

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ҚИШЛОҚ
ВА СУВ ХЎЖАЛИГИ ВАЗИРЛИГИ

ТОШКЕНТ ДАВЛАТ АГРАР
УНИВЕРСИТЕТИ



МЕВА-САБЗАВОТ ЭКИНЛАРИНИНГ ГЕН МУҲАНДИСЛИГИ

(магистратура талабалари учун маъруза матнлари)



ТОШКЕНТ-2016

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ҚИШЛОҚ ВА СУВ
ХЎЖАЛИГИ ВАЗИРЛИГИ**

ТОШКЕНТ ДАВЛАТ АГРАР УНИВЕРСИТЕТИ

**МЕВА-САБЗАВОТ ЭКИНЛАРИНИНГ
ГЕН МУХАНДИСЛИГИ**

(магистратура талабалари учун маъруза матни)

Тошкент – 2016

«Мева-сабзавот экинларининг ген мухандислиги» фанидан маъруза матни намунавий дастур асосида ёзилган бўлиб, ушбу фанга тегишли асосий тушунча ва маълумотлар қисқача баён этилган.

Сизга тавсия этилаётган маъруза матнлари биотехнология соҳасидан билим олаётган ва илмий изланишлар олиб бораётган магистрлар ҳамда аспирантлар, шунингдек илмий ходим ва ўқитувчилар учун мўлжалланган.

Тузувчилар:

М.А.Зупаров	Ботаника ва агробиотехнология кафедраси доценти, биология фанлари номзоди
М.С.Мамиев	Ботаника ва агробиотехнология кафедраси доценти, биология фанлари номзоди
А.А.Хакимов	Ботаника ва агробиотехнология кафедраси катта ўқитувчиси
У.Н.Рахмонов	Ботаника ва агробиотехнология кафедраси катта ўқитувчиси
А.Н.Аллаяров	Ботаника ва агробиотехнология кафедраси ассистенти
Г.Қ.Халмуминова	Ботаника ва агробиотехнология кафедраси ассистенти

Такризчилар:

А.А. Махсумханов	ЎзР ФА Микробиология институти, б.ф.н., катта илмий холим
Н.Т.Хакимов	ТошДАУ Ўсимликлар химояси ва карантини кафедраси доценти

Маъруза матни ботаника ва агробиотехнология кафедрасининг №2 сон баённома 09.09.2016 йил ва Селекция, уруғчилик ва ўсимликларни химоя қилиш факультети ўқув-услубий комиссияси №3 сонли баённома 28.10.2016 йил, ТошДАУ ўқув-услубий кенгашининг №5 баённома 28.11.2016 йил қарорида кўриб чиқилган ва чоп этишга тавсия этилган.

**Мавзу – 1. Кириш. Мева-сабзавот экинларининг ген мухандислиги
фани нинг аҳамияти ва вазифалари**

Режа:

- 1. Ген мухандислигининг моҳияти ва вазифалари**
- 2. Ген мухандислиги усуллари ҳал қиладиган масалалар**

Ген мухандислигининг моҳияти ва вазифалари. Вируслар билан прокариот ҳужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар кўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтказадиган система -плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халқали молекулалар - плазмидалар ва мўътадил вируслар **вектор** деб аталади (1-жадвал).

Улар табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлади. Шундай экан, энди бактерияларни културада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оксилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан деган савол туғилади?

Бу ғояларнинг амалда юзага чиқиши ген мухандислиги ёки генетик мухандислик деб аталадиган ва катта истикболга эга бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

1-жадвал

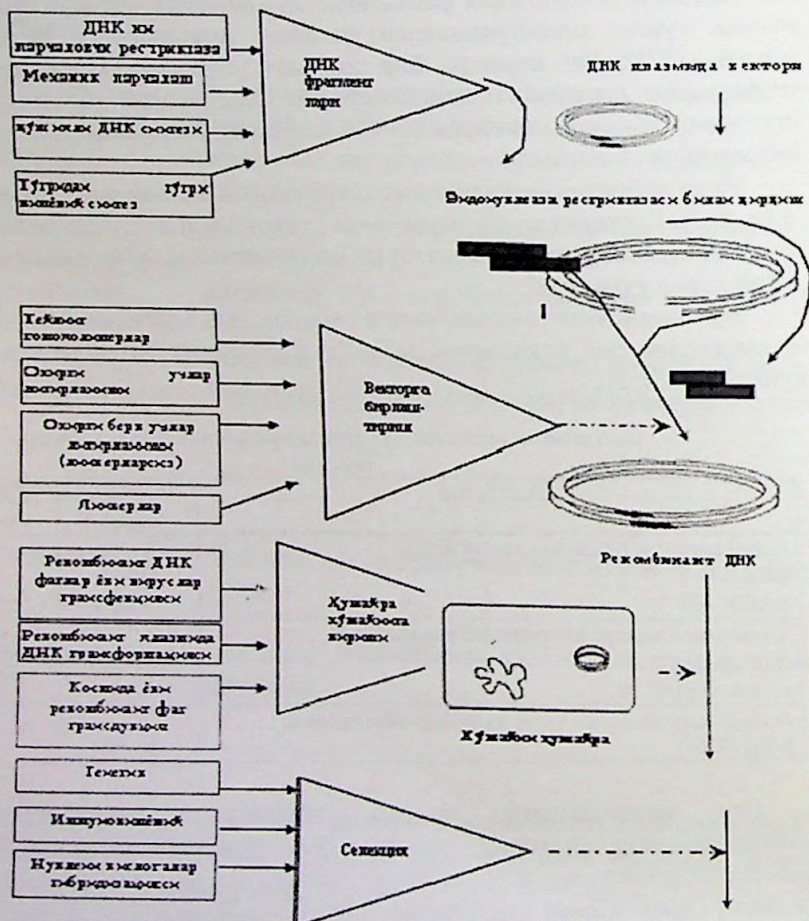
Биотехнологияда кенг қўлланиладиган баъзи бир векторлар
тавсифи

