchi DNKning birinchi va ikkinchi zanjirlariga ikkinchi zanjirni sintezlashda praymer vazifasini o'tagan to'g'nag'ichlar kovalent bog'langan holatda qoladi. Bu sirtmoq nuklein kislotalarining bir zanjirli uchastkalarini o'ziga xos tarzda yemiradigan Si endonukleazasi yordamida ajratiladi. Bunda hosil bo'ladigan tugallanish qismlari har doim ham to'mtoq bo'lavermaydi, shu sababli keyingi klonlanishning samaradorligini oshirish uchun ular to'mtoq holga kelguncha E.coli DNK-polimerazasining Klenov fragmenti (tarkibiy qismi) yordamida reparatsiyalanadi. Olingan hamrohlik qiluvchi ikki zanjirli DNK ni keyinchalik klonlashtiriladigan vektorlarga kiritish, DNK gibril molekulalari tarkibida ko'paytirish va kelgusidagi tadqiqotlarda foydalanish mumkin.

LIGAZALAR

1961 yilda Mezelson va Veygl fag 1 misolida rekombinatsiya DNK molekulalarini uzishini va keyinchalik qayta ulashini ko'rsatib berganlar. Bu DNK fragmentlarini (tarkibiy qismlarini) tikishda ishtirok etadigan fermentni qidirish ishlarini boshlash uchun turtki bo'lib xizmat qilgan. 1967 yilda shunday ferment topilgan va u DNK-ligaza deb atalgan. U nuklein kislotasining ikki zanjirli molekulasida fosfodiefir bog'lanish sintezini katalizlaydi.

Boshqacha qilib aytadigan bo'lsak, DNK-ligaza yonma-yon joylashgan nukleotidlarni tikadi, shakar qoldiqlari orasida bog'lanish hosil qiladi. DNK-ligaza DNK reparatsiyasi jarayonlarida mutlaqo zarurdir, replikatsiya jarayonida esa – DNK zanjirini ikkilantirishda usiz hech narsa qilishning imkoni yo'q

DNK-ligazaning kofaktorlardagi ehtiyoji va harakat usuli bo'yicha bir-biridan farqlanadigan 2 ta tipi amalda mavjud. E.coli DNK ligazasi kofaktor sifatida difosfopiridinnukleotiddan foydalanadi, T4 fagi ligazasi esa – Mg^{2+} ishtirokidagi ATF dan foydalanadi. T4 fagi ligazasi ko'proq universal hisoblanadi, chunki u yopishqoq tugallanish qismlarini ligirlashdan tashqari ikki zanjirli DNK fragmentlarining (tarkibiy qismlarining) to'mtoq tugallanish qismlari bilan qayta ulanish reaksiyasini katalizlash xususiyatiga ega. Bu o'rinda u ko'proq qo'llaniladi.

DNK FRAGMENTLARINING (TARKIBIY QISMLARINING) TUGALLANISH QISMLARI STRUKTURASINI (TUZILISHINI) O'ZGARTIRUVCHI FERMENTLAR.

TERMINAL TRANSFERAZA.

Terminal transferaza (tugallanish dezoksinukleotidil transferazasi) 1962 yilda Bollum tomonidan buzoq timusida aniqlangan. Mg^{2+} ionlaridan kofaktor sifatida foydalanilganda 3'-OH tugallanish qismli bir zanjirli DNK yoki turtib chiqib turgan bir zanjirli 3'-OH tugallanish qismli ikki zanjirli DNK terminal transferazaning substrati bo'lib hisoblanadi. Agar kofaktor sifatida So^{2+} dan foydalanilsa, u holda ushbu ferment to'mtoq tugallanish qismli ikki zanjirli DNK ning 3'-OH tugallanish qismiga dezoksinukleotidlarning qo'shilishini katalizlaydi

Terminal transferaza tomonidan yo'naltiriladigan reaksiyaga faqatgina bitta tipdagi dezoksinukleotidlar kiritilganda, bir zanjirli gomopolimer 3'-tugallanish qismlariga ega bo'lgan DNK molekulasi hosil bo'ladi. Xuddi shu tarzda birinchi molekulaga hamrohlik qiluvchi DNK ning boshqa molekulalarida ham gomopolimer 3'-tugallanish qismlarini qurib tugatish mumkin. Ma'lum bir shart-sharoitlarda olingan DNK preparatlarining aralashib ketishi DNK gibrid molekulalarining shakllanishiga olib kelishi mumkin.

Aynan tugallanish dezoksinukleotidil transferazasi yordamida 1972 yilda in vitro DNK molekulalarini rekombinatsiyalash bo'yicha dastlabki tajribalar amalga oshirilgan.

E.coli Poli (A)-polimerazasi 1973 yilda Sippel tomonidan kashf qilingan. U bir zanjirli RNK molekulalarining 3'-OH tugallanish qismlariga poli (A) ketma-ketliklarning qo'shilishini katalizlaydi. Ushbu polimerazadan ko'pincha tajribalar o'tkazish paytida RNK molekulalarini hamrohlik qiluvchi DNK molekulalariga RNK molekulalaridan nusxa ko'chirishga tayyorlashda RNK ning 3'-tugallanish qismiga radioaktiv belgini kiritish uchun foydalaniladi.

RESTRIKSIYA ENDONUKLEAZALARI.

Evolutsion taraqqiyot turli xil bakteriyalarga noyob endonukleazalarni in'om qilgan, bu endonukleazalar yordamida bakteriya o'z DNK sini o'zga kelib chiqishli DNK dan farqlay olish qobiliyatiga ega bo'lgan. Shu tariqa tabiat olimlarni DNK zanjirlarini uzish uchun kerak bo'ladigan yuqori darajada ixtisoslashgan reaktivlarning boy jamlanmasi bilan ta'minlagan. DNK ni o'rganishda restriksiyalovchi endonukleazalarning ikkita muhim xususiyati katta ahamiyat kasb etadi. Bu muhim xususiyatlardan birinchisi fermentning DNK dagi o'ziga xos qisqa nukleotid ketma-ketliklarini tanib olish xususiyati bilan bog'liq. Ikkinchi muhim xususiyat shundan iboratki, restriksiya endonukleazalarining juda ko'p sonli turlari amalda mavjud bo'lib, ularning har biri o'ziga xos maxsus ketma-ketliklarni tanib olish qobiliyatiga ega.

A. Restriksiya endonukleazalarining uch tipi.

I va II tiplaridagi endonukleazalar. I va II endonukleazalar guruhlariga taalluqli bo'lgan fermentlar – murakkab oqsillar bo'lib, restriksiyalovchi endonukleaza va metilaza faolligiga ega bo'ladi. DNK ning rekombinantlangan molekulalarini qurishda (konstruksiyalashda) odatda bu qiziqarli fermentlardan foydalanilmaydi. I tipidagi fermentlar DNK bilan o'ziga xos maxsus uchastkalarda bog'lanadi va so'ngra tanib olish saytlaridan 400 juft nukleotiddan (p.n.) 7 ming juft nukleotidgacha (t.p.n.) bo'lgan oraliqda o'zgaradigan turlicha masofalarda ikki zanjirli qirqishlarni amalga oshiradi. DNKning fermentativ gidrolizini amalga oshirish uchun Mg^{2+} , ATF va S adenzimetionin zarur. S adenzimetionin fermentni faollashtiradi. Qirqish ATF gidrolizi bilan birgalikda kuzatiladi, bunda ferment

Molekulyar mikrobiologiya

endonukleolitik faolligini yo'qotadi, biroq ATFaza faolligini saqlab qoladi. Shunday qilib, I tipidagi endonukleazalar DNK bog'liqli ATFazalar hisoblanadi. Bundan tashqari ular tanib olish saytlarida 6-metiladeninli qoldiqlar hosil bo'lishini katalizlaydigan, faqatgina saytning o'ziga xos bo'lgan metilazasini o'zida taqdim qiladi.

Endonukleaza zanjirni tanib olish saytidan anchagina uzoqda qirqadi, biroq bunda 6-metil-adenin hosil bo'lishi bilan kechadigan metillanish shu saytning o'zida sodir bo'ladi. Endonukleaza faolligi sayt to'liq metillashmagan holatda yuzaga chiqadi. E.coli ning K12 fermenti uchun tanib olish sayti olti-sakkizta o'ziga xos bo'lmagan asos juftliklari bilan ajratilgan ikkita qisqa o'ziga xos oleonukleotidlardan tarkib topgan bo'ladi. Bunday tuzilish (struktura) bakteriyalarning turli xil shtammlarida topilgan I tipidagi fermentlarning tanib olish saytlari uchun xosdir (tipikdir). Maxsus o'ziga xos oligonukleotid ketma-ketliklari turli xil fermentlar uchun bir-biridan farq qiladi, biroq A ning metillashgan qoldiqlari har doim bir xil pozitsiyada joylashadi.

I tipiga qarindosh bo'lgan restriksiya-modifikatsiya tizimlari (sistemalari) turli xil ichak bakteriyalari genomlarining allel lokulalari bilan kodlanadi. Bunda har bir tizim (sistema) bilan transkripsiya tartibiga mos keluvchi tartibda joylashgan uchta tishlashgan genlar: hsdR, hsdM va hsdS genlari bog'langan. hsdM va hsdS ning polipeptidli mahsulotlari ikki sistronli RNK-matritsaning biri bilan uzatiladi va birgalikda metilazani tashkil qiladi. hsdM ning polipeptidli mahsulotlari metilaza faolligiga ega bo'ladi va metilaza faolligida maxsus saytli tanib olishlarni amalga oshiradi. hsdR genining mahsuloti endonukleaza faolligiga ega bo'ladi. Har uchala polipeptid ham I tipidagi fermentlarning faol preparatlarida turlicha miqdoriy tarkibda bo'ladi.

III tipidagi fermentlar ham xuddi I tipidagi fermentlar kabi nukleaza va metilaza faolligiga ega bo'ladi. Biroq, III tipidagi fermentlar S-adenozilmetionin bilan faollashtirilishiga qaramasdan ishlashi uchun ATF ni talab qiladi, III tipidagi fermentlar ATF ning gidrolizini katalizatsiyalamaydi. III tipidagi endonukleazalar o'zlarining tanib olish saytlaridan taxminan 25 juft nukleotidlar masofasida DNK da ikki zanjirli qirqishlarni amalga oshiradi. ATF va S-adenozilmetinin ishtirokida xuddi o'sha fermentlar saytlardagi maxsus metillanishni katalizlaydi. III tipidagi fermentlar geterodimer oqsillar hisoblanadi. Ularning subbirliklari E.coli ning ba'zi bir

shtammlarida xromosoma genomlaridan tashqarida joylashgan ikkita tishlashgan genlar bilan kodlanadi. Har bir ana shunday gen o'zida alohida transkripsion birlikni taqdim qiladi. Bitta gen mahsuloti o'ziga xos maxsus ketma-ketlikni tanib oladi va metilaza faolligiga ega bo'ladi, ikkinchi gen mahsuloti esa endonukleaza funksiyasini (vazifasini) o'z zimmasiga oladi va ushbu vazifani bajaradi.

I tipidagi fermentlar DNK molekulalarini reproduksiyalanadigan (qayta hosil bo'ladigan) fragmentlarga (tarkibiy qismlarga) ajratmaganligi uchun va I va III fermentlarining endonukleaza faolligi metillanish bilan doimo raqobatda bo'lganligi uchun ushbu fermentlarning hech qaysisidan rekombinantlangan DNK larni olishda reagent sifatida foydalanilmaydi.

II tipidagi endonukleazalar.

II tipidagi restriksiyalovchi endonukleazalar rekombinantlangan DNK molekulalarini qurishda (konstruksiyalashda) va DNK strukturasini (tuzilishini) tahlil qilishda asosiy vosita bo'lib hisoblanadi. Bu fermentlar maxsus o'ziga xos nukleotid ketma-ketliklarini tanib olish va ular bilan bog'lanish xususiyatiga ega, biroq I va III tiplaridagi endonukleazalardan farqli ravishda ular maxsus fosfodiefirli bog'lanishlar bo'ylab yoki o'zlarining tanib olish saytlari doirasida yoki bu tanib olish saytlaridan unchalik uzoq bo'lmagan ma'lum bir masofalarda ikki zanjirli qirqishlarni amalga oshiradi. Bunda bitta fermentning o'zi berilgan DNK molekulasini bir xil fragmentlar (tarkibiy qismlar) jamlanmasini hosil qilish bilan qirqadi. Fragmentlarning (tarkibiy qismlarning) uzunliklari ushbu fermentlar tomonidan tanib olinadigan maxsus o'ziga xos ketma-ketliklar orasidagi masofa bilan belgilanadi. II tipidagi fermentlar 3-gidroksil guruhi va fosfat o'rtasidagi fosfoefir bog'lanishlarini gidrolizlaydi, buning natijasida uzilishning bir tomonida 5'-monoefir guruhi, uzilishning ikkinchi tomonida esa 3'-gidroksil guruhi hosil bo'ladi.

Eco RI restriksiyalovchi endonukleazasi uchun tanib olish va qirqish sayti. Bunday qirqib olishda qirqish ikki bosqichda sodir bo'ladi: avval zanjirlardan biri, keyin esa ikkinchisi gidrolizlanadi. Odatdagi sharoitlarda bir-biriga hamrohlik qiluvchi bir zanjirli tugallanish qismlariga ega bo'lgan ikkita dupleks fragmentlar (tarkibiy qismlar) reaksiya mahsuloti bo'lib hisoblanadi. Turli xil zanjirlardagi to'rtta nukleotidlar o'rtasidagi vodородli bog'lanishlarni

turg'unlashtirishga ko'maklashadigan shart-sharoitlarda bu fragmentlar (tarkibiy qismlar) reassotsirlanishi (tarqalib ketishi) mumkin.

B. II tipidagi tipik restriksiyalovchi endonukleaza.

Eco RI endonukleazasi. Juda keng qo'llaniladigan Eco RI restriksiyalovchi endonukleazasi DNK ni 5'-GAATTC-3' ketma-ketliklari uchraydigan joylarda qirqadi. II tipidagi boshqa restriksiyalovchi endonukleazalar bilan sodir bo'ladigan hollardagi kabi ushbu ketma-ketlik palindrom hisoblanadi, ya'ni har ikkala zanjirda bir-biriga qarama-qarshi tomonda 5'-3' yo'nalishida o'qiladigan aniq bir xil ketma-ketliklar joylashadi. Eco RI har bir zanjirdagi G va A qoldiqlari o'rtasidagi fosfodiefir bog'lanishlarni gidrolizlaydi. Eco RI endonukleazasi har ikkala zanjirni 5'-GAATTC-3' palindrom ketma-ketligi uchraydigan joylarda qirqishi sababli DNK molekulasi uning uchun xarakterli bo'lgan fragmentlar (tarkibiy qismlar) jamlanmasiga qirqiladi.

Yopishqoq tugallanish qismlari. Eco RI endonukleazasi bosqichli ikki zanjirli qirqishlarni amalga oshiradi, bunda hosil bo'ladigan DNK fragmentlarining (tarkibiy qismlarining) tugallanish qismlarida 5'-AATT-3' to'rtta asosdan tarkib topgan bir-biriga hamrohlik qiluvchi qisqa bir zanjirli dumlar hosil bo'ladi. Eritmaning ionlashtiruvchi kuchiga va haroratga bog'liq ravishda ushbu bir-biriga hamrohlik qiluvchi dumlar yoki juftlashgan holatda qoladi yoki denaturatlanadi va shunda 5'-tugallanish qismlarida turtib chiqadigan qisqa bir zanjirli alohida fragmentlar (tarkibiy qismlar) paydo bo'ladi. Mos keluvchi shart-sharoitlarda bir-birlariga hamrohlik qiluvchi dumlar bir-birlari bilan qayta ulanadi. Eco RI endonukleazasi bilan DNK uzilganda hosil bo'ladigan bir zanjirli tugallanish qismlari yopishqoq nomini olgan, chunki ular bir-birlari bilan juftlashish xususiyatiga ega. Bosqichli uzilishlar hosil bo'lishining muhim oqibati shundan iborat bo'ladiki, bunda ikkita har xil DNK ga Eco RI endonukleazasi bilan ishlov berish natijasida paydo bo'ladigan fragmentlar (tarkibiy qismlar) yopishqoq tugallanish qismlari yordamida qo'shilishi mumkin. Bunda ko'rsatilgan DNK larning ikki zanjirli spiral segmentlariga taalluqli bo'lgan farqlar qo'shilish jarayoniga ta'sir o'tkazmaydi.

Ferment. I va III tiplaridagi restriksiyalovchi endonukleazalardan farqli ravishda Eco RI ga o'xshash II tip fermentlari metillashtirishni katalizatsiyalamaydi. Bunda metilaza faolligini boshqa oqsil namoyon

qiladi. Eco RI faol endonukleazasi molekulyar og'irligi 31000 ga teng bo'lgan ikkita bir xil polipeptid zanjirlaridan tarkib topgan dimerni o'zida taqdim qiladi. Gomodimer struktura (tuzilishdan) kelib chiqqan holda ferment tanib olish saytining ikkala qismidagi ikkita bir xil ketma-ketliklarga simmetrik ravishda ta'sir o'tkazishini va har ikkala zanjirni bir paytning o'zida uzishini kutish mumkin, aslida esa gidroliz jarayoni ketma-ketlikda sodir bo'ladi.

Oqsil taxminan o'n juft asoslarga ega bo'lgan uchastka bilan o'zaro ta'sir o'tkazishga kirishadi, ulardan olti jufti tanib olish sayti doirasida bo'ladi, qolganlari flanklovchi bo'lib hisoblanadi. Aynan ana shu flanklovchi ketma-ketliklar, aftidan, birinchi bo'lib qir qilishi lozim bo'lgan zanjirni aniqlaydi. Bundan tashqari asoslarning flanklovchi juftliklari berilgan tanib olish saytidagi qir qilishning umumiy tezligiga ta'sir ko'rsatadi, chunki bitta DNK molekulasi turli hil tanib olish saytlarida gidroliz jarayoni har xil tezliklarda amalga oshadi. Tadqiqotlar natijasida Eco RI restriksiyalovchi endonukleazasining majmuasi va oligonukleotidning

5'-TCGCGAATTCGCG-3'

kristali olingan va rentgen yordamida uning strukturasi (tuzilishi) tahlil qilingan. Bu berilgan ferment va DNK ning bir-birlariga o'zaro ta'sir o'tkazish mexanizmini mayda tafsilotlarigacha ko'rib chiqish imkonini beradi. Shu narsa aniqlanganki, bir tomondan ikkita arginin qoldiqlari va bitta glutamat, ikkinchi tomondan esa tanib olish saytidagi asos juftliklari o'rtasida vodorodli bog'lanishlar hosil bo'ladi, buning natijasida DNK da qisman buralish yuz beradi. II tipga kiruvchi boshqa restriksiyalovchi endonukleazalarning xususiyatlari to'g'risida unchalik ko'p narsa ma'lum emas, biroq, aftidan, bu xususiyatlar Eco RI restriksiyalovchi endonukleazaning xususiyatlariga o'xshash bo'ladi.

V. II tipdagi restriksiyalovchi endonukleazalarning har xil guruhleri.

Reaktivlarning katta katalogi (ryo'xatga olish kitobi). Barcha fermentlarda taxminan 90 ta atrofida turli xil tanib olish saytlari borligi bugungi kunga kelib o'tkazilgan tadqiqotlar yordamida aniqlangan. Fermentlarning har biri ma'lum bir prokariotik organizmdan olingan, bu ularning nomlanishida o'z aksini topgan. Masalan Eco RI – *Escherichia coli* K12, Hae II va Hae III – *Haemophilus aegyptius*, Bam

Molekulyar mikrobiologiya

HI – *Bacillus amyloligiefaciens*, Mbo I va Mbo II – *Moraxella bovis* shtamidan kelib chiqqan va hokazo. Bir xil tanib olish saytlariga ega bo'lgan ikkita turli xil fermentlar izoshizomerlar deb ataladi. Biroq izoshizomerlar bitta joyning o'zida qirqishni amalga oshirishi shart emas, masalan Xma I va Sma I ni solishtirib ko'ring.

Tanib olish va qirqishning palindrom saytlari. Eco RI restriksiyalovchi endonukleazasi – II tipga kiruvchi ko'p sonli restriksiyalovchi endonukleazalardan biri bo'lib, turli xil palindrom nukleotid ketma-ketliklarini tanib oladi va qirqadi, buning natijasida hamrohlik qiluvchi bir zanjirli dumli fragmentlar (tarkibiy qismlar) hosil bo'ladi. Ushbu guruh doirasida fermentlarning bir qancha turlarini ajratib ko'rsatish mumkin. Masalan Eco RI, Hing III va boshqa bir qator restriksiyalovchi endonukleazalar olti juft asoslardan tarkib topgan ketma-ketliklarni tanib oladi, Himf I restriksiyalovchi endonukleazasi besh juft asoslardan tarkib topgan ketma-ketliklarni tanib oladi, bulardan to'rtta nukleotiddan har biri markaziy qoldiq bo'lishi mumkin. Bgl I restriksiyalovchi endonukleazasi maxsus o'ziga xos oltita nukleotid qoldiqlarini tanib oladi, biroq buning uchun ular o'rtasidan boshqa har qanday besh juft asoslar bilan ajratilgan bo'lishi zarur. Not I restriksiyalovchi endonukleazasi davomiyli sakkiz juft asoslardan iborat bo'lgan tanib olish saytiga ega, Tag I va Mbo I kabi fermentlar to'rtta nukleotidlardan iborat bo'lgan tanib olish saytlariga ega. Keyingi bizga ma'lum bo'lgan xususiyat turli xil restriksiyalovchi endonukleazalarning ta'sir ko'rsatishi natijasida hosil bo'ladigan bir zanjirli tugallanish qismlarining xususiyatlariga taalluqlidir. Eco RI, Hing III, Mbo I va Ou I restriksiyalovchi endonukleazalari har bir zanjirning 5'-tugallanish qismlari qoldiqlaridan tarkib topgan bir zanjirli dumlarni hosil qiladi, Pst I va Hae II restriksiyalovchi endonukleazalari esa har bir zanjirning 3'-tugallanish qismlari qoldiqlaridan tarkib topgan bir zanjirli dumlarni hosil qiladi.

Turli xil tanib olish va qirqish saytlariga ega bo'lgan restriksiya endonukleazalari ko'pincha bir xil yopishqoq tugallanish qismlarini hosil qiladi. Masalan, Mbo I, Bcl I va Bam HI restriksiya endonukleazalari ta'siri ostida 5'-tugallanish qismli 5'-GATC-3' hosil bo'ladi, natijada ushbu fermentlarning har qandayi bilan DNK molekulasi qirqilganda hosil bo'ladigan fragmentlar (tarkibiy qismlar) aralashtirilganda yoki kuydirilganda bir-biri bilan birikadi. Biroq Bgl I restriksiya endonukleazasi bilan DNK molekulasi qirqilganda hosil

bo'ladigan fragmentlar (tarkibiy qismlar) kuydirganda ham bir-biri bilan birikishi gumon, chunki bir zanjirli dumlar uchta nukleotiddan tarkib topgan har qanday ketma-ketlikni o'z ichiga olgan bo'lishi mumkin.

II tipdagi boshqa restriksiyalovchi endonukleazalar ham maxsus o'ziga xos palindrom nukleotid ketma-ketliklarini tanib oladi, biroq fosfodiefir ko'priqchani tanib olingan ketma-ketlikning o'rtasidan qirqadi va natijada ikki zanjirli to'mtoq tugallanish qismlariga ega bo'lgan DNK fragmentlari (tarkibiy qismlari) hosil bo'ladi

Tanib olish va qirqish joylaridan ma'lum bir masofada bo'lgan tanib olish va qirqish palindrom bo'lmagan saytlari. II tipdagi fermentlar – biroq endi boshqa turdagilari – ham maxsus o'ziga xos nukleotid ketma-ketliklarini tanib oladi, biroq bu ketma ketliklardan tashqarida bo'lgan fosfodiefir ko'priqchani gidrolizlaydi. Bunda tanib olinadigan ketma-ketlik palindrom hisoblanmaydi. Bunday holatlarda restriksiyalovchi endonukleazalar, aftidan, tanib olinadigan ketma-ketlikdan asos juftliklarining aniq sonini “sanaydi” va so'ngra zanjirni qirqadi. Bunda sanash mexanizmi shunday bo'ladiki, turli zanjirlarning gidrolizlanish o'rinlari bir-biriga nisbatan bitta nukleotidga siljigan bo'ladi. Natijada uzunligi faqatgina bitta nukleotidga teng bo'lgan turtib chiqib turuvchi bir zanjirli DNK fragmentlari (tarkibiy qismlari) hosil bo'ladi.

G. II tipdagi restriksiyalovchi endonukleazalar yordamida DNK segmentlarini kartijlash.

Restriksiyalovchi endonukleazalar yordamida DNK ning uzun segmentlarini yoki murakkab genomlarini qayta ishlab chiqiladigan kichik birliklar jamlanmalariga qirqish mumkin. O'z navbatida bunday birliklarni o'lchamlari bo'yicha bir necha usullar yordamida ajratish mumkin. Buning uchun ko'pincha agaroz yoki poliakrilamid asosida tayyorlangan yarim suyuq jismdagi DNK fragmentlarining (tarkibiy qismlarining) elektroforezidan foydalaniladi. Odatda ikki zanjirli DNK fragmentining (tarkibiy qismining) elektr maydonidagi siljuvchanligi uning o'lchamlari logarifmiga teskari proporsional bo'ladi. Ma'lum uzunlikdagi fragmentlardan (tarkibiy qismlardan) marker (belgilovchi) sifatida foydalanish bilan chizg'ich va oddiy grafik yordamida bizni qiziqtirayotgan fragmentning (tarkibiy qismning) o'lchamlarini osongina aniqlab olishimiz mumkin. Bunday tahlilni o'tkazish uchun

Molekulyar mikrobiologiya

odatda ! mkg dan kam bo'lgan miqdordagi DNK yetarli bo'ladi, chunki fragmentlar (tarkibiy qismlar) mos keluvchi bo'yoqlar bilan, masalan bromli etid bilan bo'yalganda osongina namoyon bo'ladi.

Ma'lum bir restriksiyalovchi endonukleaza bilan DNK molekulalarini qirqishda hosil bo'ladigan fragmentlar (tarkibiy qismlar) jamlanmasi ushbu DNK ning o'ziga xos "barmoq izlari" bo'lib hisoblanadi. Alohida olingan bir nechta restriktazalar bilan va bir nechta kombinatsiyalarda DNK molekulasini qirqishda hosil bo'ladigan fragmentlarni (tarkibiy qismlarni) aniqlash bilan ko'pincha boshlang'ich molekulada segmentlarning joylashish tartibini aniqlashga muvaffaq bo'linadi, ya'ni DNK ning fizik xaritasini chizish mumkin bo'ladi, bunda har bir segmentning holati ko'rsatilishi mumkin. Murakkab genomlar yoki DNK ning katta molekulalari restriksiyalovchi endonukleazalar bilan ishlov berilganda fragmentlarning (tarkibiy qismlarning) murakkab jamlanmasini beradi va ularni tahlil qilish uchun maxsus kompyuter dasturlaridan foydalanishga to'g'ri keladi.

D. Metillash vositasida DNK ni himoyalash.

Bir xil kelib chiqishli metilazalar. Bakteriyalarning restriksiyalovchi endonukleazalarni kodlaydigan genomlari o'ziga xos maxsus modifikatsiya tizimlari (sistemalari) yordamida o'z-o'zidan degradatsiyalanishdan himoyalangan bo'ladi. Maxsus o'ziga xos modifikatsiyani amalga oshiruvchi metilazalar DNK molekulasidagi xuddi o'sha nukleores triksiyalarni taniydi, ma'lum bir endonukleazalarning ta'sir o'tkazishga bo'lgan qat'iy harakatlarini yuzaga chiqaradi. Masalan, umurtqalilar DNK sida ko'pincha 5'-meCG-3' dinukleotidlari uchraydi. Agar Hpa II endonukleazaning restriksiya sayti bunday metillangan nukleotidni o'z ichiga olgan bo'lsa, u holda ferment DNK ni bu joyda qirqa olmaydi. Ushbu faktdan murakkab genomlarda Hpa II restriksiya endonukleazasining tanib olish saytlarida joylashadigan 5'-CG-3' kabi dinukleotidlarning metillanish holatini aniqlash uchun foydalaniladi. Hpa II restriksiya endonukleazasining 5'-CmeCGG-3' dinukleotidini qirqa olmasligiga qaramasdan, uning izoshizomeri, Msp I restriksiyalovchi endonukleazasi bunday qirqishni amalga oshiradi. DNK fragmentlarining (tarkibiy qismlarining) ko'rsatib o'tilgan ikkita fermentga nisbatan sezuvchanligini solishtirish bilan xaritada metillangan sitoinning joylashgan o'rnini aniqlash mumkin. Xuddi shu

tarzda agar DNK molekulasini Bst NI va Eco RII izo-shizomerlari bilan qir qilganda hosil bo'ladigan mahsulotlar taqqoslansa, u holda o'simliklar DNK sida ko'p uchraydigan 5'-CmeCTAGG-3' ketma-ketligini 5'-CC-3' ko'rinishdagi metillashmagan ketma-ketlikdan farqlab olish mumkin.

E.coli mustaqil metilazalari. Eukariot DNK sining fragmentlarini (tarkibiy qismlarini) bakterial vektorlarga kiritilganda va ular E.coli yoki boshqa prokariot hujayralarida replikatsiya qilinganda, ular uchun xarakterli bo'lgan metillanish tipi yo'qoladi va ular yangi xo'jayin hujayraga xos bo'lgan usulda metillanadi. Masalan, E.coli hujayralarida 5'-CG-3' dinukleotidlari metillanmaydi va natijada Hpa II restriksiyalovchi endonukleaza ta'siridan ilgari himoyalangan saytlar ularga nisbatan sezuvchan bo'lib qoladi. Biroq E.coli ning ikkita odatdagi fermenti: 5'-GATC-3' ketma-ketligidagi A qoldig'ini metillaydigan dam DNK- metiltransferazasi va 5'-CC-3' ketma-ketligidagi C qoldig'ini metillaydigan dcm DNK-metiltransferazasi – yangi barqaror saytlarni hosil qiladi; bu metilazalardan hech biri restriksiya-modifikatsiya tizimining (sistemasining) qismi (bo'lagi) hisoblanmaydi. Bundan tashqari E.coli da replikatsiya qilingan eukariot DNK si ularning tanib olish saytlari doirasida 6-metiladenin borligi sababli Mbo I va Bcl I restriksiyalovchi endonukleazalariga nisbatan barqaror bo'lib qoladi. Shuni qayd qilib o'tish joizki, 5'-GATC-3' saytidagi xuddi o'sha 6-metiladenin Bam HI, Bgl I va Sau 3A restriksiyalovchi endonukleazalarining ishlashiga xalaqit bermaydi, biroq agar C qoldig'i metillangan bo'lsa, u holda Sau 3A restriksiyalovchi endonukleazasi yordamida qir qish yopilib qoladi.

FOSFATAZALAR.

Fosfatazalar – fosfor kislotasi monoefirlaridagi murakkabefirli bog'lanishlarni erkin ortofosfat hosil qilish bilan uzish reaksiyalarini katalizlaydigan fermentlardir. Fosfatazalar gidrolazalar sinfiga, fosfor monoefirlari gidrolazalari tagsinfiga tegishlidir. Fosfatazalar barcha o'simlik va hayvon organizmlarida mavjud bo'ladi va uglevodlar, nukleotidlar va fosfolipidlar almashinuvida, shuningdek suyak to'qimalarining hosil bo'lishida ishtirok etish bilan hujayralar metabolizmida muhim rol o'ynaydi. Ba'zi bir fosfatazalar qondagi faolligining o'zgarishi bir qator kasalliklarga tashxis qo'yishda muhim alomat bo'lib hisoblanadi.

Molekulyar mikrobiologiya

Fosfatazalarning ko'pchiligi keng substrat o'ziga xoslikka ega bo'lgan fermentlar qatoriga kiradi. Biroq ba'zi bir fosfatazalar qayta shakllanadigan substratlarning cheklangan doirasi bilan farqlanadi. Fosfatazalar ko'pgina to'qimalarda o'zlarining katalitik va fizik xususiyatlari bo'yicha bir-biridan farq qiladigan turli-tuman ko'rinishlarda taqdim qilingan. Turli xil biologik manbalardan olingan fosfotazalarda ham substrat o'ziga xoslik va katalitik faollik bo'yicha farqlar kuzatiladi. Ba'zi bir fosfatazalarda boshqa guruh fermentlari bilan o'xshashlik aniqlangan. Fosfatazalar orasida ikkita guruh fermentlari – ishqorli va nordon fosfatazalar ko'proq o'rganilgan va keng tarqalgan. Keng substrat o'ziga xoslikka ega bo'lish bilan bu fermentlar bir-biridan o'z xususiyatlari bilan o'zlari ajralib chiqqan manbalarga bog'liq ravishda sezilarli darajada farq qiladi.

Ishqorli fosfatazalar pH 8,4 -9,4 bo'lganda maksimal (eng yuqori) faollikni namoyon qiladi. Ishqorli fosfatazalar odam va hayvonlar organizmining ko'pchilik to'qimalari va suyuqliklari tarkibida, shuningdek o'simliklar va mikroorganizmlarda mavjud. Odam organizmida bu fermentning ayniqsa yuqori faolligi ingichka ichak epiteliysida, buyraklarda, suyaklarda, jigarda, leykotsitlarda kuzatiladi. Qotgan tog'aylar ishqorli fosfatazalarning keng foydalaniladigan manbasi hisoblanadi, bu esa suyaklar to'qimalarining kalsiylashuvida ushbu fermentning muhim o'rin tutishidan darak beradi. Faol ishqorli fosfatazaning bo'lishi oziqlanish mahsulotlarini tashuvchi to'qimalar uchun xarakterlidir, u ko'pincha ravojlanayotgan to'qimalar va sekretor organlarida uchraydi. Bu ferment amalda muskul to'qimalarida, yetilgan biriktiruvchi to'qimalarda va eritrotsitlarda uchramaydi, qon tomirlari devorlari va gialin tog'ayi bu fermentga nisbatan kambag'al bo'lib hisoblanadi.

Hatto bitta morfologik paydo bo'lishning o'zida ham ferment faolligining taqsimlanishi gomogen emas. Masalan ichakning turli qismlarida fosfataza faolligi har xil, buyrak qobig'i moddasida miya qobig'iga nisbatan olib qaraganda uning faolligi anchagina yuqori ekanligi kuzatiladi. Ishqorli fosfatazaning faolligiga gormonal faktorlar (omillar) ta'sir ko'rsatadi: qonda ushbu fermentning faolligi gipofizektomiya, kastratsiyadan keyin, shuningdek kortikosteroid gormonlari preparatlari qo'llanilgandan keyin pasayadi. Tiroksin kiritilishi bilan fermentning faolligi kuchayadi. Odamda stress holatni

yuzaga keltiruvchi faktorlar (omillar) leykotsitlarda ishqorli fosfatazaning faolligini kuchaytiradi.

Ishqorli fosfatazaning qondagi faolligi ma'lum bir darajada jinsga va yoshga bog'liq bo'ladi. Eraklarda qondagi ferment faolligi ayollardagiga nisbatan 20-30 % yuqori bo'ladi, biroq ayollarda homiladorlik paytida ushbu fosfatazaning qondagi faollik darajasi sezilarli darajada (2-3 marta) ortishi kuzatiladi, bunday holat embrionning rivojlanishi, ayniqsa homiladagi osteogenez jarayoni bilan izohlanadi.

Ishqorli fosfatazaning qondagi faolligini aniqlash jigar va suyak tizimi kasalliklariga tashxis qo'yishda muhim o'rin tutadi. Masalan, jigarning surunkali kasalliklarida, sarkoidoz, sil, amaloizoz va limfagranulematozda giperfosfatazemiya qayd qilinadi. Raxitda ishqorli fosfataza faolligining ortishi (ba'zan 2-4 martagacha) 65 % holatlarda qayd qilingan. Pedjet kasalligi, shuningdek osteogen sarkoma, fosfat-qand kasalligida qon zardobida ishqorli fosfataza faolligi darajasining sezilarli darajada ortishi kuzatiladi.

Ishqorli fosfatazaning qondagi genetik jihatdan shartlangan past darajasi (gipofosfataziya) suyaklar hosil bo'lishi jarayonining buzilishi oqibatida skelet anomaliyalarida (g'ayri tabiiyliklarida) kuzatiladigan og'ir nasldan naslga o'tuvchi kasalliklarning bosh sababi bo'lib hisoblanadi, fermentdagi nuqson autosoma-retsessiv tipi bo'yicha nasldan-naslga uzatiladi.

Nordon fosfataza ham tabiatda juda keng tarqalgan. Odam organizmida nordon fosfataza faolligi qalqonsimon bezda ayniqsa yuqori. Qalqonsimon bez to'qimalari ekstrakti (suyuq aralashmasi) zaif-nordon muhitda jigar va buyrak ekstraktlariga nisbatan qariyb 1000 marta yuqori bo'lgan fosfat faolligini namoyon qiladi. Gistokimyoviy tadqiqotlar shuni ko'rsatadiki, ushbu ferment asosan qalqonsimon bezning epiteliy to'qimalarida saqlanadi, bu fermentning katta miqdori sperma hujayralarida ham topilgan. Qalqonsimon bezda nordon fosfatazaning sintezlanish jarayoni bilan jinsiy gormonlar tarkibi o'zaro chambarchas bog'liq. Siydikda androgenlar kontsentratsiyasi miqdorining past bo'lishi fosfatazaning spermadagi past faollik darajasini belgilab beradi. Kriptorxizmada va gipogonadizmada ham xuddi shunday holat kuzatiladi.

Nordon fosfataza uchun eng maqbul pH qiymati qiymatlarning 4,7-6,0 oralig'ida joylashadi, biroq o't pufagidan olingan nordon

Molekulyar mikrobiologiya

fosfatazaning maksimal (eng yuqori) faolligi pH ning 3,0-4,8 qiymatlari oralig'ida kuzatiladi.

Nordon fosfatazalarda turli xil manbalardan olingan fermentlarning molekulyar og'irligi bir-biridan farq qiladi. Masalan odam organizmi qalqonsimon bezidan olingan nordon fosfatazaning bir-biridan immunologik farq qiladigan ikkita molekulyar izofermentlari 47000 va 84000 molekulyar og'irlikka ega bo'ladi.

Qon zardobidagi nordon fosfataza faolligini aniqlash qalqonsimon bez saratoni kasalligiga tashxis qo'yishda muhim test bo'lib xizmat qiladi. Metastazalarsiz qalqonsimon bez saratoni kasaliga chalingan bemorlarda nordon fosfatazaning qondagi faolligi ortishi taxminan 25% holatlarda aniqlangan, boshqa organlarda metastaza o'smalari bilan qalqonsimon bez saratoni kasalligiga chalingan bemorlarda esa nordon fosfatazaning qondagi faolligi ortishi 80-90% holatlarda aniqlangan. Qalqonsimon bez saratoni kasalligida ushbu fermentning qondagi faolligi ko'rsatkichlarining dinamikasi kasallikni davolashda zarur bo'ladigan mezonlarni belgilab berishi mumkin.

Nordon fosfataza mavjudligini aniqlash sudmedekspertiza amaliyotida ham katta ahamiyat kasb etadi. Fermentning spermadagi yuqori faolligi ashyoviy dalillarni ekspertizadan o'tkazishda shubhali dog'larni yuqori aniqlikda aniqlab olish imkonini beradi.

TELOMERAZALAR.

Telomeraza – eukariotlar hujayralari xromosomalarining tugallanish qismlarida joylashgan telomer uchastkalaridagi DNK zanjirining 3'- uchiga maxsus takrorlanuvchi DNK ketma-ketliklarini (umurtqalilarda TTAGGG) qo'shadigan fermentdir. Telomerlar zichlangan DNK larni o'z ichiga oladi va xromosomalarni turg'unlashtiradi. Hujayraning har bir bo'linishida telomer uchastkalari qisqaradi.

Telomerlar qisqarishining o'rnini to'ldiruvchi mexanizmning (telomerazaning) mavjudligi A.M. Olovnikov tomonidan 1973 yilda taxmin qilingan.

Telomeraza teskari transkriptaza hisoblanadi, bunda u bilan telomerni uzaytirish paytida teskari transkripsiyani hosil qilish uchun matritsa sifatida foydalaniladigan RNK ning maxsus molekulasi bog'langan bo'ladi.

Telomeraza 1984 yilda Kerol Greyder tomonidan aniqlangan. Telomer va telomeraza yordamida xromosomalarni tugallanish qismlaridagi replikatsiya tanqisligidan himoyalash mexanizmlarini kashf qilganlari uchun AQSh da ishlaydigan avstraliyalik Elizabet Blekbern, amerikalik Kerol Greyder va uning vatandoshi Jek Shostakka 2009 yilda fiziologiya va tibbiyot sohasi bo'yicha Nobel mukofoti berilgan.

Umumiy ma'lumotlar.

Telomeraza faoliyati natijasida hujayralar xromosomalarining telomer uchastkalarining uzunligi ortadi yoki doimiy darajada saqlanib turadi, shu tariqa hujayra xromosomalarining tugallanish qismlaridagi replikatsiya tanqisligining o'rni to'ldiriladi va hujayralar cheklanmagan muddat davomida bo'linish imkoniga ega bo'ladi. Bu fermentni tadqiq qilish davomida (quyida tasvirlab berilishicha RNK tarkibiy qismidan va oqsil tarkibiy qismidan tarkib topgan) ma'lum bo'lishicha, RNK tarkibiy qismi amalda barcha hujayralarda doimiy darajada ekspresslanadi. Telomeraza faolligini induksiyalash uchun oqsil tarkibiy qismining ekspressiyasi zarur bo'ladi, shu sababli oqsil tarkibiy qismi telomerazaning katalitik tarkibiy qismi deb yuritiladi. Telomeraza katalitik tarkibiy qismi genining sun'iy ravishda induksiyalangan ekspressiyasi (gen muhandisligi usuli yordamida genni kiritish yo'li bilan) hujayrani immortal (o'lmas), ya'ni cheksiz uzoq muddat bo'linadigan qilib qo'yadi, shu tariqa hujayra uchun Xeyflik chegarasi bekor qilinadi. Telomeraza organizmning ma'lum bir to'qimalari (masalan, ichak epiteliysi hujayralari) faoliyat ko'rsatishi uchun bo'linishi zarur bo'lgan tana, jinsiy va boshqa bir qator tipdagi hujayralarda ekspresslanadi. Organizmning odatdagi somatik hujayralari telomeraza faolligiga ega bo'lmaydi. 85% saraton o'smalari hujayralari telomeraza faolligiga ega bo'ladi va shu sababli telomerazaning faollashuvi hujayraning xavfli qayta tug'ilishiga sabab bo'ladi deb hisoblanadi.

DNK-polimerazalar DNK ning qizlik zanjirini sintez qilish bilan ota-onalik zanjirini uning 3'-tugallanishidan 5'- tugallanishi yo'nalishida o'qib olishlari bizga ma'lum. Shunga muvofiq ravishda qizlik zanjiri 5'-3' yo'nalishida sintezlanadi. Qarama-qarshi yo'nalishdagi DNK zanjirining sintezi fermentni katalizatsiya qila olmaydi. Bundan tashqari DNK-polimeraza sintezni faqatgina maxsus RNK-praymerdan – DNK ga hamroh bo'lgan qisqa RNK dan

Molekulyar mikrobiologiya

boshlaydi. DNK sintezi tugagandan so'ng RNK-praymerlar chiqib ketadi, DNK qizlik zanjirlaridan biridagi bo'shliq esa DNK-polimeraza bilan to'ldiriladi. Biroq DNK 3'- tugallanishidagi bunday bo'shliq to'ldirilgan bo'lishi mumkin emas va shu sababli DNK ning 3'-tugallanish uchastkalari bir tortishli bo'lib qoladi, ularning 5'-tugallanish uchastkalarida esa – replikatsiya yetishmaydigan bo'lib qoladi. Bundan yaqqol ko'rinib turibdiki xromosomalar replikatsiyasining har bir raundi ularning kaltarishiga olib keladi. Bunda avvalambor telomer DNK sining uzunligi qisqarishi o'z-o'zidan ma'lum “DNK tugallanish qismidagi replikatsiya tanqisligi” muammosiga birinchi bo'lib A.M. Olovnikov 1971 yilda e'tibor qaratgan. U replikatsiya yetishmasligi oqibatida xromosomalarning tugallanish qismidagi DNK ketma-ketliklarini yo'qotish – hujayraning qarishiga olib keladi degan farazni ilgari surgan, Boshqacha qilib aytganda, taxmin qilinishicha telomerning kaltarishi “o'lim” hujayrasining replikativ potensialini belgilab beruvchi soat mexanizmining o'zidir, telomer uzunligi xavfli darajada kalta bo'lib qolganda bu mexanizm hujayralarning keyingi bo'linishining oldini oladi. A.M. Olovnikovning taxminiga ko'ra “qarimaydigan” hujayralarda (ularga saraton o'smasi hujayralaridan tashqari homila, o'zak va boshqa generativ hujayralar ham kiradi) DNK telomerining uzunligini qo'llab quvvatlab va nazorat qilib turadigan maxsus fermentativ tizim mavjud bo'lishi kerak.

A.M. Olovnikovning farazi keyingi yillarda o'zining ishonchli tasdig'ini topdi. Birinchidan, shu narsa aniqlandiki, normal (ya'ni qarishga mahkum bo'lgan) hujayralar har bir hujayra bo'linishida haqiqatan ham 50-60 ta nukleotid zvenolariga kaltaradi. Ikkinchidan 1984 yilda E. Blekbern va E. Grayder DNK replikatsiyasining asosida yotuvchi mexanizmdan farq qiladigan boshqa mexanizm yordamida telomer DNK sini sintezlaydigan fermentni ajratib oldilar. Bu ferment telomeraza deb ataldi.

TELOMERAZA QANDAY ISHLAYDI?

Shunday qilib telomerazaning asosiy vazifasi – DNK ning tandemli (juft ravishda) takrorlanuvchi segmentlarini sintezlashdan iborat, ulardan DNK telomerining G-zanjiri tarkib topadi. Shu tariqa u DNK-polimerazalar sinfiga tegishli bo'ladi, telomeraza – bu RNK bog'liqlik – DNK polimeraza yoki teskari transkripsiyadir. RNK-

matritsada DNK ni sintezlovchi bu sinfga tegishli bo'lgan fermentlar molekulyar biologlarga xuda yaxshi ma'lum. Ular kodlashtirilgan va retroviruslarda (masalan, odamda OITS ni chaqiruvchi immun tanqisligi virusida) saqlanadi va ular genomlarining DNK-nusxalarini sintez qilish uchun xizmat qiladi. Hujayra genomida teskari transkriptazalar retrotransliozonalarda kodlashtirilgan bo'ladi.

Telomer DNK sini sintez qilish uchun telomeraza tomonidan matritsa sifatida foydalaniladigan RNK shu ferment tarkibiga kiradi. Telomerazaning tengsizligi aynan shundadir: bugungi kunda bu teskari transkriptazani o'z ichiga olgan yagona ma'lum bo'lgan RNK dir. Telomeraza RNK lari turli xil organizmlarda uzunligi va tuzilishi bo'yicha bir-biridan katta farq qiladi. Sodda jonivorlarning telomerlari uzunligi 150-200 nukleotid qoldiqlari (n.o.) dan iborat bo'lgan RNK ni o'z ichiga oladi, odam telomer RNK sining uzunligi – 450 n.o., shu bilan bir paytning o'zida achitqilar telomerazasi g'ayri-tabiiy uzunlikdagi RNK ni (1300 n.o. atrofida) o'z ichiga oladi. Hujayraning boshqa har qanday RNK lari kabi telomeraza RNK si o'ziga xos ikkilamchi va uchlamchi tuzilishga ega. Telomeraza RNK si bilan izolyatsiyalangan ikkilamchi tuzilma faqatgina sodda jonivorlar uchun ishonchli ravishda aniqlangan. Telomeraza RNK sining fermentativ majmua tarkibidagi makonda yoyilgan tuzilmasi hozircha noma'lum.

Telomeraza RNK sida matritsa uchastkasi faqatgina bir marta taqdim qilingan. Uning uzunligi telomer DNK sidagi ikki marta takrorlanish uzunligidan oshmaydi. U ularni kodlashtiradi va tabiiyki ularga doimiy ravishda hamrohlik qiladi.

Telomeraza o'z RNK sining faqat bitta segmentidan foydalangan xolda ko'p marta takrorlanuvchi DNK segmentlarini sintez qilishi sababli u davriy ravishda (har bir takrorlanish yakunlangandan keyin) matritsa uchastkasini sintez qilinayotgan telomeraza DNK sining 3'-uchastkasiga ko'chirish (translyatsiya qilish-uzatish) qobiliyatiga ega bo'lishi kerak. Bunday ko'chish uchun energiya manbai bo'lib, aftidan telomer DNK si zanjiri sintezi reaksiyasining o'zi xizmat qiladi, chunki bu reaksiyaning substratlari – dezoksinukleozidtrifosfatlar – yuqori energiyali modda hisoblanadi.

Quyida telomeraza tomonidan katalizatsiyalashtiriladigan telomer takrorlanishlari sintezi mexanizmining umum tomonidan qabul qilingan sxemasi tasvirlangan. Birinchi bosqichda telomeraza telomer DNK sining 3'-tugallanish qismini topadi, telomer DNK sining bu

Molekulyar mikrobiologiya

tugallanish qismi bilan telomeraza RNK si matritsa uchastkasining bir qismi hamrohlik majmuasini hosil qiladi. Keyin esa telomerazaning RNK bog'liqlik-DNK polimeraza faolligiga navbat keladi. Bu jarayonning amalga oshishi telomerezaning maxsus subbirligi tomonidan ta'minlanadi, bu subbirlilik o'zining katalitik markazi tuzilishi bo'yicha ko'p jihatdan retroviruslar va retrotransliozonalarining teskari transkripsiyasiga o'xshaydi. DNK-takrorlanish sintezi tugagandan so'ng translokatsiya, ya'ni matritsa va ferment oqsillari subbirliliklarining telomer DNK sining yangidan sintezlanadigan qismlariga ko'chishi sodir bo'ladi va butun sikl yangidan takrorlanadi.

Telomeraza reaksiyasi mexanizmining tasvirlanishi bilan hatto yuzaki tanishib chiqish ham shunday xulosaga olib keladiki, telomeraza reaksiyasining amalga oshishi uchun ikkita tarkibiy qism – teskari transkriptaza va RNK telomerazasi yetarli bo'lmaydi. Uning tarkibida xromosomaning 3'-tugallanish qismini qidirib topish va bog'lanish (va shu tariqa o'ziga xos yakor vazifasini bajarish) uchun javobgar bo'lgan subbirlilik, translokatsiya uchun javobgar bo'lgan subbirlilik, reaksiya mahsulini (bir tortishli DNK ni) bog'lovchi subbirliliklar bo'lishi zarurligiga shak-shubha yo'q. Telomeraza tarkibida odatda nukleoz faollikka ega bo'lgan oqsilli subbirlilik topiladi, bu subbirlilik aftidan telomer DNK ning 3'-tugallanish qismidan toki bu tugallanish qismida RNK telomerazasi matritsa segmentining kerakli uchastkasiga hamrohlik qiluvchi ketma-ketlik paydo bo'lguncha bir nechta nukleotidlarni birin-ketin uzib oladi. Yana bir marta shuni ta'kidlab o'tish lozimki, fermentning to'liq oqsil tarkibi shu paytgacha birorta holatda ham ma'lum bo'lmagan.

Biz zamonaviy organizmlarda kuzatadigan telomer DNK si sintezining mexanizmi juda qadimda paydo bo'lgan. Boz ustiga genlar nukleotid ketma ketligini, telomeraza katalitik subbirliliklarini va boshqa teskari transkriptazalarni evolyutsion-genetik qiyosiy tahlil qilish shuni ko'rsatadiki, bu mexanizm birinchi eukariot hujayralarining paydo bo'lishidan oldin ham amal qilgan bo'lishi mumkin.

Nazorat savollari

- 1.Gen muhandisligida qanday fermentlar ishlatiladi?
- 2.Polimeraza fermentlari haqida ma'lumot bering.
- 3.Telomeraza fermentini ishlash mexanizmi qanday?

4.Qanday tipdagi restriksion endonukleazalar bor?

5.Ligazalar va teskari transkriptazalar vazifalari nimalardan iborat?

Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati.

1. Й.Х. Тўрақулов. Биохимия. Тошкент. “Ўзбекистон”. 1996 йил
2. А. Қосимов, Қ. Қўчқоров, С. Тешабоев. Биохимия. Тошкент. “Ўқитувчи”. 1988 йил.
3. А. Имомалиев, А. Зикрийев. Ўсимликлар биохимияси. Тошкент. “Меҳнат”. 1987 йил.
4. Ю.В. Филиппович. Биохимия асослари. Москва. “Высшая школа” 1985.
5. И.К. Проскурина. Биохимия. Москва. “VLADOS PRECC”. 2001 йил.
6. В.П. Конов, В.Н. Шведова. Биохимия. Москва. “DROFA”. 2004 йил.
7. А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. Молекуляр биология. Москва. “ASADEMA”. 2003 йил.
8. www.biotexnolog.ru.
9. www.fesmu.ru.
10. www.orldofscience.ru.
11. www.Academic.ru.
12. www/himbio.ru.
13. www.inbi.ras.ru.
14. www.wikipedia.ru.

9-MAVZU. POLIMERAZA ZANJIRLI REAKSIYASI

Reja:

1. PZR yaratilish tarixi va ahamiyati
2. PZR bosqichlari
- 3.PZRda ishtirok etadigan asbob-uskunalar tavsifi

Tayanch so‘z va iboralar: PZR yaratilish tarixi va ahamiyati, PZR turlari (oddiy PZR, RT-PCR, real vaqtdagi PZR), haroratni gradatsiya qilish PZR.

Tarixi:

-Praymerlar yordamida sun'iy DNK sintezi 1971 yilda tasvirlangan.

-1983 yilda Kari Mullis polimeraza zanjiri reaksiyasi (1993 kimyo bo'yicha Nobel mukofoti olgan) deb ataladigan sintezlangan DNK fragmentining amplifikatsiyasini ta'minlovchi usulni taklif qildi.

-Reaksiya prinsipi 1985 yilda nashr etilgan

PZRning asosiy afzalliklari

- Yuqori sezuvchanlik
- Yuqori spetsifiklik
- Bajarish texnikasini osonligi
- Olingan matritsani DNKni ajratish yoki kompleks tozalashga hojat yo'q.

• Deyarli har qanday biologik material bilan ishlash imkoniyatini beradi.

Polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) usuli ajratib olingan gen yoki DNK qismlarini maxsus praymerlar yordamida ko'paytirish uchun amalga oshiriladi. Polimeraza zanjir reaksiyasi qurilmasi termotsikler, PZR mashinasi yoki DNK amplifikatori ham deb ataladi. PZR - molekulyar-biologiyaning sezgirliги yuqori bo'lgan eksperimental usullaridan bo'lib, u biologik namunalardagi nuklein kislotalarning ma'lum bir fragmentlarini bir necha barobar miqdorda ko'paytirish (klonlash) usuli hisoblanadi. DNK matritsa - analiz qilinayotgan DNK bo'lagi. Optimal matritsa bo'lib, muzlatilmagan faqat 1 oy +40 °C da saqlangan matritsa hisoblanadi. DNK molekulasi parchalanib ketmasligi uchun bir necha marta muzlatib va yana qaytib eritish mumkin emas.

Polimeraza zanjir reaksiyasining boshqa usullardan afzalligi:

- Universalligi: PZR yordamida har qanday biologik na'munadan DNK ni aniqlash mumkin;
- Maksimal darajadagi sezgirlikka erishish imkonini beruvchi to'g'ri usul;
- Usulning o'ziga xosligi (spetsifikligi) 100% ga yaqin;
- Har qanday materialni PZR - analiz qilish imkoni mavjud;
- Bu usul yordamida na'munadagi DNK nusxalar sonini nazorat qilish va dinamikani kuzatish mumkin;
- Usulni bajarish oddiy va to'liq avtomatik tizimlashtirish mumkin;
- Natijalar bir necha soatlardan keyin olinadi, ya'ni bir ish kunida.

Mana shu bosqichlarning har biri 25-40 marotaba takrorlanib, PZR siklini hosil qiladi. Birinchi va qisman ikkinchi sikllarda nusxalar (amplikonlar) hosil bo‘ladi, ular amplifikatsiyalanayotgan genga mos tushmasligi mumkin, sababi zanjir uzunligini chegaralaydigan ikkinchi praymerning hali joylashib olmaganligi tufayli. Uchinchi sikldan boshlab amplikonlar uzunligi standart bo‘ladi. Bu jarayon zanjirli harakterga ega, yani sintezlangan amplikonlar kelgusida matritsa vazifasini bajaradi. Geometrik progressiya usulida amplikonlar yig‘ilib boradi. Uni quyidagi formula yordamida aniqlash mumkin: $R=2^n$, bu yerda R - hosil bo‘lgan spetsifik mahsulot miqdori, n - reaksiyadagi sikllar soni.

Praymer tanlashda praymer DNK - matritsaga komplementar bo‘lishi kerak. Buning uchun DNK nukleotidlar ketma-ketligini bilish talab etiladi. Buni bilish uchun esa xalqaro genbankka murojaat qilinadi, yani www.ncbi.nlm.nih.gov saytidan kerakli DNK ning nukleotidlar ketma-ketligi aniqlab olinadi. PZR qilinayotgan fragment uzunligi 100-3000 j.n. gacha oraliqda bo‘lishi lozim. Nukleotidlar ketma-ketligi aniqlangach shunga ko‘ra praymer “dizayn” (tuzish ishlari) qilinadi.

PZR ni bajarish asosan 3 ta bosqichda amalga oshiriladi:

1. Denaturatsiya (parchalash-ajratish);
2. Praymerlar ulanishi (otjig);
3. Elongatsiya (Uzaytirish)

1. Denaturatsiya (parchalash-ajratish) - qo‘sh spiralning bir-biridan ajralishi va polinukleotid zanjirning hosil bo‘lishidir. Bunda reaksiyon aralashma 9’-980S gacha qizdiriladi, natijada qo‘sh zanjirli DNK molekulasi ikkiga ajralib ikkita bir-biriga komplementar zanjirli molekula hosil bo‘ladi. Genom yoki plazmid DNK denaturatsiyasi 2-3 daqiqa ichida amalga oshirilishi tavsiya etiladi.

2. Praymerlar ulanishi (otjig) - praymer va bir zanjirli DNK - nishonning kompleks hosil bo‘lishi (gibridizatsiyasi). DNK sintezi uchun monomer bo‘lib dezoksiribonukleotidtrifosfat zarur bo‘ladi. Ulanishning optimal harorati ‘0-720S oralig‘ida bo‘lishi kerak. Ba’zi hollarda ulanish haroratini odatdagidan 3-50S ga ko‘tarish reaksiya spetsifikligini oshirishi mumkin. Praymerlar ulanish xaroratini past darajaga tushirilsa PZR mahsulotining spetsifiklik miqdori kamayishi mumkin.

3. Elongatsiya (polimerizatsiya yoki uzaytirish) - DNK-matritsa sintezi hisoblanadi, yani DNK-matritsaga kelib o'tirgan praymerning 3'-OX uchidan boshlab 3'-5' yo'nalishi bo'yicha DNK polimeraza fermenti yordamida DNK ga komplementar zanjirningxosil bo'lishidir. Elongatsiya ko'p hollarda 720S haroratda olib boriladi. Elongatsiya vaqti DNK-matritsa uzunligiga bog'liq (1 daqiqada 1-1.5 ming j.n.). PZR mahsuloti unumli chiqishi uchun PZR ning oxirgi siklida (Final) elongatsiya bilan tugatish tavsiya etiladi (3-jadval).

3-jadval.

PZR sini amalga oshirish uchun quyidagi tarkibiy qismlar ishlatiladi:

Tarkibiy qismlar	Miqdori, μL , 1 reaksiya uchun (50mkl)
DNK matritsa	1
Praymerlar: Forward	3
Praymerlar: Reverse	3
DNK polimeraza (Taq polimeraza-5U)	1
10 mM Dezoksribonukleozidtrifosfatlar (dATP, dGDP, dCTP, dTTP)	3
10 x PCR Buffer	5
steril H ₂ O	33
BSA	1



1- rasm. Bio-Rad kompaniyasining T100 Thermal Cycler PZR amplifikatori.

PZR Master Mix - bu PZR tahlilini o'tkazish uchun zarur bo'lgan tarkibiy qismlarning ko'p qismini o'z ichiga olgan oldindan tayyorlangan eritma. Aralash tarkibida Taq DNK polimeraza, dNTPs, MgCl₂, shuningdek, PZR yordamida DNK ni kuchaytirish uchun optimallashtirilgan buferdagi kuchaytirgichlar va CTABilizatorlar mavjud. PZR Master Mix -dan foydalanishning afzalliklari uning qulayligi va vaqtning kam talab qilinishidir. Komponentlarning aksariyati allaqachon qo'shilgan va formulasi allaqachon optimallashtirilgan, shuning uchun tahlilga tayyorgarlik vaqtini sezilarli darajada qisqartiradi. Asosiy PZR aralashmalaridan foydalanish, hatto yuqori hajmli tahlil muhitida ham yuqori darajadagi samaradorlikni ta'minlaydi va kamroq pipetka bosqichlari, shuningdek, ifloslanish uchun imkoniyatlarning kamligini anglatadi. PZR master aralashmasidan foydalanish, shuningdek, komponentlarni qo'shilishida tasodifan esdan chiqarib yuborish kabi xatolik ehtimolini kamaytiradi (4-jadval).

PZR Master Mix komponentlari

Ferment

Bufer (lar)

Kofaktor – Magniy xlorid (MgCl₂), eng keng tarqalgan. Bazida MgSO₄ malum fermentlar bilan ishlatiladi.

dNTP

Praymerlar

DNK namunasi (agar barcha namunalar bir xil bo'lsa)

Nukleaza yoki PZR darajasidagi suv.

4-jadval.

Hajmi	Tarkibi	So'ngi konsentratsiyasi
5 µL	10X PCR Buffer	1X
1 µL	dNTPs (10 mM)	200 µM
1 - 2 µL	Forward primer	50 - 100 pmol
1 - 2 µL	Reverse primer	50 - 100 pmol

Molekulyar mikrobiologiya

0.5 - 1 μ L	Taq DNA polymerase (5U/ μ L)	2.5 - 5 U
1 - 5 μ L	Template DNA	1 - 200 ng
1 μ L	MgCl ₂ (50 mM)	1 mM
O'zgaruvchan	Suv	Add to q.s. to 50 μ L
50 μ L	Jami hajmi	

Umumiy PZR Master Mix tayyorlanishi:

Nazorat savollari

1. PZR haqida tushuncha bering.
2. PZRning afzalliklari haqida ma'lumot bering.
3. PZR qanday bosqichlardan iborat?
4. Qanday PZR turlarini bilasiz?
5. Qaysi PZR turi samaraliroq?

10-MAVZU. GEN TUSHUNCHASI. GENNING TARKIBI VA EKSPRESSIYASI.

Reja:

1. Gen haqida umumiy tushuncha
2. Genning tarkibiy qismlari
3. Agrobacteria misolida gen ekspressiyasi.

Tayanch so'z va iboralar: Gen tarkibidagi promotor, operator, operon qismlar, gen initsiatsiyasi, stop kodon, ekzon va intron tarkibi, Agrobacteria misolida gen ekspressiyasi.

Gen deyilganda, DNK, viruslaridagi RNKlarning bir molekula oqsilni kodlovchi muayyan qismi hisoblanadi. Mazkur murakkab jarayonda i-RNK, t-RNK va r-RNKlarning tarkibiy bo'laklari ham gen vazifasini o'taydilar. Prokariot va eukariot organizmlardagi genlarning tuzilishi va tarkibida umumiy o'xshashliklar bo'lsa ham, lekin jiddiy farqlar borligi aniqlangan. RNK molekulasiining alternativ splaysing hodisasi aniqlangandan so'ng, gen tushunchasi yanada keng ma'noga ega bo'ldi. Ayrim mualliflar gen deyilganda, uning strukturali tuzilishi, boshqalar esa genlarning organizmdagi funksiyasi, yana bir xil ilmiy

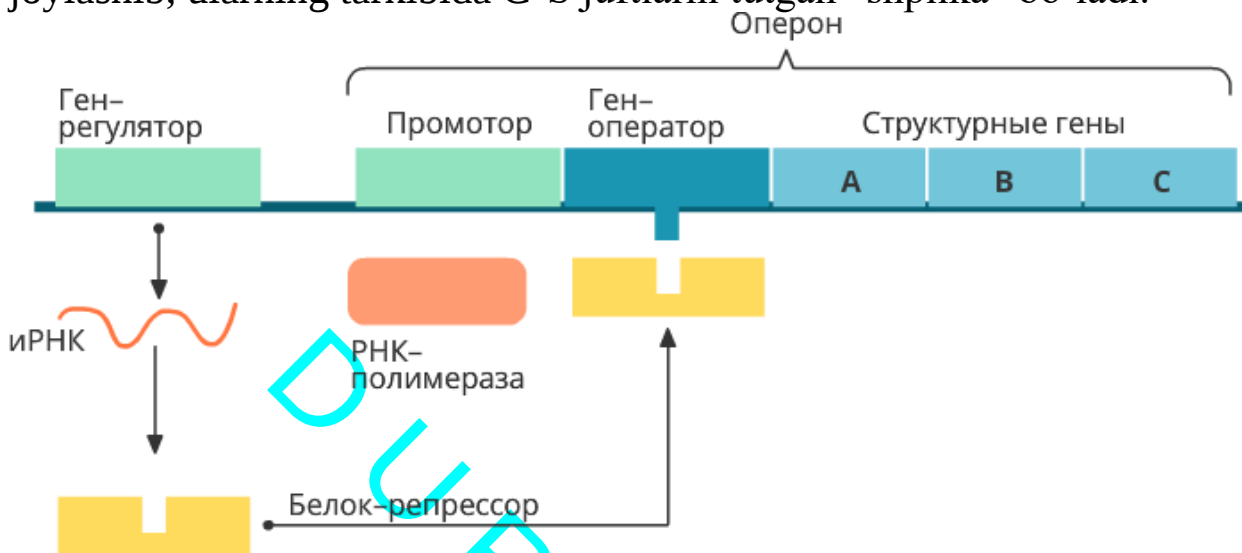
xodimlar transkripsiyaning bir qismi, so'nggi paytda esa olimlarning ayrimlari gen deyilganda transkripsiya jarayonida bitta gendan bir nechta variant i-RNKlarning sintezlanish tizimini qabul qilishni tavsiya qilmoqdalar. Ushbu jarayonda genomning bir joyidan transkripsiyaning har xil variantda boshlanishi, alternativ splaysing va bitta gendagi bir nechta promotorlar birqancha funktsiyali i-RNKlarning sintezlanadi. Shunday qilib, gen tushunchasi hozirgi kunda aniq ta'rifga ega emas. Lekin shunday gen haqidagi har xil tushunchalardan qat'iy nazar, genom deyilganda, hujayraning genetik moddiy asoslari xromosomalaridagi DNKda, yadroda, mitoxondriyalarda, xloroplastlarda, bakteriyalarda va viruslarda ham mavjudligi tushuniladi. Organizm hujayralaridagi barcha genlarning yig'indisi genom deb ataladi.

PROKARIOT GENLARNING STRUKTURASI

Prokariot organizmlar tarkibidagi nukleotidlarda ikki-uch ming bir-birini qoplamaydigan genlar tutishi aniqlangan. Hozirgi zamon fanlarining ma'lumotlariga asosan prokariotli genlar quyidagi elementlardan tashkil topgan: 1. *E.coli* bakteriyasi ikki qismdan iborat. Birinchi kodlovchi elementlari yoki uning transkripsiya birligi bo'lib, tarkibida ketma-ket joylashgan polipeptid t-RNK va r-RNKlar kodlovchi bo'limlar joylashgan. 2. Bakteriya genining ikkinchi elementi regulyatorlik qismi bo'lib, genlardagi irsiy axborotlarni birlamchi uzatilishida ishtirok etadi. Genlarning strukturali qismida intronli bo'limlar kam bo'lib, ularning asosiy qismini ekzonli-ma'noli elementlardan tashkil topgan. Prokariotli genlarning 5'-tomonidagi regulyatorli qismi o'ziga xos strukturaga ega bo'lib, transkripsiyaning initsiatsiyasini boshlang'ich nuqtasidan 50-70 juft nukleotidli masofada promotor deb atalgan gen joylashgan. Mazkur qism genlarning transkripsiyasida ishtirok etib, aynan shu bo'lim RNK sifatida transkripsiyaga uchramaydi, genlarning 3'- tomoni esa terminator qismi bo'lib, transkripsiyani to'xtatilishida ishtirok etadi. Bu bo'lim ham transkripsiyada RNKga aylanmay turg'un holatda bo'ladi. Genlarning transkripsiyasi startli nuqtadan (+3) boshlanadi. Promotorli genlarning tarkibida ikkita ketma-ket joylashgan konservativ (turg'un) qismlar mavjud bo'lib, birinchisi olti-etti juftli asoslardan iborat. Mazkur qism start nuqtadan taxminan o'n azot asosli masofada joylashgan bo'lib, – 10 deb belgilanadi. Bu bo'limni birinchi bo'lib aniqlagan Pribanov degan olim aniqlagani uchun uni Pribanov boksi deb ham ataladi.

Molekulyar mikrobiologiya

Promotordagi ikkinchi qism masofasi to‘qqizta nukleotid qatoridan iborat bo‘lib, initsiatsiya saytidan keyin joylashgan. Pribanov boksida RNK-polimeraza zanjirni muayyan o‘z joyidan spiral holatiga keltirib, RNK sintezini initsiatsiyasi uchun sharoit yaratadi. Gennning 3’-tomonida transkripsiyani nihoyasiga yetkazadigan terminator joylashib, ularning tarkibida G-S juftlarni tutgan “shpilka” bo‘ladi.



1-rasm. Prokariot organizmlar geni tuzilishi

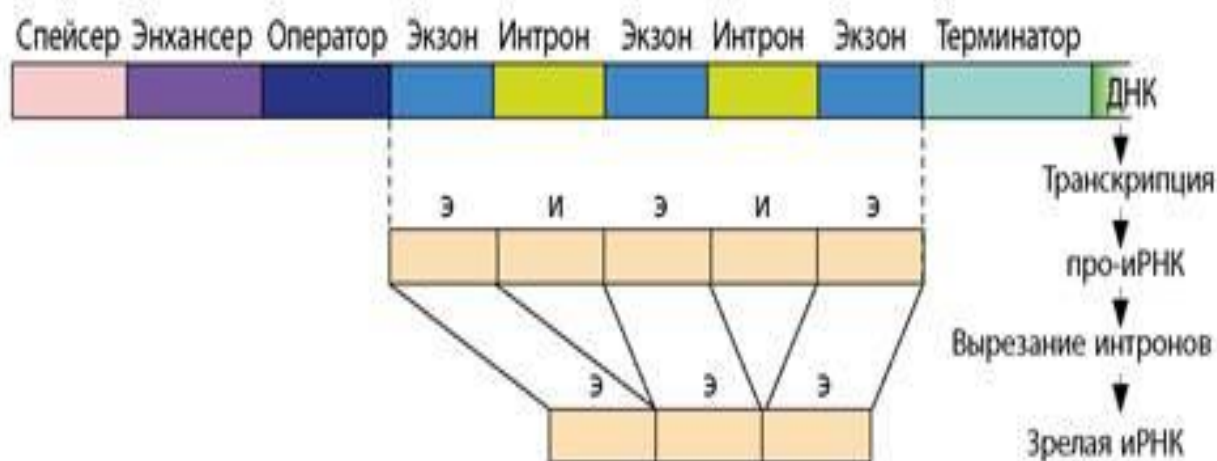
Demak, “shpilka”ni hosil bo‘lishi bilan transkripsiya to‘xtaydi. Prokariotlarda bitta molekula oqsilni sintezlovchi monosistronli genlar aniqlangan. Siston deyilganda, bir molekula oqsilni kodlaydigan DNKning muayyan qismi tushuniladi. Bunday genlarda regulyatorli qismlar bo‘lib, ekspressiyaning boshqarilishida ishtirok etadilar. Prokariot organizmlarda monosistronli genlar bilan bir qatorda polisistronlilar ham bo‘lib, oqsil – kodlaydigan genlarning joylanishi bir-biriga yaqin bo‘lib, funksiyalari ham o‘xshash bo‘lishi mumkin.

Polisistrondagi kodlovchi birliklar, regulyatorli elementlar bilan birgalikda mutanosib holda faoliyat ko‘rsatadilar. Ekspressiyasi (muvofiglashgan) koordinlashgan genlar guruhini operon deb ataladi. Bir necha polipeptidlarni kodlovchi i-RNK modifikatsiyaga uchramay shakllangan holda translyatsiyada ishtirok etadi. Boshqa xildagi RNKlar spetsifik sharoitda protsessingga uchrab yetilgan, CTABil RNKlarga aylanadi. Fransiyalik olimlar F. Jakob va J. Monolar alohida ajratilgan operonlar faol holda bo‘lmasligini ko‘rsatganlar. Operonlar

bir-birlari bilan uzviy bog'langan holda bo'lib, ularning bunday faoliyatini genetik "trigger" deb ataladi.

EUKARIOT GENLARNING STRUKTURASI

Eukariot organizmlar genomidagi genlar soni prokariotlarga nisbatan ko'p bo'ladi. Genlarning joylashish tartibi va tarkibi yuqori organizmlarda murakkabdir. Eukariot genlarda transkripsiyaniing birliklari mozaik holda joylashib, kodlovchi ekzonlar bilan kodlanmaydigan intronlar ketma-ket qismli nukleotidli bo'limlardan iborat. Eukariot genlarining o'zlariga xos xususiyatlari bo'lib, ularning genomida joylanishi bir necha marta qaytarilgan holda kuzatiladi. Eukariot genlari quyidagi elementlardan iborat. Genlardagi transkripsiya birliklari, ya'ni kodlovchi qismlari, chap va o'ng tomonda, kodlanmaydigan nukleotidlar o'rtasida joylashgan. Kodlovchi transkriptlar eukariot genlarida ekzon-intronli strukturaga ega. Istisno tariqasida besh xil gistonlar, α va β interferonlarning genlarida intronli nukleotidlar bo'lmaydi. Ekzonlar genlarda intronlar bilan ketma-ket joylashadi. Ekzon va intronlarning soni, masofasi har bir i-RNK uchun alohida – individual shakllanadi. Kodlovchi nukleotidlar soni oshgan sari gendagi intronlar proporsional holda ko'payib boradi.



2-rasm. Eukariot genom tuzilishi

Genlardagi intronlarning masofasi ekzonlarga nisbatan 2 dan 10 tagacha uzun bo'ladi. Masalan, inson genomidagi oqsil kodlovchi gen tarkibi taxminan to'qqiz ming azot asoslaridan iborat bo'lsa, undagi intronlar tarkibidagi nukleotidlar miqdori 27 ming azot asoslaridan tashkil topgan. Bir necha yillar ilgari intronlar genlarning kerak bo'lmagan – axlat qismi deb qaralar edi. Keyinchalik alternativ

Molekulyar mikrobiologiya

splaysing ya'ni bitta gendan bir nechta xil i-RNK sintezlanishi aniqlangandan so'ng, transkripsiyada intronlar ishtirok etishi aniqlandi. Hozirgi kunda ma'lumki, ekzon va intronlarning o'zaro har xil kombinatsiyalari tufayli i-RNKning turli xillari transkribirlanadi. Ayrim hollarda intronlar ekzon sifatida, ekzonlar esa intron bo'lib faoliyat ko'rsatadilar. Shu narsa aniqlandiki, intronlar tarkibida transkripsiyaning promotorlari, bitta intronda qo'shimcha yana gen bo'lishi mumkin. Eukariot genlaridagi transkripsiya birliklaridan tashqari, ularda yana regulyatorlik qismlari bo'lib, ular transkripsiyaning initsiatsiyasida (promotor) va uning yakunlanishida (terminator) bevosita ishtirok etadilar. Eukariotlardagi promotorli elementlarning o'lchami 100-200 nukleotid qoldiqlaridan iborat. Transkripsiya faolligini kuchaytiruvchi yoki pasaytiruvchi (enhanserlar va splaysenlar) DNK segmentlarining ichki qismlarida yoki ulardan ancha uzoq masofada joylashadi. Ribosom RNK, transport RNK va gistonlarning genlari o'zlariga xos struktura va funksiyaga egalar. Tirik hujayralarda ko'p sondagi oqsillarni sintezlash uchun miqdori ko'p bo'lgan ribosomalar kerak. Ularning sintezida esa har xil fraksiyali RNK ishtirok etadi. Ular haqida yuqorida ma'lumot berilgan. To'rt xil rRNK bir-birlari bilan sedimentatsiya konstantalari bilan farqlanadilar: 5S-rRNK, 5,8S-rRNK, 18S-rRNK, 28S-rRNK. Mazkur rRNKlarning genlari xromosomalarda bo'lib, ularning qismlari yadrochalar bilan assotsiirlangan holda bo'ladilar. Uch xil rRNKlarning genlari klaster bir tekislikda ketma-ket umumlashgan holda bo'lib, faqat 5S-rRNKning joylanishi alohida ekanligi aniqlangan. Ribosom RNK genlarining joylanish tartibi, tuzilishi giston oqsillarnikiga juda o'xshaydi. Ko'rsatilgan genlarning nusxalari genomda ko'p sonda bo'lib jumladan, baqalarda 100, odamda esa 300 atrofida ekanligi amaliyotda ko'rsatilgan. Baqalarning yetilgan ootsitlarida rRNK genlarining amplifikatsiyasi natijasida, yadroda ularning soni 2mln nusxada bo'lishi mumkin. Ribosoma genlarida intronlar deyarlik bo'lmaydi, DNKga nisbatan ularda G-S juftliklar soni ancha yuqori ekanligi aniqlangan. Uch xil rRNK genlarining klaster o'lchami sakkiz ming nukleotid qoldig'idan iborat bo'lib, ular bir-birlari bilan spayserlar orqali ajraladilar. Qo'shni klasterlar ham o'zaro bir-birlaridan yuqorida ko'rsatilgan usullar orqali ajralgan holda joylashadilar. Klasterlarning har biri transkripsiyada alohida bir butun

pre-r-RNK sifatida sintezlanib, keyinchalik endonukleaza ta'sirida uch hil r-RNK (5,8S, 18S va 28S) shakllanadi.

Сравнение строения генов прокариот и эукариот



3-rasm. Prokariot va eukariot organizmlar genlarini tuzilish farqlari

Hozirgi kunda genlarni bir necha xil guruhlariga bo'lib tadqiq qilinadi. Birinchi sinf genlarini matrictsali yoki nomatrictsali biokimyoviy jarayonlarni amalga oshiruvchilar bo'lib, ularga quyidagilar kiradi:

- Oqsil sintezini belgilovchi genlar bo'lib, ular matrictsali replikatsiyani, transkripsiya va translyatsiyalarni amalga oshiradi;
- Ribosom va transport RNK larni sintezlovchi genlar;
- Strukturali oqsillarni, aminokislotalarni, azotli asoslarni va uglevodlarni sintezlovchi genlar; Genlarning ikkinchi sinfiga quyidagilar kiradi:
 - RNK-polimeraza I ishtirokida ribosom RNKlarni (18S, 5,8S, 28S) transkriptlovchi genlar;
 - RNK-polimeraza II ferment yordamida oqsillarni kodlovchi genlarning transkripsiyasi;

Molekulyar mikrobiologiya

- 5S-r-RNK, t-RNK va kichik yadroviy (ky) RNKlarni RNKpolimeraza III yordamida transkriptlovchi genlar.

Funksional vazifasiga qarab ham genlar ikki guruhga bo'linadilar: bir turdagi genlar hujayralardagi xususiy oqsillarni sintezlovchi bo'lsalar, ikkinchi xildagilar esa har xil fraksiyali RNKlar sintezini boshqaradilar. Genlarning ekspressiyasi bo'yicha ham ular birbirlaridan farq qiladilar, jumladan:

- “Xo‘jalik” (housekeeping genes) genlari bo'lib, ularning mahsulotlari har qanday hujayralarni hayotiy faoliyati uchun zarur hisoblanadi;

- To'qima spetsifikligini belgilovchi genlar maxsus funksiyali hujayralarda bo'lib, ularning funksional faolligi ayrim to'qimalarda ontogeneznining muayyan bosqichlarida namoyon bo'ladi. Ilmiy ma'lumotlarga qaraganda, sutemizuvchilar va odamlarning to'qimalarida hamma genlarning 2-3% faoliyat ko'rsatadi. Jigar hujayralarida ~5%, miyada esa 9-10 % faollikda ishlaydi.

AGROBACTERIA MISOLIDA GEN EKSPRESSIYASI.

Genni o'simlik, hayvon va mikroorganizmlarga vektorlar vositasida kiritishimiz mumkin. Quyida biz o'simliklarga kerakli genni Agrobacteria yordamida kiritilishini ko'rib chiqamiz. O'simlikka gen muhandisligi orqali begona gen kiritilsa, u transgen o'simlik deyiladi.

Transgen o'simliklar olishdagi asosiy muammolardan biri o'simliklar xromosomasiga begona genlarni kiritish ya'ni, o'simlik hujayralari transformatsiyasi hisoblanadi. Bu sohani rivojlanishi uchun tuproq agrobakteriyalari Ti - plazmidalaridan o'simliklar transformatsiyasi tabiiy tizimida foydalanish imkoniyatining kashf etilishi muhim turtki bo'ldi, Ba'zi tuproq bakteriyalari turlari (Agrobacteria) ning ikki pallali o'simliklarga zarar yetkazishi va bunda o'ziga xos shish - gardishsimon bo'rtma hosil qilishi oldindan ma'lum edi. Bu shishlar zararlangan joyda muntazam ravishda bo'linib o'sadigan dedifferensiallashgan (ixtisoslashmagan) hujayralardan tashkil topgan. In vitro sharoitida o'stirilganda shish hujayralari normal o'simlik hujayralari o'sishi uchun zarur gormonlar uchramaydigan muhitda ham o'sa oladilar. Agar zararlantirilgandan so'ng barcha agrobakteriyalarni antibiotiklar qo'shib inaktivatsiya qilinsa ham shish

hujayralari tartibsiz (nazorat qilinmaydigan) bo'linish xususiyatini saqlab qoladilar. Shunday qilib, agrobakteriyalar faqat shish hosil bo'lishini indutsirlash uchungina zarurdir. Shish hujayralari o'simlikka xos bo'lmagan aminokislotalar - opinlar (arginin hosilalari)ni sintezlay boshlaydi, ular agrobakteriyalar tomonidan azot va uglerod manbai sifatida foydalaniladi. Agrobakteriyalar bilan zararlangan o'simlikda, transformant o'simlik hujayralari metabolizmi qayta quriladi va ular faqat bakteriyalar uchun zarur bo'lgan birikmalar sintezini boshlaydi. Shish hosil qiluvchi kuchli induktorlardan biri *Agrobacterium tumefaciens* misolida shish chaqiruvchi vosita Ti - plazmida deb nomlangan (ingliz tilidan Tumor inducing - shish chaqiruvchi) maxsus plazmida bo'lib, uning bir qismi o'simlik hujayrasi xromosomasiga o'mashib olishi aniqlangan. Ti-plazmida uzunligi 200 m.n.j (ming nukleotid juft) dan iborat halqasimon DNK dan tashkil topgan. U bakteriya hujayralarida avtonom replikatsiya bo'la olish xususiyatiga ega. Ti - plazmidalarni ular sintezlaydigan opinlar tipiga ko'ra 4 ta guruhga bo'lishi mumkin. Ko'pincha nopalin yoki oktopin aminokislotalarini kodiraydigan Ti - plazmidalar uchraydi. Agrobakteriya hujayrasi plazmidalarning faqat biri oktopin yoki nopalin kodiraydigan tipini saqlashi mumkin.

Genetik tadqiqotlarning ko'rsatishicha, barcha Ti-plazmidalarni o'xshash tuzilishga va ikki xil: 1) agrobakteriyaning o'zini metabolizmi uchun zarur (opinlar katabolizmi genlari, plazmidalar replikatsiyasi boshlang'ich nuqtasi va h.k.); 2) o'simlik hujayralari transformatsiyasi uchun zarur bo'lgan guruhga mansub ketma-ketliklarga ega guruhlarga bo'lish mumkin. Shuni alohida qayd etish lozimki, birinchi **genlari promotorining prokariot tipiga ega va faqat bakteriya hujayrasidagina faoliyat yuritadi, ikkinchi guruh genlari esa o'simlik hujayrasida ham ishlay oladi. Ikkinchi guruhga shish hosil bo'lishi va opinlar sintezi uchun javobgar genlar kiradi.**

O'simlikni agrobakteriyalar bilan zararlanishi natijasidagi transformatsiyasi quyidagicha kechadi. Aniqlanishicha, agrobakteriya ham, Ti - plazmida ham o'simlik hujayrasi ichiga kirmaydi, lekin Ti - plazmidaning bir qismi o'simlik hujayrasi yadrosiga o'tib, o'simlik genomiga joylashib olishi mumkin. Ti - plazmidaning bu fragmenti T-DNK (ingliz tilidan transforming DNA - transformatsiyalanuvchi DNK) deb nomlanadi. T-DNK ning uzunligi 25 m.n.j. T-DNK oxirlarida uni plazmida tarkibidan qirqish va o'simlik genomiga

Molekulyar mikrobiologiya

integratsiyasi uchun zarur to'g'ri ketma-ketliklar (25 m.n.j) joylashgan. T-DNK yettita gen: opinlardan birini kodirlaydigan *nos* geni (nopalinsintetaza) yoki *ocs* (oktopinsintetaza), shuningdek, shish hosil bo'lish belgilarini kodirlaydigan *oltita* gen, ulardan ikkitasi auksin sintezi, bittasi sitokinin sintezini kodirlaydigan genlarni tutadi. Bu genlar ekspressiyasi natijasida hujayralarning gormonal statusi o'zgaradi, bu esa ularning dedifferensiallashuvi va shish hosil bo'lishiga olib keladi.

T - DNK ning mavjud bo'lishi zaruriy bo'sa-da, bu transformatsiya jarayoni uchun yetarli emas. T-DNKni Ti - plazmidadan qirqish va uni o'simlik hujayrasiga o'tkazishda Ti – plazmidaning boshqa, ya'ni, T-DNK dan tashqaridagi vir -hududi (virulentlik hududi) javobgardir. Vir hududi yettita lokus - *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* dan iborat bo'lib, 40 m.j.n. dan iborat rayonni tashkil etadi. Bajaradigan vazifasiga ko'ra vir genlarni ikkita sinfga bo'lish mumkin:

1. *virA* va *virG* regulator genlari, oz miqdorda bo'lsa ham agrobakteriya hujayralarida doimiy ekspressiya bo'lib turadi;

2. *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* genlari T-DNK ni o'simlikka bevosita ko'chirib o'tkazilishini ta'minlaydigan oqsillarni kodirlaydi va ular faqat promotorlari bevosita faollashganidan so'ng ekspressiya bo'ladi.

Agrobakteriyalar yordamida o'simliklar transformatsiyasi amalga oshirilishi uchun uchta shart bajarilishi lozim: - bakteriya hujayrasi yuzasida bakteriyaning o'simlik hujayrasi bilan birikishi uchun zarur maxsus polisaxaridlar sintezini amalga oshiruvchi to'rtta genni agrobakteriyalar xromosomasidagi faollashuvi;

- Ti - plazmidaning vir -hududi, ya'ni DNK ning o'simlik hujayrasi yadrosiga ko'chirib o'tkazilishi initsiatsiyasi uchun zarur qismining faollashuvi;

- T-DNK ning mavjud bo'lishi. O'simliklar transformatsiyasi jarayoni agrobakteriyaning o'simlik hujayrasiga jarohatlangan qism orqali kirib borib birikishidan boshlanadi. Jarohatlanganda o'simlik hujayrasi tashqi muhitga maxsus fenolli birikma - **atsetosirengon** ajratib chiqaradi. Yuqorida ta'kidlab o'tilgandek, *virA* geni agrobakteriya hujayrasiga muntazam ravishda ekspressiya bo'lib turadi va *VirA* oqsili atsetosirengonning membrana retseptori hisoblanadi. O'simliklardan ajratib chiqariladigan atsetosirengon *VirA* oqsili orqali taniladi, u esa o'z navbatida, agrobakteriya hujayrasiga doimo

ekspressiya bo'lib turadigan boshqa oqsil VirG ning faollashuviga olib keladi. VirG oqsili boshqa vir - virC, virD, virB, virE, virF —genlari transkripsiyasini faollashtiradi va mazkur genlarning promotor qismlari bilan bog'lanib, ulaming ekspressiyasiga sabab bo'ladi. vir C, virD, virB, virE, virF genlarining oqsil mahsulotlari T-DNK bilan bog'lanib, uning Ti - plazmida tarkibidan qir qilishi va o'simlik genomiga ulanishini ta'minlaydi. VirD oqsili bir zanjirli qir qilishni avval o'ng tomondagi T-DNKning 25 m.j.n ketma-ketligidan boshlab, keyin chap tomonidagi ketma-ketligida davom ettiradi. Olingan T-DNK ning bir zanjirli ipi u bilan bog'lanadigan VirE oqsili bilan himoyalanaadi. T-DNK ning o'ng chegarasi (overdrive deb nomlanuvchi qismi) atrofida joylashgan ma'lum ketma-ketlik bilan bog'lanadi. VirC oqsili bilan birga, VirE va VirF oqsillari T-DNK ning ko'chib o'tishi va o'simlik hujayrasi yadrosiga integratsiyasini ta'minlaydi. 11 ta VirB oqsili VirD bilan maxsus ko'priq hosil qiladi, TDNK agrobakteriyalardan o'simlik hujayrasiga u orqali o'tadi. T-DNK o'zining qo'sh zanjirli strukturasi tiklaydi va o'simlik genomiga joylashadi. Shunday qilib, o'simlik hujayrasi transformatsiyasi amalga oshadi. Hozirgi vaqtda T-DNK ning ko'chirib o'tkazilishida ishtirok etadigan barcha oqsillar va mexanizmlar oxirigacha to'liq o'rganilmagan.

Nazorat savollari

- 1.Genning umumiy tuzilishi haqida aytib bering.
- 2.Prokariot organizmlarning genini tuzilishi haqida tushuncha bering.
- 3.Eukariot organizmlar geni qanday tuzilgan?
- 4.Prokariot va Eukariot organizmlar genidagi o'xshashlik va farqlari?
5. Agrobakteriya misolida gen ekspressiyasi qanday kechadi?

Foydalanilgan adabiyotlar

1. M.N.Valixonov, S.N.Dolimova, G.B.Umarova, P.Mirhamidova. Biologik kimyo va molekulyar biologiya (2-qism): / Toshkent .2015yil.135-138 betlar
2. RArtikova, S.Murodova. Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi. Darslik. -T .: «Fan va texnologiya», 2010.45-65 betlar.

11-MAVZU. MIKROORGANIZMLAR GEN MUXANDISLIGI, UNING BOSQICHLARI VA TRANSFORMANTLARNING OLINISHI.

Reja:

1. Gen muxandisligida qo'llaniladigan bakterial va virusli vektorlar
2. Mikroorganizmlar gen muhandisligi bosqichlari
3. Mikroorganizm hujayralariga plazmida dnk sini transformatsiyasi
4. CaCl_2 yordamida kimyoviy-kompetent E.coli hujayralarini olish usuli va transformatsiyasi
5. E.colining elektrokompetent hujayralarini glitserin yordamida elektroporatsiya qilib olish usuli

Tayanch so'z va iboralar: Gen muxandisligida qo'llaniladigan bakterial va virusli vektorlar va ularning tuzilishi, transformatsiya qilish usullar (kimyoviy va fizik), transformantlar seleksiyasi.

Genetik muxandislik (yoki gen muxandisligi) – bu rekombinant RNK va DNK olishdagi texnologiya, usullar va uslublar xamjixatligi, organizmdan (hujayradan) genlarni ajratish, genlar bilan turli manipulyasiyalarni bajarish va ularni boshqa organizmga o'tkazishni o'z ichiga oladi.

Transgen organizmlarni olish bosqichlari:

- ☐ Genni ajratib olish
- ☐ Genni vektor ichiga kirgizish
- ☐ Vektorni hujayra ichiga kiritish
- ☐ Organizmni o'stirish

Tarkibida qo'shimcha irsiy axborotlar tutuvchi rekombinant DNK molekulalarini hujayralarga kiritish va uning barqarorligini saqlash gen muhandisligining asosiy kalit operatsiyasi hisoblanadi. Buni amalga oshirish uchun vektor molekulalardan foydalaniladi. Agar DNK shundayligicha hujayraga kiritilsa, bakteriya hujayralaridagi fermentlar ularni nukleotidlarga parchalab tashlaydi. Ba'zi hollarda DNK hujayraga kirib o'rnamishi mumkin, lekin hujayraning bo'linishi jarayonida u nasldan-naslga berilmay yo'qolib ketadi. Rekombinant DNK hujayraning genetik apparatini tashkil qiluvchi qismiga aylanishi uchun u genomga birikishi (xromosomaga integratsiyasi) va shuning hisobiga replikatsiyalanishi yoki avtonom replikatsiyalanish xususiyatiga ega bo'lishi kerak. Begona DNKning replikatsiyasi,

ekspressiyasi va transformatsiyasini (boshqa organizmga ko'chishini) ta'minlovchi DNK molekulasi vektor deb ataladi. Vektor hujayraga qo'shimcha irsiy axborot kiritilishini amalga oshiradi. Vektor sifatida plazmidalar, bakteriofaglar, mobil elementlar va hayvonlarning viruslaridan foydalanish mumkin. Hozirgi vaqtda juda ko'p vektorlar yaratilgan bo'lib, ularni bir nechta tipga bo'lish mumkin:

1. Klonlash uchun vektorlar. Bunday vektorlarga biriktirilgan DNK fragmentlarni replikatsiyalash orqali soni (amplifikatsiyasi) ni ko'paytirish uchun foydalaniladi. Bunday maqsadlar uchun bakteriya plazmidalari va faglar qo'llaniladi. Genomning katta o'lchamdagi fragmentlarini klonlash uchun esa bakteriya va achitqi xromosomalari asosida yaratilgan (VAS va YaC) sun'iy vektorlaridan foydalaniladi.

2. Ekspression vektorlar. Ulardan genlarning muayyan ketma-ketligini aniqlash va ularning oqsil mahsulotlarini tahlil qilish, muayyan oqsilni ishlab chiqishda foydalaniladi. Shuningdek, sutemizuvchilar, o'simliklar va achitqi hujayralarida genlar ekspressiyasini amalga oshiruvchi vektorlar ham yaratilgan. Eukariot organizmlar uchun ko'p sonli ekspression tizimlar yaratilgan ekspression vektorlar poliadenillanish sayti va mazkur organizmda ishlash qobiliyatiga ega promotordan iborat ekspression kasseta tutadi.

3. Transformatsiya uchun vektorlar. Bu vektorlardan retsiپیent genomiga begona DNK fragmentlarini kiritish uchun foydalaniladi. Bunday vektorlar odatda genomga integratsiyalanishiga yordam beruvchi maxsus izchilliklar tutadi. Zamonaviy vektor tizimlar polifunksional bo'lib, bir nechta funksiyani bitta vektorga jamlaydi. Birinchi tabiiy vektorlar bakteriyalardan ajratilgan bo'lib, ko'pchiligi tajriba maqsadidan kelib chiqqan holda (ekspression, klonlash uchun, transformatsiya uchun vektorlar) gen muhandisligi usullari yordamida qayta yaratilgan.

Vektor molekulalarning tarkibida **marker gen** bo'lishi, bu gen hujayrada vektor ishtirok etayotgani haqida ma'lum qiluvchi fenotip berishi, ya'ni vektor selektiv irsiy belgiga ega bo'lishi kerak. Ko'pincha selektiv belgi sifatida tabiatda keng tarqalgan antibiotikka chidamlilik genidan foydalaniladi. Bu genlarning oqsil mahsuloti-fermentlar antibiotiklarni modifikatsiyalaydi va ularning ta'sirini inaktivlashtiradi (kuchsizlantiradi). Masalan, **nptII** geni kanamitsin antibiotigini inaktivlashtiruvchi neomitsin fosfotransferaza genini kodirlaydi. Bakteriya hujayrasi **nptII** geni ishtirokida kanamitsinga nisbatan

Molekulyar mikrobiologiya

chidamlilik hosil qiladi va shu antibiotik oziqa muhitlarida o'sib, klon va hujayralar koloniyasini hosil qiladi. Odatda tarkibida nptll geni bo'lmagan hujayralar bunday oziqa muhitlarida o'sa olmaydi va nobud bo'ladi. Demak, vektor konstruksiya tarkibida nptll genini tutishi vektor ishtirok etayotgan hujayralarni aniqlash va ularni tanlab olish imkonini beradi.

Vektor molekulasi uchun quyidagi asosiy talablar qo'yiladi:

- 1) vektor begona DNK fragmentlarini o'ziga biriktirishiga bir nechta restriktazalar uchun yagona restriksiya saytlari tutishi zarur;
- 2) vektor replikasiya boshlanish nuqtasining izchilligini tutishi hisobiga muayyan hujayralarda replikasiyalanishi shart;
- 3) vektor marker gen izchilligini tutishi zarur. Bu genlar vektor konstruksiyani tutuvchi hujayralar seleksiyasini yengillashtiradi.

Bakteriya plazmidalaridan klonlashda foydalanish.

Bakteriya hujayrasida xromosoma DNK sidan tashqari, ko'p nusxada halqasimon DNK molekulalari ham mavjud. (1-25 m.n.j.). Bunday halqasimon molekulalar plazmidalar deb ataladi. Ba'zi plazmidalar tarkibida antibiotikka chidamlilik genlarini tutadi. Hujayrada plazmidalarning ko'p nusxada hosil bo'lishi natijasida antibiotiklarni biokimyoviy neytrallovchi fermentlarning sintezi tezlashadi va hujayraning antibiotikka chidamliligi ortadi.

Yuqorida bayon etilganidek, kalsiy ionlari ishtirokida tarkibida plazmidasi yo'q bakteriyalar tomonidan plazmidalar oson yutiladi. Bakteriyalar hujayrasida faqat bir tipdagi plazmidalar ishtirok etishi mumkin.

Hujayradagi plazmidalar nusxasining soni o'zgarib turadi. Bu hujayraning va plazmidalarning irsiy xususiyatlariga bog'liq. Ba'zi turdagi plazmidalar hujayradagi soni 10-200 nusxa bo'lguniga qadar ko'payishni davom ettiradi. Boshqa turlari esa bakteriya xromosomasining ko'payish tezligida replikasiyalanadi. Bunday tipdagi plazmidalar hujayrada bir dona yoki bir nechta boiishi mumkin. Klonlash uchun faqat birinchi tipdagi plazmidalar asosidagi vektorlardan foydalanish maqsadga muvofiqdir.

Hozirgi vaqtda tabiiy vektorlar asosida foydalanish qulay bo'lgan vektor konstruksiyalari yaratilgan. Ulardan pUC tipi vektorlari va ularning hosilalari keng tarqalgan bo'lib, ulardan klonlash uchun ham, shuningdek, ekspressiyalash uchun ham foydalanish mumkin. Uncha katta bo'lmagan pUC vektorlari (~2,7 m.n.j.) tarkibida replikasiya

boshlanish nuqtasi izchilligini (ori-sayt) tutib, bu ularga bakteriya hujayrasida mustaqil replikatsiyalanish imkonini beradi. pUC vektorida klonlashni osonlashtirish uchun ko'p foydalaniladigan restriktazalarda takrorlanmas restriksiya saytlarini aks ettiruvchi sun'iy sintezlangan polilinker izchilligi mavjud.

Polilinker vektordagi begona gen ishtirokining qulay marker hisoblangan lac Z geniga o'rnatilgan. lac Z geni X-gal substratni parchalash xususiyatiga ega 3-galaktozidaza genini kodirlaydi. Bunda bakteriya hujayralari rangi oq rangdan moviy ranggacha o'zgaradi. Polilinkerning uncha katta bo'lmagan izchilligi (100-20 n.j.) P-galaktozidaza oqsili sinteziga ta'sir etmaydi. Begona DNK fragmentini klonlash uchun lac Z geni ekspressiyasini nobud qiluvchi pt/C-vektori polilinkeriga biriktiriladi. DNK ulangan vektor tutuvchi hujayralar X-gal substratni parchalaydi va bunday bakteriya hujayralari boshqa gen ulanmagan bo'sh plazmida vektori tutuvchi moviy rang hujayralardan farqli oq rangda qoladi. pUC vektorlar va ulaming hosilalarining oq-moviy rang seleksiyasi klonlash jarayonini ancha osonlashtiradi, chunki vektor plazmidaga begona genlarni ulash juda kam hollarda muvaffaqiyatli chiqadi. Aksariyat hollarda 10-30 ta ligirlangan molekulalardan faqat bittasi rekombinant bo'ladi, ya'ni o'zining tarkibida begona fragment tutadi va faqat moviy rang seleksiya yordamidagina rekombinant DNK tutuvchi bakteriya klonlarini aniqlash mumkin. pUC vektorlar tarkibida klonlangan genlarning transkripsiyasini ta'minlovchi regulator izchillikdan iborat maxsus ekspression kassetalar tutadi.