Векторлар	Нусхалар микдори	Ўлчам, минг нуклеотидлар
клонлаш учун плазмида векторлари: pBR 322 pACY 184	40-50 ~20	4,4 4,0
клонлашда махсус катталикдаги векторлар: λ Chron 4A космида pHС 79	100-200 ~20	41,8 6,4
генлар экспрессияси учун плазмида векторлари: p trp ED5-1	40-50	6,7

Ген мухандислиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисмларга бўлиш, керакли жойидан кесиш, керак бўлмаган қисмини олиб ташлаш, керак бўлган қисмларини бошқа генлардан ёки синтез йўли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генини мувофиқ организмга киритиб (Масалан, одамнинг инсулин генини микроб ҳужайрага ёки сичконнинг ўсиш гормони генини каламушга), зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳақозо ғоялар ва технологияларнинг йигиндисидир (1-чизма).

Айрим ДНК молекулалари - генларнинг бир турини кўп нусхасини ҳосил қилиш мақсадида илгаридан хужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатилиб келинган, клонланиш техникасини молекулаларга мослаштирилган варианти қўлланилмоқда. Хужайра линияларининг бир хиллигини, клонлаш усули билан ҳам кучайтириш мумкин.

Клон - деб бирдан-бир олд хужайрадан келиб чиққан хужайралар популяциясига айтилади. Клонлаш асосан мутант хужайралар олиш учун ишлатилади. Молекуляр клонлаш ДНК нинг аниқ бир намунасини тоза ҳолда кўпайтиришдан иборат.



1-чизма. Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

Ҳозирги вақтда қайси продуцент (микроорганизм) дан фойдаланган ҳолда фойдали маҳсулотлар синтез қилиш мумкинлигини аниқ кўрсатиб бериш мумкин. Агарда бундай продуцент бўлмаса, қай тарика ва қандай шароитда юқори даражада, исталган турдаги маҳсулотни олиш хусусиятини

намоён қилувчи продуцентни яратиш мумкинлигини олдиндан айтиб бериш имкониятлари мавжуддир.

Биотехнологик ишлаб чиқаришда бугунги кунда микроорганизмларни минглаб штаммларидан фойдаланилмоқда.

Озиқ-овқат саноати биотехнологиясида ген муҳандислиги соҳасини ўрганишдан мақсад:

- ✓ *тирик организмлар ирсий белгилари ҳақидаги ахборот жойлашган ДНК молекуласининг тузилиши, роли ҳамда унинг молекуляр биологияси;*
- ✓ *генетик муҳандисликнинг моддий асослари: трансформация, трансдукция, кўчиб юривчи генетик элементлар-транспозонлар, плазмидалар, вируслар, бактериофаглар, рестриктазалар, рекомбинант ДНК олиш, генларни клонлаш, ҳужайра муҳандислиги, ҳужайра ва тўқималарни сунъий шароитда ўстириш технологияси;*
- ✓ *генетик муҳандисликнинг озиқ-овқат саноатида, ҳайвонлар ва ўсимликлар селекциясида қўлланилиши;*
- ✓ *ген муҳандислигига асосланган биотехнологиянинг озиқ-овқат саноатидаги илмий-техник тараққиётни тезлаштиришдаги роли;*
- ✓ *гибридомалар олиш технологияси ва унинг юқорида келтириб ўтилган маҳсулотларни ишлаб чиқаришда қўлашни ҳамда генетик муҳандисликнинг истиқболлари ҳақида аниқ билимларни ўзлаштиришдан иборат.*

Ген муҳандислиги усуллари ҳал қиладиган масалалар. Ушбу фаннинг асосий вазифаси замонавий ген муҳандислиги ютуқларини халқ ҳўжалиги амалиётида кенг қўламда қўллашдан иборат.

Ген муҳандислиги анъанавий танлаш (селекция) усулларини инкор қилмасдан, аксинча унинг имкониятларини янада кенгайтиради. Ген муҳандислиги усуллари қуйидаги вазифаларни ҳал қила олади:

- ✓ *продуцентларнинг алоҳида олинган генларини ўзгартириш, уларни керакли функцияларини кучайтириш, яъни янги генетик ахборот киритмасдан, ўзида мавжуд иншакцияни модификация қилиш орқали штаммнинг самарадорлигини ошириш ёки яхшилаш;*
- ✓ *аниқ вазифага жавобгар бўлган, алоҳида генни ажратиб олиш ва уни ўзгартириш (мутация қилиш), ҳужайра ичида унинг нусхаларини кўпайтириш ва шу орқали маълум маҳсулот синтезини кучайтириш;*
- ✓ *промоторларни геннинг фаоллигини аниқловчи мутацияга учраган турини олиш, энхансерлар (промоторлар фаоллигини кучайтирувчилар) киритиш;*
- ✓ *ишлатиладиган субстратлар спектрини кенгайтириш. Масалан, сут зардоб, целлюлоза сақловчи чиқиндиларда тез ривожланиб, оқсил синтез қилувчи микробларнинг штаммларини яратиш;*
- ✓ *ксенобионтлар (инсон яратган биологик фаол моддалар), нефт қолдиқлари, ҳар хил токсинлар ва атроф муҳитни ифлосланттирувчи кимёвий моддаларни ва бошқа кераксиз бирикмаларни утилизация қилиш имкониятига эга бўлган микроорганизмлар штаммларини яратиш;*