Faglar asosidagi vektorlar. Kosmidlar. Vas- va Yac-vektorlar. Bakteriya plazmidalari asosidagi vektorlar klonlash uchun keng qo'llaniladi, lekin ularning bitta muhim kamchiligi bor, bu uning sig'imining kichikligidir. Bunday vektorlarda o'rtacha 7—8 m.j.n. uzunlikdagi fragmentlarni klonlash mumkin, eukariot genlari izchilligi esa (10-25 m.j.n.) uzunroq bo'ladi. Bundan tashqari, genlarning kodirlovchi qismi atrofida joylashgan regulator izchilliklarni o'rganish uchun genomini kengroq klonlash zarur. Bunday katta fragmentlarni klonlash uchun esa plazmida vektorlari to'g'ri kelmaydi. Chunki katta o'lchamdagi xromosoma DNKsi (~9 m.n.j.dan ortiq) ulangan plazmidalar barqaror bo'lmaydi va replikatsiya jarayonida asta-sekin o'lchami kichrayib boradi. X bakteriofagi asosida tarkibiga 22 m.j.n. uzunlikdagi begona DNK fragmentlarini tutuvchi vektor konstruktsiya

Molekulyar mikrobiologiya

yaratilgan. X bakteriofag asosida klonlash uchun bunday vektorlarni yaratishda fag DNK molekulasiining markaziy qismi fagning E.coli da ko'payishi uchun zarur emasligi e'tiborga olingan holda restriktazalar yordamida fag genomidan kesib olinganda replikatsiya uchun zarur bo'lgan fagning o'ng va chap yelkasi o'zgarmasdan qolishi kerak. Fag yelkalari boshqa fragmentlardan alohida ajratilib, klonlash uchun vektor sifatida qo'llaniladi. Kesilgan fag DNK si o'rniga o'lchami 9-21 m.j.n. bo'lgan begona DNK ulanadi. Bakteriyalarda faqat fagning ikkala yelkasi va begona DNK tutuvchi faglar ko'payadi. Bunda olingan fag rekombinant DNK si 30 m.j.n. dan kam bo'lmasligi kerak. Ularning plazmidalar kabi replikatsiyalanishi uchun imkon yaratiladi. Kosmidlarning o'lchami fag vektorlarinikiga nisbatan kichkina, hammasi bo'lib 5 m.j.n., kosmidlarga 30-45 m.j.n. uzunlikdagi genlarni ulash mumkin. Bunday rekombinant DNK tutuvchi fagning boshchalari faglar kabi ko'paya olmaydi. Ular bilan E.coli hujayralari transformasiyalanadi. Eukariot DNKsini tutuvchi cos-sayt o'rnatilgan duragay molekula E.colida plazmidalar singari ko'payadi va har bir fag zarrachalari individual bakterial transformant koloniyasini hosil qiladi. 100 m.j.n.dan ortiq uzunlikdagi DNK fragmentlarini klonlash maxsus yaratilgan VAS va YAC vektorlarida amalga oshiriladi.

VAS- vektorlar bakterianing F-plazmidasi asosida olingan bo'lib, bu plazmidalarning bakteriya hujayralaridagi replikatsiyasi va nusxasining ko'payishiga javobgar genlarni va klonlashni osonlashtiruvchi qator qo'shimcha nukleotid ketma-ketliklarni tutadi.

VAS- vektorlar sig'imi o'zining uncha katta bo'lmagan o'lchamida (~7 m.j.n) juda katta -100-300 m.j n. bo'ladi. Uning sig'imi genom bibliotekasini yaratishda klonlar sonini ko'p marta kamaytirish imkonini beradi.

YAC-vektorlar ham katta o'lchamdagi DNK fragmentlarini klonlashda foydalaniladi, achitqining sun'iy minixromosomasini namoyon qiladi. YAC-vektor sentromer, telomer va replikatsiya boshlanish nuqtasiga ega. Bunday vektorga begona DNK ning 100 m.j.n., dan ortiq uzunlikdagi fragmentlarini ham ulash mumkin. Bunday minixromosoma achitqi hujayrasiga kiritilganda replikatsiyalanadi va mitoz bo'linishda o'zini boshqa achitqi xromosomalari kabi tutadi.

Ti - plazmidalar asosida transformatsiya qilish uchun vektorlar. Ti - plazmidaning nodir biologik xususiyatlari genlarni

ko'chirib o'tkazishdagi ideal tabiiy vektorga aylantiradi. Ti - plazmidasi xo'jayinlarning keng spektriga ega, u T-DNK ni o'simlik xromosomasiga o'tkazadi, u yerda T-DNK replikatsiyasi amalga oshadi va uning genlari oqsil hosil qilish bilan translyatsiya bo'ladi. T-DNK chegaralari uzunligi 25 nukleotid juftliklardan iborat takrorlanuvchi to'g'ri ketma-ketliklardan iborat bo'lib, bu ketma-ketliklar oralig'iga ulangan har qanday begona DNK bo'lagi o'simlik hujayrasiga o'ta oladi. Biroq Ti - plazmidasi bilan ishlash uning katta o'lchamdaligi sababli qiyinchilik tug'diradi, an'anaviy usullarni qo'llab, genni plazmidaga ulab bo'lmaydi. Shuning uchun Ti - plazmida gen muhandisligi usullari yordamida modifikatsiya qilinib, uning asosida o'simliklar transformatsiyasi uchun vektorlar olingan. Bundan tashqari, shuni qayd etish lozimki, o'simliklarni tabiiy Ti - plazmidasi bilan transformatsiyasi natijasida, transformant hujayralar regeneratsiya bo'la olmaydi, chunki ularda shish hosil bo'lish belgilarini kodiraydigan T-DNK hududining oltita geni faolligi sababli differensiallanish xususiyati to'xtatilgan bo'ladi. Agar differensiallashuvni blokirlaydigan genlar ketma-ketligini T-DNK dan qirqib olib tashlansa, transformant hujayralar regeneratsiya qilish xususiyatini tiklaydi. Shuning uchun Ti - plazmidalaridan foydalanishda shish hosil qilish va opinlar sintezi uchun javobgar genlar ketma-ketligi qirqib olib tashlanadi, T-DNK ning faqat o'simlik genomiga ko'chirib o'tkazish uchun zarur fragmenti (eng avvalo chap va o'ng chegara takroriy ketma-ketliklari) ni qoldiriladi. Keyin T-DNK hududiga o'simlik genomiga kiritilishi lozim bo'lgan begona genlar joy lashtiriladi.

MIKROORGANIZM HUYAYRALARIGA PLAZMIDA DNK SINI TRANSFORMATSIYASI

Plazmid DNK molekulalari orqali bakteriyalarning transformatsiyasi mikroorganizmlarning zamonaviy molekulyar biologiyasi va genetik muhandisligining eng muhim bosqichlaridan biri bo'lib, hujayralardagi rekombinant (begona) DNKning kichik va o'rta bo'laklarini klonlash va amplifikatsiyasini amalga oshirishda muhim ahamiyatga ega.

Transformatsiya ishlari 1970-yillarda E. coli va Salmonella typhimurium hujayralarini 0 ° C da ikki valentli kationlar (ayniqsa, kaltsiy xlorid) eritmalari bilan davolashda DNKni qabul qilish va

Molekulyar mikrobiologiya

episomal replikonlarni yoki integrativ rekombinantlarni shakllantirishga sezilarli ijobiy ta'sirning kashf etilishi bilan boshlangan. Keyingi tadqiqotlar vakolatli hujayralarni olish mexanizmlarini batafsil o'rganishga, shuningdek, yuqori samarali transformatsiya uchun shartlar va omillarni topishga olib keldi.

Plazmidlar kichik ekstraxromosomal genetik elementlar - 1 dan 500 kpo gacha bo'lgan ikki zanjirli DNKning yopiq dumaloq molekulalari bo'lib, ular begona DNK fragmentiga kovalent tarzda biriktirilgan bo'lsa ham, mikroorganizm hujayralarida avtonom ko'payish qobiliyatiga ega. Plazmid replikatsiyaning boshlanishini amalga oshiruvchi ori saytini o'z ichiga oladi, bu ori saytisiz bakteriya hujayrasida replikatsiyani amalga oshirish mumkin emas. Plazmidlarda ma'lum sharoitlarda mikroorganizm hujayralari uchun foydali bo'lgan fermentlarni kodlaydigan genlar mavjud. Biroq, ma'lum funksiyalarga ega bo'lgan genlar topilmaydigan plazmidlar mavjud, masalan kriptik plazmidlar ("kriptik" - yashirin, yashirin).

Plazmidlar yangi DNK konstruksiyalarini yaratish, begona genlarning ekspressiyasini tahlil qilish, shuningdek, bakteriofag K yoki kosmidlar (plazmidlar xossalarini birlashtiruvchi vektorlar va fag X ga asoslangan vektorlar) asosida yaratilgan genomik DNKning sekvensiyasi, kDNK kutubxonalarini va subklonlash kutubxonalarini yaratish uchun juda keng qo'llaniladi).

Turli plazmidalar tomonidan bildirilgan asosiy fenotipik belgilar quyidagilardan iborat: antibiotiklarga qarshilik (R-plazmidlar), antibiotiklarni sintez qilish qobiliyati, enterotoksinlar va kolitsinlarning hosil bo'lishi, murakkab organik birikmalarning parchalanishi, shakarlardan foydalanish, og'ir metallarga chidamlilik, restriksiya fermentlari va modifikatsiyalarining shakllanishi kabilardir. Tabiiy sharoitda ko'plab plazmidlar konyugatsiya va tegishli jarayonlar orqali qabul qiluvchi bakterial hujayralarga o'tkaziladi. F-plazmidlar o'zlarining donor hujayradan qabul qiluvchi hujayraga o'tishini ta'minlaydigan ma'lumotlarni o'z ichiga oladi. Odatda, plazmid DNK umumiy hujayra DNKsining 0,1% dan 5% gachasini tashkil qiladi.

Bundan tashqari, yuqori nusxali plazmidlar (hujayrada 10-100 nusxada ifodalanadi) va kam nusxali plazmidlar (har bir hujayrada 1-4 nusxa) mavjud. Bundan tashqari, tor o'ziga xos spektriga ega bo'lgan (ko'payish boshlanishining ma'lum bir joyini olib yuruvchi) plazmidlar

mavjud, keng spektrli plazmidlar esa turli turlarga mansub mikroorganizmlarda ko'payish qobiliyatiga ega.

Shuni ta'kidlash kerakki, genetik muhandislik usullari yordamida tuzilgan plazmidlar begona DNK parchalarini hujayralarga o'tkazish uchun yuqori samarali vektor hisoblanadi. Bunday plazmidlar kichik o'lchamlarga ega (chunki *E. coli* ga ekzogen DNK o'tkazish samaradorligi plazmid hajmi 15 kpo dan ortiq bo'lganda keskin kamayadi), ular begona DNK fragmentini kiritish uchun ishlatilishi mumkin bo'lgan noyob restriksiya saytlarini o'z ichiga oladi, shuningdek, kerakli rekombinant DNK bilan transformant hujayralarni aniqlash uchun selektiv genetik markerlarni o'zida tutadi. Plazmid vektorining standart belgisi odatda kichik p ("plazmid" uchun) bilan boshlanadi, undan keyin vektorning xususiyatlariga yoki uning tarixiga ishora qiluvchi bir nechta harflar qo'yiladi. Transformatsiya - bu chet eldan ajratilgan DNK yordamida genetik ma'lumotni qabul qiluvchi bakterial hujayraga kiritish jarayoni. Hujayralar ma'lum bir kimyoviy yoki fizik (elektroporatsiya) bilan ishlov beriladi, bu ularni vaqtincha kichik DNK molekulalariga o'tkazuvchan qiladi.

Klassik kimyoviy usullar mikrob hujayralarini ikki yoki ko'p valentli kationlar eritmasida (eng samaralilaridan biri kaltsiy xlorid) 0 ° C atrofida inkubatsiya qilishni o'z ichiga oladi, bu hujayralarni DNK orqali DNKning kirib borishi uchun ancha sezgir (qobiliyatli) qiladi. hujayra membranasi. Mikroorganizmlarda tabiiy kompetentsiya holati faqat madaniyat o'sishining ma'lum bir bosqichida paydo bo'lishi yoki doimo mavjud bo'lishi mumkin, va ba'zi bakteriyalarda (masalan, *E. coli*) tabiiy kompetentsiya yo'q va faqat maxsus davoqlash paytida paydo bo'lishi mumkin.

Kompetentsiya holatida ko'plab bakteriyalar avtolizin, endonukleaza I va DNKni bog'lovchi oqsil sintezini faollashtiradigan maxsus kompetensiya omilini (past molekulyar og'irlikdagi oqsil) ishlab chiqaradi.

Kimyoviy-kompetent hujayralarni yuqori samarali ishlab chiqarish va hujayra devori lipopolisaxarid molekulalarining tuzilishida farq qiluvchi ba'zi *E. coli* shtammlarini o'zgartirish chastotasini oshirish uchun hujayralarni ma'lum bir pHda ikki valentli kationlar bilan oddiy ishlov berish o'rniga optimallashtirilgan kompleks usullar ko'pincha monovalent kationlar (kaliy xlorid), marganets (II), bariy (II) yoki geksaminokobalt (III) tuzlarini o'z ichiga olgan transformatsion

Molekulyar mikrobiologiya

buferlar yordamida qo'llaniladi. Shuningdek, *E. coli* ning aksariyat shtammlari hujayralarining holati DNK molekulalarining hujayra devori kanallari bilan o'zaro ta'sirini osonlashtiradigan dimetil sulfoksid (DMSO) va ditiotreitol (DTT) qo'shilgandan so'ng yaxshilanadi (adgeziya zonalari deb ataladi). Odatda *E. coli* hujayrasida 400 ga yaqin adgeziya zonalari mavjud bo'lib, ular tashqi membrana, qattiq hujayra devori va ichki membrana orqali makromolekulalarni tashish uchun kanallardir. Kompetent hujayralar ulushi, shuningdek, maxsus o'stirish sharoitlari yoki maxsus ozuqa vositalari (masalan, magniyni yuqori miqdori bilan) yordamida oshirilishi mumkin.

Haroratning keyingi keskin o'zgarishi ($40-50^{\circ}\text{C}$ haroratda 30-120 sekund issiqlik zarbasi va plazmid DNKga ega bo'lgan kompetent hujayralar suspenziyasining muzga tez qaytishi) ham oxirgi bosqichda kimyoviy transformatsiya jarayonida transformatsiya chastotasining oshishiga olib keladi. Harorat hujayra membranasining harakatchanligiga ("suyuqligi") kuchli ta'sir qiladi va membrananing kvazkristal holatini 0°C da qisqa muddatli tiklash uzun DNK molekulalarining so'rilishiga yordam beradi.

Transformatsiya jarayonining uch bosqichi

Kimyoviy va elektroshok transformatsiyasining statistik tahlili shuni ko'rsatadiki, plazmid DNK transformatsiyasi jarayonini uch bosqichga bo'lish mumkin:

- 1) DNKning hujayra bilan bog'lanishi (assotsiatsiyasi)
- 2) DNKning hujayra ichiga kirib borishi
- 3) barqaror epizomaning shakllanishi

pBR322 va pACYC184 plazmidlarining ekvimolyar nisbatlaridan foydalanganda, ushbu plazmidlardan biri bilan o'zgartirilgan hujayralarning taxminan 70-90% ikkala plazmidni ham o'z ichiga oladi. Bu natija kimyoviy jihatdan kimyoviy-kompetent hujayralarni bir nechta DNK molekulalarini o'zlashtira olishini ko'rsatadi. Umumiy ko-transformatsiya uchun shunga o'xshash natijalar elektroporatsiya bilan olingan.

Yuqori samarali kimyoviy transformatsiya sharoitida ekvimolyar nisbatda plazmidlarning 1% hujayralarni o'zgartiradi va barcha hujayralarning 1% transformatorlardir. Plazmidlar sonining 100 martaga ko'payishi transformatsiyalangan hujayralar sonining 10 baravar ko'payishiga olib keladi, bu plazmidlar sonining ko'payishi

bilan barqaror episomalarning shakllanishi uchun sharoitlarning yaxshilanganligini ko'rsatadi.

Plazmidlar va hujayralarni ekvimolyar nisbatiga elektroshok transformatsiyasi ishlatilishi plazmidlarning 10% transformatsiyani keltirib chiqaradi va barcha hujayralarning 10%i o'zgaradi. Plazmid: hujayra nisbatining 100 barobar ortishi barcha hujayralar umumiy sonidan transformantlarning 90 foizini tashkil qiladi. Asosan, har ikkala transformatsiya usuli ham hujayra ichiga bir nechta plazmidlarni kiritish uchun juda samarali. Har bir holatda, 0,1 ehtimollik bilan transformator hosil bo'lish bosqichi mavjud bo'lib, uni har bir hujayraga ko'proq plazmid DNK molekulalarini kiritish orqali oshirish mumkin.

DNK assotsiatsiyasi. Ko'pgina kuzatishlar shuni ko'rsatadiki, barcha DNK molekulalari kelib chiqishi, strukturaviy murakkabligi va konformatsiyasidan (chiziqli, yopiq yoki o'ta o'ralgan) qat'iy nazar, hujayralar ustidan taxminan 100 marta miqdoriy ortiqcha bo'lishi sharti bilan transformatsiya jarayonida samarali ishtirok etishi mumkin. DNK hujayralar va *E. coli* bilan makromolekulalarni tashish uchun asosiy hujayra kanallari hududida o'ziga xos bo'lmagan holda bog'lanadi. Transformatsiyaning ikkala usuli (elektroporatsiya va kimyoviy transformatsiya) 0°C haroratni talab qiladi, bu DNK ning hujayra bilan samarali bog'lanishi uchun membranalarining (va, ehtimol, lipopolisaxarid qatlamining) kristallanishini ko'rsatadi. Taxminlarga ko'ra, DNKning birlamchi assotsiatsiyasi DNK makromolekulalari uchun tashqi membranadagi kanallarga kirishni ta'minlaydigan past haroratlarda stabillashgan lipopolisaxarid karkasidagi teshiklar yaqinida sodir bo'ladi.

DNKning hujayra ichiga kirishi. Kimyoviy transformatsiya 0 ° C harorat va ko'p valentli kationlar hujayra kompetentsiyasining holatini va keyingi transformatsiyani induksiya qilishi kerak. Past harorat, ikki valentli kationlarning millimolyar konsentratsiyasi bilan birgalikda membrana kristallanishiga olib keladi, bu esa mobil hujayra devorining tuzilishini nisbatan qattiq va DNK molekulalarining hujayra bilan birlashishi uchun qulayroq qiladi. Past haroratlarda fosfolipidlarni, oqsillarni va lipopolisaxaridlarni hujayra yuzasida "fiksatsiya qiladi", buning natijasida kationlar hujayra yuzasida va DNK molekulalarida fosfatlarni himoya qiladi va DNKning hujayra membranasi orqali kirib borishi uchun maqbul sharoit yaratadi. Dimetil sulfoksid (DMSO),

Molekulyar mikrobiologiya

ehtimol fosfolipidlar tomonidan yaratilgan gidrofob/gidrofil interfeysda zaryad stabilizatori sifatida ishlashi mumkin.

Transformatorlarning shakllanishi. *E. coli*ning kimyoviy va elektroshok transformatsiyasi jarayonlarini o'rganish ikkala usulni qo'llashda hujayra membranasining o'zgarishini ko'rsatadi, bu DNK molekulalarining o'zaro ta'siri va mikroorganizmlar hujayralariga kirib borishini ta'minlaydi. DNKni qabul qilish uchun ko'plab mustaqil kanallarning mavjudligi (bu birgalikda transformatsiya tajribalarida ko'rsatilgan) transformatsiya jarayoni oddiy tasodifiy hodisa emasligini isbotlaydi. Agar transformantlarning hosil bo'lishi, masalan, 200 ta mustaqil kanaldan 1 tasi orqali DNKni qabul qilish jarayonining yakunlanishi ehtimoli bo'lsa, transformatsiya samaradorligi ushbu kanallar bilan bog'langan DNK molekulalarining soniga bog'liq bo'ladi. Biroq, muvaffaqiyatli transformatsiya (kimyoviy yoki elektroshok) ehtimolini 10 barobar oshirish uchun plazmid DNK molekulalarining 100 barobar ko'pligini ta'minlash kerak. Bu DNK molekulalarining hujayralarga kirib borishidan keyin sodir bo'ladigan transformant shakllanish bosqichining mavjudligini tasdiqlaydi.

KIMYOVIY-KOMPETENT HUJAYRALARNI OLISH VA TRANSFORMATSIYA.

CaCl₂ yordamida kimyoviy-kompetent *e.coli* hujayralarini olish usuli va transformatsiyasi

Ma'lumki, mikroorganizm hujayralarini kalsiy xlorid bilan ishlov berish bakteriofag X ning plazmid DNKsi va DNKsining so'rilish samaradorligini sezilarli darajada oshiradi. Hozirgi vaqtda *E. coli* ning turli shtammlarida transformatsiya samaradorligini oshirish uchun mo'ljallangan kimyoviy-kompetent hujayralarni olish uchun ko'plab usullari mavjud. Transformantlarning o'rtacha unumi ishlatiladigan plazmidlar va shtammlarga qarab 1 mkg buzilmagan(интактной) plazmid DNK uchun 10⁵-10⁷ ni tashkil qiladi.

Shuni ta'kidlash kerakki, kazein/yoki xamirturush ekstraktini o'z ichiga olgan va hujayraning tez bo'linishini ta'minlaydigan boy ozuqaviy muhitdan foydalanish (masalan, LB) samarali transformatsiya uchun katta ahamiyatga ega, chunki minimal muhitdan foydalanish hujayra kompetentsiyasining sezilarli pasayishiga (taxminan 100 ga yaqin) olib keladi.

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- steril LB muhiti (Luria-Bertani muhiti) - ilovaga qarang. 1;
- LB muhiti uchun tegishli antibiotiklar eritmaları (ampitsillin uchun muhitdagi yakuniy konsentratsiya 50-100 mkg/ml, xloramfenikol uchun 10-30 mkg/ml, kanamitsin uchun 25-50 mkg/ml, streptomitsin uchun 25-100 mkg/ml). , tetratsiklin uchun 10-20 mkg/ml). Antibiotiklar yuqori haroratda inaktivatsiyasini oldini olish uchun 55°C gacha sovutilgan erigan LB agar muhitiga qo'shilishi kerak, yaxshilab aralashtiriladi va darhol Petri idishlariga quyiladi (Ø = 85 mm bo'lgan har bir idishga 30 ml muhit)

Quyidagi tarkibdagi CaCl_2 eritmasi: 60 mM CaCl_2 ; 15%li glitserin; 10 mM PIPES (pH 7.0). Eritma tayyorlash usuli: 0,60 g PIPES [piperazin-M, M'-bms-(2-etansulfonik kislota)] 90 ml bidistillangan suvda eritiladi; shpatelning uchida NaOH qo'shing; pH ni 7,0 ga yetkazing; 1,76 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ qo'shing, 30 g glitserin qo'shing va bidistillangan suv bilan eritmaning hajmini 200 ml ga yetkazing. Filtrlash orqali sterilizatsiya qiling va 4 ° C da saqlang. Kamroq, 50 mM CaCl_2 + 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) eritmasi ishlatiladi.

Metodika**A. Kompetent hujayralarni tayyorlash**

1. 5 ml LB muhiti solingan steril probirkaga E. coli shtammi DH5a (yoki shtammi TGI, LE392 va boshqalar) ning bitta yangi koloniyasini ekib, bir kechada (12-14 soat) 37°C da intensiv aralashtirish (250-300 ay/min) bilan sheykerda o'stiring.

2. Bir kechada yetishtirilgan 4 ml E coli kulturasini 400 ml LB muhiti solingan steril 2 litrli kolbaga soling. Logarifmik o'sish fazasining o'rtasiga ($\text{OD}_{600} \sim 0,375$) ($\text{OП}_{600} \sim 0,375$), yetguncha kuchli aralashtirish (250-300 ay/min) bilan silkitgichda 37°C da o'stiring, odatda 3-4 soat davom etadi. E'tibor bering, $\text{OD}_{600} = 1$ taxminan- 8×10^8 hujayra/ml.da 1 ga to'g'ri keladi. Albatta, optik zichlik va 1 ml kulturadagi tirik hujayralar soni o'rtasidagi nisbat ishlatiladigan shtammga qarab o'zgaradi, shuning uchun ishda ishlatiladigan har bir yangi E.coli shtammi uchun kalibrlash egri chizig'ini qurish (строить) kerak.

3. O'stirilgan kulturani steril, oldindan sovutilgan Falcon sentrifuga naychalarida sakkizta 50 ml alikvotga bo'ling. Muz ustida 5-10 daqiqa davomida kulturali probirkalarni sovutib oling, hujayra

Molekulyar mikrobiologiya

suspenziyalarini 1600 g da 10-15 daqiqa davomida 4 ° C da sentrifuga qiling.

4. Supernatantni ehtiyotkorlik bilan tashlang, uning qoldiqlarini mikropipetka bilan ehtiyotkorlik bilan olib tashlang va har bir qoldiqni 10 ml muzli steril CaCl₂ eritmasida eriting.

5. Hujayralarni 1600 g da 4°C da 5 minut sentrifugalang. Supernatantni tashlang va har bir qoldiqni 10 ml muzli steril CaCl₂ eritmasida eriting. 30 daqiqa davomida muzda qoldiring.

6. 1600 g da 4°C da 10-15 minut sentrifuga qiling. Supernatantni tashlang va har bir qoldiqni 2 ml muzli steril CaCl₂ eritmasida to'xtating.

7. Kompetent hujayra suspenziyalarini steril, oldindan sovutilgan 1,5 ml li plastik mikrosentrifuga probirkalariga (har bir kolba uchun 100-300 mkl) ajrating. Darhol muzlatib qo'ying (suyuq azotda muzlatish afzal, bu qobiliyatni sezilarli darajada oshiradi) va -70 ° C da saqlang. 4 ° C da kompetent hujayralar 12-16 soatdan ko'p bo'lmagan muddatda saqlanishi mumkin.

B. Transformatsiya jarayoni

1. Oldindan sovutilgan steril mikrotsentrifuga probirkasiga ligirlash eritmasi yoki TE bufer eritmasidagi ~4-10 mkl sovuq plazmid DNK (10 ng-1 mkg) qo'shing. Bundan tashqari, har bir transformatsiya tajribasi uchun ikkita nazorat mikrotsentrifuga probirkasini tayyorlash kerak: bitta probirkada mos keladigan supero'ralgan plazmid DNK standart preparatining ma'lum miqdori bilan transformatsiyalangan kompetent hujayralar bo'lishi kerak – control transformatsiyasi; va ikkinchi probirka plazmid DNK qo'shmasdan kompetent hujayralarni o'z ichiga olishi kerak.

2. Probirkani kaftlar orasiga qizdirib, kimyoviy jihatdan kompetent hujayralar suspenziyasini (E. coli DH5a, E. coli One Shot TOP10, E. coli LM 109 va boshqalar) tez eritib, mikropipetka bilan aralashtirib, muz ustiga qo'ying va plazmid DNKsi bo'lgan har bir probirkaga darhol 100 mkl suspenziya qo'shing. Aralashmani pipetkalash yoki naychani silkitib, muloyimlik bilan aralashtiring.

3. Transformatsiya aralashmasini muzda 20-30 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

4. Aralashtirmasdan 45-120 soniya davomida suv hammomida 42 ° C da inkubatsiya qilish orqali hujayralarda issiqlik shokini keltirib chiqaring. Transformatsiya aralashmasi bilan mikrotsentrifuga

probirkalarini darhol muzga o'tkazing va hujayralarni 1,5-2 daqiqa sovuting.

5. Har bir mikrosentrifuga probirkasiga 37°C ga oldindan qizdirilgan 1 ml steril LB muhiti qo'shing. Yaxshiroq silliq aralashtirish uchun mahkam yopilgan probirkalarni gorizontal holatda qo'yib, 37°C da sheykerda (-120ay/min) 1-1,5 soat davomida kultivatsiya qiling. Bu vaqt ichida plazmid bilan olingan antibiotiklarga chidamlilik genlarining ekspressiyasi hujayralarda sodir bo'ladi va hujayralar mos keladigan yangi fenotipga ega bo'ladi.

6. Inkubatsiyadan so'ng, transformatorlari bo'lgan mikrotsentrifuga probirkalarini muz ustiga qo'ying va tegishli antibiotikni o'z ichiga olgan agarlangan (1,5% agar) LB muhiti bilan Petri idishlariga 10, 50 va 100 mkl hujayra suspenziyasi alikvotlarini eking. Steril Drigalskiy shpateli yoki steril shisha tay oqlar yordamida agar muhiti yuzasiga transformator kulturasini ehtiyotkorlik bilan va teng ravishda taqsimlang. Ko'pgina hollarda agar muhitiga qo'shimcha seleksiya vositalarining (X-gal va IPTG) eritmaları (har bir plastinka uchun 25 mkl, konsentratsiyasi 40 mg/ml) qo'shiladi, bu esa agar muhitga laktoza operonini o'z ichiga olgan E. coli plazmidlardan foydalanganda transformatsiya samaradorligini baholash imkonini beradi. Chashkalarni koloniyalar paydo bo'lguncha 37 ° C da inkubatsiya qiling (odatda koloniyalar shtammga qarab 12-48 soatdan keyin paydo bo'ladi).

7. Nazorat sifatida foydalaniladigan kompetent hujayralar antibiotik LB muhitida o'stirilmasligi kerak, chunki ularda tegishli antibiotik qarshilik marker geni bo'lgan plazmid mavjud emas. Olingan transformantlarni tahlil qilish uchun steril tish tozalagich bilan ~ 10-20 ta alohida o'stirilgan koloniyalarni tanlash kerak (ularning soni hujayralarga kiritilgan plazmid DNK miqdori va transformatsiya jarayonining samaradorligiga bog'liq), har bir koloniyani kerakli antibiotik solingan 2-5 ml LB muhitida 37 ° C da sheykerda (120 ay/min) 5-12 soat davomida kultivatsiya qiling. Keyin har bir variantdan plazmid DNKni ajratib olish va uni restriksiyali tahlilini (bir va bir nechta restriksion endonukleazalardan foydalangan holda) o'tkazish kerak, so'ngra 1% agaroz gelida elektroforez qilish kerak. Restriksiyalovchi fermentlarni tejash uchun agarozali-gel elektroforezi yordamida izolyatsiyalangan plazmidlarda qo'shimcha mavjudligini dastlabki baholashda nazorat elementi sifatida original

Molekulyar mikrobiologiya

plazmidni qo'llash mumkin (qo'shimchali plazmid agarozada nazoratga qaraganda sekinroq harakat qiladi) . Keyin tanlangan klonlarni restriksiyalash yoki PZR orqali kerakli qo'shimchanning mavjudligini tekshiring.

8. Olingan transformantlarning bir nechta koloniyalari LB agar muhitiga 4°C da qisqa muddatli saqlash uchun, -80°C da uzoq muddatli saqlash uchun tegishli antibiotik bilan ko'chirib o'tkaziladi, 1 ml kultura 15% li glitserinda muzlatiladi. (830 mkl kultura 170 mkl 87% glitserin bilan yaxshilab aralashtiriladi).

ELEKTROKOMPETENT HUYAYRALAR OLISH VA ELEKTROPORATSIYA

Kompetent hujayralarni olish usullari va elektroporatsiya jarayonining o'zi kimyoviy transformatsiyaga qaraganda sodda va qulayroqdir. Elektroporatsiya DNKning minimal miqdoridan foydalangan holda yuqori maksimal transformatsiya samaradorligini (3 tpo gacha bo'lgan 1 mkg buzilmagan plazmid DNK uchun 10⁹-10¹¹ ° gacha transformantlar) olish imkonini beradi. Katta plazmidlardan foydalanganda (o'lchami 120-140 tpo gacha) elektroporatsiya samaradorligi taxminan 10⁶ ni tashkil qiladi.

Biroq, kimyoviy transformatsiyadan farqli o'laroq, elektroporatsiyada foydalanish uchun rekombinant plazmid DNKni tozalash kerak, chunki tuzlardan tozalanmagan ligatsiya aralashmasi elektr impulsi berilganda elektroporator kamerasida uchqun chiqishiga olib kelishi mumkin, bu esa transformatsiya samaradorligini keskin pasaytiradi. Bundan tashqari, bunday elektroporatsiya jarayonida DNK ligaza E. coli hujayralariga kirishi mumkin.

Shuni ham ta'kidlash kerakki, elektroporatsiyaning yuqori samaradorligi tufayli hujayralarni begona plazmidlar bilan o'zgartirish ehtimolini minimallashtirish uchun steril eritmalar, bir marta ishlatiladigan mikrosentrifuga probirkalari va avtomatik pipetka nosiklaridan foydalanish juda muhimdir; olingan klonlarni tekshirish kerak.

Yuqorida ta'kidlab o'tilganidek, elektroporatsiya (elektr shok transformatsiyasi) E. coli holatida eng samarali transformatsiya usuli hisoblanadi va nazariy maksimalga yaqin vakolatli hujayralarni olish chastotasini ta'minlaydi. Elektroporatsiya uchun maqbul sharoitlar allaqachon ko'plab boshqa bakteriyalar turlari uchun ishlab chiqilgan,

bu yerda kimyoviy transformatsiya past samaradorlikni beradi yoki umuman ishlab chiqilmagan. Kimyoviy-kompetent hujayralarni ishlab chiqarish uchun elektrotransformatsiya aralashmasi (hujayralar + DNK) uchun eng muhim talablardan biri ikki valentli / ko'p valentli kationlardan foydalanishdan farqli o'laroq uning juda past ion kuchidir.

Elektrokompetent hujayralarni olish va elektroporatsiyada eng yaxshi natijalar E. coli shtammi MC1061 va uning hosilasi DH10B Mg²⁺ qo'shilmagan holda ozuqaviy muhitda o'stirilganda topilgan.

Elektrokompetent hujayralar yuqori darajada tozalangan krioprotektorlar - glitserin (suv molekullari bilan vodorod aloqalari hosil bo'lishi tufayli hujayra ichida muz kristallari hosil bo'lishining oldini oladi) /yoki saxaroza (o'tkazmaydigan krioprotektor) qo'shilgan suspenziyalarda -70 ° C haroratda saqlanadi. , hujayralarni osmotik tomchilardan(перепадов) himoya qiladi va muz kristalining hosil bo'lish tezligini kamaytiradi).

E.COLINING ELEKTROKOMPETENT HUJAYRALARINI GLITSERIN YORDAMIDA ELEKTROPORATSIYA QILIB OLISH USULI

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- steril muzli deionizatsiyalangan suv va muzli 10% suvli glitserin eritmasi (yuqori darajada tozalangan);
- Steril LB va SOC muhiti

Metodika

A. Elektrokompetent hujayralarni tayyorlash

1. 1litrl kolbadagi 100 ml LB (yoki SOB) muhitga 1 ml yangi kechada E. coli kulturasini seping. Kuchli aralashtirish bilan (kamida 120 rpm) 30-37 ° C da kultivatsiyaning eksponensial o'sish fazasining o'rtasiga etgunga qadar (OD₆₀₀ ~ 0,5 yoki taxminan 4-6 soat kultivatsiyaga to'g'ri keladi).

Keyingi barcha operatsiyalar muz ustida amalga oshirilishi kerak.

2. Kultura kolbasini muz ustida 15-30 minut sovutib oling, hujayra biomassasini 2700 g da 4°C da 15 min sentrifugalash orqali yig'ing. Supernatantni tashlang, ozuqa muhitining qoldiqlarini mikropipet bilan ehtiyotkorlik bilan olib tashlang.

3. Hujayralarni teng hajmdagi (100 ml) muzli deionlangan suv bilan yumshoq yuving. 4°C da 15 minut davomida 2700 g sentrifuga qiling. Supernatantni tashlang.

Molekulyar mikrobiologiya

4. Qoldiqni 0,5 hajm muzli deionlangan suvda (50 ml) suspenziya qiling. 4°C da 15 minut davomida 2700 g sentrifuga qiling. Supernatantni tashlang.
5. Choʻkmani 5 ml muzdek 10% li glitserin eritmasida suspenziya qiling. Hujayra konsentratsiyasi taxminan $1 - 3 \times 10^{10}$ hujayra / ml boʻlishi kerak.
6. Elektrokompotent hujayralar suspenziyasini muz ustida 45 mkl alikvotlarga toʻkib tashlang, darhol muzlatib qoʻying (suyuq azotda yaxshiroq boʻladi) va -70 ° C da saqlang. Glitserinda 6 oy davomida saqlashning bunday holatida elektrokompotent hujayralarning sifati saqlanib qoladi.

B. Elektrotransformatsiya jarayoni (elektroporatsiya)

1. Elektrokompotent xujayralari boʻlgan probirkalarni xona haroratida ehtiyotkorlik bilan eritib, darhol muz ustiga qoʻying. Steril elektroporatsiya kyuvetlarini muzda sovutib oling.
2. Qurilmani elektroporatsiya qilish uchun sozlang (eng koʻp ishlatiladigan qurilmalar Bio-Rad, AQSh tomonidan ishlab chiqarilgan Gene Pulser turi) quyidagi rejimda: sigʻim sigʻimi 25 mkF, elektr qarshiligi 200 OM(Q). Elektroporatsiya uchun 0,2 sm hujayra ishlatilsa, elektr kuchlanishini 1,7 kV ga oʻrnatib.
3. 45 mkl sovuq elektrokompotent hujayra suspenziyasiga 5 mkl plazmid DNK eritmasini qoʻshing. Sekin aralashtiramiz va muzda 5-10 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.
4. Elektrotransformatsiya aralashmasini sovutilgan 0,2 sm elektroporatsiya kyuvetasi tubiga oʻtkazing. Kyuvetaning tashqi devorlaridagi elektrodlarni suv izlaridan yaxshilab artib boʻlgandan soʻng, yopiq kyuvetani elektroporatsiya moslamasining yacheykasiga toʻgʻri joylashtiring (bu transformatsiya jarayonini buzishi mumkin boʻlgan elektr uzilishining oldini olish uchun muhimdir). Elektroporatsiyani impulsli oqim razryadi bilan amalga oshiring (impuls vaqti 3,9 dan 4,6 ms gacha).
5. Elektroporatsiya asbobidan kyuvetani chiqarib oling va darhol kyuvetaga 1 ml SOC muhitini soling. Pipetkalash orqali hujayra suspenziyasini tezda aralashtiramiz.
6. Suspenziyani steril 15 ml polipropilen probirkaga oʻtkazing va 30-37 ° C da (ishlatilgan shtamm va plazmidga qarab) 1-2 soat davomida oʻrtacha aralashtirish (50-120 ay/min) bilan inkubatsiya qiling.

7. Hujayra suspenziyasining 10 va 100 mkl alikvotlarini tegishli antibiotikni o'z ichiga olgan agarlangan (1,5% agar) LB muhiti bilan Petri idishlariga eking. Transformantlar koloniyalari paydo bo'lguncha (odatda 12-24 soat ichida) 37 ° C da inkubatsiya qiling.

Nazorat savollari

1. Mikroorganizmlar gen muhandisligi qanday bosqichlardan iborat?
2. Gen muhandisligida mikroorganizmlarni xususiyatlarini o'zgartirish uchun qanday vektorlardan foydalaniladi?
3. Transformatsiyani qanday usullari bor?
4. Kimyoviy agentlar yordamida qanday tartibda transformatsiya qilinadi?
5. Elektroporatsiya qanday uskunalar orqali bajariladi?
6. Elektroporatsiya ketma-ketligini aytib bering.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Bergmans H.E.N., van Die I.M., Hoekstra W.P.M. Transformation in Escherichia coli: stages in the process // J. Bacteriol. 1981. V. 146. P. 564-570.
2. Bolivar F., Backman K. Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors // Methods Enzymol. 1979. V. 68. P. 245-267.
3. Bukau B., Brass J.M., Boos H. Ca²⁺-induced permeabilization of the Escherichia coli outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein dependent transport // J. Bacteriol. 1985. V. 163. P. 61—68.
4. Calvin W., Hanawalt P.C. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 2796—2801.
5. Chen I., Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 241-249.
6. Chung C. T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989. V. 86. P. 2172-2175.
7. Dreiseikelmann B. Translocation of DNA across bacterial membranes // Microbiol. Rev. 1994. V. 58. P. 293—316.
8. Farinha M.A., Kropinski A.M. High efficiency electroporation of Pseudomonas aeruginosa using frozen cell suspensions // FEMS Microbiol. Lett. 1990. V. 58. P. 251 — 255.

9. Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 166. P 557-580.
10. Hanahan D., Bloom FA Mechanisms of DNA transformation // *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. / Eds. FC. Neidhardt et al. Washington, D.C.: ASM Press, 1996. P. 2449—2459.
11. Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria//*Methods Enzymol.* 1991. V. 204. P. 63—113.
12. Hengen P.N. Methods and reagents. Preparing ultra-competent *Escherichia coli* // *Trends Biochem. Sci.* 1996. V. 21. P. 75—76.
13. HuangR., Reusch R.N. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P 486-490.
14. Huff J.P., Grant B.J., Penning C.A., Sullivan K.F. Optimization of routine trans-formation of *Escherichia coli* with plasmid DNA // *Biotechniques*. 1990. V 9. P. 570—577.
15. Inoue H., Nojima H, Okayama H High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. V. 96. P. 23-28.
16. KielJ.A., ten Berge A.M., Borger P., Vene ma G. A general method for the con-secutive integration of single copies of a heterologous gene at multiple locations in the *Bacillus subtilis* chromosome by replacement recombination // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P 4244-4250.
17. Kushner S.R. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids // *Genetic Engineering I* Eds. H.B. Boyer, S. Nicosia Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1978. P. 17—23.
18. Mandel M., Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infectiin // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 53. P. 159-162.
19. Sato Y., Kumazawa N., Yoshikawa K., Kurusu Y. Transformation of *Escherichia coli* mediated by natural phospholipids//*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. V. 69. P. 235-237.
20. SukharevS.I., Klenchin V.A., SerovS.M., Chemomordik L. V., Chizmadzhev Y.A. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells — the effect of DNA in-teraction with rlrctropnres // *Biophys. J.* 1992. V. 63. P. 1320—1327.

21. Swords W.E. Chemical transformation of *E. coli*//Methods Mol. Biol. 2003. V. 235. P. 49-53.
22. Weaver J.C. Electroporation — a general phenomenon for manipulating cells and tissts// J. Cell Biochem. 1993. V. 51. P. 426-435.
23. Weaver J.C., Chizmadzhev Y. Theory of electroporation: a review // Bioelec- troch. Bioener. 1996. V. 41. P. 135-160.
24. Wirth R., Friesenegger A., Fiedler S. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 216. P 175—177.

12-MAVZU. MIKROORGANIZMLARDAN GEN MUXANDISLIGI YO‘LI BILAN OLINADIGAN SANOAT VA FARMATSEVTIK MAHSULOTLAR.

Reja:

1. GM yordamida olinadigan monoklonal antitelolar
2. Trombolitiklar va antikoagulyantlar
3. GM yordamida olinadigan aminokislotalar
4. GM yordamida olinadigan gormonlar(insulin, somatotropin, eritropoetin)
5. GM yordamida olinadigan vaksinalar
- 6.GM yordamida olinadigan oqsillar(sitokinin, interferon)

Tayanch so‘z va iboralar: GM yordamida olinadigan fermentlar, gormonlar, vitaminlar, terapevtik oqsillar, insektitsid toksinlar, monoklonal antitelalar, aminokislotalar.

Hozirgacha rekombinant DNK yordamida dorivor modda sifatida ishlatiladigan yoki ishlatilishi mumkin bo‘lgan inson oqsillarining 400dan ko‘proq genlari klonlangan. Bu genlar asosan k-DNK ko‘rinishida.

VOZ mutaxassislarining hisob kitoblariga ko‘ra, inson oqsillari asosida, har yili 150 mlrd dollarga teng bo‘lgan dorivor moddalar ishlab chiqariladi va bu raqam yildan-yildan oshib bormoqda.

Rekombinant DNK texnologiyasining rivojlanishi, monoklonal antitelalar olish usullarini yaratilishi, immunoglobulinlarni

Molekulyar mikrobiologiya

strukturasini va funksiyasini aniqlanishi, spetsifik antitelolardan har xil kasalliklarni davolash uchun foydalanish imkoniyatini yaratdi.

Alohida olingan har bir antitela molekulasi har xil funksiyani bajaradilar, shuning uchun ham ularni genlari bilan ishlash osonlashadi.

Spetsifik antitelolar har xil sohalarda:

- toksinlarni neytrallash;
- bakteriyalarga qarshi kurashish;
- viruslarga qarshi kurashish;
- onkologik kasalliklarni davolash maqsadida ishlatish mumkin. Bu

esa, ularga bo'lgan qiziqishni yanada kuchaytiradi.

Antitelolarni o'zi boshqariladigan raketalar o'xshatadilar: chunki, ular "chegarani buzgan" begona antigenlarni neytrallaydilar yoki ular maxsus "qurollangan" bo'lsalar, butun mishen hujayrani buzib tashlaydilar.

Monoklonal antitelalar dorivor moddalar sifatida

Antitelani (immunoglobulinni) molekulasi- 2 ta "yengil" (L) va 2ta "og'ir" (N) oqsil zanjirlaridan iborat.

Bu zanjirlar bir-birlari bilan vodorod bog'lari va aniq joydan joy olgan disulfid ko'priklari bilan bog'langanlar. L- va N- zanjirlarning N-uchlari, antigen bog'lovchi sayt hosil qiladilar. Antitelolarni alohida qismlari (domenlar) har xil funksiyani bajaradilar.

Antigen bog'lovchi saytlar 3 qismdan tashkil topgan, bu qismlar antitelalarni antigenlarga komplementarligini (mos kelishini) (CRD) belgilab beradilar va L- va N- zanjirlarning N-uchlarida o'zgarib turuvchi qismlarini (Vn va V1) hosil qiladilar.

O'zgarib turuvchi oblastlardan (Vn va V1) tashqari, har bir L-zanjir bittadan o'zgarmas (konstantnaya) oblast yoki domen (S1), har bir L-zanjir esa, 3 ta o'zgarmas oblastlar yoki domenlar (Vn1, Vn2, Vn3) saqlaydilar.

Antitelalar proteolitik ferment-papain- bilan ishlov berilsa, 3ta fragment (bo'lak) paydo bo'ladi: 2ta (identichnyy) bir xil (Fab), va 1ta (Fc)si ularga o'xshamagan fragmentlar.

O'xshash fragmentlarni har biri intakt L-zanjir saqlaydilar. L-zanjir N-zanjirni Vn va Sn1 domenlari bilan disulfid ko'priklari orqali bog'langan bo'ladi.

Fc fragment esa, N-zanjirni Sn1 va Sn3 domenlari bilan disulfid bog'lari orqali bog'lanadilar.

Fab-fragment, to'g'rirog'i uning Fv – fragment deb ataladigan N-uchi, antigenni intakt molekulasiga xos bo'lgan antigen bog'lovchilik faolligiga ega bo'ladi.

Antigenni intakt antitela bilan bog'langanidan keyin immun javob ishga tushadi:

1. Kompliment tizimi (sistemi) faollashadi; bu tizimni komponentlari hujayra membranalarini parchalaydilar, fagotsitlarni faollashtirib, immun javob sistemasini boshqa komponentlarini ishga solib, signallarni tiklaydilar (generatsiya qiladilar).

2. Antitelani Fc-uchastkasini effektor hujayrani Fc-retseptori bilan bog'lanishi natijasida, hujayra sitotoksirligi orqali o'tadigan reaksiya ishga tushadi. Faolashgan effektor hujayra, begona hujayrani lizis qiladigan moddalarni bo'shatadi. Bu moddalar bilan antitela molekulasini Fab-uchastkasi bog'lanadigan bo'ladi.

3. Eriydigan antigen bilan Fab-uchastka bog'langandan keyin, antiteloni Fc-uchastkasi fagotsitlarni retseptorlariga bog'lanishi mumkin, ular esa, antigen-antiteloni ushlab olib, bu kompleksni parchalab yuboradi.

Dorivor moddalarni ta'sir etishi kerak bo'lgan joyga olib borish uchun bir necha usullardan foydalaniladi:

- Liposomalarga kiritish; bunda liposomalarni lipid qatlami kerakli organlarni hujayralari bilan yuqori darajada o'xshagan bo'lishi kerak;
- Maxsus toksinlarni genlarini shishini yo'qotadigan limfotsitlarga joylashtiriladi, oqibatda ular toksinlarni to'g'ridan-to'g'ridan shishni ichiga kiritib, chiqaradilar;
- Dorivor moddalar monoklonal antitelalarga yoki aniq hujayralarni sirtidagi oqsillarga nisbatan spetsifik bo'lgan monoklonal antitelalarni Fv – fragmentlariga bog'lanadi, masalan, shish hujayralari (rasm A).
- Dorivor moddalarni faol bo'lmagan shaklidan foydalaniladi va ularni tegishli fermentlar yordamida faollashtiriladi.

Mana shu faollashuv jarayoni mishen hujayrani to'g'ridan-to'g'ri yaqinida sodir bo'lishini ta'minlash maqsadida, ferment shu hujayrani antigenini sirtiga spetsifik bo'lgan monoklonal antitelo bilan bog'lanadi (rasm B).

A-Dorivor moddalarni molekulasini monoklonal antitelalarga ulangan;

B- monoklonal antitelaga dorivor moddani inert formasini faol formasiga aylantiruvchi ferment ulangan.

Molekulyar mikrobiologiya

Har ikkala holatda ham monoklonal antitelo, mishen hujayra sirtidagi spetsifik oqsil bilan bog'lanadi.

Trombolitiklar va antikoagulyantlar

Qonni ivitish sistemasi trombositlardan va ulardagi plastinkali faktorlar (adenozindifosfat, to'qima tromboplastini, serotonin, antiplazmin, fibropektin, trombospondin va boshqalar), jigar hujayralarida sintez bo'ladigan plazma oqsillari (protrombin, prokonvertin, antigemofil, globulinlar, trombotrofin, fibrinogen va boshqalar) dan iborat.

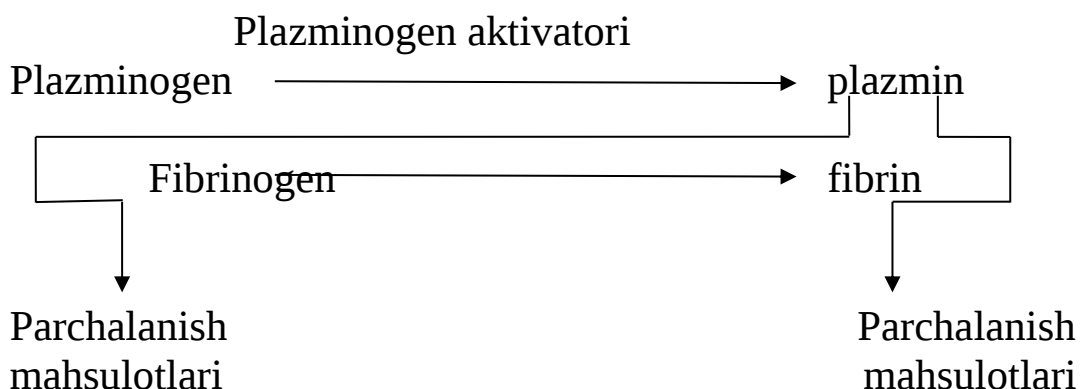
Ivishga qarshi (antisvertivayushaya) sistema qonda nafaol holatda uchraydigan (plazminogen) plazmin (fibrinolizin)- proteolitik ferment, qon plazmasini oqsillari (protein S, S fibrin hosil bo'lish jarayonini tormozlovchi antirombin III va endotelial hujayralar sintez qiladigan (prostasiklin, trombomodulin va h.k.) yoki fiksatsiya qiladigan (geparin) moddalardan iborat bo'ladi.

Bu ikkala sistemalar orasidagi tenglikni buzilishi natijasida yoki qon oqishi kuchayishi yoki tromba hosil bo'lishi yoki har ikkala jarayonlarni aralash holati kuzatiladi.

O'linga sabab bo'ladigan holatlar miya yoki yurak arteriyasini tromboemboliyasi hisoblanadi.

Ma'lumki, tromb- fibrin molekulasi (qon ivitish sistemasining faktori) dan iborat bo'lib, u qon tomirlarini devori shikastlanganda tarmoqlar (set) hosil qiladi.

Me'yorida hosil bo'lgan trombdagi fibrin molekulalari - plazmin deb ataladigan serin proteazasi ta'sirida eriydi. Plazmin esa, aktivator ta'sirida plazminogendan hosil bo'ladi (10-rasm).