- ✓ қўйила олмайдиган микроорганизмларга қўйилишни таъминлаб берувчи плазмидалар киритиш ва шу туфайли штаммларнинг хоссаларини яхшилаш мақсадида рекомбинация усулларидадан фойдаланиш;
- ✓ бошқа гуруҳ организмлар генини киритиш ва шу орқали киритилган ген махсулотини олиш. Масалан, ўсимликлардан ширинлиги сахарозадан 3000 маротаба ортиқ бўлган полипептид генини *E.coli* га ёки *Sacch.cerevisiae* культураларига ўтказиш ва шу орқали ширин таъм берувчи махсулотлар тайёрлаш;
- ✓ Янги ген конструкция қилиб, янги оқсил олиш, кейинчалик оқсил молекуласини “архитектураси” (бирламчи, иккиламчи, учламчи ва тўртламчи структуралари) ва уларнинг биокимёвий хоссалари аниқ бўлгандан кейин, сунъий генлар синтез қилиш ва уларни клонлаш орқали янги оқсиллар яратиш ва ҳ.к.

Ҳозирги даврда *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* каби микроорганизмларнинг генетикаси жуда ҳам яхши ўрганилганлиги сабабли, улар ген муҳандислигида кенг ишлатилмоқда.

Микроорганизмлар ҳужайраларидан энг муҳим бирикмалар, масалан, гормонлар (инсулин, соматостатин ва соматотропин), иммунитетни кучайтирувчи моддалар (α -тирозин, интерферон, интерлейкин, вируслар қобикларининг оксиллари, - улардан ўта хавфли касалликлар – кутириш, оксим, гепатит В, шунингдек, ҳозирги вақтда паррандаларга қиргин солаётган парранда гриппининг қўзғатувчиси H5N1-вируси ва бошқа юқумли касалликларга қарши эмлаш (вакцинация) воситалари олишда фойдаланилмоқда.

Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида аминокислоталар (треонин, прольин ва ҳ.к.), ферментлар, антибиотиклар ва бошқа биологик фаол моддаларнинг супер-продуцентлари олинган.

Бу усул ген фасълигини бошқариш унинг функциясини, тузилишини ўрганиш, прокариот ва эукариот организмларда генетик материалларни ташкил қилиш масалаларида чегараланмаган имкониятларни очиб беради.

Тирик организмлар ирсий ахборотини сунъий йўл билан маълум мақсадга мувофиқ ўзгартириш жараёни генетик муҳандислик фанининг асосий устқурмаси ҳисобланади. Генетик муҳандислик ҳужайра, хромосома ва ген даражасида амалга оширилади:

1. Ҳужайра даражасидаги генетик муҳандислик - икки ҳужайрани ўзаро қўйиш йўли билан амалга оширилади.
2. Хромосома даражасидаги генетик муҳандислик -ҳужайра ядросига қўйимча хромосомалар киритиш орқали амалга оширилади.
3. Ген даражасидаги генетик муҳандислик ёки ген муҳандислиги - энг мураккаб бўлиб, қуйидаги босқичлар асосида амалга оширилади:
 - а. аниқ мақсаддан келиб чиққан ҳолда, шу мақсадга жавоб бераоладиган ген, унинг функциясини ўрганиш орқали қидириб топилади, ажратиб олинади, клонланади ва тузилиши ўрганилади.

- б. ажратиб олинган ген хромосома ДНК си билан рекомбинацияланувчи бирор фаг геноми, транспозон ёки плазида ДНК си билан бириктирилиб вектор конструкция яратилади.
- с. вектор конструкция трансформация усули билан хужайрага киритилади ва трансген хужайра олинади.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу-2. Мева-сабзавот экинларининг ген мухандислигини ривожланиш босқичлари

Режа:

1. Ген мухандислигининг ривожланиш тарихи

Трансген хужайрадан сунъий равишда етук организм ўстирилади. Ушбу усулдан фойдаланиб ўсимлик, хайвон ва микроорганизмлар хужайраларидан трансген шакллар олиш мумкин. Хужайра мухандислиги усулларида фойдаланиб, тирик организмлардан гибрид хужайралар олиш биотехнологияси яратилди ва бу асосида моноклонал антителалар олиш йўлга қўйилди. Биотехнологиянинг бу соҳасига дастлабки қадамлар 1973 йил биринчи ген клонланган вақтдан бошлаб қўйилган эди (2-жадвал).

2-жадвал

Замонавий биотехнологиянинг дастлабки асосий ривожланиш босқичлари

Кашф этилган вақти	Бажарилган ишлар
1973 йил	Биринчи ген клонланган
1974 йил	Биринчи бактерия генларини клонлаш экспрессияси амалга оширилди
1975 йил	Биринчи гибридома яратилган
1976 йил	Рекомбинант ДНК технологиясидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш бошланган
1980 йил	Ген мухандисли усуллари ёрдамида олинган микроорганизм штамларини патентлаш ҳақидаги қарор қабул қилинган
1981 йил	Моноклонал антителла тўпламларидан фойдаланиш мумкинлиги тўғрисидаги қарор қабул қилинган. Биринчи марта генларни автоматик синтезатори сотувга чиқарилди
1982 йил	Тиббиётда рекомбинант ДНК - инсулини ва хайвонлар учун биринчи рекомбинант ДНК дан фойдаланишга рухсат берилди
1983 йил	Биринчи маротоба ген экспрессиясидан бир ўсимликдан бошқа турида фойдаланиш мумкинлиги исботланди

Илмий ишлар давом эттирилмоқда. Ҳозирги вақтда кун тартибида ОИТС (СПИД) ва парранда гриппининг қўзғатувчиси H5N1 вирусига қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди.

Ген муҳандислиги биотехнологиясининг ютуқлари саноат кўламида ва кишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Хусусан, антибиотиклар, аминокислоталар, витаминлар ва гормонлар ишлаб чиқарилмоқда, наслдор корамол клонлари яратилмоқда, тупроқ ва сувда захарли пестицид колдикларини парчалайдиган микроорганизмларни трансген штаммлари олинган, атмосфера азотини ўзлаштирувчи микроорганизмлар генлари асосида тупрокни азотли ўғитлар билан бойитиш муаммоси ечилмоқда, зарарли хашаротларга ва патоген микроорганизмларга чидамли, экологияни асровчи трансген ўсимлик навлари етиштирилмоқда, ирсий касалликларни тезкор ташхис қилиш учун диагностикалар тайёрланмоқда, шунингдек, ген терапия усуллари такомиллаштирилмоқда.

Бугунги кунда генетик муҳандисликка асосланган биотехнология тезкор ошиб бораётган, инсон эҳтиёжларини қондириш учун классик технологиялардан ўта самарали эканлигини тўла намоён қилмоқда.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 3. Ўсимликлар ген муҳандислиги учун векторлар яратиш

Режа:

1. Вектор молекуласининг ген муҳандислигидаги вазифаси
2. кДНК библиотекасини тузиш

Вектор молекуласининг ген муҳандислигидаги вазифаси. Вектор молекулалар ген муҳандислиги биотехнологиясида генларни клонлашда ва трансформация қилишда асосий иш қуролни бўлиб хизмат қилади.

Рекомбинант ДНК ни автоном репликация бўлиши учун жавоб берадиган ДНК бўлаги - вектор молекулалари дейилади.

Вектор молекулалар ўз вазифасига кўра икки типга бўлинади:

Биринчиси -автоном репликация бўлувчи векторлар.

Иккинчиси - хромосомага интеграция бўлувчи векторлар.

Вектор молекулалари вазифасини фаг ДНК лари, плазмидалар ва ўсимликларни хлоропласт ҳамда митохондриял ДНК лари ўташи мумкин.

Хўжалик аҳамияти қимматли бўлган генларни ажратиш учун ген банки (библиотекаси) тузилади. Хромосомал ДНК асосида ген библиотекасини тузиш қуйидагича амалга оширилади:

ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қириқилади ва маълум шароитда реассоциация қилинади;

Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади;

Олинган рекомбинант ДНК бактерия ҳужайрасига трансформация қилинади.

Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига эътибор бериш керак. Бу кўрсаткич куйидаги формула ёрдамида ҳисобланади:

$$N = \frac{\frac{\ln(1-p)}{p}}{\ln(1-x/y)}$$

бунда, x -клонланаётган ДНК ўлчами, y -гаплоид геномнинг ўлчами ва $p=0,99$ га тенг бўлса, 99% хромосомал ДНК нинг мос қисми клонланади.

кДНК библиотекасини тузиш. Генларни клонлашда кўпинча кДНК библиотекасини тузиш мақсадга мувофиқдир. Бу ҳолда махсус поли (Y) ва олиго (dT) колонкалари ёрдамида учларида поли (A) нуклеотидлар кетма-кетлигини сакловчи иРНК, тРНК ва рРНК дан ажратиб олинади. Олинган иРНК молекуласи олиго (dT) нуклеотидлари билан аралаштирилиб реассоциация қилинади.

Бунда иРНК молекуласининг поли (A) учида dA-dT кўш занжирли сегмент ҳосил бўлади. Ушбу икки занжирли сегментнинг олиго (dT) учи кДНК синтезини амалга оширувчи ревертаза ферменти учун праймер (кДНК синтезининг бошланиш нуқтаси) вазифасини ўтайди.

Синтез қилинган кДНК молекуласи қисқа учли икки занжирли структура билан тугалланади. кДНК синтезида матрица вазифасини ўтаган иРНК молекуласи NaOH билан парчаланади, натижада қисқа икки занжирли ва тўлиқ иРНК молекуласига комплементар бўлган бир занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади.