10-rasm. Plazminogenni plazminga aylanishi (faollashuvi) hamda plazmin ta'sirida fibrinogen va fibrinni parchalanishi.

Mana shu biologik tizimni samarali ishlamasligi, arteriyani tiqilib qolishiga olib keladi. Shunday holatda qonni tarkibida plazminni miqdorini oshirish maqsadida davolovchi vosita sifatida plazminogenni aktivatori (APg) ishlatiladi. Ammo, plazmin fibrinni ajdodi fibrinogenni parchalash xususiyatiga ega (rasm), bu esa e'tibor qilinmagan hollarda, APg bilan davolash natijasida qondagi fibrinogenni miqdorini ham kamayib ketishiga, oqibatda esa, ichki qon oqishi sodir bo'ladi.

Fibringa spetsifik bo'lgan monoklonal antiteloga APg ulangan. Bu kompleks trombdagi fibrin bilan bog'lanadi, APg trombani yaqinida plazmin to'planishini chaqiradi va u o'z navbatida trombnı lızis qiladi.

Infarkt miokard, mozg va koronar arteriyalarnı tiqilib qolganida, o'pka embolıyasida, trombolitik terapiya uchun yangi tarkibli dorivor modda - to'qima tipidagi plazminogenni aktivatoridan (TAPg) foydalaniladi.

Odam plazminogeni molekulyar og'irligi 90 kDa ga teng bo'lgan bpr zanjirli glikoprotein bo'lib, uni qondagi miqdori 2 mkmol/l atrofida bo'ladi.

Plazminogen, juda kam miqdorda organlarda yoki to'qimalar tarkibida uchraydigan plazminogenni faollashtiruvchi tabiiy modda yordamida yoki bakteriyalar sintez qiladigan streptokinazalar yordamida plazminga aylanish xususiyatiga ega. APgni asosiy xususiyatlaridan biri- fibrinoliz jarayonida ishtirok etish xususiyatidir. Bu fermentlar, tabiiy trombolitik agentlar bo'lib, koronar va serebral trombozlar hamda o'pka tomirlarining trombozlariga qarshi kurashda katta ahamiyatga egalar.

Plazminogenni streptokinaza yordamida faollashuvini dastlabki bosqichida plazminogen-streptokinaza kompleksi hosil bo'ladi; keyin esa bu kompleks fermentlar yordamida plazminogenni faol plazminga aylantiradi.

Plazmin (fibrinolizin)- keng spektrli ta'sirga ega bo'lgan endopeptidaza hisoblanadi.

Plazminogen ham, plazmin ham 5 ta disulfid ko'priklar (-S-S-) saqlaydi va ularni hisobidan spetsifik domenlar hosil bo'ladi. Plazmin trombani sirtini lızis qiladi xalos (ko'proq venada), chunki, u qonda yetarli miqdorda uchrab turadigan antiplazmin bilan tez neytrallanib turadi.

Molekulyar mikrobiologiya

Fibrinni degradatsiya mahsulotlari- tromboplastin hosil bo'lishiga xalaqit beradi.

Ammo, plazmin qonni ivitish sistemasini faollashtirishi va qonni antifibrinolitik xususiyatini ko'tarishi ham mumkin. Shuning uchun ham u geparin bilan birga ishlatiladi. Plazmin tromblarni eritishdan tashqari, hujayrani bo'linishini kuchaytirish, hujayra sirtini ko'rinishini o'zgartirish, spetsifik proteazalarni faolashtirish, proinsulinni insulinga, proadenokartikotropinni AKTGga aylantirish xususiyatiga ham ega.

APg, molekulyar massasi enzimatik va serologik xossalariga, qon plazmasidagi fibrinni bog'lab olish xususiyatlariga qarab, 2 tipga: to'qima va urokinaza tiplariga bo'lingan.

To'qima tipdagi plazminogen aktivatori(TAPg)

TAPgni miqdori har xil organlarning to'qimalarida har xil bo'ladi: ayol bachadonining to'qimasidan olingan preparatni molekulyar massasi 69 kDa ga teng bo'lib, u molekulyar massasi 31kDa va 38 kDa bo'lgan 2 ta polipetid zandirlardan tashkil topgan; o'lgan odamni tomirlaridan ekstraksiya qilib olingan fermentni molekulyar massasi 60kDa va u molekulyar og'irligi bir-biriga yaqin bo'lgan 2 ta polipeptiddan tashkil topgan. Tabiiy APg ikki zanjirli yoki proteolitik degradatsiyaga uchragan bir zanjirli ko'rinishda ham uchirishi mumkin.

Tabiiy TAPgni hujayralarni o'stirish metodi yordamida olinadi. Preparat olishni asosiy manbai-odam melanomasi hujayralari hisoblanadi; bunday ferment-mTAPgni molekulyar massasi 72 kDa va o'stirish va tozalash sharoitlariga qarab bir yoki ikki zanjirli shaklda olinishi mumkin. Melanoma to'qimalaridan olinadigan TAPgni tozalash uchun affin xromatografiya usulidan foydalaniladi. Buning uchun bir necha affin sorbentlar sintez qilingan (konkanavalin A, n-aminobenzamidin, imidin sirka kislota, bor kislotasi, lizin bog'langan sorbentlar).

1980-yillarga kelib, TAPgni rekombinant preparatlarini (rTAPg) olish metodi yaratildi. Odamda TAPgni geni 8-xromosomada joylashgan. *E.coli*, *S.cerevisiae* va hayvon hujayralarida klongan TAPg genini mahsulot sanoat sharoitida ishlab chiqarilgan, keng klinik tadqiqotlardan o'tkazilib, trombolitiklar dunyo bozoriga chiqarilgan.

TAPgni tabiiy va rekombinant formalarini infarkt miokard trombolizisida va boshqa tipdagi trombolizlarda taqqoslab sinab ko'rilishi, ularni mutlaqo bir xil ta'sirga ega ekanligini ko'rsatgan.

Rekombinant TAPgni ishlab chiqarishda (uni alteplaza deb nomlangan) karvonboshi AQShning “Genentech” firmasi va “Boehringer Ingelheim”(bu firma alteplazani “activase” va “actilyse” nomlari bilan ishlab chiqariladi) firmalari hisoblanadilar.

Plazminogenni urokinaza tipidagi aktivatorlari

Urokinaza- plazminogenni aktivatori, insonni siydigida uchraydi, 2 ta polipeptid zanjirdan (A va B) iborat bo‘lib, bir-birlari bilan disulfid ko‘priklar orqali bog‘langanlar. Yuqori va past molekulyar massaga ega bo‘lgan urokinazalar ma’lum: 55 kDa va 34 kDa.

Preparatni inson buyragini embrion hujayralaridan olinadi. Urokinaza plazminogenni faollashtirib, uni plazminga aylantiradi. Urokinazani fibrinolitik xususiyati streptokinazadan balandroq. U fibrinoliz jarayonini trombaning ichida (endotromboliz) va uni sirtida (ekzotromboliz) amalga oshiradi. Klinik-farmakologik ta’siri bo‘yicha streptokinazaga yaqin turadi. Urokinaza, katta antigenlik xususiyatiga ega emas, shuning uchun ham undan foydalanish jarayonida allergik reaksiyalar kelib chiqish xavfi kamroq va qayta ishlatish ham ishlatish ham tavsiya etiladi.

Urokinazani bu zanjirli formasi proukinaza deb ataladi. Proukinaza urokinazani profermenti hisoblanadi. U har xil organlar va to‘qimalarda, shu jumladan qon plazmasida ham uchraydi. Proukinaza- bir zanjirli glikoprotein, 411 ta aminokislota qoldig‘idan tashkil topgan. Peptid bog‘laridan birini plazmin yordamida glikolizga uchrashi uni urokinazaga transformatsiya bo‘lishiga olib keladi.

Urokinaza tipidagi plazminogenni aktivatorlarini gen injenerligi metodi bilan olinishi katta ahamiyat kasb etadi. Proukinaza/urokinaza geni insonni 10-xromosomasida lokatsiya bo‘lgan. Klonlangan *E.coli* ga ekspressiya qilingan urokinaza genining mahsuloti, proteaza ingibitori bor yoki yo‘qligiga bog‘liq ravishda bir yoki ikki zanjirli bo‘lishi mumkin.

Rekombinant urokinaza (r-urokinaza), rekombinant prokinazani (r-proukinaza) va siydikdan ajratilgan tabiiy urokinazani qiyosiy o‘rganish, preparatni rekombinant formalari, tabiiy, tabiiy formasiga nisbatan yaxshiroq tromboselektivlik xususiyatiga ega ekanini va nisbatan ozroq qo‘shimcha belgilar chaqirishini ko‘rsatgan.

Streptokinaza- to‘g‘ri trombolitik ta’sirga ega bo‘lib, plazminogenni aktivatori hisoblanadi, 1-avlod trombolitiklariga kiradi.

Molekulyar mikrobiologiya

Streptokinaza tozalangan holatda oq rangli, hidsiz kukun bo'lib, suvda yaxshi eriydi. Molekulyar massasi 40-50 kDa atrofida.

Streptokinazani S gruppaga kiruvchi β -gomolitik streptokinazadan olinadi. Bu to'g'ri bo'lmagan fibrinolitik. Streptokinaza qonda aylanib turuvchi proaktivatorni aktivatorga, plazminogenni plazminga transformatsiya qiladi.

Streptokinaza preparati trombni ichiga kira oladi va uni ichiga fibrinolizni faollashtiradi. Ayni mana shu xususiyati bilan plazmindan farq qiladi.

Qonda aylanib yuradigan trombni parchalanishidan hosil bo'lgan mahsulotlar gipokaogulyatsiya chaqiradi, eritrotsitlarni va trombositlarni agregatsiyasini blokirovka qiladi, qonni yopishqoqligini kamaytiradi.

Streptokinaza trombolitik preparatlar orasida mustahkam joyga ega, uning mikroblardan olinishi hamda nisbatan yuqori bo'lmagan reaktogenligi bilan bog'liq.

Streptokinazaga nisbatan hosil bo'lgan antitelolar 6 oy mobaynida yo'qoladilar; bu oqsilni immunologik reaktogenligi streptokokk bilan kasallanganlarda namoyon bo'ladi.

Dunyo bozorida mikroblar streptokinazalari: kabikaza ("Kabi vitrum" firmasi), srteptaza ("Hoechest" firmasi), streptokinaza ("Smith kline" firmasi) nomi bilan savdoga chiqarilgan.

AQShni "Phillips Petroleum" firmasi streptokinazani *S. cerevisiae* va ekpressiya qilish metodini patentlaganlar. Achitqi zamburug'iga ekpressiya qilingan oqsil molekulyar massasi va faolligi bo'yicha *Streptococcus equisimilis* dan ajratib olingan streptokinaza bilan bir xil. Rekombinant DNK texnologiyasi srteptokinazani katta chiqim bilan olish imkonini yaratdi (1 l ozuqa muhitdan 1 g streptokinaza).

Rekombinant DNK metodi bilan streptokinaza genini tashuvchi vektor olingan va u bakteriya genomiga transformatsiya qilingan. Bu metod AQSH patenti bilan muhofaza qilingan.

Germaniyada streptokinazani fermentatsiya usulida olish patentlangan; gen injenerligi usuli bilan streptokinaza geni saqlaydigan plazmid olingan. Bu plazmidani *Streptococcus* hujayrasiga transformatsiya qilish orqali streptokinazani ekpressiyasi olingan. Bunday hujayralarni fermentatsiyasidan keyin, kultural suyuqlikdan molekulyar massasi 42 kDa ga teng bo'lgan streptokinaza ajratib olingan va tozalangan.

Streptodekaza- streptokinazani uzoq vaqt davomida ta'sir etadigan (prolongiravanny) preparati, immobillangan fermentlar guruhiga kiradi. O'rtacha terapevtik dozasini bir marotaba kiritilishi qonni fibrinolitik faolligini 48-72 soat ko'taradi.

Plazminogenni rekombinant to'qima aktivatori (aktilize)-glikoprotein bo'lib (endoteliy ishlab chiqaradigan endogen moddani to'liq analogi), u tizimli kiritilgandan keyin plazmada fibrin bilan bog'lanmaguncha nafaol shaklda bo'ladi. Preparat faollashgandan keyin, u plazminogenni plazminga aylantiradi va fibrin bo'lakchalarini erishiga olib keladi. Bunda, faqat tromb to'qimalarini fibrinolizi ortadi xolos.

Streptokinazani va plazminogenni atsilirlangan kompleksi

Streptokinazani va plazminogenni atsilirlangan kompleksi- (savdo nomi- eminaza)- 2 avlod trombolitik preprat bo'lib, u 1-marotaba Angliyani "Beecham" firmasida ishlab chiqarilgan va patentlangan. Kompleks tarkibiga kiruvchi atsil guruh trmbolitikni tabiiy ingibitor L2- antiplazmin inaktivativatsiya uchrashidan saqlaydi. Eminaza qonga tushishi bilan atsil guruhni gidrolitik kesilishi boshlanadi va faollashgan kompleks doimiy tezlikda ajralib turadi.

Kompleks, qonda paydo bo'lgan tuguncha- fibringa ta'sir qiladi, ammo fibrinogenga tegmaydi.

Trombolitiklarni qo'shimcha va xavfli ta'siri- to'satdan qon oqish jarayonini boshlanishi- eminaza ishlatilganda, ko'p kuzatilmaydi. Xalqaro klinik sinovlardan o'tgan eminaza bugungi kunda butun dunyoda trombolitik preparat sifatida keng ishlatilib kelinmoqda.

Trombolitik sifatida- TAPg va urokinaza saqlagan ximer (gibrid) molekulalar ham ishlatilib kelinmoqda. Bu gibrid molekulalar ham fibringa kuchli ta'sir ko'rsatadi va tromblarni lizisini kuchaytiradi.

Ximer molekulalar, oxirgi k-DNKni (bu k-DNK TAPgni oxirida amin saqlovchi fragmentni kodlaydi va fibringa nisbatan ko'rsatiladigan spetsifiklik uchun javob beradi) proukinazani oxirgi karboksil tutuvchi fragmentni kodlovchi, molekulani fermentativ xususiyatlariga javobgar bo'lgan k-DNK bilan qo'shilishidan hosil bo'ladilar.

Bu birikma har ikkila tomonlama uchun ham xarakterli bo'lgan, fibringa nisbatan spetsifiklikka ega; ammo bu preparatni davolash dozasi TAPgni va urokinazaga nisbatan 4 barobar kamroq. Dozani

Molekulyar mikrobiologiya

kamligini to'g'ridan-to'g'ri sababi, ximer molekulali preparatlarda qo'shimcha ta'sirni yo'qligi bilan tushuntiriladi.

Shveysariyaning "Ciba- Geigy" firmasi, TAPg, urokinaza va proukinazalarni fragmentlarini saqllovchi ximer molekulalarini konstruksiya qilgan va hayvon hujayralariga klonlashtirgan.

AQShda trombolitiklarni kerakli joyga yetkazuvchi gen injenerlik sistemasi yaratilgan. Trombolitik oqsilni tromba hosil bo'lgan joyga yetkazib beruvchi monoklonal antitelolarni tuzilishi o'rganilgan. TAPgni β -zanjirini hosil bo'lishiga javobgar bo'lgan genlar, antitelo sintez qiluvchi gibridomlarga kiritilgan. Bu sistema, fibrin to'planadigan joyga tanlab keltirilishi kerak bo'lgan oqsilni ekspressiya qiladi, bundan tashqari bunday faollashtirilgan oqsil plazmogenni faollashtirish xususiyatiga ham ega. AQShni "Genentech" firmasi ishlab chiqqan bu sistema katta muvaffaqiyat bilan ishlatilmoqda.

Antikoagulyantlar. Eng xavfsiz preparatlarga geparin va uning xosilalari kiradilar. Geparin qonni suyuq holatda ushlab turuvchi gumoral faktorlarga kirib, u kaogulyasiya tizimining deyarli barcha faktorlari bilan yuqori darajada bog'lanish xususiyati ega. Geparin, serin proteazalarni va fibrin tizimini ta'sirini neytralizatsiya qiladi. Neytralizatsiya jarayoni antitrombin III-geparin (AT- III-geparin) kompleksi hosil bo'lishi hisobidan amalga oshadi. Geparin preparati geterogen bo'lib, AT- III bilan yuqori va past darajada bog'lanish xususiyatiga ega bo'lgan fraksiyalardan tashkil topgan. AT- III-plazminogen aktivatorlarini ingibitorlari hisoblanadi.

Tibbiyotda past molekulali yoki fraksiyalarga ajratilgan geparin preparatlari-logiparin, fraksiparin, dalteparin, klivarin nomlari bilan ishlatiladi. Ularni II-avlod geparinlarga kiritishadi. Past molekulalari geparinlarni, yuqori molekulali geparinlarni bakterial geparinazalar yordamida fermentativ depolimerizatsiya qilish orqali tayyorlanadi. Geparin antiplazmin bilan kompleks hosil qilish hisobidan fibrinolitik sistemani faolligini oshiradi. Geparin endotelial hujayralarni sirtida va qon hujayralarida to'planadi va ularni membranalaridagi geparin miqdori qonning plazmidalaridagi geparin miqdoriga nisbatan 100 marotaba ko'proq konsentratsiyada bo'ladi. Aynan mana shuning uchun ham geparin endoteliya sirtiga va trombotsitlarga manfiy zaryad berib, tromblarni adgeziyasiga yo'l qo'ymaydi hamda agregatsiyaga uchragan tromblarni ajralib ketishiga olib keladi.

Past molekulali geparinlar kaogulyasiyaga ta'sir etmaydi, ya'ni ular qonni ivish vaqtini o'zgartirmaydi, ammo ularni terapevtik samarasi yuqori molekulalarnikiga nisbatan balandroq. Bu esa, geparin asosan trombositlarni agregatsiyasi va adgeziyasini chegaralab qo'yishini ko'rsatadi. Geparinni klinik samaradorligi bilan qonni ivish vaqtini ko'payishi orasidagi korrelyasiyani yo'qligi ham bu mexanizmni tasdiqlaydi.

Fragmin deb ataladigan antikoagulyant (bu preparatni shvetsiyaning "kvi vitrum" firmasi ishlab chiqaradi) ni standart geparindan, uning asosiy antikoagulyant faollikka ega bo'lgan fraksiyasini ajratib olish orqali tayyorlanadi. Bu preparatni yarim parchalanish davri uzoq bo'lganligi uchun ham, uni ir marotabalik, teri ostiga inyeksiya qilish orqali ishlatishga imkon beradi. Bu preparat antikoagulyantlik va trombolitik ta'siridan tashqari u, qonni tarkibidagi triglitseridlarni miqdorini pasaytirish xususiyatiga ega. Butun dunyo sog'liqni saqlash tashkiloti(VOZ) fragmindan yangi avlod antikoagulyantlarni klinik samaradorligi va xavfsizligini aniqlash bo'yicha xalqaro standart sifatida foydalanishga yo'llanma bergan.

Gollandiyaning "Organon" va Fransiyaning "Choy" firmalari organik sintez metodi bilan geparinni analogi - geparinoidni olish texnologiyasini yaratganlar, bu preparatni faolligini oligosaxaridlarni sulfatlangan shakllari belgilaydi.

Girudin- tibbiyot zulugining (*Hirudo medicinalis*) so'lak bezlaridan ajraladigan oqsil modda, to'g'ri va tez ta'sir qiladigan antikoagulyant. Uzoq yillardan beri kichik qon tomirlarini tromboemboliyasini davolash maqsadida ishlatilib kelinadi. Girudin trombinni kuchli va spetsifik ingibitori hisoblanadi va tez ta'sir etuvchi qonni ivishiga qarshi ishlatiladigan (protivasvertivayuschiy) preparatlar guruhiga kiradi, girudin fibrin iplarini hosil bo'lishi va to'planishiga qarshi ta'sirga ega. U trombalardagi fibrin bilan bog'langan trombinlarni inaktivatsiya qiladi. Girudinni bir-biriga yaqin bo'lgan bir necha ko'rinishlari ma'lum: HV1, HV2, HV3. ularni orasida HV1 yaxshi o'rganilgan. HV1 - molekulyar og'irligi 7000ga teng bo'lgan oqsil, uning tarkibida 65 ta aminokislota bor. Girudin faqat trombinni ingibirlaydi va tripsin hamda plazminga qarshi faollikka ega emas. Girudin- yurak, nafas olish yo'li va immun sistemaga ta'sir etmaydi.

Hozirgi paytda girudin rekombinant DNK texnologiyasi yordamida olinadi. Girudin geni *S. cerevisiae* ga ekspressiya qilingan

Molekulyar mikrobiologiya

(Fransiyaning “Fransdene” va “Sanofi” firmalari). Uni tozalash uchun VEJX- yuqori samarali suyuqlikda xromotogrifiya qilish usulidan foydalaniladi.

“Civa Geigy” firmasi girudinni qisman desulflangan variantini *S. cerevisiae* ga ekspressiya qilish metodini ishlab chiqqan. Birga sulfogruppasi bo‘lmagan rekombinant girudin antikoagulyantlik faoligi bo‘yicha geparindan baland turadi.

S va S oqsillar- antikoagulyant sistemaning muhim faktorlaridan hisoblanadi. S oqsili 1-marotaba 1960-yilda autoprotrombin II- α sifatida ta’riflangan va 1976-yil toza holda ajratib olingan.

S oqsili- glikoprotein, uning molekulyar massasi 62000, 2ta subbirlikdan tashkil topgan. Subbirliklar o‘zaro disulfid bog‘lar bilan bog‘langan, γ -karboksiglyutamin kislotaning 10 aminokislota qoldig‘ini saqlaydi.

S oqsili ivitish sistemasining vitamin Kga bog‘liq bo‘lgan ingibitori hisoblanadi. Qonda s oqsili miqdorini kamayib ketishi, trombozga olib kelishi mumkin. Bu oqsilni yetishmasligi irsiy va keyin qabul qilib olingan bo‘lishi ham mumkin: masalan, s oqsili yetishmaganda tromboflobit rivojlanishi mumkin. S- oqsilini defitsiti, jigar kasallanganda seziladi. Shu munosabat bilan S oqsili jigarda sintez bo‘ladi degan fikrlar ham bor.

S oqsili, S oqsilini kofaktori hisoblanadi va u bilan trombotsitlarni, endotelial va boshqa hujayralarni fosfolipidli membranalari sifatida faollangan kompleks hosil qiladi. Oqibatda S oqsilini katalitik xususiyati ortadi. S oqsili ham vitamin Kga bog‘liq hisoblanadi va manfiy zaryadlangan fosfolipidlarga nisbatan yuqori darajada bog‘lanish (srodstvo) xususiyatiga ega. S oqsili glikoproteid, uning molekulyar og‘irligi 69000.

Adenovirus kiritilgan buyrak hujayrasi kulturasi yordamida S oqsilni rekombinant formasini olish texnologiyasi yaratilgan (“Eli Lilly” firmasi. Tozalangan oqsilni 90% 2 subedinitalik va 10% bir subeditsalik oqsildan iborat faolligi bo‘yicha inson qonining plazmasidagi S oqsildan kam emas. S oqsilni gen injenerlik preparati ortopedik va abdominal jarrohlik, o‘pka emboliyasi kasalliklarni davolash uchun tavsiya qilingan.)

S oqsilni 2ta rekombinant gibridlari (antikoagulyant va fibrinolitik faolliklari) (Yaponiyani “Hoechst Japan” firmasi mahsuloti) infarkt va

miokard va operatsidan keyingi tormbozni davolash uchun tavsiya qilingan.

1982-yilda S oqsilni faollashtiruvchi yana bir kofaktor ajratib olingan va tavsiyalangan. Bu kofaktor (trombomodulin) endotelial hujayralarni membranalarida lokalizatsiya bo'lib, u trombotsitlarni aglutinatsiyasini va kaogulyatsiyasini kalsiyga bog'liq bo'lgan ingibitori hisoblanadi. Tromodulin-shoxlanmagan glikoproteini, uning molekulyar massasi 68000 - 77000 oralig'ida, 117 aminokislota qoldiqlaridan tashkil topgan. Tromobodulin strukturasi ajratib olingan va keyingi ekspratsiya orqali maymunni buyrak hujayralariga qlonlangan ("Asahi Chomical", Yaponiya firmasi).

Aminokislotalar

Aminokislotalar- tibbiyot amaliyotida, operatsiyadan o'tgan kasallarni davolash, markaziy asab tizimi kasalliklarini, oshqozon va 12 barmoqli ichak yarasi, jigar kasalliklarini (serotonin, asparagin, valin, gistidin, glitsin, glyutamin va glyutamin kislota, sistein) davolash uchun, oziq-ovqat sanoatida, ta'm va xushbo'ylik beruvchi moddalar, antioksidantlar va ozuqa qo'shimchalari (alanin, asparagin kislota, glitsin, glyutamin kislota, lizin, sistein) sifatida, qishloq xo'jaligida ozuqa qo'shimcha moddalar (lizin, treonin) sifatida, kimyo sanoatida-polimerlarni sintezi uchun dastlabki moddalar va kosmetik mahsulotlar ishlab chiqarishda keng ishlatiladi.

Dunyoda har yili 800ming tonna aminokislotalar ishlab-chiqarilib, ularni bahosi 5 mlrd dollardan ko'proqni tashkil qiladi, ishlab chiqariladigan aminokislotalarni yarmidan ko'prog'ini L-gltamin kislota tashkil qilib, u ta'm va aromat beruvchi modda- glyutamati natriy tayyorlashda ishlatiladi.

Sanoatda aminokislotalar asosan, oqsil gidrolizatlaridan ekstratsiya qilish yoki 2 ta spora hosil qilmaydigan, grammusbat tuproqda yashovchi bakteriyalar- *Corynebacterium* va *Brevibacterium* spp.larni metabolism mahsulotlaridan tozalash orqali olinadilar. Odatda, bu mikroorganizmlarni mahsuldorligini oshirish maqsadida mutagenez usulidan foydalaniladi. Mutagenez jarayonidan keyin muayyan aminokislota ko'proq sintez qiladigan shtammlarni tanlab olinadi. Ammo, bunday metod ko'p vaqt talab qiladi va uni samaradorligi unchalik ko'p emas. Bunga aliyernativ bo'lgan tadbir ma'lum biokimyoviy reaksiyani kataliz qiluvchi fermentlarni sintezini kodlovchi spetsifik genlarni ajratib olish va o'zgartirish hisoblanadi.

Molekulyar mikrobiologiya

Masalan, triptofan aminokislotasini olishni gen injenerlik usuli quyidagilardan iborat: *Corynebacterium glytamicum* (bu bakteriyani tabiiy shtammi triptofan sintez qiladi, ammo kam miqdorda) bateriyasiga triptofan sintezini chegaralab ko'yuvchi ferment, antranil sintetazani kodlovchi genni nusxasi kiritilgan.

Triptofan biosintezini yanada ko'tarish uchun *Corynebacterium glytamicum* hujayrasiga 3ta asosiy fermentlarni modifikatsiyalangan genlari kiritiladi (3-dezoksi-D-arabinogheptulozat-7-fosfat sintetaza, antranilat sintetaza va antranilatfosforibozil transferaza). Aminokislotalar sintez qilish uchun alternativ sifatida *E.coli* dan foydalanish mumkin.

Ma'lumki, hujayra, to'qima va organlarni funksiyalarini organizmni suyuq muhiti orqali boshqarib turuvchi muhim boshqaruvchi α 2-makroglobulin (MG) hisoblanadi. Bu oqsil proteolitik fermentlarni faolligini ingibirlash, sitokinlarni tashish, endotsitoz jarayonini boshqarish, qonni har xil hujayralarini kooperatsiyasida qatnashish, mikroorganizmlar va genlarni prezentatsiyasida qatnashish xususiyatiga ega. Odam qonini plazmasidan α 2-MGni tozalash (polietilenglikol bilan bo'lak-bo'lak cho'ktirish, amino almashtiruvchi va metalxelat afodin xromatografiyasi usullaridan foydalanilgan) natijasida, protezalarni ingibirlash xususiyatiga, o'ziga xos bo'lgan boshqaruvchanlik xossaga ega bo'lgan preparat olingan. Nativ holatdagi α 2-MG asosida barqaror, plazmin va interferon α -IF2 bilan to'liq biologik moslikka ega bo'lgan komplekslar olingan. α 2-MG-IF2 kopleks preparatini to'g'ridan-to'g'ri shishga kiritilishi ankologik amaliyotida istiqbolli usul sifatida ishlatilib kelinmoqda.

Kelib chiqishi qanday bo'lishidan kat'iy nazar tabiiy peptidlar universal hisoblanadilar, ular sut emizuvchi hayvonlarni organizmiga himoya vositasi sifatida ta'sir ko'rsatadilar, organizmni bosh sistemalaridan biri bo'lgan immun sistemasi ishini stimulyasiya qiladilar. Polipeptidlarni olish uchun qimmatbaho mag'sulot, gidrobiontlar hisoblanadilar. Gidrobintlardan olingan 1-preparat Ganglin deb atalib, u 1981-yilda "Biomed" ilmiy- ishlab chiqarish birlashmasida tinch okeanida yashovchi kalmarlarni gangliyasidan ultrafiltratsiya yo'li bilan tozalash va peptidlarni ajratish usullari orqali olingan. Ganglin 45ta peptidli fraksiya tutadi. Ganglinni immunomodullovchilik xususiyati, undan ikkilamchi immunodefitsitlarni har qanday turlarini davolashda ishlatish imkonini

beradi. Bu preparat immunitetni hujayra va gumoral bo‘lakchalarini boshqarish reaksiyalarini va organizmlarni nospetsifik rezistentligini PMYAL va makrofaglarni funksional faolligini kuchaytirish, T-limfotsitlarni hosil bo‘lishini, ularni differensiatsiyasini hamda funksional faolligini oshirish, qon zardobida spetik antitelalar sintezini tezlatish, autoimmun jarayonlarini rivojlanishini kamaytirish xususiyatiga ega bo‘lib, antigistaminlik, antiserotoninlik, shamollashga qarshi xususiyatlar ham namoyon qiladi.

Ganglin veterinariya uchun ozuqaga qo‘shimcha (modda) preparat sifatida ro‘yxatga olingan.

Molokin- deb nomlangan yana bir gidrobiont preparat lasos baliqlardan olinadi, bu preparat immun boshqarish faolligidan tashqari, gonadatropik xossasiga ham ega. “Biomed” IICHB birlashmasida yaratilgan vermin- tozalangan, steril, liofil quritilgan oqsil va peptidlarni aralashmasi bo‘lib, u Eisenia foetida deb atalgan chuvalchaglarni gomogenatidan olingan. Bu preparat zaharli emas, mutagenlik faoliyati yo‘q, oksidoreduktaza, tranferaza va gidrolaza faolliklariga ega. Vermin asosida tayyorlangan maz uzoq vaqt tuzalmaydigan yiringli yaralarni davolashda ishlatiladi.

L-askorbin kislotasining sintezi

L-askorbin kislota (vitamin S)ni olinishi, keyin, mehnatni ko‘p talab qiladigan jarayon bo‘lib, u bitta mikrobiologik bosqich va bir necha kimyoviy bosqichlarni o‘z ichiga oladi. U, asosan D-glukozadan olinadi. Bu reaksiya quyida keltirilgan:

L-askorbin kislotasining sanoatda olinishi: D-sorbitolni L-sorboza o‘tkazilishi, bakteriyasi ishtirokida amalga oshadi. Bu bakteriya sorbitol degidrogenaza fermentini sintez qiladi. Qolgan reaksiyalar-toza kimyoviy reaksiyalardir.

Oxirgi bosqiyada, 2-keto- L-gulon kislotasi(2-KLG), nordon sharoitda, L-askorbin kislotasiga aylanadi.

Har xil mikroorganizmlarni metabolizmlarini biokimyoviy izlanishlar, glyukozadan 2-KLGni *Corynebacterium* va *Crwinica herbicolalarni* birgalikda o‘stirish orqali olish mumkinligini ko‘rsatdi. Ammo bir mikroorganizm uchun tanlangan o‘stirish sharoitlari, ikkinchi mikroorganizmga to‘g‘ri kelmaydi, bu esa, mikroorganizmlardan bittasini o‘stirish muhitini tark etib ketishga majbur qiladi. Bunday holatlarda mikroorganizmlarni birin-ketin o‘stirish mumkin, ammo bunday jarayonni, doimiy qilish qiyin, chunki

Molekulyar mikrobiologiya

har xil mikroorganizmlarni o‘stirish, har xil sharoitlarni talab qiladi. Bu jarayonni quyidagi reaksiyada ko‘rish mumkin:

2-KLGni mikrobiologik sintezi: *Erwinia*, D-glyukozadan 2,5-DKG sintezini amalga oshiruvchi 3ta ferment sintez qiladi, *Corynebacterium* esa, 2,5-DKGni 2-KLGga o‘tkazuvchi ferment sintez qiladi. Mana shu yo‘l bilan glyukozadan askorbin kislotasi tayyorlash uchun kerak bo‘ladigan old mahsulotni, 2 mikroorganizmni hamkorlikda o‘stirib olish mumkin. D-glyukozani 2-KLGga aylantirib beradigan bitta mikroorganizm yaratishni eng oddiy yo‘li, *Corynebacterium*dan 2,5-DKG-reduktaza kodlaydigan genni ajratib olib, uni *Erwinia herbicola*ga o‘tkazishdir. Bu jarayon quyida aks ettirilgan.

Erwinia herbicola rekombinant bakteriyasi yordamida D-glyukozani 2-KLGga aylanishi. Bu jarayonda ishtirok etuvchi fermentlar E harfi bilan belgilangan va tegishli ravishda raqamlar bilan ko‘rsatilgan.

Erwinia herbicolani transformatsiya qilingan hujayralari D-glyukozani to‘g‘ridan-to‘g‘ri 2-KLGga aylantirib beradilar. Bunda *Erwinia herbicolani* ichki membralarida lokalizatsiya bo‘lgan fermentlari, glyukozani 2,5-DKG(2,5-disktoglyukan kislotaga), sitoplazmada joylashagan 2,5-DKG-reduktaza esa, 2,5-DKGni 2-KLGga aylanish jarayonini kataliz qiladi. Demak, genetik manipulyasiya yordamida, har xil mikroorganizmlarda o‘tadigan metabolik reaksiyalarni bitta organizmda to‘plash imkonini yaratildi. Bu gibrid kombinerlangan metabolik yo‘lda sodir bo‘ladigan oxirgi mahsulotni sintez qilish imkoniyatiga ega bo‘ldi. Shunday qilib, bu gibrid organizm, hozirgacha L-askorbin kislotasi tayyorlashda keng ishlatilib kelinayotgan 3 bosqichli reaksiyani ya‘ni D-glyukozadan 2-KLG olish reaksiyasini bir o‘zi bajaradigan biologik fabrikaga aylanib koddi.

Gormonlar Insulin

Insulin oshqozon osti bezining Langergans orollaridagi β -hujayralarda sintez bo‘ladi, shu hujayralardan ajratib olingan m-RNKni 70% i, aynan mana shu oqsil kodlaydi.

Odam insulini- molekulyar ohirligi 5808ga teng bo‘lgan polipeptid, 51ta aminokislota qoldig‘idan atshkil topgan. Bir-birlari bilan disulfid bog‘lar bilan bog‘langan 2ta subbirlikdan iborat. Subbirliklarni bittasi 21ta aminokislota qoldig‘idan (A-zanjir), 2-si esa

30ta aminokislota qoldig'idan (V-zanjir) tashkil topgan. (zanjirlarni aminokislota tarkibi xo'jayin vidospetsiyafichen). Insulindan oldingi mahsulot (proinsulin) β -hujayralarni ichida DNK ishtirokida va RNK bilan boshqarib turadigan mexanizm asosida sintez qilinadi. Proinsulinni uzun zanjiri, golji apparatida granulada qadoqlanadi (to'planadi) va o'sha joyda, gidrolizga uchrab, 4 ta aminokislotasini yo'qotadi va insulinga aylanadi. Bu jarayonda, S-peptid deb nomlangan bog'lovchi pigment ham hosil bo'ladi. Insulin va S-peptid ekvivalent konsentratsiyada, insulinni sekretsiyasini kuchaytiruvchi moddalarga javoban (glyukoza, mannoza va ba'zi aminokislotalar: arginin, leysin) sekretsiyaga uchraydilar. Shuningdek, unchalik ko'p bo'lmagan miqdorda nativ holatdagi hamda qisman parchalangan proinsulin ham sekretsiya bo'ladi. Bu modda unchalik ko'p bo'lmagan gipoglikemik ta'sirga ega. β -hujayralarni granulalarida insulin 2 atom sink va 6 molekula insulindan iborat bo'lgan kristall ko'rinishida to'planadi.

Umuman olganda, odamni oshqozon osti bezi, 8 mggacha insulin saqlaydi, bu esa, taxminan 200 biologik birlikka teng (yedinitsa miqdori, preparatni massasi bo'yicha aniqlanadi, analitik maqsadlar uchun ishlatiladigan insulin standarti- 28 Yed/mgni tashkil qiladi.)

Insulin nuklein kislotalar, oqsillar biosintezi, uglevodlar, lipidlar almashinuvi va yuqori energetik birikmalarni hosil qilish kabi jarayonlarda ham faol ishtirok etadi. Insulin organizmda karbon suvlarni almashinuvini boshqaradi, to'qimalarni glyukoza yutishini kuchaytiradi va uni (glyukozani) glikonga aylanishiga yordam beradi hamda glyukozani hujayra to'qimalariga kirishini yengillashtiradi. Shakarli diabet kasalligini davolovchi spetsifik dori sifatida, insulin geperglikemiyaning va glyukozuriyaning pasaytiradi, mushak va jigarda glikogenlarni to'planishiga yordam beradi, glyukozani hosil bo'lishini kamaytiradi, diabetli lipimiyani yo'qotadi, kasalni umumiy holatini yaxshilaydi. Kasal odamni sog'lom odamdan birdan-bir farqi shundaki, sog'lom odam bu gormonni oshqozon osti bezidan oladi, kasal esa, shifokor yordamida tashqaridan qabul qiladi.

I - tipdagi qandli diabet- insulinga bog'liq bo'lgan diabet kasalini soni mamlakatimizda bir necha yuz minglar bilan sanaladi. Bu kasallik yurak-qon-tomir va boshqa kasalliklar bilan birga, keng tarqalgan og'ir kasalliklar qatoriga kiradi va erta invalid bo'lib qolish va hatto o'limga ham sabab bo'ladi.

Molekulyar mikrobiologiya

II - tipdagi diabet- insulinga bog'liq bo'lmagan diabet- kasallikni yengilroq shaklini tashkil qiladi. Bu tipdagi kasallik bilan to'la (semiz) odamlar ko'proq kasallanadilar.

Insulinni ochilish tarixi- russ vrachi I.M. Sobolev nomi bilan bog'liq (XXI asrni ikkinchi yarmi). Bu olim, inson qonidagi shakarni miqdori, oshqozon osti bezida sintez bo'ladigan maxsus gormon bilan boshqarilib turilishini isbotlab bergan.

1922-yili Kanadaning Toronto shahri klinikalaridan birida hayvonlarni oshqozon osti bezidan ajratib olingan insulin birinchi marotaba diabet bilan kasallangan, 10 yoshli o'g'il bolani qoniga yuborilgan. Natija yaxshi bo'lganini sezgan, amerikasi "Eli Lilly" firmasi oradan bir yil o'tar-o'tmas, hayvon insulinini ishlab chiqarishni boshlagan. Yirik shohli hayvonlarni va cho'chqalarni oshqozon osti bezilari katta-katta "qushxonalarda" tajribali hodimlar tomonidan ajratib olingan va tezlik bilan muzlatilgan(-70°S) va maxsus vagon-refrejeratorlarda ixtisoslashgan farmatsevtika korxonalariga yuborilgan. U joyda bezdan gormon ajratib (ekstraksiya qilib) olingan.

Yirik shohli hayvonlarni oshqozon osti bezini og'irligi, o'rtacha 200-250g bo'lib, 100g kristall holatdagi insulin olish uchun 1000-1200kg bez kerak bo'ladi.

Ho'kizni oshqozon osti bezidan ajratilgan insulin, cho'chqanikiga qaraganda, inson uchun ko'proq antigenlik xususiyatiga ega. Insulinni sanoat sharoitida ishlab chiqarilgandan keyin, bir necha yil davomida uni ajratib olish va tozalash bo'yicha, ilmiy va amaliy ishlar olib borilgan va nihoyat undan I-tip diabet kasalligini davolash maqsadida foydalanishga ruxsat berilgan. Qon tarkibidagi glyukozani to'g'ri (mos, bir xil) nazorat qilish uchun, teri ostiga bir sutkada 4 marotaba insulin yuborish kerak bo'lgan.

1935-yil daniyalik tadqiqotchi Xagedorn insulinni organizmdagi ta'sirini optimallashtirishga erishgan. U ta'siri uzoqroq davom etadigan (prolongatsiya qilingan)-protamin-sink-insulin ishlab chiqqan va bu preparatdan sutkasiga bir marotaba foydalanish kifoya bo'lgan.

1952-yilda birinchi marotaba insulin kristall holatda olingan; gormonlarni tozalash metodlarini rivojlanishi (immunoelektroforez, yuqori samarali suyuqlik xromotografiyasi-VEJX va h.k.), insulinni gomogen holatda ajratib olishga imkon berdi va bunday preparat bir komponentli insulin nomi bilan chiqariladigan bo'ldi.

1954-yil angliyalik bioximik G. Sendjer-insulinni strukturasini aniqlagani uchun nobel mukofotiga sazovor bo'ldi.

1963-1965-yillarda insulinni har ikki zanjiri sintez qilindi hamda ularni disulfid bog'lar bilan bog'lanishi amalga oshirildi.

1970-yillarda A. Yudayev va S. Shvachkmnlr insulinni sintezini amalga oshirdilar. Ammo, bunday qimmat va murakkab sintezni ishlab chiqarishga tadbiiq qilish norentabel deb topildi.

O'tgan asrni ikkinchi yarmida, asosan 1970-yillardan keyin, insulinni o'ta toza holatda olish bo'yicha juda katta ishlar qilindi, bu esa insulindan allergiya bo'lish muammosini, buyrak va ko'z faoliyatini buzilishini, insulinga immun rezistentligini ijobiiy hal qidishga imkon yaratdi.

1980-yillargacha asosan, yirik shohli hayvonlar va cho'chqani oshqozon osti bezidan olingan insulindan foydalanib kelingan. Yirik shoxli hayvonlarni insulini odam insulinidan 3ta aminokislota qoldig'i bilan, cho'chqa insulini esa, bitta aminokislota qoldig'i bilan farq qiladi. Shakarli diabetni davolashda eng samaraliroq gormon-gomologik insulin, ya'ni odam insulini hisoblanadi

1980-yilda Daniyaning "Novo" nomli farmatsevtika kompaniyasi cho'chqa insulini farmatsevtik yo'l bilan odam insuliniga aylantirish usulini ishlab chiqqan. Bunda, insulinni V zanjirini 30-joyidan-joy olgan aminokislota alaninni treoninga almashtirilgan va olingan mahsulotni xromotografiya yo'li bilan tozalangan va natijada 99% tozalikka ega bo'lgan bir komponentli odam insulini olingan.

Molekulyar biologiyani yutuqlaridan foydalanib, insulinni Langergans orollarini β -hujayralarida quyidagi bosqichlar asosida biosintez bo'lishi aniqlangan:

- gormonni strukturasii haqidagi kodlangan axborot, insulin genida (DNKni bir qismida), 11-xromosomada aniqlangan;

- glikoza va ba'zi bir boshqa moddalarni, stimullovchi ta'siri natijasida, bu axborotni RNK-polimeraza insulin genidan m-RNK ko'rinishida ribosomalarga ko'chirib o'tkazadi va u joyda (ribosomada) aminokislotalarni bir-birlariga bog'linishi va oqsil hosil bo'lish jarayoni amalga oshadi;

- Ribosomalarda restriktazalar ta'sirida 109ta aminokislotalardan tashkil topgan polipeptid zanjiri-preproinsulin sintezlanadi va natijada bir necha yuzdan, bir necha minggacha nukleotiddan iborat bo'lgan fermentlar hosil bo'ladi;

Molekulyar mikrobiologiya

-Oshqozon osti bezining β -hujayralarida preproinsulin sintezi jarayonida, oldinda joylashgan 23 aminokislotalar molekulani hujayra membranasidan o'tkazib qo'yadi. Keyin bu aminokislotalar fermentlar yordamida uziladilar va 86ta aminokislotadan iborat bo'lgan proinsulin hosil bo'ladi.

Proinsulin shunday o'raladiki, unda molekulani 2 uchi (N- va C-uchlari) bir-birlariga yaqin joylashib qoladilar, molekulani markaziy qismi, fermentlar ta'sirida uzib tashlanadi; markaziy qismni asosiy roli insulinni 2 zanjirini to'g'ri joylashishini ta'minlashdan iborat.

Buyuk Britaniyada *E.coli* yordamida odam insulinini har ikkala zanjiri sintez qilingan va keyin ular bir-birlariga ulanib, biologik faol moddalar olishga erishilgan. Bir hujayrali organizm o'zining ribosomalarida insulin molekulasini sintez qila olishi uchun, uni kerakli dastur bilan ta'minlash, ya'ni unga gormon sintez qila oladigan gen kiritish kerak.

Kimyoviy yo'l bilan (bu ishni bioximiklar bajaradilar) insulinni predshestvennikini biosintez qila oladigan dastur yoki insulinni α - va β -zanjirlarini sintez qilaoladigan 2 ta gen olish kerak.

Keyingi bosqichda- insulinni (yoki insulin zanjirlarini, alohida-alohida) predshestvennikini genini *E.coli* ni genomiga kiritish. (Bu tadqiqotlarda *E.coli* ni laboratoriyada o'stirilgan alohida shtammlaridan foydalaniladi); bu ishlarni gen injeneriyasi bajaradi. *E.coli* dan tegishli restriktazaga ega bo'lgan plazmida ajratib olinadi. Kimyoviy yo'l bilan sintez qilingan sintetik gen plazmidaga kiritiladi (buning uchun *E.coli* ni β -galaktozidazasining funksional faol S-uchini klonlanadi). Natijada *E.coli* galaktozidaza va insulindan tashkil topgan oqsil zanjirini sintez qilish imkoniyatiga ega bo'lib qoladi. Sintez bo'lgan polipeptidlarni ferment molekulasidan kimyoviy yo'l yordamida kesib olinadi va keyin uni tozalash ishlari bajariladi. Bakteriyalarda, bir bakteriya hujayrasida 100000 ga yaqin insulin molekulalari sintez bo'ladi.

E.coli sintez qiladigan gormonal moddalarini tabiati, bir hujayrali organizmlarni genomiga qanday gen kirishi bilan belgilanadi. Agar, insulinning predshestvennikini geni klonlangan bo'lsa, bakteriya insulinining predshestvennikini sintez qiladi va u, keyin ta'sirga uchrab, prepeptid ajralib tushadi va biologik faol insulin hosil bo'ladi. Tozalangan holda predshestvennikini insulinini olish uchun, biomassadan ajratib olingan gibrid oqsil ximiko-fermentativ transformatsiyaga uchratiladi va tegishli xromotografik tozalash

tadbirlari (frontal, gelfiltratsiya, anionalmashish va h.k.) o'tkaziladi. Rossiyada (RAN Biorganika instituti) *E.coli* ni gen injener shtamlari yordamida rekombinant insulin olingan. Buning uchun bakteriya biomassasidan gibril oqsil- predshestvennik ajratib olinadi. Bu oqsil o'zini tarkibida (umumiy hujayra oqsilga nisbatan) 40%gacha preproinsulin saqlaydi. In vitro sharoitida preproinsulinni insulinga aylanishi, yuqorida keltirilgan ketma-ketlik asosida amalga oshiriladi. Ya'ni, In vitro-etakchi polipeptid kesib tashlanadi va preproinsulin insulinga aylanadi. Ammo, preproinsulinni insulinga aylanishi oksidlangan sulfitoliz bosqichi va 3ta disulfid bog'larini qaytarilib ulanishi hamda, bog'lovchi S-peptidni kesilishi orqali sodir bo'ladi. Bir qator xromotografik tozalash tadbirlaridan keyin (ion almashinuv, gelfiltratsiya, VEJX(yuqori samarador suyuq xromotografiya va h.k.) yuqori tozalikka va tabiiy faollikka ega bo'lgan odam insulini olinadi.

Affin xromotografiya metodidan foydalanish, preparat tarkibidagi, insulinga nisbatan yuqori molekulali og'irlikka ega bo'lgan oqsillardan qutilishga olib keldi. Bunday oqsillarga proinsulin va qisman parchalangan proinsulinlar kiradilar va ular antiinsulinli antitelolarni hosil bo'lishini kuchaytirish xususiyatiga egalar. Insulinni standartizatsiyasi, uni odatdagi, 1%dan ko'proq proinsulin saqlaydigan monotsikli-0,0005% va monokomponentli-0,001%dan kamroq proinsulin saqlaydigan preparatlarga ajratishga sabab bo'lgan.

Davolashni boshidan odam insulindan foydalanish allergik reaksiyani kelib chiqishini mimumlashtiradi. Insulin bilan davolashni asorati-gipoglikemik holat (shakar miqdorini kamayib ketishi), insulinni miqdorini oshib ketishidan kelib chiqadigan belgilar-markaziy asab sistemasining buzilishi (o'zini boshqacha tutish) komagacha olib keladi.

"Eli Lilly" kompaniyasi odam insulini ishlab chiqarishda rekombinantli DNK texnologiyasidan foydalaniladi. Bunda odam proinsulini k-DNKsi *E.coli* yoki *S.cerevisiae*ga kiritilgan va biosintez natijasida hosil bo'lgan proinsulin insulingacha gidrolizlanadi. Bu firma, "Ximulin" nomi bilan insulin chiqaradi. Tibbiyot amaliyotida "Ximulin" guruhiga kiruvchi bir qator preparatlar: Ximulin ("Eli Lilly")- muntazam, NPX, lente, ultalente va ularni kombinatsiya qilingan tadbirlardan foydalaniladi.

Odam insulini tez adsorbsiya bo'ladi va preparatni shaklidan qat'iy nazar, hayvon insulini nisbatan qisqa vaqt ichida ta'sir ko'rsatadi.

Molekulyar mikrobiologiya

Odam insulini cho'chqa, ho'kiz va ayniqsa bu ikki insulinlarni aralashgan shakllarga nisbatan kamroq allergenlikka ega.

Insulin molekulasida, uning fizik-kimyoviy va biologik xossalari uchun katta ahamiyatga ega bo'lgan uchastkalar borligi aniqlangan. Bu uchastkalarni aminokislota ketma-ketligiga mutatsion o'zgarishlar kiritilganda, molekulani xossa va xususiyatlari tubdan o'zgaradi. Insulinni β -zanjirini modifikatsiya qilib, gormonal faolligi, tabiiy insulinga nisbatan baland bo'lgan analoglari yaratilgan.

Gen injenerli insulinni sifatini nozorat qilish rekombinant shtammni va plazmidani stabilligini xarakterlovchi, preparatda begona genetik materialni yo'qligi, hamda ekspressiya bo'ladigan genni bir xilligini va boshqa xususiyatlarni (hammasi bo'lib, 22ta ko'rsatgich) qo'shimcha kuzatishni o'z ichiga oladi.

Hozirgi vaqtda, meditsina amaliyotida 3tipga mansub insulinlar ishlatiladi:

- qisqa ta'sir etuvchi va tez samara ko'rsatuvchi preparatlar;
- o'rtacha ta'sir doimiyligiga ega bo'lgan preparatlar;
- uzoq ta'sir etuvchi va sekin samara ko'rsatuvchi preparatlar.