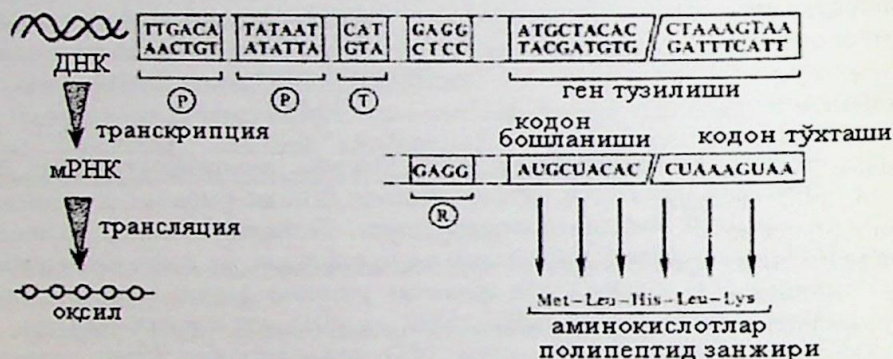
Ҳосил бўлган қисқа икки занжирли структура кДНК нинг иккинчи занжирини синтез қилишда праймер вазифасини ўтайди. ДНК-полимераза I ферменти ёрдамида кДНК нинг иккинчи занжири синтез қилинади. Ҳосил бўлган кДНК нинг бир занжирли қисми SI-нуклеаза ферменти ёрдамида парчаланади ва икки занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади. Шу йўсинда ҳосил бўлган кДНК молекуласи вектор молекулаларига уланган ҳолда клонланади.

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш куйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100°C ҳароратда 5 мин., 0,2 N NaOH эритмасида 15 мин.), бир занжирли ДНК молекуласи стабил кўзгалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза филътрига бириктирилади. Олинган

фильтр [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] АТФ нуклеотида билан нишонланган иРНК молекуласи билан гбри; изация килинади.

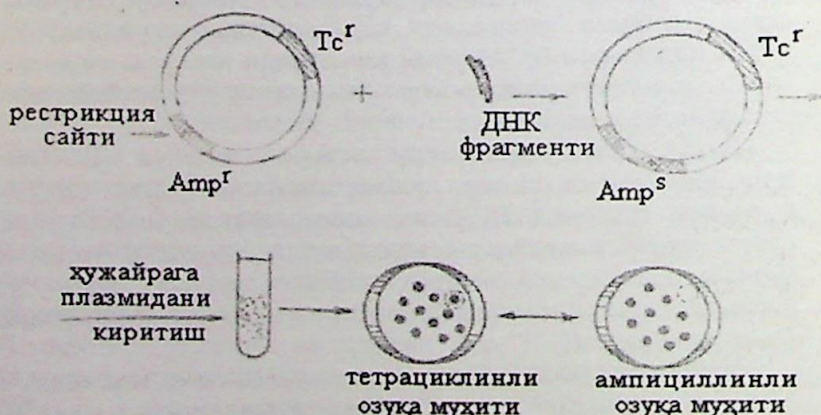
Молекуляр гибридизация жараёнида филътрга бириккан рекомбинант ДНК молекуласига комплементарлик конунияти асосида нишонланган иРНК молекулалари бирикади.

Хосил бўлган гибрид ДНК молекуласи денатурация килиниб, нишонланган иРНК молекуласи ажратиб олинади (элюция ёрдамида). Олинган иРНК молекуласи хужайрасиз оксил синтез килиш тизимида текшириб кўрилади. Хосил бўлган оксил молекуласини идентификация килиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади.

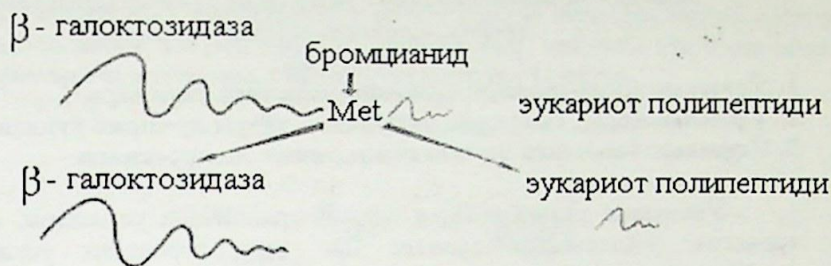


2-чизма. Прокариотларда ген экспрессияси

Р – промоторлар – РНК-полимеразалар боғланувчи сайтлар; Т- транскрипцияни кучайтирувчи сайт; R- рибосомалар боғланувчи сайт.

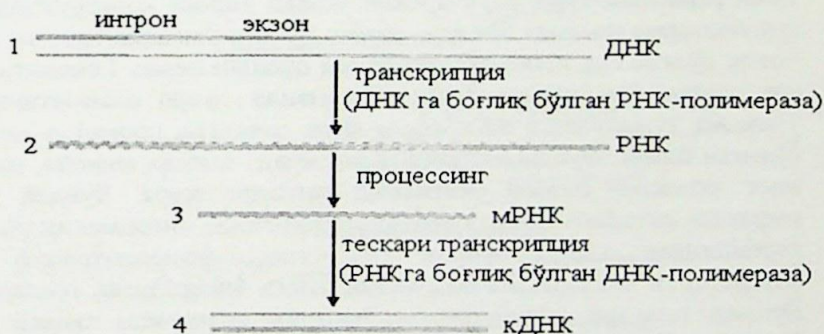


3-чизма. Вектор ёрдамида клонланувчи ДНК киритилган колонияларни аниклаш



4-чизма. Эукариотнинг полипептиди ва β -галактозидазадан ташкил топган химерли оксилни конструкция қилинган ген ахбороти асосида синтез қилиниши

Ҳар иккала пептид метионин (Met) билан боғланган. Бромцианид таъсирида химер молекула метионин турган жойдан парчаланadi.



5-чизма. мРНК ахбороти асосида геннинг синтезланиши

1-эукарион ген; 2-ДНК матричасига РНК транскрипцияси; 3-процессинг – оқибатида интронлар сакламайдиган, етилган мРНК ҳосил бўлади; 4- мРНК матричасида кДНК синтези.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 4. Мева-сабзавот экинлари хужайрасига генларни трансформация қилиш усуллари

Режа:

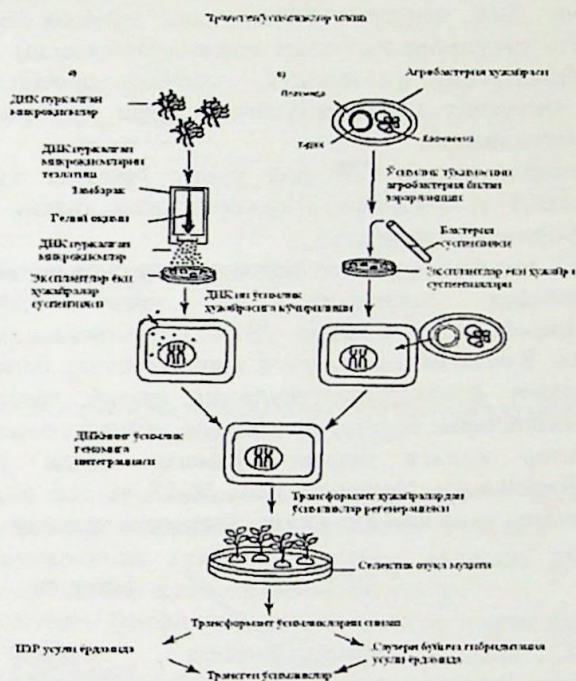
1. Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари
2. Ўсимликларга генларни тўғридан - тўғри кўчириб ўтказиш
3. Ўсимлик геномига бегона генларнинг экспрессияси

Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари. Икки паллали трансген ўсимликлар олишда энг кенг тарқалган усуллардан бири агробактериялар билан кокультивация қилиш усули ҳисобланади (1 - расм). У ўсимлик эксплантларини Т-ДНК худудига бегона ген жойлаштирилган вектор конструкцияга эга агробактериялар билан трансформация қилишга асосланган. Унинг кенг тарқалганлигининг сабаби, трансформацияни амалга оширишнинг бирмунча соддалиги трансген ўсимликларни ажратиб олишда юқори (ўсимлик турига қараб, 10-60 %) самарадорлиги билан изоҳланади.

Дастлабки материал учун вектор (бинар, коинтегратив ёки муайян трансформация тури учун яроқли бошқа бирор) конструкцияга эга бўлган агробактерия штамми бўлиши лозим. Вектор ўсимлик геномига киритилиши лозим бўлган ген кетма-кетлигига эга бўлиши керак. Геннинг келиб чиқиши (прокариот ёки эукариот) трансформация учун аҳамиятсиздир, лекин у ўсимлик хужайрасига экспрессия бўла оладиган промотор назорати остида бўлиши лозим. Функционал гендан ташқари, вектор, албатта, трансформациянинг селектив нишон белгисини сақлаши шарт. Бундай нишон белги сифатида антибиотиклар: канамицин (*npt*-гени), гигромицин (*npt*-гени) ва ёки гербицидлар хлорсульфурон (*ALS*-гени), фосфинотрицин (*bar*- гени) (*BASTA*) га чидамлилиқ белгисини юзага чиқарадиган генлар ишлатилади. Бундан ташқари, реципиент – ўсимлик навларини танлаб олиш лозим. Трансформация учун эксплант сифатида стерил ўсимлик барг пластинкалари олинади. Бироқ бунинг учун ёш илдизлар (арабидопсисда), гипокотил (помидорда), уруғпалла (помидор, бақлажонда), бўғим оралиғи (картошқада) ҳам ишлатилиши мумкин.

Эксплантларни вектор конструкцияли агробактериялар сакловчи суюқ муҳитида инокуляция қилинади. Инокуляция қилиш муддати ҳар бир тур ўсимлик учун алоҳида танлаб олинади. Бунда эксплантнинг жароҳатланган юзасида хужайраларнинг зарарланиши бошланиб, кокультивациядан сўнг 24 – 48 соат ўтгач, Т-ДНК бўлагини бегона (танлаб олинган) ген билан бирга ўсимлик геномига жойлаштириш содир бўлади. Шундан сўнг, эксплантларни антибиотиклар (карбенициллин ёки цефотаксим) сакловчи озика муҳитига ўтказилади, бу агробактерия хужайраларнинг танлаб нобуд бўлишига сабаб бўлади. Бундан ташқари, озика муҳитига керакли (тўғридан-тўғри регенерация ёки каллус ҳосил бўлиши учун) фитогормонлар ва трансформант хужайраларни селектив танлаб олиш учун антибиотиклар, гербицид қўшилади. Антибиотик ёки гербицидга чидамлилиқ генларининг экспрессиясини амалга оширувчи трансген ўсимликлар селектив агент қўшилган муҳитда ўса олса, трансген бўлмаган ўсимликлар бундай муҳитда

нобуд бўлади. 2-5 ҳафтадан сўнг трансформант эксплантлардан поялар ўсиб чиқа бошлайди, уларни ажратиб олинади ёки кейинги кўшимча молекуляр таҳлиллар учун тупроққа кўчириб ўтказилади (1-расм).