Qisqa ta'sir ko'rsatuvchi insulin- neytral pHda ishlaydigan, kristall holatdagi sink-insulin bo'lib, uni samarasi teri ostiga yuborilgandan keyin minut oralig'ida namoyon bo'ladi va 5-7 soat davom etadi.

Ta'sir davrini uzaytirish maqsadida ko'plab boshqa insulin preparatlari modifikatsiya qilingan va ular neytral muhitda eritilganda suspenziya hosil qiladilar. Ular fosfatli buferda protamin saqlaydilar- protamin- sink-insulin va (NPX-xagedor neytral protamini bilan bog'langan holda)-NPX-insulin yoki atsetatli buferda sinkni har xil konsentratsiyasi saqlangan holda- ultralent, lent, semilent insulin nomi bilan bozorga chiqarilganlar.

Ta'sir davomiyligi o'rtacha bo'lgan insulinlar protamin saqlaydilar. Protamin-forel balig'idan olinadigan oqsil bo'lib, unda arginin miqdori ko'p, uning o'rtacha molekulyar og'irligi esa, 4400ga teng. Kompleks hosil qilish uchun protamin va insulin 1:10 nisbatda olinadi. Terini ostiga kiritilgandan keyin, organizmni proteolitik fermentlari protamini parchalaydilar va insulin organizmga so'riladi.

NPX unga aralashtiriladigan muntazam- farmakologik profilini o'zgartirmaydi. NPX-insulin, davolovchi aralashmalarda o'rtacha ta'sir davomiyligiga ega bo'lgan komponent sifatida, insulin lentega nisbatan biroz bo'lsada ustuvorlikka ega.

Fosfatli buferda barcha insulinlar (cho'chqa, ho'kiz, odam) sink bilan kristallar hosil qiladilar, ammo faqat ho'kiz insulinini yetarlicha gidrofoblikka ega. Aynan, gidrofoblik insulinini sekin va barqaror ajralib turishini belgilaydi. Ultralent insulin shunday xususiyatga ega. Cho'chqa insulinini sinkli kristalli tezroq eriydi, samarasi oldinroq seziladi, ammo ta'sir etish davri qisqa. Shuning uchun faqat cho'chqa insulinidan tashkil topgan ultralent preparati yo'q. Ko'p komponentli cho'chqa insulinini, insulin-suspenziya, insulin-neytral, insulin-izofal, insulin aminoxinurid nomlari bilan chiqariladi. Insulin lente- 30% insulin semilente (insulinini sink nomi bilan atsetat buferdagi amorf holatdagi cho'kmasi, uni samarasi tez boshdanadi) bilan 70% insulin ultralente (yomon eriydigan kristall holatdagi sink insulin, ta'siri sekin boshlanib, uzoq davom etadi)ning aralashmasidan tayyorlangan. Bu ikki komponent, nisbatan tez absorbsiya va barqaror ta'sirga ega bo'lgan kombinatsiyadan iborat bo'lganligi sababli, insulin-lenteni juda qulay terapevtik preparat sifatida ta'sir etishini ta'minlaydi.

Insulinini aerosol sifatida burunni shilliq qavatiga yuborilganda, plazmada gormonni samarali miqdori tez ko'tariladi, ammo uzoq vaqt davomida bu usuldan foydalanib bo'lmaydi, chunki shilliq qavatga zaharli ta'sir ko'rsatadi.

Somototrop gormon(STG) yoki odamni o'stirish gormoni

STG- 191 aminokislotadan tashkil topgan peptid tabiatli gormon bo'lib, gipofizni oldingi bo'lagidan sekretsia bo'ladi. Bu gormon birinchi marotaba 1963-yilda o'liklarni gipofizidan ajratilgan va tozalangan. Bu gormonni yetishmasligi gipofizar past bo'ylikka (karlikka) olib keladi. Bunday kasallik 1 mln odamdan 7-10ta holatga to'g'ri keladi. G'arb mamlakatlari bolalarida bu holat har 5000 odamdan bittasiga to'g'ri keladi. Gormon turspetsifiklikka ega bo'lib, bu gormon yetishmagan holatlarda yagona davolash vositasi hisoblanadi. STGni 10mg/kg mushaklar orasiga bir yil mobayida haftasiga 3 marotaba in'eksiya qilinganda, davolashni birinchi yilida 6smga o'sish kuzatilgan.

Yanada sezilarli natijalarga erishish uchun gormon bilan davolashni 4-5 yoshdan boshlab, balog'at yoshiga yetguncha, hatto undan ham keyinroqqacha davom ettirish kerak. Bitta o'likdan 4-6mg samototropin olish mumkin (oxirgi, farmatsevtik preparatga hisoblaganda). STG ishlab chiqaruvchi yirik kompaniyalarni farmatsevtik preparatlarni umumiy miqdori, rivojlangan mamlakatlarda

Molekulyar mikrobiologiya

uchraydigan gipofizar karlikni uchdan biriga yetishi mumkin xalos, somatotropinni yetishmasligi bu gormondan yana boshqa kasalliklarni (qiyin bitadigan sinish, kuyish, yara, gemoezni buzilishi) davolashda ham ishlatilishi mumkin ekanligi aniqlangandan keyin yanada sezilarli tus oldi.

Bundan tashqari o'likni gipofizidan ajratib olingan gormonni geterogenligi tufayli, qo'shimcha muammolar ham paydo bo'ldi. Gormonni ajratish va tozalash usullarini mukammallashtirilganiga qaramasdan, 5% kasallarda (gormon qabul qilingan) antitelolar paydo bo'ldi va ular gormonni biologik faolligini yo'qqa chiqardi. Bundan tashqari, gipofizdan ajratilgan material, ba'zida juda uzoq davom etadigan inkubatsion davrga ega bo'lgan neyrotoksin xususiyatli virus bilan zararlangan chiqadi, bu esa, STG qabul qilgan bolalarni ko'p yillik tibbiyot nazoratida bo'lishini talab qiladi. STG preparatlarida uchraydigan viruslar juda ko'p holatlarda o'limga sababchi bo'lgan. 1985-yildan boshlab VOZ (Butun dunyo sog'likni saqlash tashkiloti) odam gipofizidan ajratilgan gormondan foydalanishni bekor qildi.

Somatrop deb nom olgan rekombinant somatotropin, odam insulinidan keyingi 2-biosintetik farmatsevtik preparat bo'ldi.

1980-yil "Genentech" firmasi birinchi bo'lib, biologik toza, virus saqlamaydigan STGni ishlab chiqardi. *E.coli* ni genetik konstruksiya qilingan hujayralarda sintez qilingan gormon, gipofizdan ajratilgan ajratilgan gormondan molekulani N-uchida metionin saqlashi bilan farq qiladi. Bu gormon gipofizdan ajratilgan STGga nisbatan ham yuqori biologik faolikka ega. Bunga sabab, rekombinant gormonni yuqori darajada tozaligidir. Bu gormon ta'sirida, gipofizar karlikka ega bo'lgan bolalarda yiliga 8-18sm o'sish ro'yxatga olingan. Bu ko'rsatgich gipofizdan olingan gormonga nisbatan bir necha marotaba ko'proqni tashkil qiladi.

Birinchi bosqichda, ikki zanjirli DNK-nusxali m-RNK klonlangan va restriksion endonukleazalar bilan parchalash natijasida, birinchi joylashgan 23 aminokislotadan tashqari barcha ketma-ketlikni kodlaydigan gen olingan.

Ikkinchi bosqichda, 1-dan 23-gacha aminokislotaga mos keladigan sintetik polipeptid klonlangan.

Keyingi ikki fragment bir-biriga qo'shib, promotorlar juftligiga promotor-RNK-polimerazani transkripsiyasini initsiatsiyasi uchun zarur bo'lgan DNKga spetsifik ketma-ketlik va ribosomani bog'lovchi

uchustkasiga mos ravishda “quritilgan”. Mana shu texnologiya asosida 1ml *E.coli* ni kulturasidan 2,4mkkgacha gormon olingan.

Bakteriya sintez qilingan STG kerakli molekulyar og‘irlikka ega va hech qanday bakteriya oqsili bilan aralashmagan. STGni aminokislota ketma-ketligini, ya’ni uni birlamchi strukturasini o‘zgartirib, (uni kodlaydigan genini modifikatsiya qilish orqali), bakteriya hujayrasida molekulani faol uchastkasini o‘rganishga yordam beradigan gormonni analoglarini sintez qilish ham mumkin (masalan, o‘rishni kuchaytiruvchi yoki noyegyukogezga ta’sir etuvchi uchastkalar).

Rekombinant DNK metodini ishlatib, boshqa o‘stiruvchi faktorlar va to‘qimalarni differensirovka qiluvchi faktorlar sintez qilish ham mumkin. Buning uchun dastlab ularni m-RNKlari ajratib olinadi, keyin tegishli gen ajratiladi. Bunday texnologiya somatomedin Aga tegishli bo‘lib, u, tog‘ay to‘qimalarida oltingugurti fiksatitsiyasini stimullaydi va uni hosil bo‘lishi somatotropin bilan induksiya qilinadi.

1982-yil 44ta aminokislotalardan tashkil topgan polipeptid sintez qilingan edi. Bu polipeptid somatotropinni gipotolomik riziling-faktorini (STG-RF) biologik faolligiga ega. STG-RFni organizmga kiritilishi somatotropin yetishmovchiligini to‘liq kompensatsiya qiladi. U nafaqat gipofizar karlikni, diabetni ba’zi formalarini davolashda hamda to‘qimalarni regeneratsiyasida ham yaxshi natijalar beradi(kuchli quygan hollarda).

Somatotropin gormonini olish.

Gormonning bo‘yni regulyasiya qilishda ishtirok etishi XVIII asr oxiri XIX asr boshlarida ma’lum bo‘lgan edi. 1921 yil gipofiz ekstrakti yordamida gigant kalamushlarni o‘stirishga muvaffaq bo‘lindi. 1956 yil ekstraktdan biologik faol bo‘lgan boshlang‘ich ta’sir qiluvchi modda somatotropin ajratib olindi. Ikki yildan so‘ng qarilikning ba’zi ko‘rinishlarini davolashda muvaffaqiyat bilan qo‘llanila boshladi. Somatotropin yuborilgan odamlar tez o‘shib, ularning gavdalari normal proporsiyalar ola boshlaydi.

Yuzasiga kimyoviy faol atomlar guruhi joylashtirilgan polemer granulalari reaktorga joylashtiriladi va somatotropin gormoning biror uchining oxirida bo‘lgan aminokislota bilan ta’sir ettiriladi. Birinchi aminokislota polimer bilan birikkandan so‘ng granular yuviladi va tartib bo‘yicha ikkinchi keladigan aminokislota bilan ishlov beriladi. Aminokislotalar zanjiri kerakli uzunlikka yetgach, endi keraksiz bo‘lib qolgan polimerdan maxsus ishlov berilib xolos etiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

Shu usul bilan bir necha yuz aminokislota qoldiqlaridan tuzilgan tabiiy oqsillar shu jumladan, somatotropin ham sintez qilingan. Hozir qattiq fazali sintez odam ishtirokisiz ishlamaydigan maxsus avtomatlashtirilgan qurilmalar yordamida amalga oshiriladi. Bunday sintezator yordamida kerakli oqsilni olish uchun mikroprotsessorga aminokislotalar ketma ketligi to'g'risidagi ma'lumot, barcha aminokislotalar va zarur reaktivlar kiritilsa sanoqli kunlarda sintez amalga oshadi. Lekin oqsillarning qattiq fazali sintezi hozircha faqat ilmiy ahamiyat kasb etib birinchidan uning yordamida juda kam miqdorda oqsil olish mumkin, ikkinchidan har bir yangi aminokislota birikish bosqichida xatoliklar ketishi mumkin, zanjir uzayishi bilan bu xatoliklar soni oshib boraveradi. Natijada kerakli oqsil juda kam miqdorda xosil bo'lib, uni qo'shimchalardan tozalash ba'zan qiyinchiliklar tug'diradi.

Tirik hujayrada xam oqsil sintezi shu kabi sekin asta zanjir uzayib borishi bilan yuz beradi, biroq sintez xech qanday xatoliklarsiz amalga oshadi chunki hujayrada har bir alohida molekula qattiq nazorat ostida bo'ladi. Molekulalar molekulalar orqali boshqariladi. Biosintezning yuqori samaradorligi ko'rinib turibdi.

Xuddi avtomatik sintezatordagidek tirik hujayrada ham aminokislotalar ketma ketligi to'g'risidagi ma'lumotlar saqlanuvchi sistema bor. Saqlanishi birligi bo'lib, ikkilamchi spiralga o'ralgan ipsimon DNK ning bir qismi xizmat qiladi. Har bir aminokislota ma'lum nukleotidlar uchligi mos kelib ular genetik alfavitning go'yoki harflar vazifasini bajaradi.

Oqsil biosintezi transkripsiyadan boshlanadi. U esa oqsil to'g'risidagi ma'lumotning operativ tashuvchisi hisoblanadi. So'ngra translyatsiya jarayoni ketadi: ribosoma deb ataluvchi sub hujayra bo'lakchalarida m-RNK strukturasiga aynan o'xshash bo'lgan oqsil molekulasi sintez bo'ladi. Endi esa kerak bo'lmagan m-RNK transkripsiya uchun yana ishlatiladigan monomerga parchalanadi.

Ribosomani programmalashgan boshqaruvchi qismi bo'lgan tikuv mashinasiga qiyos qilish mumkin, m-RNK molekulasini esa bajaradigan operatsiyalar ketma-ketligi yozilgan perfolentaga, mashinadan perfolentani bir marta o'tkazsak mashina xech qanday xatolarsiz kerakli choklarni tushiradi, perfolentani yana bir marta o'tkazsak, yana bitta chok tushadi. Hujayrada m-RNK ni sintezi

qanchalik faol ketsa, oqsil molekulalari vaqt birligida ribosomada (shunchalik ko'proq) hosil bo'ladi. O'z navbatida genning sintetik faolligi DNK zanjirida alohida gen-promotorlarning borligi bilan aniqlanadi.

Oqsilni sintez qiluvchi hujayrada albatta ko'p miqdorda o'zida aminokislotalar ketma-ketligi kodlangan. Unga mos ravishdagi m-RNK bo'ladi. Bunday jadal sintezlash jarayoni rak bilan kasallangan gipofiz hujayrasida ketadi: og'irligi 0.8 g bo'lgan shish bo'lakchasi somatotropin genini olish uchun dastlabki manba bo'lib xizmat qiladi.

Fermentlar va oqsillarni denaturatsiyaga uchratuvchi moddalar ishtirokida somatotropin m-RNK sini ko'p miqdorda saqllovchi shish hujayralarni parchalaydi. Natijada maksimal darajada toza bo'lgan somatotropin m-RNK sini ajratib olish mumkin bo'lgan murakkab moddalar aralashmasidan iborat bo'lgan eritma hosil bo'ladi. Eritmani sentrifugalash orqali oddiy tozalash olib boriladi. Bunday ribonuklein kislotalarga boy bo'lgan fraksiya hosil bo'ladi. Somatotropin keyin m-RNK sining bir uchi o'nlab bir xil nukleotidlardan tuzilgan. Kimyoviy yo'l bilan o'sha bir xil uchiga komplementar bo'lgan nukleotidlar zanjirining sintez qilish qiyin ish emas, bu biz sintez qilgan oligonukleotidlar m-RNK ning o'ziga komplementar uchi bilan spetsifik bog'lanadi. Agar bu oligonukleotidni kimyoviy yo'l bilan sellyulozaga biriktirilsa, eritmadan faqat somatotropin m-RNK larni tutib oluvchi sorbent hosil bo'ladi. Shuning uchun modifikatsiya qilingan sorbentini kolonkaga joylashtiriladi, so'ngra kolonkadan ribonuklein kislotalar aralashmasini o'zida tutgan eritma o'tkaziladi. Keyin esa m-RNK larni sorbentidan desorbsiya qiluvchi eritma o'tkazilib, toza holdagi m-RNK eritmasi olinadi.

Toza m-RNK eritmasidan "DNK" nusxasini avtomatik tarzda sintez qilib beruvchi revertaza deb ataluvchi ferment bor. Buning uchun m-RNK eritmasiga barcha 4 ta nukleotid va revertaza fermenti qo'shiladi va bir necha minutdan so'ng jarayon o'z o'zidan tugallanadi, DNK ning bitta zanjiri xosil bo'ladi. Genda esa DNK ning har bir zanjiri o'ziga komplementar zanjir bilan birlashgan bo'ladi. Bu komplementar zanjirning sintezini DNK polimeraza fermenti avtomatik ravishda bajaradi. Nihoyat nukleaza fermenti DNK zanjirining qo'sh zanjirli qismlarini buzmaganda holda bir zanjirli keraksiz bo'laklarini yo'qotadi. So'ng somatotropin geni bilan boyitilgan preparat tayyor bo'ladi.

Molekulyar mikrobiologiya

Genetik materiallar bilan manipulyatsiya qiluvchi asosiy harakatlanuvchi kuchlar turli xil fermentlardir. Revertaza, DNK polimeraza, nukleazalar-nuklein kislota molekulalari bilan aniq belgilangan kimyoviy operatsiyalarni bajaruvchi fermentlardir. Somatotropin geni bilan ishlashda ham fermentlardan foydalaniladi.

Hozirgi kunda gen injeneriyasida fermentlardan tashqari plazmidadan foydalanilmoqda.

Plazmidalarga restriktaza fermenti bilan ishlov berilganda DNK molekulasini aniq bir joyidan kesib ularni halqasi ochiladi va bir chiziqli zanjir ko'rinishiga keltiriladi. Restriktaza plazmidani yopishqoq uchlar hosil qilib kesadi. Agar olingan genda xam xuddi shunday yopishqoq uchlar hosil qilinsa, plazmida o'ziga qo'shimcha genni biriktirib halqa ko'rinishiga aylanadi.

Ajratib olingan genga yopishqoq uchlarni ulash uchun restriktaza tanib kesa oladigan nukleotidlardan iborat bo'lgan oligonukleotidni kimyoviy yo'l bilan sintez qilinadi. So'ng komplementar zanjir hosil bo'ladi va hosil bo'lgan qo'sh zanjirli DNK bo'lakchasini genning ikkita uchiga ulanadi. Bu ligaza fermenti yordamida bajariladi. So'ng restriktaza fermenti bilan genga ishlov beriladi va yopishqoq uchli gen hosil bo'ladi. Agar genni kesilgan plazmida bilan aralashtirib, aralashmaga ligaza fermenti bilan ishlov berilsa, tarkibiga plazmida kiritilgan gen hosil bo'ladi.

Plazmidaning o'zi yaroqsiz hisoblanadi. Agar uni ichak tayoqchasi hujayrasining sitoplazmasiga kiritilsa, u ko'paya boshlaydi. Plazmida bilan birga unga kiritilgan gen ham ko'payadi. Bakteriyalarga zarur bo'lgan ozuqa muhitini yaratib, kerakli harorat berilsa, ular ko'payadi. Bakteriyalar yetarli darajada ko'paygach, ularning plazmidalarini ajratib olib, restriktaza yordamida ulardan ko'paygan genlarni olish mumkin.

Odam organizmi gipofizida faol somatotropin hosil qilib parchalovchi pregormon deb ataluvchi faol bo'lmagan gormon bo'ladi. Ichak tayoqchasi hujayrasida pregormonni parchalab faol holatga o'tkazuvchi molekulyar mexanizmlar mavjud emas. Shuning uchun ham ajratib olingan genni faollashtirilmasa, bakteriya hujayrasi kerak bo'lmagan oqsilni sintez qiladi.

E.coli plazmidasida restriktaza fermenti yordamida genda nukleotidlar ketma-ketligida shifrlangan ma'lumotni o'qishni boshlash

haqida signal beruvchi DNK bo'lakchasi - promotor ajratib olinadi. So'ngra ligaza fermenti yordamida somatotropin geniga ulanadi va promotor va gendan iborat fragment plazmidaga tikiladi, plazmidalar ichak tayoqchasi hujayrasiga kiritiladi va nihoyat bakteriya o'sish gormonini sintez qila boshlaydi. Ichak tayoqchasi o'ta faol bo'lib, 1 l bakteriya kulturasidan 50 ta gipofizdan olish mumkin bo'lgan o'sish gormonini ajratib olish mumkin.

Odam somatotropin gormoni ishlab chiqarish yo'lga qo'yilgandan so'ng uni nafaqat bo'yini o'stirish uchun, balki boshqa bir qator kasalliklarni davolashda qo'llasa bo'ladi. Somatotropin modda almashinuvining juda ko'p jarayonlariga: oqsillar sinteziga, yog'larning taqsimlanishiga, suyak to'qimasining hosil bo'lishiga ijobiy ta'sir ko'rsatadi. Shuning uchun ham uni to'qimalar regeneratsiyasining stimulyatori sifatida: jarohatlarni, kuygan to'qimalarni, singan joylarni davolashda qo'llash mumkin.

Hayvonlarda sintetik o'sish gormoni yordamida sutni ko'paytirish, yirik qoramollarning massasini oshirish mumkin.

Eritropoetin

Eritropoetin (yunoncha erithros-qizil, poietikos-yaratuvchi, ishlab chiqaruvchi)- gliprotein tabiatli gormon bo'lib, eritropoetinga sezgir hujayralarda proliferatsiya (to'qima va hujayralarni ko'payish orqali yangi hosil bo'lishi) va differensirovka (tabaqalanish, farqlanish) jarayonlarini kuchaytirish va morfologik taniladigan eritroblastlar hosil bo'lishida ishtirok etadi.

Eritropoetin 165 ta aminokislotadan tashkil topgan va molekulyar og'irligi 30400ga teng bo'lgan polipeptid.

Bu gormon suyak iliklaridagi eritrotsitlarni predshestvennikida joylashgan spetsifik retseptorlarga ta'sir qilib, eritroid o'simtalarni hujayralarini proliferatsiyasi va differensiyasiga kuchaytiruvchi ta'sir ko'rsatadi.

Endogen eritropoetin to'qima gipoksiyasiga javoban bo'laklarga ajralib chiqadi. Anemiyada eritropoetinni induksiyasi kuchayadi, oqibatda suyak iliklarida eritrotsilar hosil bo'lishi ham kuchayadi va anemiyani korreksiyasiga olib keladi.

Eritropoetin buyrak faoliyati susaygan va anemiya (kam qonli) bilan kasallanganlarga beriladi. U gemoglobinni ko'taradi va odatda, kasallarda qon quyish muammosini ijlbiy hal qiladi. Bu gormon SPID va rak kasallarga ham foyda beradi.

Molekulyar mikrobiologiya

Eritropoetin birinchi marotaba og‘ir anemiya bilan og‘rigan kasallarni siydigidan ajratilgan. Tabiiy manbalarda juda kam miqdorda uchraganligi uchun, uni ajratish deyarli mumkin emas.

Gen injenerlik texnologiyasidan foydalanib, sut emizuvchilarni hujayra kulturalarida (SNO shtamm) odamni rekombinant eritropoetini olingan. Preparatni ishlab chiqarish uchun immuno-affin va ion-almashinuv xromotografiyasi metodlaridan foydalaniladi. Bu usullar yordamida gomogen, monomer va to‘liq faollikka ega bo‘lgan, deyarli boshqa oqsil moddalar saqlamagan oqsil olish mumkin.

Eritropoetin ishlab chiqarishga ixtisoslashgan kompaniya AQShni Kaliforniya shtatida joylashgan Atdep firmasi hisoblanadi. Bu firma yiliga 3 mlrd dollarga teng bo‘lgan miqdorda eritropoetin ishlab chiqariladi.

Bu gormon Rossiyada ishlab chiqariladigan 4ta gen injenerlik preparatlaridan biri hisoblanadi. Xususan, NPO “Mikrogen” yuqori darajada tozalangan (99,5%) odam eritropoetini zardob albumini bilan aralashmasini izotonik sitrat buferda “Eritrostim” nomi bilan savdoga chiqargan.

Vaksinalar

Viruslar- to‘lig‘icha ichidagi parazitlar hisoblanadilar va ularni replikatsiyasi (ko‘payishi, nusxalanishi), xo‘jayin hujayrasidagi DNK, RNK va oqsil moddalarni sintezi bilan uzviy bog‘liq.

Viruslarni replikatsiyasi bir necha bosqichlarni o‘z ichiga oladi:

- hujayraga adsorbsiya bo‘lish va unga kirish;
- erta hosil bo‘ladigan, nostrukturaviy oqsillarni sintezi, masalan polimerazalar;
- DNK yoki RNKni sintezi;
- virus bo‘lakchalarini yetilishi va ularni hujayradan chiqishi.

Virus bilan kasallanganda, ko‘pincha kasalliklarni birinchi klinik belgilari namoyon bo‘lganda yoki undan odinroq, viruslarni replikatsiyasi o‘zini maksimumga ko‘tariladi.

Retsipiyyentda patogen mikroorganizmlarga immunitet shakllanishiga vaktsinatsiya yordam beradi.

Organizmga vaktsina kiritilganda paydo bo‘ladigan antitelolar, immunologik javob javob mexanizmini ishga tushuradi- antitelolar ishlab chiqariladi. Bu antitelolar keyingi infeksiya jarayonida patogen mikroorganizmlarni proliferatsiyasini to‘stib qo‘yadi va kasallikni rivojlanishiga yo‘l qo‘ymaydi.

Vaksinatsiyani samarasi birinchi marotaba **1796-yilda vrach Edvard Djenner** tomonidan ochilgan. Bu olim, qoramolni ospa kasalliga bilan og‘rigan (bu kasallik unchalik havfli emas) odam ospa kasalligini qabul qilmasligini tasdiqlab beradi.

Natural ospa-yuqumli kasallik, juda ko‘plab hollarda o‘limga olib keladi, agar kasal o‘lmagan qolganda ham, basharasida qandaydir xunuklik, asabini buzilishi, ko‘zlarini ko‘rmasdan qolish hollari namoyon bo‘ladi. E. Djenner 8 yoshli Djeys Flipp nomli o‘g‘il bolani ko‘pchilikni olidida qoramol ospasiga qarshi emlaydi. Emlashda shu kasallik bilan og‘rigan odamni terisida paydo bo‘lgan yiringlardan ekssudatlar olib ishlatadi va mu‘lum vaqt o‘tgandan keyin bolani natural ospa bilan kasallan odamni yiringlari bilan ikki marotaba yuqtiradi. Oqibatda kasallikni barcha belgilari emlagan joyni qizarishi bilan tugaydi va bu belgilar ham bir necha kundan keyin butunlay yo‘qolib ketadi.

E. Djenner yaratgan birinchi vaksinadan boshlab, odamlar uchun ishlatiladigan viruslarga qarshi vaksinalarni ko‘pchiligi o‘ldiradigan (inaktivatsiya qilingan) patogen mikroorganizmlar yoki tirik, ammo virulent (attenuirlangan) bo‘lmagan shtammlar asosida yaratilgan. Bunday ishlanmalar yetarli darajada samarali bo‘lib, ko‘plab virusli kasalliklarni tarqalishini oldini oladi, ammo uni ishlatilishi qator sabablarga ko‘ra chegaralangan:

- barcha patogen mikroorganizmlarni o‘stirish imkoniyati bo‘lmaganligi;
- patogen mikroorganizmlar va viruslar bilan ishlashni xavfliligi;
- attemuratsiya (ko‘pchilik hollarda inaktivatsiya to‘liq bo‘lmaydi) qilingan shtamlarni qayta tiklanish havfi (oldingi holatdagi tiklanishi);
- an’anaviy vaksinalarni ishlab chiqarish bahosini balandligi (hayvon va odam viruslarini kultura ichidagi titri va ularni kuchayish tezligi unchalik yuqori emas).

Rekombinant DNK texnologiyasi, xavfsiz va samaraliroq, arzonroq ishlatish uchun chegarasi bo‘lmagan yangi avlod vaksinalarini yaratish imkoniyatini yaratdi. Bunda har xil yondashishlardan foydalaniladi:

1. Patogen mikroorganizmdan virulentlikka javobgar genlarni chiqarib tashlash orqali, ularni modifikatsiyaga uchratiladi, bunda shtammni immun javob berish xususiyatlari saqlanib qoladi. Natijada,

Molekulyar mikrobiologiya

patogen bo'lmagan mikroorganizm saqlagan, qayta tiklana olmaydigan va patogen bo'lmaydigan tirik vaksinalar olinadi.

2. Patogen mikroorganizmlarni asosiy antigenligi determinantlarini (oqsillarni) kodlaydigan genlarni yoki ularni segmentlarini, muqobil organizmga masalan, *E.coli* da ekspressiya qilinadi va katta miqdorda kerakli mahsulotni olib, uni vaksina sifatida ishlatiladi. Bunday patogen mikroorganizmlarni faqatgina alohida kompanetlarini saqlovchi vaksinalar, patogen mikroorganizmlar sub'edinitalik vaksinalar deb ataladi

Sub'edinitalik vaksinalarni ustuvorlik tomoni shundaki, uni tarkibidagi oqsil barqaror va xavfsiz, uni kimyoviy xususiyatlari ma'lum, unda xo'jayin organizmda noxush, qo'shimcha samara beradigan qo'shimcha oqsillar yoki nuklein kislotalari yo'q.

Bu vaksinalarni kamchilik tomoni- spetsifik oqsilni tozalashni qimmatligi, uni ajratib olingandan keyingi konformatsiyasi, in situ holatdagi (ya'ni virusli kapsid yoki qobig'idan) konformatsiyasidan farqlanishi mumkin, bu esa, oqsilni antigenlik xossalarini o'zgarishiga olib kelishi ham mumkin.

3. Patogen mikroorganizmlarni asosiy antigen determinantlarini kodlovchi, kodlangan genlar, patogen bo'lmagan tashuvchini (odatda viruslarni) genomiga kiritilib, tirik, xavfsiz kasal qo'zg'atuvchi mikroorganizmlar saqlamagan vaksina olinadi. Odatda, tirik vaksinalar, tirik bo'lmagan yoki sub'edinitalik vaksinalarga nisbatan samaraliroq bo'ladi.

Rekombinant vaksinalar yaratishni yangi yo'nalishlaridan biri- DNK-vaksina yaratish hisoblanadi. Bunday vaksinalarni genli, polipeptidli vaksina, nuklein kislotalardan olingan vaksinalar ham deb yuritiladi DNK vaksinalarni ishlash prinsipi quyidagicha: bemorni organizmiga patogen organizmni immunogen oqsillarini kodlovchi gen saqlagan DNK molekulasini va mana shu genni eukariotlar (odam) hujayrasiga ekspressiya qilish zarur bo'lgan genetik elementlarni kiritiladi. Bunday genlarni produtsenti sifatida tegishli genga ega bo'lgan rekombinant plazmidalar saqlagan bakterial hujayralar ishlatiladi. Yetarli miqdorda biomassa (nusxalar miqdori) to'plaganidan keyin bakteriyadan plazmidali DNK ajratib olinadi va boshqa DNK molekulalari hamda qo'shimcha, keraksiz moddalardan tozalanadi. Olingan DNK vaksinani parenteral yo'l bilan organizmga

kiritiladi, bunda uni katta qismi hujayralararo bo'shliqqa kelib tushadi va undan keyin hujayraga kiradi.

Uchuqqa qarshi vaksinalar. Oddiy uchuq virusi (Herpes simplex virus, HSV), umumiy yoki lokal harakterga ega bo'lgan yuqumli kasalliklar chaqiradi Terini shilliq qavatlarini, asab sistemasini shikastlanishi va xronik qaytalanib o'tadigan, urogenital(siydik yo'lini) infeksiyasi, ko'zni kuchli shikastlanishi-yallig'lanishi bilan o'tadi.

Bundan tashqari, bu kasallik onkogen hisoblanadi, shuning uchun ham o'ldiradigan yoki attenuirlangan virus bilan vaksinatsiya qilish, rak kasalligini rivojlanishi bilan bog'liq bo'lgan HSVdan himoyalaniish uchun onkogen bo'lmagan sub'edinitalik vaksinadan foydalaniladi.

Har qanday sub'edinitalik vaksina yaratish uchun eng avvalo, patogen mikroorganizmda antitelo sintez qiladigan komponentlarni aniqlash kerak. HSV-tipidagi antitelani oladigan bo'lsak, bunday komponent hujayra qobig'ida joylashgan glikoprotein D hisoblanadi(gD). Sichqonlarga bu komponentni kiritilganda, ularda intakt(tirik) HSVni neytrallaydigan antitela hosil bo'ladi. gDHSV-1gen ajratib olinib, sut emizuvchilarni hujayralaridagi ekspressiyalanuvchi vektorlar bilan xitoy sichqoni (SNO) tuxum hujayrasiga kiritilgan. Aynan mana shu hujayralarda, *E.coli* ni hujayrasidan farqli o'laroq, begona oqsillarni glikolizlanish jarayoni sodir bo'lgan.

To'la qonli gD geni, normal sharoitda sut emizuvchilarni hujayralarini membranalar bilan belgilanadigan oqsilni sintezini kodlaydi. Keyin modifikatsiya gen bilan SNO-hujayrani transformatsiya qilingan. Transformatsiya qilingan hujayra oqsil mahsulotlarini glikoliz qilgan va atrof-muhitga sekretiya qilgan. Chunki glikolizlangan oqsil, hujayra membranasida bog'lanib qola olmagan. Modifikatsiya qilingan gD oqsilini kiritilishiga nisbatan samarali bo'lgan.

Salmonellyozga qarshi vaksinalar

Salmonellani har xil shtammlari o'tkir ichak infeksiyasini, tug'ishdan keyingi infeksiyani, bryushnoy tif, ovqat bilan zaharlanish kasalliklarni chaqiradilar.

Quyida yirik shohli hayvonlarda, parrandalarda va odamlarda mana shu kasalliklarni oldini olish uchun, qo'sh deletsiya (xromosoma

Molekulyar mikrobiologiya

ba'zi uchastkalarini yo'qotish) metodi yordamida og'izdan qabul qilinadigan vaksinalar yaratilgan.

Patogen bo'lgan shtammlar yaratishni bunday usuli, ularni asosida tirik vaksinalar yaratishga yaroqli bo'lib, bu usul patogen mikroorganizmni genomidan mustaqil hayotiy muhim funktsiya uchun javobgar bo'lgan uchastkani olib tashlashga (deletsiyaga) asoslangan.

Birdaniga shunday uchastkalarni ikkitasini olib tashlash yaxshi natija beradi, chunki bir vaqtni o'zida 2 ta uchastkani qayta tiklash mumkin bo'lmaydi. Qo'sh deletsiyali shtamm chegaralangan ko'payish (proliferatsiyalanish) va juda past patogenlikka ega bo'lsada, immun javob chiqarishni ta'minlaydi. Salmonellani qo'sh deletsiyali shtammi juda yengil shaklda infeksiya chaqiradi va intakt Salmonellaga nisbatan 100mng marotaba kamroq virulentlikka ega.

Sitokininlar

Sitokininlar-limforetikulyar hujayralarda sintez bo'ladigan, xilma-xil funktsiyaga ega bo'lgan oqsillarni katta geterogen gruppasidir. Sitokininlar- immun sistemalarni faoliyatini ta'minlab turuvchi va gomogenezni nazorat qilib turish bilan bog'liq bo'lgan xilma-xil o'zaro munosabatlarda ishtirok etadilar.

Sitokininlarni birinchi guruhi- interferonlar hisoblanadilar. Sitokininlarni bir qismi interleykinlar sifatida klassifikatsiya qilingan bo'lib, ular aniqlanishi bo'yyaa nomerlab chiqilgan.

Interferonlar olish

Interferonlar- endogen glikoproteidlar bo'lib, ularni molekulyar massasi 3000 atrofida, nospetsifik virusga qarshi ta'sirga ega, RNK va oqsil sintezi bilan bog'liq bo'lgan hujayrada o'tadigan metabolik jarayonlarga ta'sir ko'rsatadi. Dastlab interferonlarni viruslar bilan zararlangan hujayralarda ishlab chiqarilishi aniqlangan(1-tip), keyinroq interferonlarni immun reaksiya davomida limfotsitlarda ham sintez bo'lishi aniqlangan(2-tip).

Katta miqdorda interferonlar olish uchun 6 kunlik bir qavatli tovuq embrionini hujayra kulturalaridan yoki ma'lum virus bilan kasallangan odam qonini o'suvchi leykotsitlaridan foydalaniladi.

Boshqacha qilib aytganda, interferonlar olish uchun ma'lum virus hujayra sistemasi yaratiladi.

Odam hujayrasidan interferon biosinteziga javobgar bo'lgan gen ajratib olingan. Odamni ekzogen interferoni DNK rekombinant texnologiyasi yordamida olinadi.

Interferonni k-DNKsini ajratish quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi:

- odam leykotsitlaridan m-RNK ajratib olinadi va uni kattaligi (razmeri) bo'yicha fraksiyalarga bo'linadi, qaytma transkripsiya o'tkazilib, modifikatsiya qilingan plazmidani saytiga kiritiladi;

- olingan mahsulotni *E.coli* ga transformatsiya qilinadi;

- klonlarni har bir gruppasini interferon m-RNK bilan gibridizatsiya qilinadi;

- k-DNK va k-RNK saqlagan hosil bo'lgan gibridlardan, m-RNK ajratib olinadi va uni oqsil sintezi sistemasida translyatsiya qilinadi;

- translyatsiya natijasida olingan har bir aralashmani interferonlik virusga qarshilik faolligi aniqlanadi, interferon faolligiga ega bo'lgan gruppalar, interferon-m-RNK bilan gibridlangan k-DNK tutgan klon saqlaydi, to'liq razmenga ega bo'lgan odamni interferon-kDNKli klon qayta identifikatsiya qilinadi;

Interferonlar-limfokinlik va immunomodulyatorga o'xshagan faollikka ham ega bo'ladilar. Interferon (1-tipdagi), viruslarni hujayraga replikatsiyasini ingibirlovchi modda sifatida ta'sir ko'rsatadi va o'zini samarasini xo'jayin hujayra ribosomalari tomonidan hujayra fermentlari sintezini kuchaytiruvchi sifatida namoyon qiladi. Ular viruslarni kuchayishini tormozlaydilar va bunda virusli m-RNK translyatsiyasini va virusli oqsillarni sintezini buzadi.

Ko'pchilik hayvonlar interferonlar sintez qiladilar, ammo ularni faolligi turga spetsifik, ya'ni ular faqat o'zlari sintez bo'lgan hayvonlardagina faollik ko'rsatadilar.

Odam interferonini 3-tipi aniqlangan:

- interferon α , I-tip fibroblastli interferon;
- interferon β - I-tip odamni fibroblastli interferoni;
- interferon γ -II- odamni immunli interferoni.

Har qanday tipga mansub bo'lgan hujayralar ishlab chiqaradigan interferon, faollik turi va kimyoviy tuzilishi bilan bir-biridan farq qiladi(jadval-). Interferonlar organizmni virus bilan zararlanishiga xalaqit beradigan asosiy endogen faktorlardan biri hisoblanadilar.

Interferonlar 3 fermentni induksiyasini chaqiradi:

- Protein kinazalar- peptid zanjirini boshlang'ich bosqichini qurilishini buzadigan fermentlar;

- Oligoizoadenilat sintetazalar- virus RNKsini buzadigan RNKkazani faollashtiruvchi ferment;

Molekulyar mikrobiologiya

- Fosfodiesterazalar- t-RNKni oxirgi nukleotidlarni parchalovchi ferment peptidni elongatsiyasini buzilishiga olib keladi.

Interferonlarni virusga qarshi va immunomodellash samarasini hisobga olib, Rossiyaning "Biomed" deb nomlangan ilmiy ishlab chiqarish birlashmasida IFN α va probiotiklar saqlaydigan maxsus shamlar qo'yish yo'lga qo'yilgan va u virusli va bakterial etiologiyaga ega bo'lgan dizbakteriozni, kandidozlarni davolashda, shuningdek genikologiya amaliyotda endometrik, kolpit, vaginit va genikologik uchuq kasalliklarini davolash uchun tavsiya qilingan.

Interferonlarni qo'shimcha samarasi-charchoqlik, bosh og'rig'i, holsizlik, mialgin, anemiya, oshqozon-ichak va yurak-qon-tomir kasalliklarini buzilishida namoyon bo'ladi. Genlarni klonlash metodlarini rivojlanishi yuqori darajadagi tozalangan barcha tipdagi sitokininlarni tayyorlashni va ko'plab interleykinlarni (IL) identifikatsiya qilish imkonini yaratdi.

Odam interleykinini spetsifik geniga ulangan marker peptidni kodlovchi DNK segmenti (oqsilni tozalash va identifikatsiya qilishni yengillashtiruvchi gibrid oqsilni bir qismini kodlovchi) ni produtsent mikrob hujayrasiga o'tkaziladi va u joyda ximer oqsil eksspressiya bo'ladi(xo'jayin hujayrada proteazalari bilan parchalanishdan saqlash maqsadida bir yoki bir necha aminokislotalarni almashtirish orqali himoyalangan oqsilni sintezini kodlovchi genning mahsuloti).

Interleykinni rekombinant molekulasini konstruksiyasini bir guruh spetsifik fermentlar to'plami bilan amalga oshadi. Ximer oqsilni tarkibiga kiruvchi nishonli (marker) peptid, immunoaffin xromotografiyasi yordamida tozalanadi.

Sitokininlarni asosiylari IFN γ va IL-2 hisoblanadilar. IFN γ -tabiiy sitokininlik samarasini faollashtiruvchi bosh mediator, tabiiy killer hujayralarni differensiatsiya jarayonini va ular bilan oksik ta'sirni boshqaradi, hamda sitotoksin limfotsitlarini faollashtiradi. IFN γ ta'sirida, IL-1, IL-2, IL-12, IFN β kabi sitokininlarni va ikkilamchi shishlarni nekroz qiluvchi faktorlarni sintezi ko'tariladi.

Interleykinlar tegishli mishen hujayralarni sirtida joylashgan retseptorlar orqali o'zini samarasini ko'taradi.

Ko'plab interleykinlar tibbiyot amalyotida keng ishlatilib kelinmoqda. Masalan, IL-1 immunogen shishlarni (melonomalar, buyrak raki, siydik qopi raki) davolashda ishlatilmoqda.

Interferon olish

Interferonlar oqsil tabiatli bo'lib, barcha umurtqalar hujayralarida sintez bo'ladi. Interferonlar organizmning gemostazholatini saqlab tiruvchi universal omildir.

Interferonlar sistemasi -organizmda boshqaruv funksiyasini bajaradi, chunki ular har xil biokimyoviy jarayonlarni modifikatsiya qilish xususiyatiga ega.

Ohirgi yillarda interferonlar yordamida xavfli o'smalarning bazi formalarini davolash mumkinligi haqida ma'lumotlar paydo bo'lgan. Shu vaqtgacha interferonlarning faqat virus infeksiyalariga qarshi faolligi ma'lum edi.

Hozirgi paytda esa interferonlarning 3 ta eng asosiy faolligi ma'lum.

1. Antiviruslar
2. Immunosistemani mustahkamlash
3. Antiproliferativ

Bundan tashqari interferonning radioprotektiv effekti ham aniqlangan. Interferonlarning o'zlarida bir qator biologik faolliklarni namoyon qiluvchi universal faktorlar bo'lib, har xil kasalliklarni davolashda muvaffaqiyatli ravishda bo'llasa bo'ladi.

Interferonlar sistemasi 1957 yil ochilgan. O'shandan boshlab fundamental izlanishlar natijasida interferonlarning xususiyatlari, induksiyalash mexanizmlari, molekulyar, hujayraviy va organizm darajasida ta'sir etish mexanizmlari va klinikada qo'llash usullari haqida bir qator ma'lumotlar to'plangan.

Induktorlar.

Induksiyalovchi faktorlar interferon induktorlari yoki interferonogenlar ta'siri ostida umurtqalilar hujayralarida interferonlar hosil bo'ladi. Barcha induktorlar ikki asosiy guruhga bo'linadi: tabiiy va sintetik.

I. Tabiiy induktorlarga:

1. Hayvonlarning DNK va RNK tutuvchi viruslari, xashorotlar, o'simliklar, bakteriyalar viruslari;
2. Har xil bakteriyalar (eubakteriyalar, riketsiyalar, mikoplazmalar, xlamidalar), sodda hayvonlar, mikroorganizm mahsulotlari hujayra qo'sh zanjiri RNK lari, tabiiy polifenollar kiradi.

II. Sun'iy induktorlarga:

Molekulyar mikrobiologiya

1. Past molekulali moddalar asosiy bo'yoqlar, siklogeksamid va boshqalar;

2. Yuqori molekulali moddalar polifosfatlar, polisulfatlar va boshqalar kiradi.

Interferonogenlar ta'siri ostida barcha yadroviy hujayralar interferonlarni sintez qilishiga qaramasdan, amaliyotda preparat olish uchun faqat ba'zi bir hujayra sistemalarigina ishlatiladi.

Interferonlarni ishlab chiqaruvchi hujayralar.

Odamlarda asosan limfotsitlar va makrofaglarda interferonlar ko'plab sintez bo'ladi va ular interferon produyaentlari hisoblanadi. Produtsent - hujayralarga bog'liq ravishda odam interferonlari 3 guruhga bo'linadi.

- α -interferon leykotsit hujayralar tomonidan.
- β -interferon dipoloid fibroblastlar tomonidan.
- γ -interferon yoki immun interferon. T-limfotsitlar tomonidan ishlab chiqariladi.

α -interferonlar oqsil tabiatli bo'lib, 16000 Da dan 23000 Da gacha molekula massasiga ega. β -interferonlar glikoproteid bo'lib, molekula massasi 20000 Da. γ -interferon ham glikoproteid bo'lib, 20000-25000 Da molekula massaga ega.

Interferonlarning faolliklari.

Tabiiy himoya faktorlari bo'lgani uchun xar qanaqa virusli infeksiyalar ta'sirida interferonlar sintez bo'ladi. Organizm yetarli miqdorda interferon sintez qilmasa kasallik og'ir kechadi.

Virusli infeksiyalar ta'sirida kelib chiqqan kasallikka ekzogen interferonni qo'llash endogen interferonning hosil bo'lishini stimullaydi.

1977-yilda interferonning xavfli o'smaga qarshi ta'siri borligi aniqlangan. O'sha paytdan beri xavli o'smalarni interferon yordamida davolashda qo'llash soxasida katta ishlar olib borildi. Xavfli limfomalarni, Xodjikin kasalligini, surunkali limfoleykoz, o'tkir miyeloleikoz, ko'krak bezlari achenokarinnomasi, miyadagi shishlar va boshqa kasalliklarni davolashda α -interferon muvaffaqiyatli natijalar berdi. B-interferon unchalik yaxshi natija bermadi.

Har xil formadagi xavfli o'smalarga har xil dozadagi turli xil interferonlar kerak. Tajribalar natijasida γ -interferon α va β -interferonlarga nisbatan kuchliroq o'smalarga ta'sir etishi ma'lum

bo'ldi. γ -interferon ochilgandan so'ng uni klinikada qo'llash joriy etildi. Sezilarli samaraga erishish uchun yuqori dozalardagi interferon uzoq vaqt davomida yubirildi. γ -interferon α va β -interferonlarning antivirus va o'smalarga qarshi faolliklarni kuchaytiradi. Qondagi gangliozydilar yuqori konsentratsiyalarida bo'lsa, α va β -interferonlar inaktivatsiyalanadi, bunday hollarda faqat γ -interferon ishlatiladi. Agar shish hujayralari α -interferonga nisbatan sezgir bo'lsa, terapiya γ -interferon bilan olib boriladi.

Interferonlarni olish texnologiyasi:

I. Oddiy uslublar bilan interferon olish.

Qondan oddiy uslublar yordamida interferon olish juda kam chiqish unumiga ega. 1978-yili Kantell va uning hamkasblari Xelsinkidagi Sog'liqni Saqlash Markaziy laboratoriyasida 50000 1 odam qonini qayta ishlab bor yo'g'i 0,1 g toza interferon olishga muvaffaq bo'lishdi. Mutaxassislarning fikriga ko'ra 0,1 g interferon 10000 yengil virusli infeksiya bilan kasallangan va 2000 ta surunkali virusli infeksiya bilan kasallangan bemorlarni davolash uchun yetarli ekan.

Shuning uchun butun dunyoda har xil turdagi interferonlarni gen injeneriya uslubi bilan (ko'p miqdorda) ishlab chiqarish maqsad qilib qo'yilgan.

II. Gen injeneriya uslubi bilan interferon olish.

Biotexnologiyaning ohirgi yillarda qo'lga kiritgan yutuqlari organizm genotipini, genotipik belgilarni ham o'zgartirish maqsadida genlar bilan turli amallarni bajarishga imkon beruvchi uslublarni ishlab chiqishga olib keldi. Ana shu yo'nalishdagi tadqiqotlar gen injeneriyasi deb ataladi. Bunday tadqiqotlarning asosiy maqsadi bitta organizmdan olingan genlarni ikkinchi organizm genomiga to'g'ridan-to'g'ri ko'chirib o'tkazish yo'li bilan yangi fenotiplar yaratish, bu usul bilan genomning irsiy nuqsonlarini tuzatish, ya'ni irsiy kasalliklarga davo topishdir. Gen injeneriyasining dastlabki yutuqlari odam uchun foydali mahsulotlar, dori moddalar sintezlab beradigan yangi mikroorganizm shakllarini yaratish bilan bog'langandir. Interferon genini ko'chirib o'tkazish quyidagi bosqichlardan iborat:

- 1.Kodlovchi DNK olish (genni olish);
- 2.E.Coli baktariyasining yangi shtammini olish;
- 3.Vektor DNK olish;
- 4.Vektor DNK ni restriksiyalash;

Molekulyar mikrobiologiya

- 5.Promotorni sintez qilish;
- 6.Promotorni kodlovchi DNK ga ligaza yordamida ulash;
- 7.Promotor + k-DNK fragmentini vektor DNK ga ligaza yordamida ulab, rekombinant DNK olish;
- 8.Rekombinant DNK ni yovvoyi E.coli bakteriyasiga kiritish;
- 9.E.coli bakteriyasini klonlash va o‘stirish;
- 10.Ekstraksiyalash;
- 11.Interferon preparatini cho‘ktirish;
- 12.Moddani tozalash va dori formasini olish.

Genni olish.

1. Oqsilning birlamchi strukturasi va biologik koddan kelib chiqib, shu oqsilga to‘g‘ri keladigan genlarning nukleotidlar tarkibini bilib olish. Keyin esa kimyoviy bilan genni sintezlash mumkin. Shu usul bilan uzunligi 200 tagacha kodonga boradigan kichikroq genlarni olish mumkin.

2. Hujayra genomidan tayyor genni ajratib olish juda qiyin, chunki har bir gen ulushiga butun genomning kichik bir qismigina to‘g‘ri keladi va ko‘pgina genlar intronlar bilan bo‘laklarga bo‘lingan bo‘ladi.