1 расм – Трансген ўсимликларни олиш схемаси.

а)-биобаллистикалар усули; б)-агробактериялар билан кокультивация

Протопластлар шу йўсинда трансформация қилинади, лекин бу усулдаги трансформация протопластларнинг ўзида регенерация қилиш қобилияти сустлиги учун кам самара беради.

Агробактериялар билан кокультивация қилиш усули орқали ҳозирги кунга қадар деярли барча икки паллали кишлоқ хўжалик экинларидан трансген ўсимликлар олинган. Бу усул баъзи бир паллалилар (бугдой, маккажўхори, шоли) да ҳам ўз ифодасини топган.

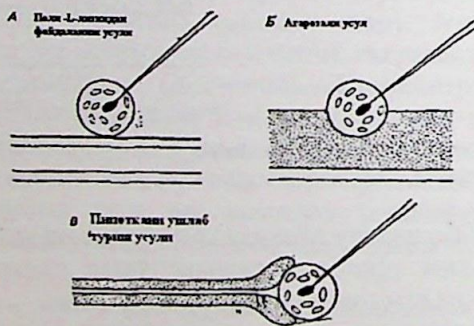
Ўсимликларга генларни тўғридан-тўғри кўчириб ўтказиш. Ўсимлик хужайраларига генларни тўғридан-тўғри кўчириб ўтказишда ўсимлик протопластларининг трансформацияси кенг қўлланилади. Ўсимлик хужайра деворига ферментлар (целлюлаза, пектиназа) билан ишлов берилганда хужайра девори емирилиб, фақат протопласт қолади. ДНК иштирокида протопластларни тўғридан - тўғри трансформациялаш усули ишлаб чиқилган. Трансформациянинг бирмунча юқори самарадорлигига (10^{-2}) электропорация ва полиэтиленгликол кўшиш усули орқали эришиш мумкин. Агробактериялар билан трансформация қилишга нисбатан, тўғридан - тўғри

кўчириб ўтказиш усулининг частотаси кам бўлса-да, бирмунча афзаликларга эга. Вектор махсус биологик сигналлар ва трансформация функциялари (Т-ДНК худуди билан чегараланган ва *vir*-худуди) га эга бўлмаслиги ҳам мумкин. Трансформация учун деярли ҳар қандай бегона ген тутувчи ДНК вектори қўлланилиши мумкин. Бунда гибрид ген (фақат тегишли регулятор худудлар мавжуд бўлганида) хужайра рекомбинацияси механизмларидан фойдаланиб, айниқса, протопласт ядросига тўғридан - тўғри инъекция қилишда ўсимлик ядро ДНКсига интеграция бўлади ва экспрессияланади.

Ҳозирги вақтда 140 дан ортиқ ўсимлик турлари вектор ДНКсини протопласт хужайраларига турли усуллар билан кўчириб ўтказиш орқали трансформация қилинган.

ДНК микроинъекцияси. Бир қатор тажрибаларнинг кўрсатишича, ўсимлик хужайралари трансформацияси учун хайвон хужайраларидаги микроинъекциялар сингари ДНК микроинъекциялари усулини қўллаш мумкин. Бунда инъекция учун протопластлар олишда уларни полилизинли шишаларга ёпиштириш усуллари ишлаб чиқилганлиги қатор техник қийинчиликларни бартараф этиш имкониятини берди (2-расм).

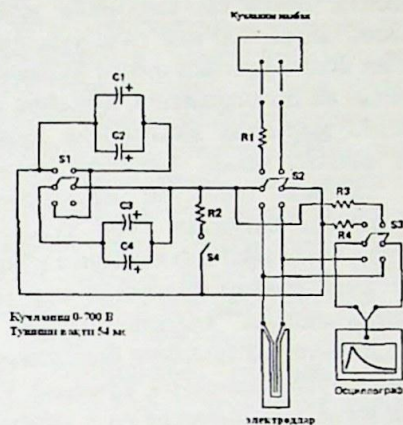
Вектор типига боғлиқ бўлмаган ҳолда ўсимлик протопластлари трансформацияси самарадорлиги 10-15 % дан ошмайди, у икки паллали ўсимликлар учун ҳам бир паллалилар учун ҳам бир хилда мувофиқ келади.



2 – расм. Микроинъекцияни амалга ошириш учун протопластларни иммобилизация қилиш усули

Электропорация. Бу усул юқори импульсли кучланишларнинг мембраналар ўтказувчанлигини қайтар даражада оширишга асосланган. Ўсимлик протопластлари учун электропорация муолажалари жуда самарали бўлбанади. Усулнинг моҳияти қуйидагича: ДНК- векторини сақловчи юқори концентрацияли эритмадаги ўсимлик протопластларига юқори вольтли импульс (кучланиш 200-350 В, импульс давомийлиги 54 мс) билан таъсир этилади (3-расм). Натижада ДНК молекулалари хужайра мембранасидаги поралар (тешикчалар) орқали ютилади. Эритма аралаштирилгандан сўнг протопластларни регенерация бўлиши учун етарли

муҳитга экилади. Кўчириб ўтказишнинг самараси электр шокидан сўнг 24-28 соат ўтгач аниқланади.