3. Teskari transkriptaza - revertaza yordamida genlar olishning mashaqqatlari kamroq.

Genom

i-RNK

Kimyoviy sintez

k-DNK

r-DNK

Bakteriya hujayrasi

Klon

Interferon

Qonni rak kasaliga chalingan, gripp bilan kasallanib, endi tuzalgan donorning qonidan leykotsitlari ajratiladi. Leykotsit hujayralari sun‘iy muhitda ko‘paytiriladi. Ko‘paytirish jarayonida leykotsitlar induksiya qilib turiladi: interferon sintezi to‘xtamasligi uchun muhitga vaqti-vaqti bilan gripp virusi yuborib turiladi. Yetarli miqdorgacha leykotsitlar ko‘paytirilgach, i-RNK larni ajratamiz. Buning uchun tez muzlatib, tez

eritish jarayoni bir necha marta takrorlanadi va hujayralar buziladi. Sentrifuga qilinadi va i-RNK lar yig'indisi spirt bilan ajratib olinadi. i-RNK lar yig'indisi Σ i-RNK hosil bo'ladi. Shu yig'indi ichida interferonga tegishli i-RNK borligini bilish uchun Afrikada yashaydigan 1,5 sm li mitti *Xenopus laevis* degan baqaning ootsitlariga (tuxumlariga) mikroskop ostida mikroshpritslar yordamida Σ i-RNK eritmasi yuboriladi. Baqaning ootsitlarida RNKaza fermenti mavjud bo'lmaganligi sababli har bir i-RNK ga tegishli bo'lgan oqsillar bemaolol sintez bo'ladi. Shular qatori α -interferon xam sintez bo'ladi.

Leykotsit hujayra m-RNK larining murakkab aralashmasidan talaygina individual, ya'ni interfon m-RNK sini ajratib olish va bulardan genlar sintez uchun foydalanish mumkin. Har xil uzunlikdagi va har xil molekula massali Σ i-RNK lar yig'indisidan interferonga tegishli i-RNK ajratib olish uchun ularning uchlariga poliadeninlar ulab modifikatsiya qilinadi. Qattiq tashuvchilardan biriga politiminlar ulab biospetsifik adsorbent yasaladi va u xromotografik kolonkaga joylashtiriladi. Kolonkaning tepasidan modifikatsiya qilingan Σ i-RNK lar yig'indisi o'tkaziladi. Natijada i-RNK lar polidenin uchlari bilan adsorbentning politimin uchlariga ulanadi. Kolonkadan avval i-RNK lar so'ngra, o'rtacha va mayda molekulalar o'tadi. Ularni alohida probirkalarga yig'iladi. Har bir probirkadagi i-RNK lar ootsitlarga tekshiriladi va interferon sinteziga javob beruvchi i-RNK bor probirka topiladi. Biospetsifik xromatografiya uslubidan foydalanib interferonning molekula massasiga teng bo'lgan i-RNK lar eritmasi ajratib olinadi. Shu i-RNK eritmasini revertaza fermenti va barcha nukleotidlar bir zanjirli k-DNK xosil qiladi. So'ng probirkaga DNK-polimeraza fermenti yuboriladi va k-DNK ning ikkinchi komplementar zanjiri sintez qilinadi. Interferonga tegishli k-DNK ning nusxasi olinadi, lekin bu probirkada molekula massasi bir-biriga yaqin bo'lgan interferondan tashqari juda ko'p boshqa oqsillarning k-DNK lari ham bor DNK lar klonotekasi hosil bo'ladi. Ularning ichida interferonning k-DNK larini ajratish kerak. Buning uchun elektroforez usuli qo'llaniladi. Elektr maydonida DNK lar o'zlarining zaryadlariga bog'liq ravishda bir-biridan sekin-asta ajraladi. Har biri ajratib olinib, plazmidaga ulanadi. Agar interferon sintez bo'lsa, o'sha DNK interferonga tegishli k-DNK bo'ladi.

Yangi shatamm olish.

Genni (k-DNK ni) hujayraga shunday joylashtirish kerakki, toki hujayra nukleazalari ta'sirida parchalanib ketmasligi, barcha hujayra genomida tegishli joy oldigan (unga integratsiyalanib qoladigan) bo'lsin. Buning uchun gen in vitro o'tkazgich (vektor) rolini bajaruvchi ma'lum DNK bilan qo'shiladi. Vektor sifatida ko'pincha plazmidalardan foydalaniladi. Gen injeneriyasiga doir tadqiqotlarda odatda ichak tayoqchasi *Escherichia coli* bakteriyasidan foydalaniladi. Bu bakteriya genomi membranaga birikkan bitta xromosoma (DNK molekulasi) va sitozolda "qalqib yuradigan" plazmidalardan iborat. Plazmida asosiy DNK molekulasidan taxminan ming baravar kichik bo'ladi. Hujayrada bir nechta har xil plazmida bo'lishi mumkin, ularning har biri ko'p miqdordagi nusxalardan iborat bo'la oladi. Plazmidalar replikatsiyasi asosiy genetik material replikatsiyasidan mustaqil holda boradi. Ba'zi plazmidalar xromosomaga o'rtnashib olishi va undan yana ajralib chiqishi mumkin. Hujayralar konyugatsiyasi paytida plazmidalar bitta bakteriya hujayrasidan ikkinchisiga o'ta oladi.

E.coli bakteriyasi konomitsin antibiotigi bilan ishlov beriladi, ularda konomitsinga chidamlilik hosil qilinadi. *E.coli* K-12 shtammini yaratguncha konomitsinning konsentratsiyasi ortib borish tartibida 12 marta o'zgartirib bakteriyaga yuboriladi.

Vektor DNK ni olish.

Tayyor bo'lgan *E.coli* K-12 shtammi hujayralaridan plazmidalarni olish uchun quyidagi uslublar yordamida hujayralar buziladi va ichdagi moddalar ajralib chiqadi:

- a. Ultratovush yuqori energaya berib;
- b. Mexanik yo'l bilan gomogenlab;
- c. Sirt faol moddalar bilan maydalab;
- d. Haroratli shok berib (hujayralar tez muzlatilib, tez sovutiladi, bir necha marta takrorlanadi).

Hujayra membranalari parchalangandan so'ng sentrifuga qilinadi:

1. 900-1200 g da hujayra membranalari, buzilmay qolgan hujayralar;
2. 1200-3000 g da yadrolar, mitoxondriyalar;
3. 30000 g da lizosomalar;
4. 105000 g da boshqa ballast moddalar cho'kadi.

Eruvchi vitaminlar, aminokislotalar, uglevodlar, plazmidalar eritmada qoladi. Eritmadan plazmidalar spirt bilan cho'ktiriladi va xromatografik usullar yordamida tozalab olinadi.

Restriksiyalash.

Plazmida, ya'ni halqali DNK molekulasining bir qismi chiqarib tashlanadi. Buning uchun restriksion endonukleazalar (restriktaza) qo'llaniladi. Restriktazalarning substratga spetsifikligi shunda namoyon bo'ladi, ularning har biri muayyan bir nukleotidlar tartibini tanib oladi. Masalan Eco R I restriktaza GAATTC va CTTAAG tartibini tanib oladi va G xamda A nukleotidlari o'rtasidagi bog'ni gidrolizlaydi.

DNK molekulasining komplementar zanjirlari turli joylaridan kesib olinadi, natijada zanjirlarning ularga komplementar polinukleotidlarini biriktira oladigan "yopishqoq" uchlari tutashmay turgan qismlari hosil bo'ladi.

Promotor interferon oqsili sintezini boshqaruvchi regulyatsiyalovchi DNK ketma-ketligi sintez qilinadi va k-DNKga ligaza fermenti yordamida fosfodiefir bog'i hosil qilib ulanadi.

Rekombinat DNK olish.

Ko'chirib o'tkazish uchun k-DNK uchlarida ham restriksiya qilingan plazmidaning yopishqoq uchlariga komplementar yopishqoq uchlar hosil qilinadi. So'ng ligaza fermenti yordamida promotor, k-DNK vektorga ulanadi va yana halqali DNK molekulasini olinadi, lekin plazmida DNK sining qismi o'rniga o'tkazish uchun tanlab olingan interferon geni bo'ladi. Klonlash uchun mo'ljallangan k-DNK tayyor bo'ladi.

k-DNK ni bakteriyaga kiritish.

E.coli bakteriyasining kanamitsin bilan tarbiyalangan K-12 shtammi emas, dastlabki (yovvoyi) kulturasiga rekombinant plazmidalar qo'shilsa, ma'lum sharoitlarda ular bakteriya hujayralariga kirib o'rnatilib oladi, rekombinant bakteriyalar hosil bo'ladi.

Rekombinant DNK li bakteriyalarni klonlash va mahsulot olish.

Klonlash rekombinant DNK ni ko'paytirish usulidir. Hujayrada rekombinant plazmidalar replikatsiyalana boshlaydi. Bakteriyaga zarur bo'lgan harorat, pH muhit, tuzlar, vitaminlar, N, C manbalari uning o'sishiga sharoit yaratilsa bakteriya tez rivojlanadi. Bakteriyalar

Molekulyar mikrobiologiya

ko'payganda hosil bo'ladigan bakteriyalar hujayralarida ham shunday rekombinant plazmidalar hosil bo'ladi.

Bunda plazmidalar hujayra genomiga (xromosomalariga) o'rtnashib, matritsa tariqasida ishlab borishi mumkin. Hujayrada plazmida genlari tomonidan kodlangan oqsillar interferonlar sintezlanadi. Endi bakteriya massasidan yetarli miqdorda mahsulot ajratib olish mumkin.

So'ng interferon ekstraksiyalanadi, cho'ktiriladi, tozalanadi va dori shakli tayyorlanadi.

Nazorat savollari

1. Monoklonal antitanalar qanday tartibda ishlab chiqariladi?
2. Sanoatda qanday oqsillar ishlab chiqariladi?
3. Sanoatda ishlab chiqariladigan aminokislotalar haqida ma'lumot bering.
4. Gen muhandisligi usullari orqali qanday vaksinalar olinadi?
5. Somatotropin gormonini sanoatda olish qanday bosqichlardan iborat?
6. Interferonlar qanday tartibda olinadi?

13-MAVZU. GENOMNI O'RGANISH USULLARI.

Tayanch so'z va iboralar: Nuklein kislotalar sekvensi; restriksiyali analiz; gibridizatsiya usullari; genli daktiloskopiya; genlarni nokautlash.

Reja:

1. Nuklein kislotalar sekvensi
2. Gibridizatsiya usullari
3. Genli daktiloskopiya
4. Genlarni nokautlash

Nuklein kislotalar sekvensi

Mahalliy adabiyotlarda nuklein kislotalarning nukleotidlar ketma-ketligini ochish usullari odatda sekvensiya texnologiyasi ataladi. 1950-yillarda polipeptid zanjiridagi aminokislotalarning ketma-ketligini aniqlash usullari ishlab chiqilgan. Nazariy jihatdan, bu qiyin emas, chunki tabiiy oqsillarda mavjud bo'lgan barcha aminokislotalar turli xil xususiyatlarga ega. Shuning uchun, genetik kodni ketma-ketligi

ochilishi, tegishli oqsilning aminokislotalar ketma-ketligidan transkripsiyalangan DNKning nukleotidlar ketma-ketligini tiklash mumkin bo'ldi. Biroq, genetik kod buzilgan. Shuning uchun aminokislotalar ketma-ketligini tahlil qilish natijasida olingan DNK ning birlamchi tuzilishi aniq emas. Bundan tashqari, eukariotlar uchun faqat ekzonlarning nukleotid tarkibi shu tarzda tiklanishi mumkin, shu bilan birga intronlarning tarkibi haqidagi ma'lumotlar splaysing natijasida yo'qoladi.

DNKning genetik muhim qismlarini aniqlash imkonini beruvchi usullar muhim ahamiyat kasb etadi. Shuningdek, ular DNKni sekvenirlashning mutlaqo yangi samarali usullarini ishlab chiqish va rekombinant DNK molekulalarini yaratish uchun xizmat qiladi.

Sekvenirlash DNK ni restriksion endonukleazalar bilan qirqish orqali hosil bo'lgan 350-1000 juft nukleotid va undan ortiq ketmaketlikdan iborat bo'laklarning nukleotid asoslari izchilligini aniqlash imkonini beradi. Sekvenirlashning ikkita asosiy tamoyili: kimyoviy va fermentativ sekvens mavjud.

Kimyoviy sekvens nukleotidlarning tanlab kimyoviy degradatsiya qilinishiga asoslangan. U 1977-yilda A.M. Maksam va V. Gilbert tomonidan taklif etilgan va ularning nomi bilan ataladi. Bu usulda sekvenirlashda DNK ning bir zanjirli molekulasini olish zarur, uning bir uchini ^{32}P izotopi bilan nishonlanadi, nishonlangan DNK preparati to'rt bo'lakka bo'linadi va har biriga to'rt asosni bir yoki ikkiga bo'luvchi maxsus reagent bilan ishlov beriladi. Masalan, 60%-li chumoli kislotasini qo'shish purin asoslari (A+G)ni, dimetilsulfat faqat guanin asoslarini; toza gidrazin esa pirimidin asoslari (T+C) ni parchalaydi, 1,5 N NaCl eritmasida esa faqat sitozinli asoslar parchalanadi. Har bir DNK molekulasiga bir necha joyidan shikastlantirish to'g'ri kelishi uchun reaksiyani amalga oshirish sharoitini tanlab olish muhimdir. Shikastlangan molekulalarga piperidin bilan ishlov berilganda DNK da uzilish u aynan azotli asos shikastlangan joyda hosil bo'ladi.

Natijada nishonlangan bo'laklar to'plami olinib, ularning uzunligi shikastlangan asosdan to molekulaning oxirigacha bo'lgan masofada aniqlanadi. To'rttala reaksiya natijasida hosil bo'lgan bo'laklarni denaturatsiyalovchi sharoitda akrilamid gelida to'rtta qo'shni yo'lakchalarga quyib chiqiladi. Shundan so'ng radioavtografiya amalga oshiriladi, natijada radioaktiv nishonga ega bo'laklar rentgen

Molekulyar mikrobiologiya

plyonkasida iz qoldiradi. Ularning joylashuviga ko'ra, nishonlangan qismdan shikastlangan asos qanday masofada joylashganini, buni o'rganish orqali ularning holatini aniqlash mumkin. Rentgen plyonkasidagi chiziqlar yig'indisiga ko'ra, tahlil qilinadigan DNK bo'lagining nukleotid ketma-ketligi aniqlanadi

Ushbu usul yordamida qisqa muddat ichida SV40 virusi, pBR322 plazmidasi va boshqa ko'plab organizmlar DNK ketma-ketliklarini to'liq aniqlashga muvaffaq bo'lingan. Biroq Maksam-Gilbert usuli muolajalarining sezilarli darajada qiyinligi va uzoq davom etishi bilan bog'liq bir qator kamchiliklarga ega. Hozirgi vaqtda kimyoviy degradatsiya yordamida sekvenirlash asosida nukleotid ketma-ketliklarni tez va mukammal aniqlash usullari ishlab chiqilgan bo'lib, qattiq fazali sekvenirlash va aylanma fazali xromotografiyadan foydalanish orqali sekvenirlash shular jumlasidandir.

Fermentativ sekvenirlash. Senger tomonidan 1977-yilda taklif etilgan nukleotidi zanjirni terminatsiyasi (sintezni to'xtatib qo'yish) yo'li bilan sekvenirlash usuli keng qo'llaniladi. Senger usuli negizida (komplementar) DNK zanjirining replikatsiyasi tamoyili yotadi. U DNK ketma-ketligi sintezi uzilgan, ya'ni zanjir o'sishi terminatsiyaga uchragan turli qismlarida amalga oshadi. Fermentativ sekvenirlashning asosiy xossasi tuzilayotgan zanjir sintezining terminatsiyasiga asoslanadi.

Replikasiyani to'xtatishga sabab bo'ladigan terminatsiya agentlari 2', —*—3'-didezoksitriphosfatlar (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) hisoblanadi. Mazkur modifikatsiya qilingan azotli asoslar keyingi dezoksiribonukleotid bilan fosfodiefir bog'larni hosil qila olmaydi. Senger bo'yicha sekvenirlash negizida DNK ning replikatsiyasi yotadi, bunda asosiy ferment DNK polimeraza (asosan, DNK polimeraza I hisoblanadi. Bir zanjirli DNK-matritsa kalta nukleotid praymer va komplementar nukleotidlar ishtirokida DNKning ikkinchi zanjiri sintezi amalga oshadi. Bunda zanjir uzayishi toki dezoksinukleotidga birikishiga qadar davom etadi, natijada oxirgisining birikishi sintezni to'xtatilishiga olib keladi.

Probirkalarga to'rtta bir xil tarkib: nukleotid ketma-ketligi oldindan aniqlab olingan DNK matritsaning denaturlangan bo'lagi, to'rtta dezoksinukleotid, DNK-matritsaga komplementar bo'lgan va undan DNK polimeraza I sintezini davom ettiradigan hamda DNK polimeraza I fermentining o'zi, radioaktiv nishonlangan qisqa praymer

(16-24 n.j) dan iborat reaksiya aralashma solinadi. Shundan so'ng har bir probirkaga didezoksinukleotidlardan biri qo'shiladi. Har bir probirkada sintezlanadigan zanjir DNK polimeraza I didezoksinukleotidni biriktirib oladigan joyda terminatsiyalanadi. Didezoksinukleotid reaksiya aralashmasiga qo'shilgan bo'lib, bitta probirkadagi sintez komplementar zanjirning ddATP bilan bog'lanishi hisobiga, ikkinchisida ddGTP hisobiga uziladi va h.k. Zanjir uzilishi tasodifiy nuqtalarda amalga oshishi hisobga olinadigan bo'lsa, praymerdan boshlab sekvenirlanadigan bo'lak oxiriga qadar uzunlikdagi fragmentlar yig'indisi hosil bo'ladi. Olingan DNK fragmentlari poliakrilamidli gelda (bitta nukleotidga qadar aniqlikda) ajratiladi, radioavtografiya qilinadi va to'rtta probirkadagi bo'laklarning ajralishining ko'rinishiga asosan DNKning nukleotid izchilligi aniqlanadi.

Bunday axborotga ega bo'lgach, DNK ga biologik muhim qismlarni joylashtirish mumkin. Masalan, SV40 virusi replikatsiyasi bitta maxsus Hind III nuqtadan boshlanadi va ikkala yo'nalishda davom etadi. Restriksion xaritalar va restriksion bo'laklar virus oqsillari uchun mRNK sintezlanadigan DNK bo'laklarini xaritalashda foydalanilgan. Hozirgi vaqtda istalgan DNK bo'lagingining nukleotid ketma-ketligini to'liq aniqlash yechimi topilgan. Bugungi kunda pro- va eukariotlarning bir necha minglab genlari nukleotid ketma-ketligi o'rganilgan. Ko'plab prokariot organizmlar genomining nukleotid ketma-ketligi aniqlangan. Eukariotlardan achitqilar (*Sacharomyces cerevisiae*), nematodalar (*C.elegans*), arabidopsis, drozofilla pashshasi va odam genomini to'liq sekvenirlashga muvaffaq bo'lingan.

Sholi va sichqon genomining nukleotid ketma-ketliklari aniqlanmoqda. Bunday hajmdagi tadqiqotlarning olib borilislii sekvenirlash usullarini avtomatlashtirish va zamonaviylashtirishni talab qiladi. Yuqorida nomlari keltirilgan ikkala usulni ham avtomatlashtirish to'liq yo'lga qo'yilgan, bu esa sekvenirlashni soddalashtiradi, sarf-xarajatlarni kamaytiradi. Ayniqsa, nukleotid ketma-ketliklarini aniqlashning avtomatlashtirilgan fermentativ usulidan keng foydalanilmoqda. Terminatsiyalovchi nukleotidlar bilan bog'lanuvchi fluorescent bo'yoqlardan foydalanish barcha reaksiyalarni bitta probirkada olib borish imkonini beradi. Bundan tashqari sekvenirlashning mutlaqo yangi usullari, masalan, fiksatsiya qilingan oligonukleotid chiplari bilan gibrizatsiya orqali, ekzonukleazalardan

Molekulyar mikrobiologiya

foydalanish va boshqa usullar yordamida sekvenirlash ishlab chiqilgan. Mazkur usullarning barchasi DNKni yirik qismlari, shuningdek, istalgan genomning sekvenirlash muammosini tezda hal etish imkonini beradi. Olingan natijalar ma'lumotlar bazasi-genlar bankiga kiritiladi. Eng yirik genlar banki Genbank (AQSH), EMBL(OYE), DDBJ (Yaponiya) hisoblanib, yagona INSD tarmog'iga ulangan. Ushbu ma'lumotlar bankiga kiritilgan nukleotid ketma-ketliklari to'g'risida INTERNETdagi quyidagi manzillar: www.ddbi.nig.ac.jp, www.ebi.nas.uk, www.ncbi.nlm.gov. da tanishish mumkin.

Genning nukleotid ketma-ketligi va genetik kodini bilgan holda, u kodirlaydigan oqsil aminokislotalari ketma-ketligini aniqlash mumkin. Ilgari oqsil tarkibini aniqlash uchun ajratib olingan va tozalangan oqsilning o'ta murakkab va ko'p mehnat sarflanadigan tahlilini o'tkazish talab etilar edi. Ko'pincha nukleotid ketma-ketliklarini aniqlash orqali oqsilning strukturasini aniqlash, oqsilning o'zini to'g'ridan-to'g'ri sekvenirlashga nisbatan oson kechadi.

Hozirgi kunda sekvenirlash yo'li bilan olingan nukleotid ketma-ketliklarning kompyuter tahlilini amalga oshirish ilgari aniqlangan nukleotid ketma-ketliklar bilan taqqoslash, gomologiya (o'xshashlik) darajasini aniqlash, maxsus (masalan, regulator-boshqaruvchi) izchilliklarni ajratib ko'rsatish, RNKning ikkilamchi tuzilmasini modellashtirish imkonini beradigan kompyuter dasturlarining ko'plab turlari mavjud. Sekvenirlashning tezkor usullari ishlab chiqilgach, oldindan belgilangan muayyan ketma-ketliklarga ega, nisbatan uzun oligonukleotidlarni sintez qilishning oddiy, tezkor usullari yo'lga qo'yildi. Hozirda 100 nukleotidga qadar ketma-ketliklarni oson sirtez qilish mumkin. Bu jarayonni avtomatlashtirish esa sintezni yanada tezlashtiradi.

GIBRIDIZATSIYA USULLARI

Nuklein kislotalarning komplementar RNK yoki DNK ketma-ketliklari bilan bog'lanish qobiliyatiga asoslangan gibridlanishi maxsus nukleotidlar ketma-ketligini yuqori sezuvchanlik va aniqlik bilan tez aniqlash imkonini beradi.

Gibridlanishning mohiyati shundaki, komplementar nukleotidlar ketma-ketligini o'z ichiga olgan nuklein kislotalarning (DNK-DNK, RNK-RNK, DNK-RNK) har qanday bitta zanjiri 65 ° C dan yuqori bo'lmagan haroratda inkubatsiya paytida ular renaturatsiyalanadi

(qayta- assotsiatsiya, tavlaniş(отжигаются)), qo'sh spiralning tuzilishini tiklaydi, ya'ni nuklein kislotalarning geterogen bir zanjirli molekulalari, bir-birini to'ldiruvchi ketma-ketliklarni tavlashda (отжиге) geterodupleks, gibrid molekulalarni hosil qiladi.

Nuklein kislotalarning denaturatsiya va renaturatsiya jarayonlarining tezligi harorat, pH va vaqtga bog'liq. Shunday qilib, DNK 90-95 °C gacha qizdirilganda, qo'sh spiralning tuzilishini saqlab qolish uchun azotli asoslarning bir-birini to'ldiruvchi juftlari (AT va G / C), shuningdek, gidrofobik va steking o'zaro ta'sirlari(стэкинг-взаимодействий) orasidagi vodorod aloqalarining energiyasi yetarli bo'lmaydi.

Eritmaning pH ning 10 ga ko'tarilishi bilan DNKning denaturatsiyasi sodir bo'ladi, chunki bunday sharoitda molekulaning manfiy zaryadlangan fosfor asosining elektrostatik itarilishi keskin kuchayadi. A/T juftining ikkita vodorod bog'ini uzish uchun G/C juftining uchta vodorod bog'ini uzishdan ko'ra kamroq energiya talab qilinganligi sababli, denaturatsiyaning yuqori darajasi uchun zarur bo'lgan aniq harorat va pH DNK nukleotid tarkibiga bog'liq. G/C tarkibi qanchalik yuqori bo'lsa, DNKning erish nuqtasi (Gt) yoki DNKning erishi pH (pHt) shunchalik yuqori bo'ladi.

Asos juftlarini tiklash bilan zanjirlarning renaturatsiyasi harorat yoki pH ning asta-sekin pasayishi bilan sodir bo'ladi. Keskin pasayish hatto bir xil zanjirda ham mahalliy komplementar qismlarning juftlashishiga olib kelishi mumkin.

Kichik fag DNKsi (10-50 tpo) yuqori tezlikda renaturlanadi. Izolyatsiya qilingandan so'ng bir necha yuz alohida bo'laklardan iborat bakterial DNK taxminan 1-1,5 soat ichida 50% ga renaturlanadi. Nospetsifik bog'lanishli renaturatsiya ehtimolini kamaytirish uchun yuqori haroratda va past ionli quvvatda (yuqori pH) o'tkazish maqsadga muvofiqdir.

Shunday qilib, renaturatsiya (gibridlanish) tezligi ikkita to'ldiruvchi nukleotidlar ketma-ketligi o'rtasidagi to'qnashuv ehtimoliga bog'liq bo'lib, bu ularning reaksiya aralashmasidagi konsentratsiyasi bilan belgilanadi. Shunga ko'ra, duragaylash tezligi eritmadagi har qanday nuklein kislota ketma-ketligining konsentratsiyasini aniqlash uchun ishlatilishi mumkin (ya'ni, tahlil

Molekulyar mikrobiologiya

qilingan DNK namunasidagi ma'lum bir genning nusxalari sonini hisoblash uchun).

Indikator sifatida nuklein kislota namunasidagi kerakli ketma-ketlikni to'ldiruvchi yorliqli bir zanjirli DNK bo'lagi (DNK-zondi deb ataladi, 20-1000 nukleotiddan iborat) ishlatiladi va gibridizatsiya paytida DNK zondi duplekslarga kiritiladi. Har qanday gibridlanmagan bir zanjirli molekulalarni parchalash uchun eritmaga ko'pincha maxsus nukleazalar qo'shiladi.

DNK-DNK gibridizatsiya jarayoni to'rtta asosiy bosqichdan iborat: 1) denaturatsiyalangan bir zanjirli DNK nishonini nitroselyuloza yoki neylon membranali filtrda yuqori haroratda fiksatsiyalash; 2) filtrni ma'lum sharoitlarda (harorat, ion kuchi) maqsadli DNK bilan gibridlanadigan, yorliqli bir zanjirli DNK zondi bilan bufer eritmasida inkubatsiya qilish; 3) ortiqcha bog'lanmagan DNK zondini olib tashlash uchun duragaylashdan keyin filtrni yuvish; 4) yorliqli ikki zanjirli gibrid molekulalarni aniqlash. Gibridizatsiya signalini aniqlash tizimi yuqori sezuvchanlik va o'ziga xoslikni ta'minlashi kerak.

Tajribani o'rnatishda bir zanjirli DNK zanjirlaridan biri (bir zanjirli DNK, ssDNK) membranaga mahkamlanadi - qattiq ssDNKga ega bo'lgan bunday membrana blot deb ataladi (Sautern-blot, ushbu texnikani ishlab chiqaan amerikalik olim E.Sautern nomiga atab). Ikkinchi ip (zond yoki prob) dog'dagi bir zanjirli DNKdagi kerakli qo'shimcha ketma-ketlikni aniqlash uchun radioaktiv yoki lyuminescent yorliq bilan yorliqlanadi. Agar RNK va bir zanjirli DNK o'rtasida geteroduplekslarning hosil bo'lishi o'rganilsa, unda RNK biriktirilgan blot Nozern-blot deb ataladi.

DNK (RNK) zondlari yolg'on musbat yoki yolg'on salbiy signallarni ishlab chiqarmasdan, faqat kerakli nukleotidlar ketma-ketligiga gibridlanishi kerak. Eksperimental vazifalarga qarab, gibridizatsiya zondlari uzun (100 dan ortiq nukleotidlar) yoki qisqa (50 dan kam nukleotidlar) bo'lishi mumkin va klonlangan buzilmagan(интактные) genlarni, ularning parchalarini yoki kimyoviy sintezlangan molekulalarni ifodalaydi. Odatda, DNK nishoni va zond o'rtasida barqaror gibridizatsiya kompleksini shakllantirish uchun 50 nukleotidli hududda ularning 80%i kamida komplementar bo'lishi kerak.

Laboratoriya amaliyotida eng ko'p ishlatiladigan zondlar ^{32}P radioaktiv izotopi bilan yorliqlanadi, bunday zondlar yuqori o'ziga xos

radioaktivlikka ega, past fonli shovqinni ta'minlaydi va avtoradiografiya yordamida gibrizatsiya signalini osongina aniqlash mumkin. Biroq, qisqa muddatli yashovchi ^{32}P izotopi bilan ishlashda xavfsizlik qoidalariga, shu jumladan radioaktiv moddalar bilan ishlash va chiqindilarni to'g'ri yo'q qilishga qat'iy rioya qilish kerak.

Xromogen, xemilyuminessent yoki lyuminessent ro'yxatga olish tizimlari (biotin, digoksigenin, ftoroxromlar va boshqalar) kabi radioaktiv bo'lmagan duragaylash zondlari bilan ishlash ancha xavfsizroq. Bundan tashqari, radioaktiv yorliqlanmagan namunalar sezilarli signal yo'qotmasdan yetarlicha uzoq vaqt saqlanadi va gibrizatsiya eritmalari bir necha marta qayta ishlatilishi mumkin.

Biotin bilan yorliqlangan DNK zondlarini qo'llash boshlandi. Gibrizlanish signalini kuchaytirish uchun xromogen yoki xemilyuminessent substratning fermentativ transformatsiyasi (превращение) qo'llaniladi.

Bu holda standart gibrizatsiya jarayoni quyidagi bosqichlardan iborat: 1) biotin bilan yorliqlangan zond filtrga mahkamlangan maqsadli DNK (ДНК-мишень) bilan gibrizlanadi; 2) ortiqcha gibrizlanmagan zondni olib tashlash uchun filtrni yuving va biotin bilan bog'laydigan streptavidinni qo'shing; 3) biotinlangan ferment (ishqoriy fosfataza yoki xren peroksidaza) qo'shing, u ham streptavidin bilan bog'lanadi; 4) xromogen yoki xemilyuminessent substratni kiritish va tegishli ferment ta'sirida substratni mahsulotga aylantirish jarayonida rang o'zgarishini yoki lyuminessentni aniqlash.

Ko'pincha, biotinlangan zond bilan DNK gibrizatsiyasidan so'ng, eritma ichiga biotin bilan bog'lanish joyiga ega streptavidin-ishqoriy fosfataza kompleksi (konyugat) kiritiladi.

Shuni ta'kidlash kerakki, DNK zondlari yordamida gibrizatsiya reaksiyasi o'ta sezgir va selektivdir, bu hatto hujayradagi bitta molekula konsentratsiyasida ham nukleotidlar ketma-ketligini aniqlashga imkon beradi. Ushbu usul yordamida genomdagi komplementer DNK- zondini DNK ketma-ketligining nusxalari sonini aniqlash mumkin.

Nuklein kislotalarning gibrizlanishi diagnostik tadqiqotlarda nafaqat bir xil, balki o'zaro bog'liq genlarni ham izlash uchun ishlatiladi. Ammo gibrizatsiya usuli hujayralardagi genlarning ekspressiya darajasini o'rganishda (o'rganilayotgan gen ketma-ketligining bir qismini o'z ichiga olgan yorliqli DNK-zondini hujayralardan ajratilgan buzilmagan (интакт) yorliqsiz RNK bilan gibrizatsiya qilish) hamda

Molekulyar mikrobiologiya

RNK transkriptlarining joylashishini aniqlashda ayniqsa keng qo'llaniladi..

DNK-DNK GIBRIDIZATSIYA

DNK-DNK gibrizatsiyasi usuli, masalan, plazmid vektorlarining bir qismi sifatida klonlangan DNK uzun qismlarida o'ziga xos nukleotidlar ketma-ketligini qidirish va lokalizatsiya qilish uchun ishlatiladi.

Ushbu yondashuv (kichik modifikatsiyalar bilan) genomik tadqiqotlar uchun ham qo'llaniladi. Shunday qilib, DNK-DNK (Sauzern) gibrizatsiyasi yordamida ma'lum ketma-ketliklarni aniqlash, shuningdek ularning nafaqat prokariotik xromosomadagi, balki umumiy eukariotik DNK gidrolizatlarida ham nusxalari sonini aniqlash mumkin.

Sauzern gibrizatsiya tibbiy tadqiqotlarda genotipdagi o'zgarishlarni aniqlashda, shuningdek, atrof-muhitdagi mikroorganizmlarni (shu jumladan klinik materialdagi patogenlarni) aniqlash usullarini ishlab chiqishda keng qo'llanildi.

SAUZERN-BLOTTING GIBRIDIZATSIYASI

O'rganilayotgan nukleotidlar ketma-ketligi tarkibida ma'lum DNK hududlarini izlash uchun odatda 1975 yilda Edvin Sauzern tomonidan taklif qilingan uzatish usuli qo'llaniladi. Yondoshuvning umumiy sxemasi quyidagicha: O'rganilayotgan ajratilgan DNK ketma-ketligi kichikroq bo'laklarga bo'linadi (masalan, restriksiyalovchi nukleazalar bilan ishlov berish orqali), shundan so'ng ular elektroforez yordamida agaroz gelida hajmi bo'yicha ajratiladi. Geldagi DNK fragmentlarining joylashuvi hujjatlashtirilgan.

Keyinchalik, fraksiyalangan gel bo'laklari bufer eritmasiga shimdirilgan filtr qog'oziga joylashtiriladi. Yuqoridan gel maxsus membrana filtri (neylon yoki nitroselyuloza) bilan qoplangan bo'lib, uning ustiga bir necha qatlamli filtr qog'ozi qo'llaniladi, ular namlikni osongina singdiradi. DNK bo'laklarini o'tkazish nitroselyulozada shuningdek neytral va manfiy zaryadlangan neylon membranalarda o'zaro joylashishini saqlab turish uchun yuqori ion kuchiga ega bufer eritmasi qo'llaniladi (fiksatsiya o'tkazilgandan keyin amalga oshiriladi).

Qog'oz kapillyar nasosning bir turi bo'lib xizmat qiladi, bu DNK parchalarini geldan bufer eritmasi oqimi bilan yuvish va ularni membrana filtriga o'tkazish (to'ldirish), vazifasini bajaradi. bu yerda

DNK keyinchalik ishqor bilan denaturatsiya qilinadi va immobilizatsiya qilinadi (fiksatsiyalanadi).). Bu gel tarkibidagi DNK molekulalarini DNK zondi bilan gibridizatsiya qilishni osonlashtiradi. Neylon yoki manfiy zaryadlangan neylon membranali filtrlarda DNK fiksatsiyasi ko'pincha ikki varaq filtr qog'ozi orasiga quruq filtr qo'yish va uni 80 ° C haroratda 2 soat davomida isitish orqali amalga oshiriladi.

Ijobiy zaryadlangan neylon membranalarida gibridlanish uchun 0,4 M NaOHli ishqoriy uzatish qo'llaniladi - bu vaqtda DNK fiksatsiyasi membranada o'tkazish bilan bir vaqtda sodir bo'ladi.

Ba'zan nuklein kislota bo'laklarini agaroz gelidan membranaga o'tkazish uchun suyuqlik oqimi gradientini yaratish uchun kapillyar kuchlar o'rniga elektr toki yoki vakuum ishlatiladi. Elektr va vakuumli uzatish usullarining arzonroq va sodda kapillyar usuldan afzalligi nuklein kislotalarning membrana filtriga tezroq o'tishidir (odatda 12-24 soat o'rniga 3-6 soat).

Keyin membrana (Sautern-blot) yorliqli DNK zondi zond va uning komplementar DNK o'rtasida vodorod bog'larini hosil qilish uchun maqbul bo'lgan ma'lum vaqt va sharoitlarda (harorat, pH) eritmada inkubatsiya qilinadi. Gibridizatsiya uzoq vaqt davomida - 12-24 soat ichida amalga oshiriladi.

Keyingi bosqichda membrana past ion kuchiga ega bo'lgan isitilgan bufer eritmasida maxsus bog'lanmagan yorliqdan yaxshilab yuviladi. Shundan so'ng, gibridizatsiya natijasi avtoradiografiya yordamida (agar radioaktiv yorliqli DNK zond sifatida ishlatilgan bo'lsa) yoki boshqa usulda (masalan, biotinlangan yorliq ishlatilsa, to'g'ridan-to'g'ri vizualizatsiya) aniqlanadi. Usulning sezgirligi kerakli DNK parchalarini aniqlash imkonini beradi, ularning soni pikogrammalarda o'lchanadi.

DNK zondini komplementar ketma-ketlikka ega bo'lgan DNK fragmentlarining lokalizatsiyasi osongina aniqlanadi, chunki DNK geldan filtrga o'tkazilganda fragmentli tasmalarning nisbiy holati o'zgarmaydi. O'rganilayotgan DNK ketma-ketligini qayta ishlash uchun turli xil restriksiya nukleazalaridan foydalangan holda ushbu amaliyotni takrorlash orqali tegishli gen qismidagi genomning batafsil restriksiya xaritasini olish mumkin. Bundan tashqari, har biri ma'lum bir DNK ketma-ketligiga komplementar bo'lgan bir nechta yorliqli zondlar bilan ketma-ket gibridizatsiyalarni amalga oshirish mumkin,

Molekulyar mikrobiologiya

birinchi navbatda oldingi zondni keyingisi bilan gibridizatsiyalashdan oldin membranadan butunlay olib tashlash mumkin.

Shunday qilib, restriksiyalangan DNK bilan mos keladigan zondning gibridizatsiyasi mahsulotlariga mos keladigan chiziqlarni aniqlash va ajratilgan DNK uchun "fragment narvoni" qurish mumkin, bu, masalan, biologik namunalarni (genom daktiloskopiyasi deb ataladi) identifikatsiya qilish uchun sud-tibbiyot ekspertizasida qo'llaniladi.

Kerakli reaktivlar va eritmalar:

- - SSC bufer eritmasi (pH 7,7)
- - 0,25 M HCl (tajribadan oldin tayyorlang);
- - DR ning denaturatsiya qiluvchi eritmasi. Tarkibi: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl. Xona haroratida saqlang;
- - HP neytrallash eritmasi. Tarkibi: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2); 1,5 M NaCl; 0,81 M HCl; 1 mM EDTA. Xona haroratida saqlang;
- - Transfer uchun RP eritmasi. Tarkibi: 250 mM NaOH; 1,5 M NaCl;
- - Oldgibridizatsiya uchun RPG eritmasi. Tarkibi: 5x SSC; Denxardtning 5x eritmasi (1-ildovaga qarang); 0,1% natriy dodesil sulfat; qizil lososning sperma DNK eritmasi (yakuniy konsentratsiyasi 100 mkg/ml);
- - "A" yechimi: 2x SSC; 0,1% natriy dodesil sulfat;
- - eritma "B": 1x SSC; 0,1% natriy dodesil sulfat;
- - eritma "C": 0,1x SSC; 0,1% natriy dodesil sulfat;
- - toza 96% etanol va 70% etanolning suvdagi eritmasi;
- - steril distillangan (deionizatsiyalangan) suv.

A. Zondni neylon filtrga o'tkazish uchun namuna tayyorlash

1. 2-bobda tavsiya etilgan tavsiyalarga muvofiq bakterial shtammdan xromosoma (plazmid) DNKni ajratib oling.

2. Olingan preparatdagi DNK konsentratsiyasini uning optik zichligini spektrofotometrda 260 nm da o'lchab aniqlang.

3. DNK preparatini tegishli restriksiya bilan ishlov bering. Plazmid DNK bilan ishlaganda 1-3 mkg DNKdan foydalanish kifoya, xromosoma DNK bilan gibridlanish holatida konsentratsiyani 5-10 mkg gacha oshirish tavsiya etiladi.

4. 12-16 soat davomida 0,9% agaroz gelida 20-40 V kuchlanishda elektroforez orqali namunaning DNK bo'laklarini elektroforez bilan ajratishni amalga oshiriladi. Yupqa (qalinligi 0,7 mm gacha) gellardan foydalanish maqsadga muvofiqdir. Eksperimental namunalar bilan bir vaqtda gelga ma'lum o'lchamdagi DNK fragmentlari (DNK markeri) bo'lgan namunani qo'shish kerak.

5. Geldagi DNK bo'laklarining joylashishini uni suratga olish yoki elektroforetik namunalarni gel hujjatlashtirish tizimi yordamida skanerlash orqali aniqlang (masalan, "Vilber Lourmat", Fransiya tomonidan ishlab chiqarilgan Bio-Print qurilmasida).

6. Gelni 0,25 M HCl ga 10 daqiqaga botiring (undan ko'p emas), bromfenol ko'k bo'yog'i rangini sariqqa o'zgartirgandan so'ng, suv bilan yuvib tashlang. Bu bosqich zarur emas, lekin sekin aralashtirish bilan HCl bilan bunday ishlov berish DNKning depurinatsiyasiga va DNKning o'rtacha uzunlikdagi bo'laklarga bo'linishiga olib keladi (o'tkazish paytida 5 tpo dan katta bo'laklar agarozadan yaxshi o'tmaydi).

7. Gelni zudlik bilan DE eritmasi solingan vannaga soling va DNKni denaturatsiya qilish uchun doimiy yengil silkitib, 30-40 daqiqa davomida inkubatsiya qiling (taxminan 20 daqiqadan so'ng denaturatsiya buferida inkubatsiya qilinganda bromofenol rangini yana ko'k rangga o'zgartiradi). Jarayon xona haroratida amalga oshiriladi.

8. Gelni deionizatsiyalangan suv bilan yuvib tashlang va uni HP eritmasi bilan to'ldirilgan vannaga joylashtiring. Hammomni doimiy yengil silkitib, xona haroratida 30-40 daqiqa davomida inkubatsiya qiling (taxminan 20 daqiqadan so'ng neytrallashtiruvchi buferda inkubatsiya qilinganda bromofenol ko'k rangi o'zgaradi).

9. Gelni deionizatsiyalangan suv bilan yuvib tashlang va uni RP eritmasiga soling. Hammomni doimiy yengil silkitib, xona haroratida 30-40 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

B. DNK fragmentlarini membranali filtrga o'tkazish

1. Hy-bond N neylonli membrana filtri (GE Healthcare, Buyuk Britaniya) varag'idan gelning o'lchamiga ko'ra to'rtburchaklar shakldagi bo'lakni kesib oling (har bir tomondan 2-5 mm qo'shimcha chetlari bilan). Shuningdek, Whatman ZMM to'rtburchaklar shaklidagi 6-1 varaqlar tayyorlang. Ulardan biri vakuum o'tkazish apparatidagi maydonning o'lchamlariga (yoki uzatish konteynerning o'lchamlariga) mos kelishi kerak, qolganlari gelning o'lchamlariga muvofiq kesiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

2. O'tkazish jarayoni boshlanishidan yigirma daqiqa oldin neylon va qog'oz filtrlarni 20x SSC buferli hammomga joylashtiring.

3. Vakuum uzatish apparatining (masalan, Bio-Rad, AQSH tomonidan ishlab chiqarilgan) deionizatsiyalangan suv bilan oldindan namlangan sirtiga qurilma o'lchami bilan bir xil o'lchamdagi ho'l vatman qog'ozi bo'lagini qo'ying. Keyinchalik, ustiga neylon filtr qo'ying, uning yuzasiga 1-2 ml 20x SSC bufer eritmasini teng ravishda quyish kerak, shundan so'ng gel filtr chegaralari bo'ylab ehtiyotkorlik bilan joylashtiriladi (gel bir marta joylashtiriladi, keyin uni ko'tarib bo'lmaydi!). Uning ustiga, 20x SSC eritmasi bilan namlangan Whatman ZMM ning 5-6 varag'ini boshqasining ustiga qo'ying.

Havo pufakchalari paydo bo'lishiga yo'l qo'ymaslik uchun gel, neylon va qog'oz filtrlaridan iborat bunday "sendvich" ni juda ehtiyotkorlik bilan yotqizish kerak (agar ular paydo bo'lsa, pufakchalarni chiqarib yuborish uchun siz pipetka bilan muloyimlik bilan aylantira olasiz). Filtrlar va gel orasidagi havo pufakchalari bo'lgan joylarda DNK o'tkazilmaydi.

4. Qurilmani suv oqimi nasosiga ulang va juda past suv bosimida (~ 12 mm) (~ 12 mm pt.ct.) 2-3 soat davomida vakuum uzatishni amalga oshiring.

5. Vakuum-apparatni suv oqimi nasosidan ajratib oling. Neylon filtrni qoplagan Whatman varaqlarini olib tashlang va uni (gel chetlari qalam bilan belgilangan) 200 ml 2x SSC solingan vannaga pinset bilan o'tkazing. Vannani muloyimlik bilan silkitib, 5 daqiqa davomida chayqating. Vakuum apparati plastinkalarini deionizatsiyalangan suv bilan yuving va quriting.

6. Neylon filtrni probirkadan pinset bilan olib tashlang va uni quruq Whatman MMM varag'iga yuzini tashqariga qaratib qo'ying va quriting. Xona haroratida 3-4 soat davomida quriting.

7. Quritilgan neylon filtrni pechga 80°C haroratda joylashtiring va DNK bo'laklarini fiksatsiyalash uchun 2 soat ushlab turing (yoki 120°C da 30 daqiqa qizdiring). Ushbu amaliyotdan so'ng filtr gibridizatsiyaga tayyor. Shuningdek, AQSHning Stratagene firmasida ishlab chiqarilgan Stratalinker UV qurilmasi yordamida ultrabinafsha (-120 mJ/sm^2) ta'sirida membrana filtrida DNKning tez fiksatsiyasini amalga oshirish mumkin. Filtrni polimer plyonkaga o'rash orqali -20 dan 4°C gacha bo'lgan haroratda saqlanishi mumkin.

V.Gibridizatsiya

1. Membrana filtrini gibridizatsiya boksiga (gibridizator) yuzini tashqariga qaratib joylashtiring. Suyuqlik filtrni to'liq qoplashi uchun RPG oldindan gibridizatsiya eritmasini boksga quying. Eritmaning qurib qolishiga yo'l qo'ymaslik uchun filtr (gibridizatsiya paytida doimo nam bo'lishi kerak) lavsanli plyonka bilan qoplangan bo'lishi kerak, boksni qopqoq bilan mahkam yoping va uni termostatga joylashtiring. 42°C da 2 soat (yoki 62°C da 15 daqiqa) sheykerda yengil silkitib inkubatsiya qiling. 2-3 ml RPG eritmasi bo'lgan shisha mikrobiologik probirkaga radioaktiv yorliqli zondni (-2 mkl/ml) qo'shing. Eritmani ohistalik bilan aralashtiring, so'ngra denaturatsiya qilish uchun qaynoq suv hammomida 5 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

2. Probirkani muzda tez sovutib, tarkibini neylon filtrli gibridizatsiya boksiga quying (filtr yuzasidan pinset yordamida lavsan plyonkasini olib tashlangandan keyin).

3. Filtrni lavsan bilan yoping va boksni qopqog'i bilan yoping, uni 42-62 ° C haroratda termostatga qo'ying va shakerda doimo zaif silkitib, 12-16 soat davomida inkubatsiya qiling.

Примечание Температура инкубации фильтров зависит от типа используемого меченого ДНК-зонда. Для элюированных из геля рестрикционных фрагментов ДНК она составляет 65—68°C. При гибридизации с олигонуклеотидными пробами обычно используют температуру на 5°C ниже соответствующей T_m — в пределах 42—60°C. В случае использования вырожденных олигонуклеотидов (содержащих инозин или имеющих смешанный нуклеотидный состав) оптимальную температуру гибридизации подбирают экспериментально.

Eslatma. Filtrni inkubatsiya harorati ishlatiladigan DNK zondining turiga bog'liq. Geldan elyutsiya qilingan restriksiyalovchi DNK fragmentlari uchun u 65-68 ° C ni tashkil qiladi.

D. Membran filtrini bog'lanmagan yorliqdan yuvish

1. Neylon membrana filtrini pinset bilan boksdan olib tashlang. Aralashmaning tomchilarini tomizib qo'ying va filtrni "A" eritmasi bilan hammomga qo'ying. Xona haroratida, doimo silkitib, 10-15 daqiqa davomida inkubatsiya qiling. Yuvish yangi A eritmada 2-3 marta takrorlanishi kerak .

Diqqat. Gibridizatsiyadan so'ng radioaktiv eritma ehtiyotkorlik bilan stakanga quyiladi va xavfsizlik qoidalariga rioya qilgan holda utilizatsiya qilinadi.

Molekulyar mikrobiologiya

2. Filtrni 55-65 ° C gacha qizdirilgan "B" eritmasi bilan vannaga o'tkazing. Doimiy silkitib, 55-65 ° C da 15-30 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

3. Filtrni 55-65 ° C gacha qizdirilgan "C" eritmasi bilan vannaga o'tkazing. Hammomni doimiy silkitib, 55-65 ° C da 10 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

4. Neylon filtrni probirkadan pinset bilan olib tashlang. Uni "Watman ZMM" ning quruq varag'iga yuzini qaratib qo'ying va xona haroratida quriting (3-4 soat).

Eslatma. Yengil yuvish uchun faqat birinchi bosqichni bajarish yoki 2 va 3-bosqichlarda past haroratlardan foydalanish kifoya (agar filtrning radioaktivligining fon darajasi past bo'lsa, aks holda to'liq yuvishni amalga oshiring). Shuni yodda tutish kerakki, filtr quriganida, unga maxsus bog'lanmagan yorliqli zondning qoldiqlarini olib tashlash deyarli mumkin emas, shuning uchun ba'zi protokollar filtrni quritishni tavsiya etmaydi.

E. Radioavtograf olish

1. Filtrni lavsanli plyonkaga yopishtiring va radioavtografini olish uchun uni shaffof bo'lmagan kassetadagi rentgen plyonkasiga (masalan, Eastman Kodak, AQSh tomonidan ishlab chiqarilgan) joylashtiring. Operatsiya qorong'uda (fotosurat xonasida yoki maxsus jihozlar yordamida) amalga oshiriladi.

2. Kassetani bir muddat yopiq holda saqlang (odatda ta'sir qilish 2-3 soatdan bir necha kungacha davom etadi) -70°C da.

3. Kassetadan avtografini olib tashlang va plyonka ishlab chiqaruvchisining tavsiyalariga muvofiq rentgen plyonkalari uchun maxsus ishlab chiquvchida tasvirni ishlab chiqing.

4. Tasvirni skanerlang. Gibridizatsiya ma'lumotlarini A bosqichida olingan geldagi chiziqlarning joylashuvi bilan solishtiring.

RNK-DNK GIBRIDIZATSIYA

Elektroforetik tarzda ajratilgan PHK bo'laklarini geldan nitroselyuloza yoki neylon filtrga o'tkazish usuli Nozern-blot deb ataladi. RNK molekulalarini membranaga o'tkazish va qo'shimcha DNK zond bilan gibridizatsiyalashdan so'ng signalni aniqlash tamoyillari yuqorida tavsiflangan DNK-DNK gibridizatsiyasiga (Sauzern- blotting) juda o'xshash. Nozern blotting - bu mRNK hajmini aniqlash va organizm rivojlanishining turli bosqichlarida yoki turli xil

stressli sharoitlarda ma'lum bir genning ekspressiya darajasini o'rganish uchun standart usul hisoblanadi.

FORMALDEGIDLI RNK ELEKTROFOREZI, NOZERN BLOTTING

Odatda, RNK namunalari ikkilamchi RNK tuzilmalarining shakllanishini kamaytirish uchun denaturatsiya qiluvchi vosita sifatida formaldegidni o'z ichiga olgan agaroz gelida ajratiladi. O'rganilayotgan RNK bilan gibrizatsiyalash uchun har xil zondlar (kamida 25 ta komplementar maqsadli RNK(PHK-мишени) asoslarini o'z ichiga olgan DNK, RNK yoki oligonukleotidlar) qo'llaniladi.

Ko'pincha yorliqli praymerlar yordamida RNK bilan gibrizatsiya uchun zond sifatida ishlatiladigan kDNK sintez qilinadi. Zondlar radioaktiv izotoplar (^{32}P) yoki xemilyuminetsent yoki xromogen aniqlash tizimi yordamida yorliqlanadi.

- agaroz;
- - 36,6% formaldegid eritmasi (pH 4,0);
- - 50x FGRB bufer eritmasi (formaldegidjel bilan ishlaydigan buferdan) - 1-ilovaga qarang;
- - Formaldegid elektroforez paytida gelning quduqlariga PHK ni kiritish uchun 4 x bufer eritmasi. Tarkibi: 50x FGRB; bo'yoq eritmasi (50% glitserin; 1 mM EDTA va 0,25% bromofenol ko'k) va mos ravishda 1: 2,5: 9 hajmdagi 36,5% formaldegid. -20°C haroratda saqlang;
- - 20x SSC bufer eritmasi - 1-ilovaga qarang;
- - HSB gibrizatsiya buferi eritmasi (yuqori SDS gibrizatsiya buferidan) - 1-ilovaga qarang;
- - natriy dodesil sulfatning 10% eritmasi;
- - rentgen plyonkasini ishlab chiqaruvchi eritma (pastga qarang).

Metodika

Elektroforez

1.Nozer-n-gibrizatsiya uchun umumiy RNKni fraksiyalash formaldegid bilan 1-1,5% agaroz gelida 2,2 M konsentratsiyada amalga oshiriladi. Gel quyidagicha tayyorlanadi: 1-1,5 g agaroz steril distillangan (deionizatsiyalangan) suvda eritiladi. 2 ml 50x FGRB buferi va 16,6 ml 36,5% formaldegid qo'shing (mo'rili shkak ostida qo'shing, chunki formaldegid bug'i zaharli.). Aralashtiring va 100 ml suv bilan suyultiring. $45-60^{\circ}\text{C}$ gacha sovutilgan gelni qoralama

Molekulyar mikrobiologiya

ostidagi hammom-substratga quying. Faqat shu maqsadda ishlatiladigan alohida toza elektroforez kamerasiga ega bo'lish kerak.

2. RNK namunasini kiritish uchun 4x bufer eritmasi bilan aralashtiramiz (3:1), aralashmani 65°C da 15 daqiqa davomida qizdiring (PHK ning mumkin bo'lgan ikki zanjirli tuzilmalarini denaturatsiya qilish va formaldegidning RNK bilan kimyoviy reaksiyasini ta'minlash uchun) va muzda 2-5 daqiqa sovutib oling. Odatda, 10-20 mkl yakuniy hajmda gelning har bir lunkasiga 10-30 mkg RNK qo'llaniladi (suyultirishlar uchun suvdan ko'ra 100% formamiddan foydalanish yaxshidir).

3. 1x FGRB bufer eritmasida elektroforezni amalga oshiring, bufer gelning yuqori yuzasini qoplamasligi kerak (gelni quritishdan saqlash uchun Saran Wrap plyonkasi bilan yoping). Aks holda, formaldegid geldan tarqaladi va gel qalinligida formaldegid kontsentratsiyasining bir xilligi yuzaga keladi, bu esa elektroforez paytida RNK tasmalarining egilishiga olib keladi. Elektroforez 3-10 V/sm kuchlanishda bromfenolli ko'k bo'yoq gelning ~80% dan o'tguncha amalga oshiriladi (bo'yoq 100 asosli o'lchamdagi RNK bo'lagi hududiga kiradi). Agar bufer eritmasiga etidiy bromid qo'shilsa, keyingi gibridizatsiya natijalarini aniqlashda notekis fonni oldini olish uchun uning konsentratsiyasi 0,1 mkg / ml dan oshmasligi kerak.

Eslatma. Nozern- blotting bilan birgalikda RNK molekulalarining o'lchamini aniqroq aniqlash uchun glioksal va dimetilsulfoksid (DMSO) yordamida agaroz elektroforez keng qo'llaniladi. RNK namunasi quyidagicha tayyorlanadi (30 µl uchun): RNK (10 µg gacha) - 6 µl; 0,2 M Na₂HPO₄ (pH 7,0) - 1,5 µl; DMSO - 15 µl; 6 M deionizatsiyalangan glioksal - 4,5 mkl va denaturatsiya uchun 50 ° C da 1 soat davomida inkubatsiya qilinadi.

Keyin muz ustida namunaga 3 µl 10x buferi qo'shiladi va 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0, DEPC-suv) da tayyorlangan 1% agaroz geli lunkalariga yuklanadi. Elektroforez 4 V/sm tezlikda glioksalning dissotsiatsiyasini oldini olish uchun bufer eritmaning anoddan katodga qayta aylanishi bilan amalga oshiriladi. RNK molekulyar og'irlik belgilari, 10–20 ng/µl (Roche Diagnostics, Shveytsariya) standart sifatida ishlatilishi mumkin.

B. RNKni membrana filtriga o'tkazish

1. 30-45 daqiqa davomida 300 ml suvda formaldegiddan gelni qisman yuving.

2. Gelni 300 ml 20x SSC buferida 30-45 daqiqa davomida yuving.

3. PHK ni geldan Hybond N yoki Hybond N+ neylon membranasi (GE Healthcare, Buyuk Britaniya) kapillyar usulda o'tkazish 18-24 soat ichida amalga oshirilishi mumkin. Buning uchun 20xSSC buffer eritmasi ishlatiladi va vatman qog'oz, gel, membrana va qog'oz filtrlardan katta bo'lmagan "sendvich" taxlanadi

4. RNKni immobilizatsiya qilish uchun membranani qisqa muddatga (2 min) UV nurlari bilan nurlantiriladi yoki 80°C da 2 soat davomida inkubatsiya qilinadi. Whatman qog'oz varaqlari - 20 ° S da.

B. DNK zond bilan RNKning gibridlanishi

1. Membrana filtrini 2x SSCda PHK namunalari bilan namlang va 12-25 ml HSB gibridizatsiya bufer eritmasi bo'lgan gibridlash stakaniga soling. 42-68 ° S haroratda (oligonukleotid zondining nukleotid tarkibiga qarab) 30-60 daqiqa (ba'zan bir necha soatgacha) doimiy aylantirib aralashtirish bilan oldigibridizatsiyani amalga oshiring.

2. Probirkaga radioaktiv yorliqli DNK zondini (0,1-1,0 mkg) qo'shing va 12-24 soat davomida gibridizatsiyani davom ettiring.

D. Membrana filtrini bog'lanmagan yorliqdan yuvish

1. Membranali filtrni ikki marta 50 ml 1 x SSC 0,1% SDS bilan xona haroratida 10-15 daqiqa davomida yuving.

2. Membranani ikki marta 50 ml 0,1 x SSC bilan 0,1% SDS bilan 65-68 ° C da 20-30 daqiqa davomida yuving. Eritmani issiq holda yuvish haroratiga keltirish uchun oldindan qizdirish kerak. Ba'zi protokollar Nozern-blot uchun bog'lanmagan zondlarni issiq yuvishni tavsiya etmaydi.

D. Radioavtografiya va rivojlanishi(проявка)

1. Ho'l membranani polimer plyonkaga yopishtiring va avtoradiografiya yordamida radioaktiv signallarni ro'yxatdan o'tkazing (masalan, Kodak X-Ota1 plyonkasi, Eastman Kodak, AQSh). Radioavtografiyaning davomiyligi quyidagi formulalar bo'yicha radioaktivlikning umumiy foniga qarab belgilanadi: $T_{\text{exr}} = [600 \times 100] / \text{srt}$ va $T_{\text{exr}} = [600 \times 100] / [\text{srt} \times 4]$, bu yerda T_{exr} - xona haroratida radioavtografiya uchun kassetada filtr va rentgen plyonkaning ta'sir qilish vaqti (soatlarda); $T_{\text{exr}} - 70^\circ \text{C}$ da avtoradiografiya uchun kassetada filtr va rentgen plyonkaning ta'sir qilish vaqti (soatlarda). Membrananing qurib ketishiga yo'l qo'ymaslik uchun ekspozitsiyani - 70 ° C da amalga oshirish yaxshiroqdir.

Molekulyar mikrobiologiya

2. Ishlab chiquvchi(проявителя) yordamida filmni 3-4 daqiqa davomida ishlab chiqing.(Проявить) Misol uchun, PT-2 ishlab chiqish(проявки) eritmasi deionizatsiyalangan suvda (qorong'ilikda saqlanadi) tayyorlangan I va II eritmalarning teng hajmlaridan iborat. I eritmada (litrdan) 28 g metol va 28 g gidroksinon mavjud. II eritmaning tarkibi (1 litr uchun): 106 g NaSO₃; 20 g NaOH; 20 g KBr va 100 ml etanol.

3. (1 litr deionizatsiyalangan suv uchun) 250 g natriy giposulfit va 10 g bor kislotasi bo'lgan eritma yordamida plyonkani 15-20 daqiqa davomida mahkamlang.(Фиксировать) Plyonkani vodoprovod suvi bilan 15 daqiqa davomida yuvib tashlang, deionizatsiyalangan suv bilan chayqang va quriting.

4. Radtiovavtrofayk tasvirlarning densitometriyasi Un-Scan-It (Silk Scientific, Inc., AQSH) kabi turli kompyuter dasturlari yordamida amalga oshiriladi.

GEN DAKTILOSKOPIYA

Genetik daktiloskopiya yoki DNK daktiloskopiya - bu har bir tirik mavjudotning DNK nukleotidlari ketma-ketligining o'ziga xosligiga asoslangan individlarni (organizmlarni) biologik identifikatsiya qilishning ilmiy usullari tizimi, o'ziga xos "genetik iz" bo'lib, u shaxs (organizm)ning individual va butun hayoti davomida o'zgarmaydi.

Usul 1984-yil 10-sentyabrda ingliz genetiki Alek Jeffreys tomonidan kashf etilgan. U butun dunyoda asosan sud-tibbiyot sohasida turli jinoyatlarni ochish uchun sud-tibbiy ekspertizalarni o'tkazishda, shuningdek, qarindoshlik aloqalarini o'rnatish va shaxsni aniqlash bilan bog'liq boshqa ko'plab vazifalarni hal qilishda qo'llaniladi.

Bugungi kunda DNK barmoq izlari hatto portativ laboratoriyalarda ham amalga oshirilmoqda va dunyoning o'nlab korxonalari odamni genomik identifikatsiyalash uchun uskunalar ishlab chiqaradi.

Insonni (individual yoki organizmni) DNK identifikatsiya qilish usuli, barmoq izlari bilan identifikatsiya qilish usuliga o'xshash, boshqa ko'plab buyuk kashfiyotlar singari, tasodifan - boshqa tadqiqotning qo'shimcha mahsuloti sifatida tug'ilgan.

1984-yil 10-sentyabrda ingliz genetiki Alek Jeffris Lester universiteti laboratoriyasida xromosoma DNKdagi genetik anormalliklarni kuzatishning yangi usullaridan birini o'rganish

jarayonida DNKning rentgen nurlarini ko'rib chiqdi va to'satdan DNKning mavjudligini aniqladi. Turli odamlarning zanjirlari noyob nukleotid ketma-ketligiga ega.

Olim mioglobinni kodlovchi DNKni tahlil qilar ekan, gelda (ya'ni DNK bo'laklari elektr maydonida kattaligiga qarab tezlikda harakatlanadigan jelatin matritsasi) ko'plab minisatellitlarni topdi. Bu g'alati ko'rinardi, garchi genlarning aksariyati uni o'qiyotganda hisobga olinmaydigan "arimas" DNK bo'laklarini o'z ichiga olgan bo'lsa-da, DNKdan oqsil sintezi joyiga genetik ma'lumotni tashuvchisi. Yaqindan o'rganib chiqqach, u turli odamlarning DNK namunalarida bir-biridan juda farq qiluvchi minisatellit ketma-ketliklari mavjudligini tushundi. Jeffries bu nimani anglatishini darhol tushundi. Muayyan shaxsning DNK ketma-ketligi uning DNK profilini yoki "genetik pasport" ni tashkil qiladi, bu shaxsni aniq identifikatsiyalash uchun ishlatilishi mumkin. U kashf etgan DNK segmentlari hech qachon takrorlanmaydi.

Jeffries tadqiqot natijalarini e'lon qilishi bilanoq, Buyuk Britaniya Ichki ishlar vazirligi olimlari darhol u bilan bog'lanishdi: kashfiyotda ular Britaniya fuqarosi bilan yaqin qarindoshligini da'vo qilayotgan muhojirlar haqiqatni gapiryaptimi yoki yo'qligini tekshirishning ishonchli usulini ko'rdilar.

Bu kashfiyot, albatta, birinchi navbatda sud-tibbiyot ekspertizasi jarayonida gumon qilinuvchi shaxslarning ayblanayotgan jinoyatlariga aloqadorligini yoki aksincha, aloqador emasligini isbotlash uchun sud-tibbiyot ekspertizasida qo'llanila boshlandi. An'anaviy barmoq izlariga - barmoq izlari bo'yicha shaxsning shaxsini aniqlashga - genetik (genomik) barmoq izlari, ya'ni shaxsni aniqlash qo'shildi:

1. sochlar (ildiz bilan),
2. tupurik (masalan, sigaret filtrida),
3. teri zarralari,
4. bir tomchi qon
5. suyaklar, shu jumladan tish;

Darhaqiqat, har qanday inson biomaterialida DNK mavjud. Va, Alek Jeffreys ta'kidlaganidek, odamlarni uning xususiyatlari bilan aniqlash mumkin. Jinoiy tergov harakatlari jinoyat joyidan topilgan sochlar, tana suyuqliklari va teri namunalaridan olingan DNK bilan gumonlanuvchilarning DNKsini solishtirishga kirishdi.

Molekulyar mikrobiologiya

Keyinchalik, Alek Jeffreys tomonidan kashf etilgan DNK barmoq izini olish texnikasi qarindoshlikni o'rnatish va shaxsiy identifikatsiya bilan bog'liq boshqa ko'plab vazifalarni hal qilish uchun hamma joyda qo'llanila boshlandi.

Hozirgi vaqtda DNKni tiplash eng kuchli va keng qo'llaniladigan biotexnologik usullardan biridir. U DNK namunalari tarkibidagi eng kichik farqlarni aniqlash uchun, shu jumladan organ va to'qimalarni transplantatsiya qilishda donor va retsiptiyentning mosligini aniqlash, o'ziga xos mikroorganizmlarni aniqlash, o'simliklarni ko'paytirish jarayonida zarur genlarni kuzatish, otalikni aniqlash, odam qoldiqlarini aniqlash (masalan, noma'lum o'lgan askarlar yoki ofat qurbonlarini aniqlash uchun), hayvonot bog'larida hayvonlarning ko'payishini tartibga solish, OIV infeksiyasi va xlamidiya kabi kasalliklarni yuqori aniqlik bilan tezkor tashxislash, kasallikni aniqlaydigan genlarni aniqlash. odamning saraton va boshqa kasalliklarning turli shakllariga moyilligini aniqlashda samarali hisoblanadi..

DNK profilini yaratish jarayoni

Inson DNK ketma-ketligining 99,9% tarkibi bir xil bo'lishiga qaramay, turli odamlarning DNKlari juda individualdir. DNK profilini aniqlash genomning tanlangan hududida takrorlanuvchi elementlar sonini tahlil qiladi. Takrorlanuvchi element tandem takrori deb ataladi va uning soni o'zgaruvchan.

DNK profilini tuzishda genomning (yoki lokuslarning) qancha ko'p qismlari tahlil qilinsa, shaxsni aniqlashning aniqligi shunchalik yuqori bo'ladi. Hozirgi vaqtda DNK profilini tuzish uchun lokuslar soni 16 yoki undan ko'pga etadi [8].

Insonning DNK profilini tuzish (DNK profilini aniqlash)ni ularning genomini to'liq dekodlash bilan adashtirmaslik kerak.

DNK profilini aniqlash jarayoni shaxsning DNK namunasini tayyorlash bilan boshlanadi (odatda "nazorat namunasi" deb ataladi). Yo'naltiruvchi namunani olishning eng maqbul usuli bukkal (yonoq) tamponidan foydalanishdir, chunki bu usul ifloslanish ehtimolini kamaytiradi. Agar buning iloji bo'lmasa (masalan, agar bunday tartib sud qarorini talab qilsa), boshqa usullardan qon, tupurik, sperma yoki boshqa mos suyuqliklar yoki shaxsiy narsalardan (masalan, tish cho'tkasi, ustara va boshqalar) to'qimalardan namunalar olish uchun foydalanish mumkin. Saqlash joylaridan olingan namunalar (masalan, sperma banki yoki to'qima biopsiyasini saqlash) ishlatilishi mumkin.

Biologik qarindoshlarning qonidan olingan namunalar, avvalroq profillangan odam qoldiqlari kabi, shaxsning profilining ko'rsatkichi bo'lib xizmat qilishi mumkin.

Keyin quyida tavsiflangan usullardan biri yordamida shaxsning DNK profilini yaratish uchun nazorat namunasi tahlil qilinadi. Tahlil qilingandan so'ng, genetik o'xshashlik mavjudligini aniqlash uchun DNK profilini boshqa namuna bilan solishtirish mumkin.

Shu bilan birga, DNK namunalarini solishtirish, ayniqsa, jinoiy tergovda, ayniqsa ekspertlar gumonlanuvchilar haqida qo'shimcha ma'lumot olganlarida, etarli darajada ob'ektiv bo'lmashligi mumkin.[9]

DNK PROFILINI ANIQLASH USULLARI

RFLP tahlili(Restriksion fragmentlar uzunligi polimorfizmi)

DNK profilini aniqlash uchun ishlatiladigan birinchi genetik tahlil usullari cheklash endonukleazasini aniqlash va keyinchalik Southern blot tahlili edi. Polimorfizm chegaralangan endonukleaza bo'linish pozitsiyalarida paydo bo'lishi mumkin bo'lsa-da, fermentlar va DNK problari tandem takroriy lokuslarni tahlil qilish uchun eng ko'p ishlatiladi. Biroq, Southern blotting ko'p mehnat talab qiladi va ko'p miqdordagi DNK namunalarini talab qiladi.

Bundan tashqari, Karl Braunning ko'plab minisatellit lokuslarini ko'rishning original texnikasi bir vaqtning o'zida kuzatilgan o'zgaruvchanlikni oshiradi, bu alohida allellarni ajratishni qiyinlashtiradi va shu bilan otalikni tekshirish uchun ushbu usulni istisno qiladi. Ushbu dastlabki usullar PCR usullari bilan almashtirildi.

PSR tahlili

Polimeraza zanjiri reaksiyasi (PCR) texnikasi ixtiro qilinishi bilan DNK profilini o'zgartirish va juda kichik (yoki buzilgan) namunalardan ma'lumotni tiklash qobiliyati jihatidan oldinga katta qadam tashladi. PCR oligonukleotid primerlari va termoCTABil DNK polimerazalari yordamida DNK segmentini bir necha marta ko'paytirish imkonini beradi. Tahlilning birinchi usullari, masalan, nuqtalarni tozalash, ularning soddaligi va natijalarni olish tezligi tufayli juda mashhur edi. Biroq, ular RFLP usuli bilan bir xil rezolyusiyaga ega emas edilar. Bundan tashqari, jinsiy zo'ravonlik qurbonlaridan olingan vaginal tampon kabi namunalar aralashmasi uchun DNK profillarini aniqlash qiyin bo'lgan.

Molekulyar mikrobiologiya

Yaxshiyamki, PCR usuli tandem takroriy lokuslarni tahlil qilish uchun osongina moslashtirildi. AQShda FQB DNK profilini aniqlash uchun 13 ta tandem takrori to'plamini standartlashtirdi, shuningdek, jinoiy ishlar bo'yicha sud-tibbiy identifikatsiya qilish uchun birlashtirilgan DNK ma'lumotlar bazasini - Birlashtirilgan DNK indeks tizimini (CODIS) yaratdi. Shunga o'xshash tahlillar va ma'lumotlar bazalari boshqa mamlakatlarda ham yaratilgan. Bundan tashqari, bitta nukleotid polimorfizmini (SNP) tahlil qilish imkonini beruvchi asboblarni to'plamini ishlab chiqilgan.

Qisqa tandem takrorlash tahlili

Hozirgi vaqtda qo'llaniladigan DNK profilini aniqlash usuli PCR usuliga asoslangan va qisqa tandem takrorlaridan (SRT) foydalanadi. Bu usul qisqa takrorlanuvchi DNK ketma-ketligiga ega bo'lgan yuqori polimorfik hududlarni tahlil qiladi (eng keng tarqalgani 4 ta asosiy takrorlanishdir, lekin boshqa takroriy uzunliklar ham topiladi, shu jumladan 3 va 5 ta asosiy juftlik). Turli odamlar turli xil takroriy sonlarga ega bo'lganligi sababli, bu DNK hududlari shaxslarni farqlash uchun ishlatilishi mumkin. CTP o'z ichiga olgan genom hududlari uchun o'ziga xos oligonukleotid primerlari tanlanadi, so'ngra tegishli DNK fragmentlari PCR yordamida kuchaytiriladi. Keyinchalik bu DNK fragmentlari elektroforez orqali ajratiladi va tan olinadi. Ikkita umumiy ajratish va tanib olish usullari mavjud: kapillyar elektroforez (CE) va gel elektroforezi.

Mitoxondrial tahlil

Yuqori darajada degradatsiyaga uchragan bio-namunalar uchun ba'zan etarli yadroviy DNKni olish mumkin emas. Bunday holatlarda mitoxondrial DNK (mtDNK) tahlil qilinadi, chunki hujayrada mtDNK ning ko'p nusxalari mavjud, yadro DNKsining esa 1-2 nusxadan ko'p bo'lmasligi mumkin. Mitoxondriyal tahlil yo'qolganlar kabi holatlarda faqat onalik qarindoshlari bo'lgan hollarda aniqlashda foydali yordamchi hisoblanadi. Mitoxondriyal DNKni sochlar (ildizlari bilan), eski suyaklar yoki tishlar kabi biomateriallardan olish mumkin.

Bu usul, xususan, dunyodagi eng mashhur firibgarlardan biri Anna Anderson o'zi da'vo qilgan Rossiyaning Buyuk Gertsogi Anastasiya Nikolayevna Romanova emasligini aniqlashda ishlatilgan.

GENLARNI NOKAUTLASH

Gen nokauti- molekulyar genetika usuli bo'lib, unda ba'zi genlar tanadan olib tashlanadi yoki ishlamay qoladi. Shunday qilib,

ishlamaydigan genlar uchun "nokaut" bo'lgan organizm olinadi. Nokaut organizmlar nukleotidlar ketma-ketligi ma'lum bo'lgan genlarning funktsiyalarini o'rganishga yordam beradi (teskari genetika). Nokaut va oddiy organizmlar o'rtasidagi farqlar nokaut qilingan gen funktsiyasini ko'rsatishi mumkin.

Knock-in genlarini kiritish usuli gen nokaut usuliga o'xshaydi, lekin knock-in holatida berilgan gen tanadan chiqarilmaydi, balki boshqasi bilan almashtiriladi.

Nokaut usuli 1980-yillarda Mario Kapekki, Oliver Smitis va Martin Evans tomonidan ishlab chiqilgan bo'lib, ular o'zlarining ishlari uchun 2007 yilda fiziologiya yoki tibbiyot bo'yicha Nobel mukofotini olganlar.

Genni nokdaun qilish - bu tegishli nukleotidlar ketma-ketligini o'zgartirish yoki mos keladigan m-RNK molekulasi bilan komplementar qisqa oligonukleotid yordamida bir yoki bir nechta genlarning ekspressiyasini kamaytiradigan usul. Genni nokdaun qilish usuli teskari genetika usullariga tegishli. Agar genning ketma-ketligi o'zgarganda, organizm bu gen uchun nokaut deb ataladi.

Tegishli m-RNKga komplementar yoki DNKdagi nukleotidlar ketma-ketligi bilan bog'langan qisqa oligonukleotidlardan foydalanilganda, genning nokdaunti genning xromosoma tuzilishi va DNK ketma-ketligini o'zgartirmasdan, gen ekspression parametrlarining vaqtincha o'zgarishiga olib keladi.

Qisqa muddatli nokdaun holatida oligonukleotidning gen yoki transkript bilan bog'lanishi transkripsiya, translatsiya yoki m-RNK degradatsiyasi bloklanishi (masalan, RNK aralashuvi tufayli) tufayli ekspressiyani pasaytiradi, m-RNKdan oldingi birlashma ham buzilishi mumkin. Tadqiqotchilar genni o'chirish yoki uning ekspressiyasini kamaytirishning organizmning fenotipiga ta'sirini o'rganadilar va uni oddiy odamlar bilan solishtiradilar. Qisqa muddatli gen nokdaunlari ko'pincha rivojlanish biologiyasida qo'llaniladi, chunki oligonukleotidlar zigotaga osongina kiritilishi mumkin va embrion rivojlanish jarayonida barcha qiz hujayralariga o'tkaziladi.

Nazorat savollari

1. Kimyoviy sekvens va fermentativ sekvensni bir-biridan farqlarini aytib berin.
2. Gibrizatsiyani qanday turlari bor?

- 3.DNK-DNK gibridizatsiya qanday tartibda amalga oshiriladi?
- 4.RNK-DNK nima deb nomlanadi?
- 5.Gen daktiloskopiyasi nima?
- 6.Gen daktiloskopiyasini qanday usullari bor?
- 7.Genlarni nokautlash nima?

Foydalanilgan adabiyotlar

Gibridizatsiya uchun

- 1.Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G. R. A method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzomethyl-paper and hybridization with DNA probes// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5350-5354.
- 2.Carlson D.P., Superko C., Mackey J., Gaskill M.E., Hansen P. Chemiluminescent detection of nucleic acid hybridization 11 Focus. 1990. V. 12. P. 9—12.
- 3.Grunstein M., Hogness D.S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975. V. 72. P. 3961-3965.
- 4.Khandijan E. W. Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes // Biotechnology. 1987. V. 5. P. 165—167.
- 5.Meinkoth J., Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports//Anal. Biochem. 1984. V. 138. P. 267-284.
- 6.Pollard-Knight D., Simmonds A.C., Schaap A.P, Akhavan H., Brady M.A. Nonradioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence // Anal. Biochem. 1990. V. 185. P. 353—358.
- 7.Sayler G.S, Layton A.C. Environmental application of nucleic acid hybridization // Annu. Rev. Microbiol. 1990. V. 44. P. 625-648.
- 8.Southern E. Southern blotting // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 518—525.
- 9.Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis//J. Mol. Biol. 1975. V. 98. P. 503—517.
- 10.Tyagi S., Kramer F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // Nat. Biotechnol. 1996. V. 14. P. 303-308.
- 11.Wetmer J.G. Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids // Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1976. V. 5. P. 337-361.

Genlarni nokautlash

1. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. — 5. — Garland Science, 2008. — 1392 с. — ISBN 0815341059.
2. ↑ Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — Москва: Мир, 2002. — 589 с. — ISBN 5030033289.
3. ↑ Нобелевская премия по физиологии и медицине — 2007, Элементы.ру (12.10.2007). Архивировано 13 января 2017 года. Дата обращения: 12 января 2017.
4. ↑ О. БЕЛОКОНЕВА. НОБЕЛЕВСКИЕ ПРЕМИИ 2007 ГОДА. ГЕНЫ ПОД ПРИЦЕЛОМ, НАУКА И ЖИЗНЬ (декабрь 2007). Архивировано 13 января 2017 года. Дата обращения: 12 января 2017.
5. Summerton, J. Morpholino, siRNA, and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity (англ.) // Med Chem. : journal. — 2007. — Vol. 7, no. 7. — P. 651—660.
6. ↑ Summerton, J. Morpholino Antisense Oligomers: The Case for an RNase-H Independent Structural Type (англ.) // Biochimica et Biophysica Acta (англ.)рус.: journal. — 1999. — Vol. 1489, no. 1. — P. 141—158. — PMID 10807004.
7. ↑ Nasevicius, A; Ekker S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish (англ.) // Nature Genetics : journal. — 2000. — Vol. 26, no. 2. — P. 216—220. — doi:10.1038/79951. — PMID 11017081.

14-MAVZU. GENODIAGNOSTIKA VA GENOTERAPIYA USULLARI.

Reja:

1. DNK reparatsiya, genomni redaksiyalash
2. CRISPR/Cas9 redaksiyalash tizimi
3. TALEN redaksiyalash tizimi.

Molekulyar mikrobiologiya

Tayanch soʻz va iboralar: DNK reparatsiya, genomni redaksiyalash, CRISPR/Gas9 redaksiyalash tizimi, TALEN redaksiyalash tizimi.

Gen diagnostikasi - alkogolizm, semizlik, onkopatologiya, homiladorlik, bepushtlikka moyillik uchun qon testi, shuningdek, turli sport turlariga individual moyillikni aniqlashda qoʻllaniladi

Gen diagnostikasi - irsiy patologiyaga olib keladigan mutatsiyalarni aniqlash uchun molekulyar genetik usullardan foydalanadigan tibbiyotning yangi sohasi. Asosiy usul DNK testidir.

Tadqiqot natijalariga koʻra, shifokor bemor uchun eng xavfli kasalliklarning samarali oldini olishi, kuzatish, dori terapiyasi, ovqatlanish va turmush tarzi boʻyicha individual tavsiyalar berishi mumkin.

Gen terapiyasi - gen nuqsonlarini yoʻnaltirilgan oʻzgartirish yoki hujayralarga yangi xususiyatlar berish maqsadida bemorlarning somatik hujayralariga genlarni kiritish orqali irsiy, koʻp omilli va irsiy boʻlmagan (yuqumli, xavfli va boshqalar) kasalliklarni davolash.

Reparatsiya yoki taʼmirlash (lotincha reparatio - tiklash) - hujayraning maxsus funksiyasi boʻlib, u hujayradagi normal DNK biosintezi paytida yoki fizik yoki kimyoviy reagentlar taʼsirida shikastlangan DNK molekulalarining kimyoviy shikastlanishi va uzilishlarini tuzatish qobiliyatidan iborat. U hujayraning maxsus ferment tizimlari tomonidan amalga oshiriladi. Bir qator irsiy kasalliklar (masalan, xeroderma pigmentosum) taʼmirlash tizimlarining buzilishi bilan bogʻliq.

Genomni tahrirlash - bu genetik muhandislikning bir turi boʻlib, unda organizm genomiga DNK boʻlaklarini kiritish, olib tashlash yoki qayta joylashtirish maxsus ishlab chiqilgan endonukleazlar yoki "molekulyar qaychi" yordamida amalga oshirilishi mumkin. Ushbu usulda turdagi nukleazalar qoʻllaniladi:

- meganukleazalar,
- sink barmoq nukleazalari (rux barmoqlari),
- TALEN nukleazalari
- CRISPR-Cas tizimi

Yana bir usul, genetik materialni hujayralarga etkazish uchun sunʼiy ravishda yaratilgan patogen boʻlmagan viruslardan foydalanishga asoslangan. Bu usul 2011-yilda genomni tahrirlash "Yil usuli" deb topildi

CRISPR/Gas konsepsiyasi

Kasalliklarni genetik darajada davolash zamonida, hozirgi tibbiyot uchun butun tirik olamning universal biologik kodi – DNKni muvaffaqiyatli tahrirlash maqsadida molekular usullar muhimligi juda ham oshib boryapti. Bugungi kunda shunday molekular usullarning ichida eng bexatosi bu CRISP/Cas texnologiyasidir. Kelinglar unda CRISP/Cas o‘zi nima va u bilan nima qilish mumkinligini ko‘raylik.

Bakteriyalar immuniteti haqida bir og‘iz gap

Bakteriyalar – bizning mikroskopik ukalarimiz – ham kasal bo‘lishadi. Bakteriyalarning kasalliklarini qozg‘atuvchi agentlar – bakteriofag-viruslardir. Va albatta, Darvin bobomizning tabiiy tanlanish mexanizmlariga ko‘ra, bakteriyalar bu dunyoda o‘z avlodini qoldirib, o‘z turini saqlab qolishlari uchun viruslarga qarshi muvaffaqiyatli kurashish metodlarini (bakterial immunitet desak xato bo‘lmas edi) o‘ylab topishlari kerak bo‘lgan. Va aynan CRISP/Cas shu bakterial immunitet vazifasini bajaradi.

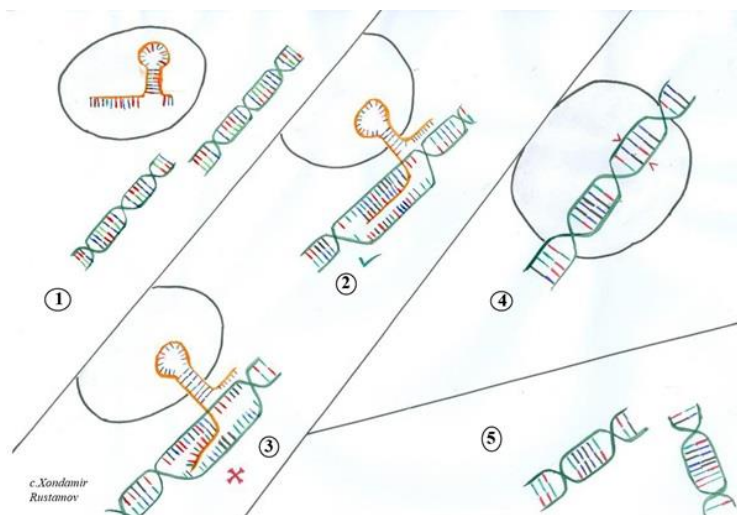
Hayot davomida bakteriya hujayrasiga yuzlab o‘zga DNK zanjirlari (keling ularni qulfga o‘xshataylik) tushib qoladi. Shu qulflar ichidan bir nechitasi bakteriya uchun xavfli bo‘ladi – bular virus DNKsidir.

CRISP/Cas shu virus DNKsi bilan kurashadi. U ikki qismdan iborat: birinchisi – kalit – u xavfli qulflarga tog‘ri tushib ularni tanib oladi, ikkinchisi esa – bolg‘a – u qulfnı sindirish qobiliyatiga ega. Agar siz bakteriya bo‘lsangiz viruslarga qarshi kurashish quroli – CRISP/Cas – tayyorlash usulini yozib oling. Buning uchun sizga quyidagicha masalliq kerak bo‘ladi:

– DNK zanjirini kesa oladigan Cas nukleaza-oqsili (“bolg‘a”) – 1 dona (Siz buni xromosomangizdagi Cas genidan osongina sintez qilib olishingiz mumkin).

– Virus DNKsini tanib oladigan, 20-30 nukleotiddan iborat bo‘lgan RNK zanjiri (RNK-gid deb nomlanadi – “kalit”) – 1 dona (bu masalliqni ham xromosomangizdagi CRISP genidan sintez qila olalasiz)

Kalit bilan bolg‘a bakteriya hujayrasiga tushgan hamma qulflarni tekshirib chiqishadi. Agar ularning ichida kalitga tog‘ri tushadigan qulf topilsa, bu qulf virus DNKsi deb hisoblanadi va Cas oqsili virus DNK zanjirini shavkatsizlik bilan ikkiga bo‘lib tashlaydi va u endi foydasiz nukleotidlar to‘plamiga aylanib qoladi.



12-rasm. CRISP/Casning virus DNKsini topish va kesish jarayoni

1) CRISP/Cas va bakteriya hujayrasiga tushgan o'zga DNK zanjirlari.

2) RNK-gid DNK zanjirlarini xavfliqligini tekshirmoqda. DNK RNK-gidning tanuvchi nukleotidlariga 100% komplementar – bu virus DNKsi.

3) DNK RNK-gidning tanuvchi nukleotidlariga 100% to'g'ri kelmadi – bu virus DNKsi emas

4) Cas nukleaza-oqsili virus DNKsini qaychi singari kesib tashlamoqda

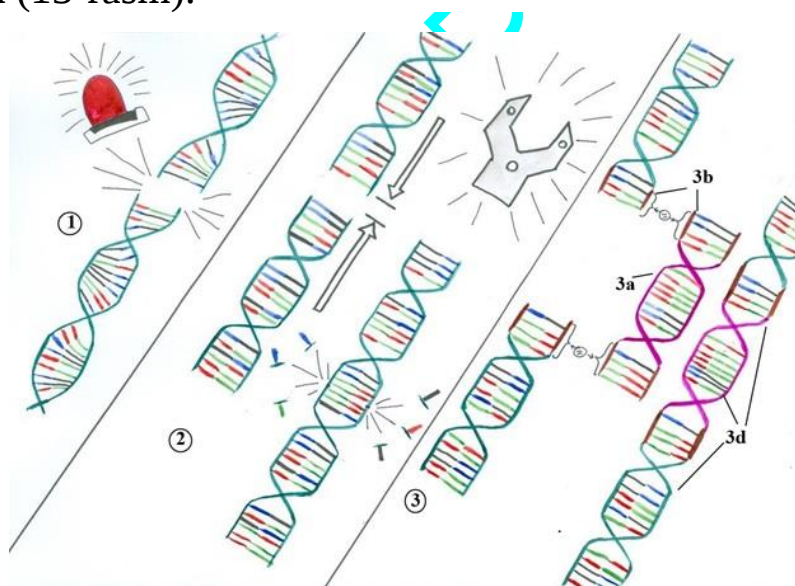
5) Ikkiga kesilgan xavfsiz virus DNKsi

Xo'p endi aytingchi bundan odamlarga foydasi bormi? Ha, juda ham to'g'ri savol. Yuqorida aytilgan gaplar bilan odamlarda kasalliklarni davolash o'rtasida bitta ham o'xshashlik yo'qligiga siz ham e'tibor bergan bo'lsangiz kerak. Chunki biz virus yoki hatto bakteriyalar ham emasmiz.

CRISP/Cas sistemalari dunyo ilm-fanini juda ham katta qiziqishini jalb qildi. Ko'plab olimlar CRISP/Casni o'rganishni boshladi. Ularning tadqiqotlari CRISP/Cas nafaqat virus DNKsini, balki undan ancha murakkabroq organizmlarning (ko'plab xayvonlar, va shu jumladan odamning ham) DNKsini kesa olishini ko'rsatib berishdi (12-rasm). Bunday DNKni “qirqish” hozirgi ilm-fanda juda ham katta ahamiyatga ega. Buning yordamida biz, masalan, bir xilgi nasl kasalliklarga olib keluvchi genlarni “o'chirib” qo'yishimiz mumkin.

Buning uchun biz o'zimizning organizmimizdagi o'zgartirishni xohlaydigan genimizni (qulfni) taniydigan RNK-gid (kalit) tayyorlashimiz kerak. Bu ishni biz hozirgi gen injeneriya metodlari yordamida osonlik bilan bajarishimiz mumkin. Bundan so'ng biz o'zgartirilgan kalit bilan boltani biriktiramiz va odam hujayrasi ichiga jonatamiz.

CRISP/Cas odam hujayrasiga tushganidan so'ng bakteriya ichida bo'lib o'tgan stsenariy bo'yicha ishlashni boshlaydi. RNK-gid kerak genni topadi va Cas oqsili bu genni qaychi singari ikkiga kesib tashlaydi. Shu yerdan senariyda o'zgarishlar paydo bo'ladi. Biz virus emasmiz va bizning hujayralarimizda maxsus DNKni himoya va saqlash sistemalari mavjud. Agar hujayra o'zining DNKsi shikastlanganligini bilib qolsa u albatta o'z ichida "harbiy holat" e'lon qiladi. Bundan so'ng hujayra ikki DNK zanjirlarini bir biriga oddiy urushtirish orqali biriktirishga harakat qiladi. Bu harakat DNK zanjirlarini biriktirishga olib keladi, ammo bunda o'rtadagi ayrim nukleotidlar tushib qolishiga sabab bo'lishi mumkin. Bu genni "o'chishiga" yoki genni ichida xavfliroq mutatsiyalariga sabab bo'lishi mumkin (13-rasm).



13-rasm. Hujayrada DNK reparatsiya jarayoni.

- 1) Hujayra shikastlangan DNK zanjirini topib oldi.
- 2) Hujayra ikki DNK zanjirlarini urushtirish yo'li bilan birlashtirishga harakat qilmoqda (ayrim nukleotidlar tushib qoldi).
- 3) Shikastlangan DNK zanjiri, 3a-biz kiritgan DNK zanjiri, 3b-o'xshash nukleotidlar ketma-ketligi, 3d- o'zgartirilgan gen.

Molekulyar mikrobiologiya

Bu ishda faqat omadga ishonib qolmasligimiz uchun, biz CRISP/Cas bilan birga hujayra ichiga biz o'zgartirishni xohlaydigan gen bilan chekkalari o'xshash DNK zanjirini jo'natishimiz mumkin. Hujayra bu DNK zanjirimiz genni gomologik kopiyasi deb hisoblaydi va shu DNK zanjiri asosida o'zining genini reparatsiya (tuzatish) qiladi.

Shu bois biz nafaqat genlarni bexato "kesa" olamiz, balki ularga xohlaganimizdek yangi genlar qo'sha olamiz. Bu texnologiya odamlarda hozirgacha ishlatilganmi? Kelajakda bizni nima kutmoqda?

CRISP/Cas ustida tajribalar butun dunyoda juda ham katta tezlik bilan olib borilyapti. Ayni paytda organik olamning ko'plab turlarining genomini taxrirlash metodlari ishlab chiqilgan. Bu texnologiyani odamlarda qo'llanishi ham chuqur o'rganib chiqilyapti. Masalan, 2016 yilning oktabr oyida xitoylik olimlar o'pka saratoniga chalingan bemorning genlarini ilk marotaba muvaffaqiyatli taxrirla olishgan, 2015 yilda olimlar beta-talassemiya bilan kasallangan odam embrionlarini genomini taxrirlashgan. 2018 yilning noyabr oyida yana Xitoyda Xe Tszunkay olim tomonidan CRISP/Cas texnologiyasi yordamida dunyoda birinchi gen-o'zgartirilgan chaqaloqlar (ularda OITSga olib keladigan gen o'zgartirilgan) yaratishda yordam berganligi tog'risida e'lon qilindi (bunga aniq ilmiy tasdiqlar hali yo'q).

Kelajakda CRISP/Cas texnologiyasi nimalarga qodir ekanligini tasavvur qilish ham qiyin. Fantaziyamizni yaxshiroq ishlatsak, Gollivudning yangi fantastik blokbasteri syujetini o'ylab qo'yishimiz ham mumkin. Real dunyoda esa bu umuman boshqa masala – ilm etikasi masalasi, lekin bu butunlay boshqa mavzudir...

Genomni tahrirlash tizimlarining asosiy yo'nalishlari.

Yangi avlod texnologiyalari: Zinc Finger, TALEN, CRISPR.

Zinc-finger texnologiyasi. Fok I – endonukleazalar domeni bilan bog'langan oqsil domeninig "Rux barmoqchalari" tipi sayt-spetsifik nukleaza sifatida faol bo'lib DNKni in vitro sharoitida qat'iy belgilangan uchastkalarini o'ta aniqlikda qirqishi allaqachon 1996-yilda birinchi marta ko'rsatib berilgan edi. Shu kabi ximerik oqsillar modulli strukturaga ega bo'lib har bir "rux barmoqchalari" domeni bir nukleotid tripletini taniydi (Zinc-finger Nuclease, ZFN).¹ Bu kulturalanadigan hujayralar jumladan pluripotent tana hujayralari hamda model hayvonlar va o'simliklarda asosiy tahrirlash usuliga aylandi.² Ammo ZFN texnologiyasi murakkabligi va har bir aniq genom lokuslari uchun oqsil domenlarining konstruksiyasini tuzishga

yuqori harajat talab etilishi, bir nukleotidli almashinuv yoki domenlar aro o‘zaro noto‘g‘ri ta’sirlar sababli DNK-nishonning noaniq qirqilishi ehtimolliklari kabi bir nechta kamchiliklarga ega.³ Shuning uchun genomni tahrirlovchi yangi texnologiyalar topish maqsadida faol izlanishlar davom etdi. So‘nggi yillarda bu izlanishlar genomlarni tahrirlash imkonini beruvchi yangi instrumentlarning yaratilishiga sabab bo‘ldi. Oshirish va ular uchun konstruksiyalar tuzishning nisbatan soddaligi bilan farq qiladi. Bu kabi texnologiyalar genomlar ustida turli xil manipulatsiyalarni amalga oshirishda faol qo‘llanilmoqda va bu orqali transgen va mutant hayvon va o‘simliklar yaratish hamda kulturalanadigan odam pluripotent hujayralari asosida kasalliklar modelini yaratish va tadqiq etish kabi bir qator murakkab muammolarni hal etish uchun imkon yaratadi. Bundan tashqari epigenomikasini o‘rganish va xromosoma lokuslarini hujayra siklida o‘tkazish uchun TALEN DNK- bog‘lovchi domenlari asosidagi ximerik oqsillar va faoliyati to‘xtatilgan (inaktivatsiya) Cas9 nukleazalaridan genlar transkripsiyasini boshqarish bo‘yicha olib borilgan tajribalarda foydalanilgan.

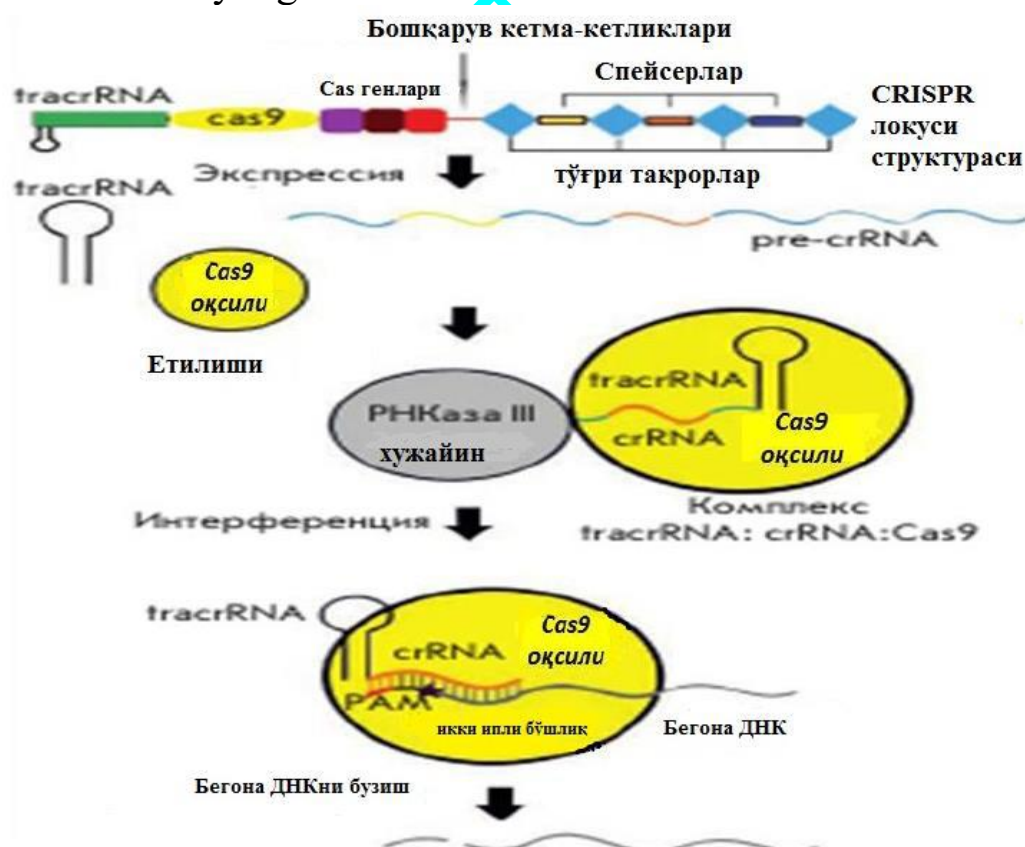
2011-yilda genomlarni yuqori darajadagi aniqlikda tahrirlash imkonini beruvchi usullar qatorida TALEN tizimi ham nufuzli “Nature Methods” halqaro jurnali tomonidan yil texnologiyasi deb tan olindi. Bu texnologiyaning yaratilish tarixi Xanthomonas avlodi bakteriyalarining o‘rganilishi bilan bog‘liq. Ushbu bakteriyalar sholi, qalampir, pomidor kabi o‘simliklarning patogeni hisoblanib qishloq xo‘jaligiga katta iqtisodiy zarar keltiradi, bu esa ularning sinchkovlik bilan o‘rganilishiga sabab bo‘ldi. Aniqlanishicha, bakteriyalar o‘simliklar hujayralarining sitoplazmasiga effektor oqsillarni (TALE, Transcription Activator-Like Effectors) ajratib chiqaradi, bu esa o‘simliklar hujayrasidagi jarayonlarga ta’sir etib patogenlarga nisbatan chalinuvchanlik darajasini oshiradi. Keyinchalik effektor (ta’sir etuvchi) oqsillarning faoliyat mexanizmlarini o‘rganish natijasida, ular eukariotlardagi transkripsiya omillarini takrorlab DNK bilan bog‘lana olish va o‘zlarining gen-nishonlarining ekspressiyasini faollashtirish qobiliyatiga ega ekanligi aniqlandi.

TALE oqsillari DNKga bog‘lanishi, domen va yadroda joylashish signali hamda maqsaddagi genning transkripsiyasini faollashtirish uchun javobgar markaziy domendan tashkil topgan. Birinchi marta ushbu oqsillarning DNKga bog‘lana olish qobiliyatlari 2007-yilda tavsiflangan edi.

Molekulyar mikrobiologiya

CRISPR texnologiyasi. TALEN ximerik oqsillari tizimi kashf qilinganidan ikki yil o'tib CRISPR genomni tahrirlash texnologiyasini faol qo'llash rivojlandi. Bu texnologiyaning elementlari kodirlamaydigan RNK va Cas (CRISPR-associated) oqsillari hisoblanadi. TALEN ximerik oqsillaridan farqli ravishda CRISPR/Cas tizimi yordamida tanib olish xususiyati nishonlangan DNK va kodirlamaydigan RNKlarning o'zaro komplementar bog'lanishi hisobiga amalga oshiriladi.

Bunda nukleaza faolligiga ega kodirlamaydigan RNK va Cas oqsillaridan iborat kompleks hosil bo'ladi. Ba'zi bakteriya genlarida 1987-yilda sirli takrorlar aniqlangan, ularning funksiyalari qariyb 20 yil davomida noma'lumligicha qoldi. Bakteriya genlarining sekvens qilinishi genomda analogik nukleotid ketma-ketligi ega bo'lgan ko'plab mikroorganizmlarning aniqlanishiga sabab bo'ldi, bular xarakterli strukturaga ega, ya'ni noyob DNK-speyserlarining qisqa uchastkalari bir-biridan qisqa palindrom takrorlar bilan ajralgan (14-rasm). Aynan ushbu xususiyatiga ko'ra ular CRISPR deb nomlandi.



14-rasm. Bakteriya hujayralarida CRISPR/Cas9 harakatlanish mexanizimi

TALEN va CRISPR/Cas9 texnologiyalari yordamida ishlaganda ikki zanjirli bo‘linmalarni spetsifik kiritish uchun saytlarni sinchkovlik bilan tanlab olish zarur. Dastlabki bioinformatik tahlillarga ko‘ra, genomga ikki zanjirli bo‘linmalarni kiritish maqsadsiz effektlarning ham ehtimolligi borligi bilan tushuntiriladi.

Kerakli saytlarni tanlashda ketma-ketliklarning takrorlanishidan va genomning boshqa rayonidagi yuqori gomologiyalaridan qochish talab etiladi.

TALEN ximerik oqsillari tizimidan foydalanilganda bir necha sabablarga ko‘ra maqsadsiz effektlari vujudga keladi. Birinchidan, bu spetsifik nukleotidlar va RVD bog‘lanishning effektivligidagi farqlardir. NN va HD monomerleri nukleotidlar bilan kuchli vodorod bog‘lar hosil qiladi, bu vaqtda NG va NI – kuchsiz shakllanadi. Bu DNK-taniydigan domenlarni maqsadli saytlardan bir necha nukleotidlarga farqlanuvchi saytlar bilan bog‘lanishiga imkon berishi mumkin. Ikkinchidan, kodning tug‘ma bo‘lgani uchun monomerlarning nukleotidlar bilan bog‘lanish ehtimolligi mavjud, masalan, NG va A larning o‘zaro bog‘lanishi. Uchinchidan, ikki nukleazalarning FokI domenlari bir hil DNKga bog‘lanuvchi domenlari (gomodimerlarning hosil bo‘lishi) bilan dimerizatsiyaga uchrashi mumkin. Bu muammo majburiy geterodimerlar sifatida ishlovchi FokI domenlariga ega TALEN tizimini yaratish orqali bir qator ishlarni amalga oshirish davomida hal etilgan.² Ehtimolli maqsadsiz effektlar nukleazalar tanish saytlari orasidagi speyser DNKning xajmi qayd etilmaganligi natijasida sodir bo‘lishi mumkin. Bu xususiyat FokI domenlari dimerizatsiyalanishi uchun yetarli masofada joylashgan nukleazalarning maqsadsiz saytlar bilan bog‘lanishida ikki zanjirli bo‘shliq kiritish imkonini beradi.

S. pyogenes cas9 nukleazalari 5'-NGG-3' konsensusi bilan RAM larning majburiy ishtirokini talab etadi, bunda kam miqdorda bo‘lsa ham u nishonlarni tanlashni cheklaydi. Xususan, odam genomida maqsadli (nishon) saytlar har 8–12 n.j. laridan so‘ng joylashgan bo‘ladi. CRISPR/cas9 tizimining asosiy kamchiligi – maqsadsiz mutatsiyalar paydo bo‘lishining nisbatan yuqori ehtimolligidadir. In vitro, bakteriyalarda va odam hujayralarida olib borilgan tajribalarda 20 nukleotidli sgRNA (single guide RNA) larning speyser uchastkalarida ba’zi bir nukleotid almashinuvlari CRISPR/cas9 tizimining sezilarli darajada faolligini susaytirishga olib kelishi ma’lum qilingan, ayniqsa

Molekulyar mikrobiologiya

agar bu almashinuvlar sgRNA ning so'nggi 10–12 nukleotidlari 3'-oxirlarida joylashgan bo'lsa. Shu bilan bir vaqtda sgRNA ning 5'-oxiridagi almashinuvlar tizimning faoliyati uchun hech qanday ta'sir o'tkazmaydi. Ammo ma'lumki, agar sgRNA ning 3'-oxiridagi bir yoki ikki nukleotidli almashinuvlar CRISPR/cas9 tizimining faoliyatiga ta'sir etmaydi, va aksincha, agar 5'-oxirida joylashgan bo'lsa faoliyatga to'sqinlik qiladi. Umuman olganda, maqsadsiz effekt cas9 uchun 5'-oxiri nukleotidlariga nisbatan kam ahamiyatga ega ketma-ketlikni yo'naltiruvchi 3'-oxiridagi –8–12 n.j. almashinuylarning joylashishlari bo'yicha aniqlanadi, bunda Cas9 i sgRNA larga kiritiladigan almashinuvlar va aynan nishon-sayt xususiyatlarining konsentratsiyasi va miqdori uchdan oshmasligi lozim. Ko'rsatilgan kamchiliklarni yengish cas9 ortologlarini qo'llashga asoslangan usullarni qidirish va ishlab chiqishga imkon beradi. Bularning faolligini ta'minlash uchun murakkab konsensus ketma-ketlikka ega RAM zarur hisoblanadi. Masalan, II tip N. meningitidis CRISPR/cas PAM larni 5'-NNNNGATT-3', konsensusi bilan taniydi, bu jarayonda nishon tanlash imkoniyatini cheklab spetsifiklikni oshirishi mumkin.

CRISPR/cas tizimlari yordamida genomni tahrirlash spetsifikligini oshirish maqsadida sgRNA jufligi (ZFN va TALEN juftlik analoglari singari) bilan ikki Cas9 nikazalaridan foydalaniladi. Ushbu sgRNA jufligi FokI domenlari bilan faqat ikki mustaqil oqsillarning ta'siri effektivlikni oshirish va yig'ish jarayonlarini tezlashtirish maqsadida Golden Gate reaksiyasi qo'llaniladi, bu bir reaksiya aralashmasida bir vaqtning o'zida ligirlash va restriksiya endonukleazalari yordamida gidrolizlash imkonini beradi.

15-MAVZU. MIKROORGANIZMLARNI SISTEMATIK HOLATINI MOLEKULAR GENETIK IDENTIFIKATSIYA QILISH.

Reja:

Tayanch so'z va iboralar: 16S va 18S rDNK geni yordamida identifikatsiyalash, filogenetik daraxt tuzish, flyurotsentli in situ gibridizatsiyalash, MALDI-TOF uskunasiida bakteriyalarni aniqlash.

Flyurotsentli in situ gibridizatsiyalash

FISH (flyurotsentli in situ gibridizatsiyasi) biologiya va mikrobiologiyani ko'plab sohalarida turli maqsadlarda qo'llaniladi. FISH nafaqat ko'paytiriladigan, balki ko'paytirilmaydigan mikroorganizmlarni ham aniqlash, hisoblash va aniqlash imkonini beradi, shuning uchun bu yondashuv mikrobial jamoalarning ishlash tamoyillarini tushunishga yordam beradi.

Bu usul inson to'qimalarida patogen mikroorganizmlarni (tuberkulyoz bakteriyalari), o'simlik patogenlarini aniqlashga yordam beradi, u og'iz bo'shlig'ida, ichak mikrobiotasida, nafas yo'llarining infeksiyalarida rivojlanayotgan mikrobial jamoalarni tahlil qilishda qo'llaniladi.

FISH anaerob cho'kindilarni o'rganishda, simbiozlarni o'rganishda, veterinariya tibbiyotida virulent turlar va shtammlarni aniqlashda va ko'p hollarda xromosomadagi nukleotidlarning ma'lum bir ketma-ketligini lokalizatsiya qilishda ham qo'llaniladi.

Mikrobiologik diagnostikaning maqsadi- mikroorganizmlarni tabiiy yashash joylarida tez va aniq aniqlashdir.

Kultivatsiyaga asoslangan usullar ko'p vaqt talab etadi va ko'pincha kerakli mikroorganizmlarni, ayniqsa patogen va ko'paytirilmaydigan turlarni izolyatsiya qila olmaydi.

Shuning uchun bu yondashuv murakkab mikrob jamoalarining tarkibini to'liq aks ettirmaydi va ko'plab mikrobial patogenlar va ko'paytirilmaydigan shakllarni o'rgana olmaydi.

Flyurotsentli in situ gibridizatsiyasi, aksincha, molekulyar genetik usullarning aniqligini vizual ma'lumot olish bilan birlashtiradi (klassik mikroskopik usullardan foydalangani kabi), bu mikroorganizmlarning alohida hujayralarini tabiiy yashash joylarida aniqlash va identifikatsilash imkonini beradi.

In situ gibridizatsiya (FISH) ikki guruh tadqiqotchilar tomonidan mustaqil ravishda ishlab chiqilgan. Radiobelgilangan DNK yoki 28S rRNK *Xenopus* oositlarining sitologik preparati bilan gibridlangan va duragaylash natijalari radiografik usulda aniqlangan.

Shundan so'ng, ISH xromosomalar evolyutsiyasini o'rganish, o'smalar va leykemiyalar xromosomalarini tahlil qilish va turlarning keng doirasini sitogenetik o'rganish uchun kuchaytirildi.

Molekulyar mikrobiologiya

Bu usul mikrobiologiyada 1988- yilda, rRNKga xos oligonukleotid radioaktiv yorliqli zondlar birinchi marta bakteriyalarni aniqlash uchun ishlatilgandan buyon o'rganib chiqildi.

Flyurotsent belgilarining rivojlanishi bilan radioaktiv teglar asta-sekin izotopik bo'lmagan bo'yoqlar bilan almashtirila boshlandi. 1989 - yilda E. DeLong birinchi bo'lib flyuresan yorliqli oligonukleotidlarni alohida bakteriya hujayralarini aniqlash uchun ishlatgan.

Radioaktiv zondlardan farqli o'laroq, lyuminescent zondlar xavfsizroq, ko'proq aniqlik beradi va qo'shimcha aniqlash bosqichlarini talab qilmaydi. Bundan tashqari, flyuresant yorlig'i turli emissiya to'lqin uzunliklariga ega bo'lgan bo'yoqlar bilan qo'llanilishi mumkin, bu bir vaqtning o'zida bir nechta ketma-ketlikni aniqlash imkonini beradi. Faqat so'nggi 10 yil ichida FISH usulining sezgirliigi va tezligi uni filogenetiklar, mikrobial ekologlar va diagnostikachilar yordamida ajralmas holga keltirdi.

FISH flyuoresant- yorliqli zondlar yordamida nuklein kislotalar ketma-ketligini aniqlaydi, ular metabolik faol buzilmagan hujayralarga kirib boradi va u yerda maqsadli molekulalarning bir-birini to'ldiruvchi ketma-ketliklari bilan gibridlanadi.

Ushbu protsedura quyidagi ketma-ket bosqichlarni o'z ichiga oladi:

- 1) na'munani hujayralar bilan biriktirish;
- 2) yorliqli oligonukleotid zondni loyihalash va tayyorlash;
- 3) namuna hujayralarida kerakli nukleotidlar ketma-ketligi mavjudligini aniqlash uchun tegishli yorliqli zond bilan duragaylash;
- 4) reaksiyaga kirmagan zondlarni olib tashlash uchun yuvish (bog'lanmagan yorliq);
- 5) lyuminescent mikroskop yordamida xromosomalaridagi qo'shimcha joylar bilan bog'liq bo'lgan yorliqli molekulalarni vizualizatsiya qilish, natijalarni hisoblash va hujjatlashtirish.

FISH-ZONDLAR VA YORLIQLASH

Flyuresant yorliqli, 16S rRNKga xos oligonukleotid zondlari mikrobial jamoalarning turli vakillarini aniqlash uchun ishlatiladi.

Zondlarning o'ziga xosligi rRNKda maqsad sifatida tanlangan qismiga qarab, jinsdan shohlikka o'zgaradi. Bunday zondlar tabiiy namunalarda o'smaydigan mikroorganizmlar mavjudligini aniqlash uchun ishlab chiqilishi va sinovdan o'tkazilishi mumkin, ammo oligonukleotid zond bilan gibridlangan hujayralarning signal

intensivligi hujayradagi rRNK miqdori bilan bevosita bog'liq. FISH uchun zondni tanlashda uning o'ziga xosligini, sezgirligini va hujayra ichiga kirish qulayligini hisobga olish kerak. Odatda, uzunligi 15-30 nukleotid bo'lgan oligonukleotid zondlari avtomatik sintezatorda yaratiladi. Qisqa zondlar o'z maqsadlariga osonroq erishadilar, ammo ular kamroq aniq. Turli xil yorliqlash yo'llari mavjud. To'g'ridan-to'g'ri lyuminescent yorliqlash eng ko'p qo'llaniladigan usul bo'lib, u ham eng tez, eng arzon va eng oddiy hisoblanadi va gibridizatsiyadan keyin qo'shimcha operatsiyalarni talab qilmaydi.

Bir yoki bir nechta lyuminescent bo'yoq molekulalari oligonukleotidga kimyoviy jihatdan zondning 5'-uchidan sintez paytida yoki 3'-uchidan flyuresent yorliqli nukleotidlarni biriktirish uchun terminal transferazalar yordamida fermentativ ravishda biriktiriladi.

C-18 qo'shimchasi orqali oligonukleotidga flyuresentizotiosianat (P1TC) biriktirilishi yorliq va oligonukleotidning to'g'ridan-to'g'ri konyugatsiyasiga nisbatan signal intensivligini oshirishi mumkin. Signalning flyurosentligini zondlarning ikkala uchida yorliqlash orqali oshirish mumkin: flyuresent so'nishiga to'sqinlik qiluvchi kiritish segmentlari orqali 3'-uchidan bitta flyuresent molekulasi va 5'-uchidan to'rttasi. Flyuresent yorliqli oligonukleotid zondlari turli kompaniyalar tomonidan sintezlanadi.

Zondlar qorong'i joyda -20°C da bir necha oy davomida saqlanishi mumkin. Ba'zi hollarda bilvosita yorliqlashdan foydalanish yaxshiroqdir.

Filtrlarni FISH uchun tayyorlash

1. Filtrlarni steril (spirt bilan ishlov berilgan) pinset va qaychi yordamida bo'laklarga (masalan, 25 mm filtrni osongina 8-10 sektorga kesish mumkin) kesib oling. Sektorlarni qo'rg'oshin qalam bilan belgilang, boshqa markerlarda flyurisent bo'yoqlar bo'lishi mumkin.

2. Ko'pgina protokollar filtr yuzalarini past eriydigan agarozda namlashni tavsiya qiladi, ammo bu qadam majburiy emas. Deionlashtirilgan suvda 0,2% (w/v) past eriydigan agaroz (gel kuchi 1000 g/sm bo'lishi kerak) tayyorlang.

Oldindan tayyorlangan o agaroz eritmasini mikrotolqinli pechda qaynatib oling. Petri idishlariga agaroz quyiladi va $35-40^{\circ}\text{C}$ gacha sovutiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

Filtrlarning ikkala tomonini agarozaga botirib, filtrlarni katak tomoni yuqoriga qarab toza shisha slaydlarga joylashtiring. Filtrlarni havoda 20-40° C haroratda 10-30 daqiqa davomida quriting.

3. Filtrlarni suvsizlantirish uchun ularni 80-96% etanol bilan namlang (xona haroratida 1 minut inkubatsiya) va filtrlarni shisha yuzasidan ehtiyotkorlik bilan olib tashlang. Steril deionizatsiyalangan suv bilan yuvib tashlang. Filtrlarni havo bilan quriting. Preparatlar signalni sezilarli darajada yo'qotmasdan -20 ° C da bir necha hafta davomida saqlanishi mumkin.

B.Endogen peroksidazalarning inaktivatsiyasi (HRP belgisi bo'lgan zondlardan foydalanganda)

Ba'zi mikroorganizmlar, ayniqsa anaerob dengiz cho'kindilaridan, peroksidazalar yoki psevdoperoksidaza faolligi bo'lgan oqsillarni o'z ichiga olishi mumkin. Buni filtr qismini vodorod peroksid va flyuretsent yorliqli tiramidlarni o'z ichiga olgan kuchaytiruvchi buferda inkubatsiya qilish orqali tekshirish mumkin. Peroksidaza faolligi yuqori bo'lgan hujayralar yorqin flyuretsent bo'ladi. Bunday fermentlarni xlorid kislotasi bilan faolsizlantirish kerak. Buning uchun filtr sektorlarini xona haroratida 50 ml 0,01 M HCl ichida 10 minut davomida inkubatsiya qiling. Filtrlarni 50 ml fosfatli buferlangan sho'r suvda (tarkibi: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6), keyin 50 ml deionlangan suvda yuving. Filtrlarni havoda quriting va muzlatgichda -20 ° C da saqlang.

G.Mikrob hujayra membranalarining qattiqligini buzish usullari

Lizotsim bilan o'tkazuvchanlik

1. Har bir filtr qismiga 10 mkl yangi tayyorlangan 0,05% lizotsim eritmasidan qo'shing. 30-60 daqiqa davomida 37°C da inkubatsiya qiling.

2. Filtrlarni ikki marta steril deionizatsiyalangan suv bilan yuving, so'ngra bir marta 96% etanol bilan 1 daqiqa davomida yuving va havo bilan quriting. Preparatlar signalni sezilarli darajada yo'qotmasdan -20 ° C haroratda bir necha hafta davomida saqlanishi mumkin

Axromopeptidaza bilan o'tkazuvchanlik

Aktinobakteriyalarni o'z ichiga olgan suv namunalari bilan FISHni amalga oshirish uchun hujayralarni lizotsim bilan oldindan ishlov

berish, so'ngra axromopeptidaza bilan qayta ishlash kerak (EC 3.4.21.50). Axromopeptidazaning yangi eritmasini quyidagi tarkibga tayyorlang: 0,01 M NaCl; 0,01 M tris-HCl (pH 8,0); axromopeptidaza - 60 birlik / ml. Filtrlarni axromopeptidaza eritmasida 37°C da 30 daqiqa davomida inkubatsiya qiling. Filtrlarni lizotsim bilan o'tkazuvchanlik uchun ta'riflanganidek yuving.

D. Gibridizatsiyani amalga oshirish

1. Toza, yog'siz slaydda (dastlab 96% etanol bilan yaxshilab artib tashlangan va havoda quritilgan) hujayra tomoni yuqoriga qarab yotgan har bir filtr qismiga 9 mkl gibridizatsiya buferi eritmasini qo'llang.

2. 20-50 ng/mkl konsentratsiyadagi mos keladigan Cy3-belgilangan oligonukleotid (zond) eritmasidan 1 mkl qo'shing, mikropipetka uchi bilan juda ehtiyotkorlik bilan aralashtiring. Filtr bo'limlarini mikrotsentrifuga naychalariga mos keladigan zondni o'z ichiga olgan gibridizatsiya tampon eritmasi bilan joylashtirish mumkin, lekin qimmat zondni tejash uchun odatda yuqorida tavsiflanganidek to'g'ridan-to'g'ri filtrga qo'llaniladi.

3. Gibridizatsiyani nam kamerada (shisha slaydlar uchun yopiq quti, qat'iy gorizontall tarzda joylashtirilishi kerak, pastki qismida gibridizatsiya buferi eritmasi bilan namlangan filtr qog'ozi bilan) termostatda 37-58°C haroratda 2 soat davomida o'tkazing. Harorat rejimi, shuningdek, gibridlanish bufer eritmasidagi formamid konsentratsiyasi gibridlanishning o'ziga xosligi uchun juda muhim va ularni tanlash ishlatiladigan zondga bog'liq. Eritmaning filtr yuzasidan bug'lanishiga yo'l qo'ymaslik uchun nam kamera kerak, aks holda zondning o'ziga xos bo'lmagan bog'lanishi mumkin.

J. 4',6-diamidino-2-fenilindolon (DAPI) bilan bo'yash, mikroskopiya

Namunadagi mikroorganizmlarning umumiy sonini baholash uchun binoni odatda DAPI yordamida bo'yash amalga oshiriladi. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) DNKning A/T ga boy hududlari bilan bog'langan DNKga xos bo'yoqdir va floresan kompleks hosil qiladi. DAPI floresan mikroskopiya keng qo'llaniladi. DAPI buzilmagan hujayra membranasiga kirishga qodir bo'lganligi sababli, bu bo'yoq tirik va qo'zg'almas hujayralarni bo'yash uchun ishlatilishi mumkin. DAPI flyuresensi yaqin ultrabinafsha nurlar bilan qo'zg'atiladi.

Molekulyar mikrobiologiya

1. Har bir filtr qismiga 10 mkl DAPI suvli eritmasidan (0,5 ng/ml) qo'llang va qorong'i joyda xona haroratida 10-15 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

2. Filtr qismlarini steril deionizatsiyalangan suvda yuving va qorong'i joyda quriting.

3. Filtr qismlarini hujayra tomoni yuqoriga, toza, yog'siz slaydga joylashtiring, filtr qismlari yoniga bir necha tomchi Citifluor AF1 Anti-Fade Mix 4:1 tomchisini qo'ying va slaydni ehtiyotkorlik bilan uzun qopqoq bilan yoping. qabariqdan saqlaning. Preparatlar -20 ° C da qorong'i joyda bir necha oy davomida sezilarli signal yo'qotmasdan saqlanishi mumkin.

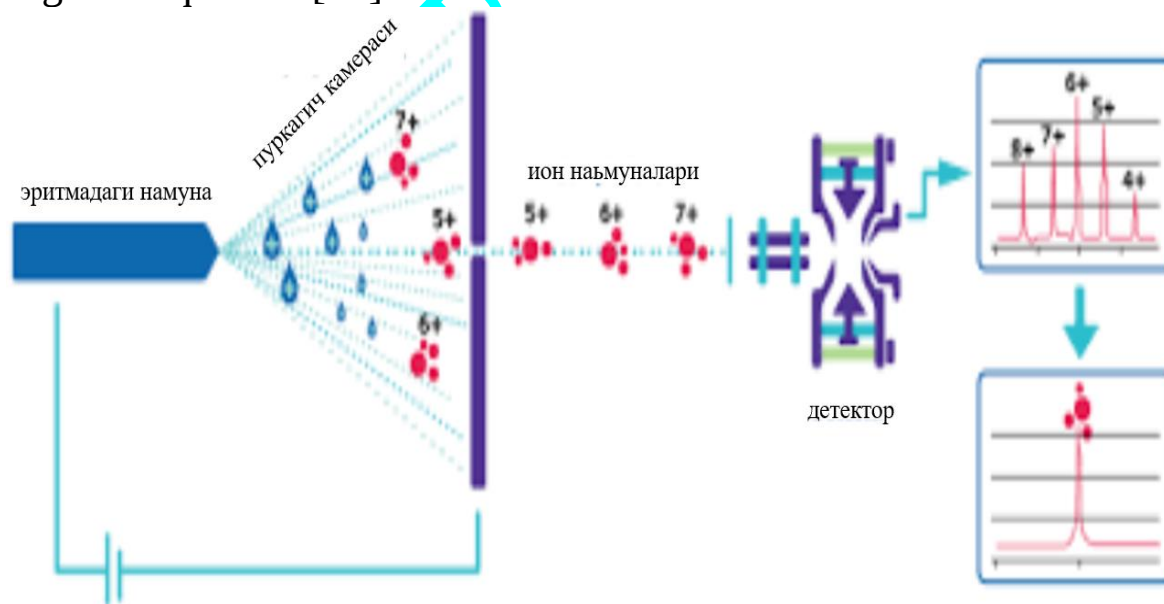
Raqamli kamera bilan jihozlangan tegishli yorug'lik filtrlari bilan epiflyuresant mikroskop ostida moyga botirish bilan taxminan x1000 kattalashtirishda mikroskopik tahlilni o'tkazing. To'lqin uzunliklari: DAPI (ko'k) - qo'zg'alish 350 nm va emissiya 456 nm; karbosianin 3 (qizil) - 552 nm da qo'zg'alish va 565 nm da emissiya. Hujayralar odatda statistik ahamiyatga ega bo'lishi uchun har bir filtr bo'limi uchun raqamli kameraning 30 dan 40 gacha ko'rish maydonida hisoblanadi. Bir ml namunadagi hujayralar soni (TV) $N = n * (S_{\text{filtr}} / K_{\text{o'rish}} \text{ maydoni}) / V$ formulasi bo'yicha hisoblanadi, bu yerda n -ko'rish maydonidagi o'rtacha hujayralar soni, G – namuna hajmi ml'larda.

MALDI-TOF USKUNASIDA BAKTERIYALARNI ANIQLASH.

MALDI-TOF MS yordamida mikroblarni identifikatsiyalash ma'lumotlar bazasida mavjud bo'lgan PMF (Peptide Mass Fingerprint yoki peptidlarning ionlanishdan xosil bo'lgan spektr izi) noma'lum organizmning PMF bilan solishtirish yoki noma'lum organizm biomarkerlari massalarini proteom ma'lumotlar bazasi bilan taqqoslash orqali amalga oshiriladi. PMF ni taqqoslaganda noma'lum mikrobial izolatlarning MS spektri ma'lumotlar bazasida mavjud bo'lgan ma'lum mikrobial izolatlarning MS spektrlari bilan taqqoslanadi (15-rasm). Mikrob hujayrasi quruq massasining 60-70 foizini tashkil etadigan yuqori darajada boyitilgan ribosoma oqsillarining o'ziga xos tuzilishi 2-20 kDa massa oralig'ida [21]. Ma'lum bir mikroorganizmni aniqlash uchun uning PMF naqshini keng ochiq ma'lumotlar bazasida joylashgan ribosomal oqsillarning PMF lari bilan taqqoslash orqali foydalaniladi. Shunday qilib, mikroorganizmning o'ziga xosligini turga qadar, ko'p hollarda shtammm turlari va darajasiga qarab aniqlash

mumkin [22]. Ushbu yondashuv mikroblarni identifikatsiyalashda keng qo'llaniladi, chunki u sodda va agar organizmning PMF si ko'plab namunalari ma'lumotlar bazasida mavjud bo'lsa, uni mikrobial diagnostika laboratoriyasida qo'llash mumkin. Biomarker massalarini genom ketma-ketligidan prognoz qilingan oqsil molekulyar massalari bilan taqqoslash orqali mikroblarni identifikatsiyalash mikrobiologik diagnostika laboratoriyalarida unchalik keng tarqalmagan, chunki u prognoz qilingan oqsil molekulyar massalari ma'lumotlar bazasini yaratish uchun organizmning to'liq genom ketma-ketligini bilishni talab qiladi.

Kultivatsiya sharoitlari mikroblar fiziologiyasiga va oqsil ekspression profiliga kuchli ta'sir ko'rsatishi mumkin bo'lsada [23], ular MALDI-TOF MS yordamida mikroorganizmlarni aniqlashga ta'sir qilmaydi. Nensi Valentin va boshqalar olimlar tomonidan uchta bakterial turni to'rt xil kultural muhitda kultivatsiya qildilar va mikrobial MALDI-TOF MS ni aniqlash kultura sharoitiga bog'liq emasligini aniqladilar [24].



15-rasm. MALDI-TOF MS-dagi ish jarayonini ko'rsatadigan sxematik diagramma.

MALDI-TOF MS uchun matritsalar sifatida bir qator organik birikmalar ishlatilgan, ammo mikrobiologik dasturlar uchun α -siyano'-gidroksitsinnaminik kislota (SHSA), 2,5-digidroksibenzoy kislotasi (DHB) va 3,5-dimetoksi'-gidroksitsinnaminik kislota (sinapik kislota)

Molekulyar mikrobiologiya

eng foydali deb topildi. Matritsa eritmasi suvdan va tarkibida etanol/metanol yoki atsetonitril va matritsani eritadigan triftoroatsetik kislota (TFA) kabi kuchli kislota bo'lgan organik erituvchi aralashmalaridan iborat. Erituvchilar mikroorganizmlarning hujayra devoriga kirib, hujayra ichidagi oqsillarni chiqarib tashlaydi. Erituvchi bug'langanda oqsil molekulalari va hujayraning boshqa birikmalari matritsa eritmasida ushlanib "kristallanadi". MALDI-TOF MS yordamida mikroblarni identifikatsiya qilish uchun namunalarni tayyorlash jarayoni u ajratilgan manbaga bog'liq yoki bakteriya hujayra devorining tarkibiy qismlarining kimyoviy tabiatidan foydalaniladi. Tadqiqotchilar mikroorganizmlarning turli guruhlari uchun turli xil namunalarni tayyorlash usullarini belgiladilar. Ba'zi mikroblarni to'g'ridan-to'g'ri MS aniqlash mumkin, bu to'g'ridan-to'g'ri hujayraning profillanishi deb ataladi, boshqalari uchun butun hujayra lizatlari yoki ahamiyatsiz hujayra ekstraktlari tayyorlanadi. To'g'ridan-to'g'ri hujayralarni profillashda mikroorganizmlarning bitta koloniyasi olinadi va to'g'ridan-to'g'ri namunaviy idishga joylashtiriladi va darhol matritsa eritmasi bilan qoplanadi.

MALDI-TOF MS da bakteriyalar qaynoq suvda eritilib, so'ngra oqsillarni etanol bilan cho'ktiriladi, cho'kkan oqsillar quritilib, 70% li chumoli kislota va atsetonitrilda eritilib MALDI-TOF MS yordamida tahlil qilinadi. Tadqiqotchilar MALDI-TOF MS yordamida mikobakteriyalarni aniqlash uchun turli xil namunalarni tayyorlash usullarini ishlab chiqish orqali, to'g'ridan-to'g'ri bakteriyalarni identifikatsiya qilish yoki chumoli kislota bilan aniqlash mumkinligi bayon etilgan. Bunda xar kun ishlash mobaynida xavfsizlikka e'tibor ko'proq qaratilgandir. [25] tomonidan faolsizlantirish va qayta ishlash usullarining tartibini ko'rsatib berildi. Bunda buraladigan qopqoqli naychalarda to'plangan mikobakterial koloniyalar tarkibida suv va 0,5 % Tvin 20 mavjud va 95 ° S da 1 soat qizdirish bilan faolsizlantirildi. Mikobakteriyalarning hujayra devorini buzish uchun shisha qoldiqlari yordamida sentrifugada tebratiladi va olingan cho'kma chumoli kislotada xamda atsetonitrilda eritildi, so'ngra yana sentrifuga qilib cho'ktirildi. Yakuniy bosqichda supernatant Maldi nishon-likopchasiga joylashtiriladi va matritsa bilan qoplanadi.

Bakteriyalarda bo'lgani kabi, achitqini identifikatsiyalash uchun turli xil namunalarni qayta ishlash usullari MALDI-TOF MS yordamida tekshirilgan va bunda keltirilgan ma'lumotlarga ko'ra,

formik kislota bilan "tegishli ekstraktsiya" amalga oshirish eng ijobiy usul xisoblangan [26, 27]. Qo'ziqorin gifalari va sporalarini namuna tayyorlashning beshta usulini o'rgangan. So'ngra ular namuna tayyorlash usullarini ishlab chiqib, bunda qo'ziqorin agarda Sabouraud gentamitsin-xloramfenikol bilan 72 soat davomida 27 °S da o'stirilganda, etanolda inkubatsiya qilingandan so'ng chumoli kislota bilan ekstraktsiya qilindi.



16-rasm. MALDI-8020 Benchtop Linear MALDI-TOF Mass Spectrometer from Shimadzu Biocompare.com

So'ngra atsetonitril qo'shib, sentrifuga qilindi va supernatant MALDI-TOF MS da tahlil qilish uchun ishlatildi (16-rasm).

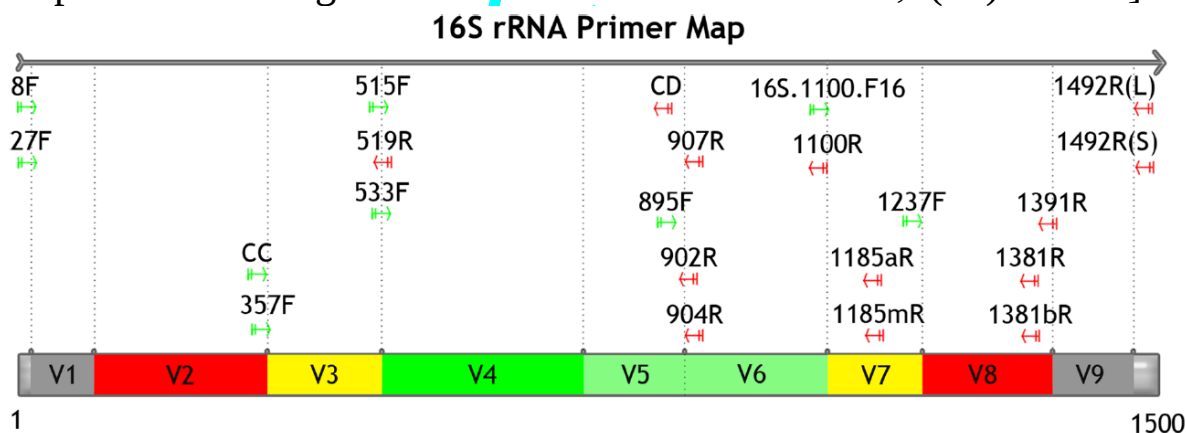
Usul xususiyatlari (MALDI Biotyper):

- Sezgirligi - o'lchov diapazoni 10'-105 hujayralar;
- Usul, kultura yoki atrof-muhit xususiyatlariga bog'liq emas;
- Tez va oson namunalarni tayyorlash: 5 daqiqagacha / namuna;
- O'lchov tezligi: ~ 1 min / namuna;
- Tadqiqotning barcha bosqichlarini avtomatlashtirish qobiliyati;
- Identifikatsiya aniqligi taxminan 97-99%;
- Arzon narx: 0,5 yevro / namuna;
- Ochiq ma'lumotlar bazasi tizimi - yaratish qobiliyati ma'lumotlar bazalariga egalik qilish va ularni boshqa foydalanuvchilar bilan almashtirish.

Prokaryotik 16S ribosoma RNK (rRNK) ketma-ketliklari atrof-muhit mikrobiologiyasi va molekulyar evolyutsiyada mikroblarning taksonomik tasnifi va filogenetik tahlili uchun ishonchli markerlar

Molekulyar mikrobiologiya

sifatida keng qo'llaniladi. 16S rRNK gen ketma-ketligi birinchi marta 1985 yilda filogenetik tahlil uchun ishlatilgan [Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(20):6955–9]. Chunki u primer dizayni uchun yuqori darajada saqlangan hududlarni va filogenetik xususiyatlarni aniqlash uchun gipero'zgaruvchan hududlarni o'z ichiga oladi. Mikroorganizmlarning 16S rRNK gen ketma-ketligi bakterial assotsatsiyalarni profillash uchun eng keng tarqalgan marker genga aylandi [Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):442–6.]. To'liq uzunlikdagi 16S rRNK gen ketma-ketligi to'qqizta yuqori o'zgaruvchan mintaqadan iborat bo'lib, ular to'qqizta yuqori darajada saqlanib qolgan hududlar bilan ajratilgan [Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*. 2003;55(3):541–55., Wang Y, Qian P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009;4(10):e7401.].



Turli xil o'zgaruvchan hududlarning tasviri. Qizil hududlar (V2, V8) filum darajasida yomon filogenetik rezolyutsiyaga ega. Yashil hududlar (V4, V5, V6) eng qisqa geodezik masofa bilan bog'liq bo'lib, ular filogeniya bilan bog'liq tahlillar va yangi bakteriya filasini filogenetik tahlil qilish uchun eng yaxshi tanlov bo'lishi mumkinligini ko'rsatadi. 515 F dan 1100R gacha yoki V4 dan V6 gacha bo'lgan hududlar yangi bakterial nasllarga ega ekstremal muhitni o'rganish uchun ko'proq mos keladi.

Zamburug'lar morfologik, ekologik, metabolik va filogenetik jihatdan xilma-xildir. Ular ko'plab bioaktiv molekulalarni ishlab chiqarishi ma'lum, bu ularni qishloq xo'jaligi, sanoat va farmatsevtika

dasturlari bilan yangi kimyoviy xilma-xillikni kashf qilishda tabiiy mahsulotlar tadqiqotchilari uchun juda foydali qiladi. Tabiiy mahsulot kimyosidagi ahamiyatiga qaramay, qo'ziqorinlarni aniqlash kimyogarlari, ayniqsa, malakali mikolog bilan ishlamaydiganlar uchun juda qiyin vazifa bo'lib qolmoqda [Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085

(<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>)]. Hisob-kitoblarga ko'ra zamburug'lar 1,5 dan 5,1 million turgacha bo'lgan, yerdagi eukaryotik organizmlarning ikkinchi eng katta guruhidir [(1) O'Brien, H. E.; Parrent, J. L.; Jackson, J. A.; Moncalvo, J. M.; Vilgalys, R. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 5544–5550. (2) Blackwell, M. *Am. J. Bot.* 2011, 98, 426–438. (3) Hawksworth, D. L. *Mycol. Res.* 1991, 95, 641–655.].

ITS regioni zamburug'lar uchun rasmiy DNK shtrix-kod belgisi sifatida tan olinishi tadqiqot hamjamiyatiga katta foyda keltirgan, e'tiborga molik muvaffaqiyatdir.

Schoch va boshq [Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 6241–6246.]. ITS qismi juda keng namunali zamburug'lar guruhi uchun to'g'ri identifikatsiya qilish ehtimoli yuqori bo'lgan belgilar qatoriga kiradi. Zamburug'larga qarshi qo'shimcha tadqiqotlar ITS qismini mos zamburug' shtrix-kodi sifatida qo'llab-quvvatladi [(1) Kelly, L. J.; Hollingsworth, P. M.; Coppins, B. J.; Ellis, C. J.; Harrold, P.; Tosh, J.; Yahr, R. *New Phytol.* 2011, 191, 288–300. (2) Dentinger, B. T. M.; Maryna, Y. D.; Moncalvo, J.-M. *PLoS One* 2011, 6, e25081. (3) Seena, S.; Pascoal, C.; Marvanová, L.; Cássio, F. *Fungal Divers.* 2010, 44, 77–87.].



17-rasm. ITS regionining genomda joylashishuvi

Molekulyar mikrobiologiya

Zamburug'lar oilasining turlari inson hayotida muhim rol o'ynaydi va turli xil tabiiy va sun'iy bo'shliqlarni egallash qobiliyatiga ega [(4) Stajich, J. E.; Berbee, M. L.; Blackwell, M.; Hibbett, D. S.; James, T. Y.; Spatafora, J. W.; Taylor, J. W. Curr. Biol. 2009, 19, R840–R845.]. Zamburug'larni tur darajasida aniqlash ilmiy tadqiqotlarda ham asosiy (ekologiya, taksonomiya) va amaliy (genomika, bioprospecting) qo'llashda muhim ahamiyatga ega.

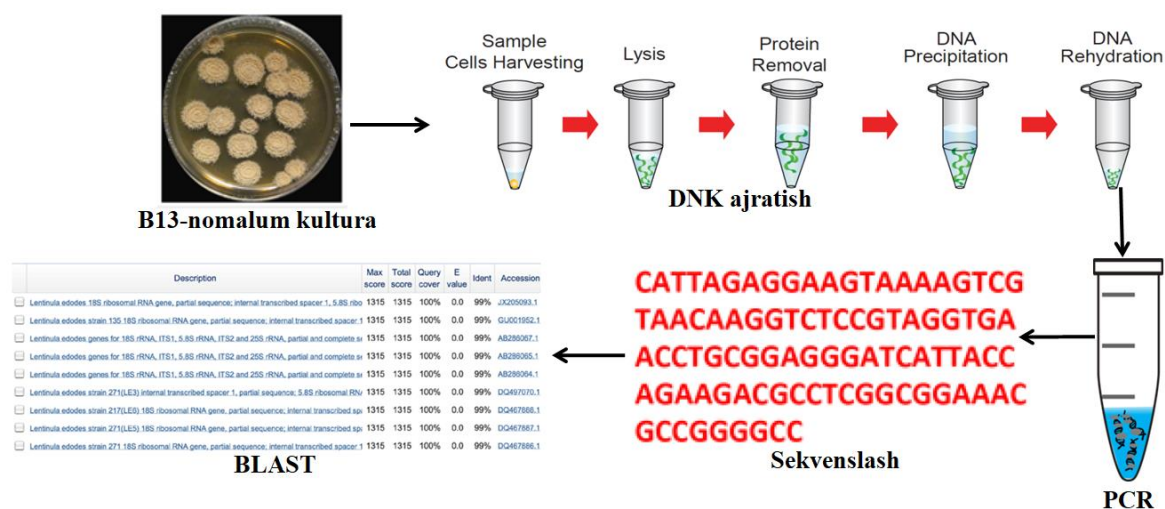
1-jadval

Zamburug' turlarni identifikatsiyalash uchun tuzilgan ma'lumotlar bazalari ro'yxati

Foydalaniladigan ma'lumotlar bazasi	URL	Hududining nomi
Barcode of Life Database, BOLD	http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine	ITS
CBS-KNAW	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx	ITS
FUSARIUM-ID	http://isolate.fusariumdb.org	ITS, tef1, RPB1, RPB2, tub2
Fungal Barcoding	http://www.fungalbarcoding.org	ITS
Fungal MLST database Q-Bank	http://www.q-bank.eu/Fungi/	partial actin, tub2, RPB1, RPB2, tef1 among others
ISHAM, The International Society for Human and	http://its.mycologylab.org	ITS

Animal Mycology		
Naiiv e Bayesian Classifier	http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp	28S, ITS
RefSeq Target Loci (RTL)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/	ITS, 18S, 28S
International Subcommision on Hypocrea and Trichoderma (ISHT) TrichoKey and TrichoBLAST (Trichoderma)	http://www.isth.info/tools/blast/	ITS and tef1, RPB2
UNITE, User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhizal Database	https://unite.ut.ee/	ITS

Mikroorganizmlarning molekulyar genetik identifikatsiya qilish tartibi va filogenetik shajarasini yaratish



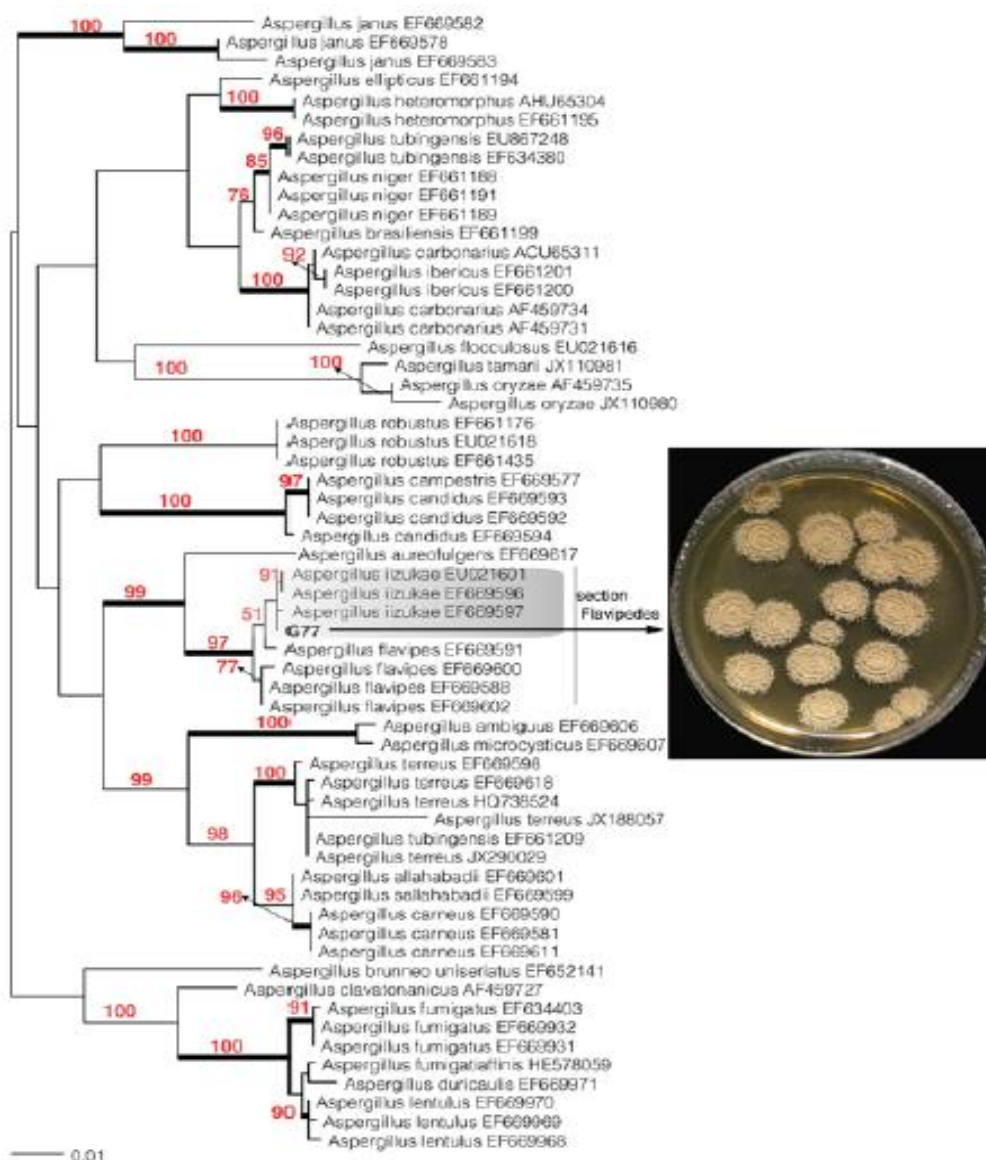
Molekulyar mikrobiologiya

Mikroorganizmlarni (zamburug', achitqi, bakteriya) molekulyar genetik identifikatsiya qilishda dastlab, noma'lum kultura mikrobiologik usullar yordamida toza holatda ajratib olinadi. So'ngra ushbu na'munadan umumiy DNK ajratiladi va na'munaning turiga qarab marker genlariga praymerlar tuzilib, PZR amplifikatsiyasi amalga oshiriladi. Hosil bo'lgan PZR fragmentning nukleotid ketma-ketligi (sekvens) aniqlanib NCBI ma'lumotlar bazasidagi turlar bilan taqqoslanadi va mazkur shtamm qaysi turga tegishli ekanligi ma'lum bo'ladi.

Na'munalarning gen ketma-ketliklarining Fasta fayllari yig'iladi va Top Blast qidiruv moslamalari bir multiple sekvens moslashtirish (aligned) dasturi yordamida tekislanadi.



Species/Ab	Sequence
19. DQ3612	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
20. ON5080	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
21. OL8993	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
22. MK1844	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
23. MK1844	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
24. EU9094	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
25. JN4154	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
26. DQ1198	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
27. KJ0108	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
28. KP0536	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
29. AY2970	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
30. DQ3413	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
31. DQ0205	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
32. EF4059	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
33. DQ3612	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
34. EU3608	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
35. OL8993	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
36. MN2070	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
37. AY0076	TGCGCTTACGCGCAAGATTTAGTGAATACGGAATAACCCAAAGTACAGAAATGGTGCCNTACGCGCAANGATTTAAGTGAATACGTATTAANCCAAAGTCAGAA
38. DQ3591	CCAAAGTCAGAAATGGTAAATTTGGTTGTAAAGTAAAGTTTTCTTAAACATACCTTTATTATCAAGAGATATAATCTCTTTAATTTAATAAAACCAAATTTAA
39. KY5011	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
40. DQ3413	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
41. JN3919	TGACGATGAAAACAGGCATCTTCGAATGAACATTCACCTCTATAATTTACCACCAACAGATGAGGAAAAACAAATGAAATTTGACAGTCAGGATTTAGTCGC
42. GQ3325	TGAACACCGTGCACAACACGGCAGGAACACCACTGCCACGCCCAACAGTGGTGGCCACGACCCGTTCTCTTCGAGCACAAGTCCCTCAACACCATCGAGA
43. MN7250	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
44. MT2585	TGGTTGTGAATAAGTATTTTCTTAAACATTCGTTATTATCAGGCATAATTTAGTATCTTTAATTTAATAATAACCTAATTTTAAAGGAGGAATTTTATATGA
45. FJ5503	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
46. XQ0342	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
47. KT6929	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA
48. MH9310	TGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAGAAGTACTATTTGTGATGCGTATAATGTAGCGGCTCATGATCCATTTAGTTTTCAACACAAATCATTAGATACCGTACAAA



Filogenetik daraxtga asoslangan usul.

DNK barkodlash uchun ketma-ketlik ma'lumotlari [ITS yoki boshqa taksonga xos genlar] to'g'ridan-to'g'ri zamburug' meva tanasidan yoki zamburug' kulturasidan olinadi va GenBank yoki boshqa maxsus ma'lumotlar bazalari kabi NCBI da BLAST qidiruvi o'tkaziladi. Identifikatsiya NCBI da boshqa mos yozuvlar ketma-ketliklari bilan umumiy ketma-ketlik o'xshashligiga (masalan, 97–100% ketma-ketlik o'xshashligiga) asoslanadi va shu bilan noma'lum ketma-ketlikning identifikatsiyasini ta'minlaydi. DNK taksonomiyasida, BLAST qidiruvidan so'ng, eng gomologik ketma-ketliklar (odatda eng yaxshi 50-100 ketma-ketliklar) NCBI dan yuklab olinadi va bir nechta ketma-ketlikni moslashtirishga kiritiladi va maximum likelihood va Bayesian inferences kabi filogenetik daraxt qurish usullari qo'llaniladi. Ushbu

Molekulyar mikrobiologiya

usullar yordamida noma'lum ketma-ketlik evolyutsiya doirasida aniqlanadi.

DURDONA

MUNDARIJA

Kirish.....	3
1-mavzu. Mikroorganizmlarda DNK irsiy axborot tashuvchisi	4
2-mavzu. Mikroorganizmlardan nuklein kislotalar ajratish	51
3-mavzu. Agarozali va poliakrilamidli gel-elektroforez, uning turlari.	66
4-mavzu. Mikroorganizmlarda plazmid dnk tarkibi va transformatsiya hodisasi.....	73
5-mavzu. Bakteriofaglarning tuzilishi, litik sikli va tabiatdagi ahamiyati.	83
6-mavzu. Mikroorganizmlarda faglar yordamida irsiy axborotni tashishda transduksiya va konyugatsiya hodisasi.	95
7-mavzu. Tabiiy va sun'iy mutatsiya hodisasi.	104
8-mavzu. Gen muhandisligi fermentlari.	115
9-mavzu. Polimeraza zanjirli reaksiyasi	141
10-mavzu. Gen tushunchasi. genning tarkibi va ekspressiyasi.	146
11-mavzu. Mikroorganizmlar gen muxandisligi, uning bosqichlari va transformantlarning olinishi.....	156
12-mavzu. Mikroorganizmlardan gen muxandisligi yo'li bilan olinadigan sanoat va farmatsevtik mahsulotlar.....	175
13-mavzu. Genomni o'rganish usullari.	218
14-mavzu. Genodiagnostika va genoterapiya usullari.....	243
15-mavzu. Mikroorganizmlarni sistematik holatini molekulyar genetik identifikatsiya qilish.	252

DURDONA

DURDONA

**Xalilov Ilxom Mamatqulovich
Sherqulova Jamila Payanovna
Qobilov Fazliddin Bozorovich
Xalilova Feruza Mamatqulovna**

MOLEKULYAR MIKROBIOLOGIYA

O'quv qo'llanma

Muharrir: A. Qalandarov
Texnik muharrir: G. Samiyeva
Musahhih: Sh. Qahhorov
Sahifalovchi: M. Bafoeva

Nashriyot litsenziyasi AI № 178. 08.12.2010. Original-maketdan bosishga ruxsat etildi: 03.12.2024. Bichimi 60x84. Kegli 16 shponli. «Times New Roman» garn. Ofset bosma usulida bosildi. Ofset bosma qog'ozi. Bosma tobog'i 17,0. Adadi 100. Buyurtma №751.

“Sadriddin Salim Buxoriy” MCHJ
“Durdona” nashriyoti: Buxoro shahri Muhammad Iqbol ko'chasi, 11-uy.
Bahosi kelishilgan narxda.

“Sadriddin Salim Buxoriy” MCHJ bosmaxonasida chop etildi.
Buxoro shahri Muhammad Iqbol ko'chasi, 11-uy. Tel.: 0(365) 221-26-45