3 - расм. Электропорацияни амалга ошириш учун паст кучланишли қурилманинг тузилиши

Липосомаларга жойлаштириш. Ўсимлик протопластларига ўтказиладиган экзоген генетик материални нуклеин кислоталарни парчалайдиган нуклеазалар таъсиридан химоя қилишда қўлланиладиган усуллардан бири липосомаларга жойлаштириш усули.

Липосомалар қобиғи фосфолипидлардан ташкил топган сферик шакллар ҳисобланади. Уларни фосфолипидларни сувли эмульсияларига ультратовушлар билан ишлов бериш ёки каттик чайқатиш натижасида олиш мумкин. Липосомалар ёрдамида ўсимлик протопластларига тамаки мозаикаси вируси РНК си, *A. tumefaciens* бактерияси Ti – плазмидаси ДНК си, шунингдек, бутун метафаза даври хромосомалари киритилган. Липосомалар ёрдамида кўчириб ўтказиш тизимларнинг афзалликлари сифатида уларнинг хужайраларга нисбатан захарлилигининг камлиги, липосомаларни парчалаш хусусиятига эга хужайралари бўлган кўплаб ўсимликларда ишлатиш мумкинлигини кўрсатиш мумкин. Ҳозирги вақтга келиб, мазкур усул техник жиҳатдан қийинлиги ва трансформациялаш фаоллигининг нисбатан кам (0,5-1 %) лиги учун тобора кам фойдаланилмоқда.

Биобаллистик трансформациялар усули. Биобаллистика усули бугунги кунга келиб, бир паллалилар учун энг самарали усуллардан ҳисобланади, шунингдек уни икки паллали ўсимликларда ҳам муваффиқият билан қўллаш мумкин. Трансформация учун дастлабки материал сифатида культуралар суспензияси, каллус тўқимаси ёки бир паллалиларнинг етилмаган муртак ўсимталари олинади.

Мазкур усулнинг моҳияти шундан иборатки, диаметри 0,6-1,2 мкм бўлган вольфрам, олтин ёки платина бўлақчалари трансформация учун зарур ген конструкциялари сақловчи ДНК устидан пуркалади. ДНК тутувчи вольфрам,

платина ёки олтин бўлакчалари целлофан қобик билан ўралиб, биобаллистик замбарак ичига жойлаштирилади. Каллус ёки хужайра суспензияси агарли озика мухити солинган Петри лycopчасига ўтказилади ва биобаллистик замбарак рўпарасига 10-15 см масофада жойлаштирилади. Замбаракдаги босим вакуум насос билан 1,0 атм гача туширилади. Босим тушириладиган вақтда замбаракдан вольфрам ёки олтин бўлакчалари отилиб чиқиб, хужайра деворини ёриб ўтади ва цитоплазмага, хужайра ядросига ўтади.

Одатда бевосита марказда жойлашган хужайралар вольфрам ва олтин бўлакчаларининг қўлаб келиб урилиши ва жуда кучли босими туфайли нобуд бўлади, улардан 0,6-1 см марказдан узоқда эса трансформант хужайралар жойлашади. Шундан сўнг хужайраларни давомли экиш ва регенерация қилиш учун озика мухитларига қўчириб ўтказилади.

Биобаллистик замбараклар ёрдамида бир паллали маккажўхори, шоли, буғдой, арпа ўсимликлари трансформация қилиниб, турғун трансген ўсимликлар олинган. Бундан ташқари биобаллистик трансформация ДНК ни эмбриоген чангчига тўғридан-тўғри қўчириб ўтказиш, трансген дигаплоид ўсимликлар олиш учун қўлланилади ва у селекция ишларида муҳим босқич ҳисобланади. Бу усул билан тамаки ўсимлигининг трансформацияси амалга оширилиб, гаплоид ўсимликлар регенерациясидан сўнг турғун трансформантлар олинган.

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

Т-ДНК кетма-кетликлари борлигини тўлиқ исботлашда полимераза занжир реакцияси (ПЗР) таҳлили ва Т-ДНК бўлагини радиоактив зонд сифатида қўллаш орқали трансген ўсимлик хромосома ДНК сининг блот – гибридизациясига асосланган молекуляр таҳлили ўтказилади. Бундай таҳлилларни ўтказиш жуда қimmat турса-да, олинган натижалар трансформация амалга ошганлиги, Т-ДНК – конструкцияларнинг қанчаси ўсимлик геномига ўрнаша олганлиги тўғрисида ишончли маълумот олиш қонини беради. Бундан ташқари, функционал ген экспрессиясининг шимча таҳлилини тегишли мРНК ёки оксилни аниқлаш усуллари орқали амалга оширилади.

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

ўсимлик хужайралари трансформацияси учун тўғридан –тўғри ишлатиб бўлмасди.

Бактерия генлари эукариот хужайраларда транскрипция бўлиши учун уларнинг промотор кетма-кетликларини ўсимлик генлари промоторлари ёки бошқа ўсимлик хужайрасида транскрипцияни иницация қила оладиган промоторларига алмаштириш лозим бўлади. Бундан ташқари, бактериал геннинг 3 - қисмига полиаденилланиш сигналини сакловчи фрагментни улаш лозим. Бундай модификациялар эукариот РНК – полимеразанинг бактериал кетма-кетликни транскрипциялаши ва ундан сўнг мРНК ўсимлик хужайрасида бактериал оксилни трансляция қилиш учун керак бўлади.

Бактериал генларнинг экспрессияси учун промотор сифатида кўпинча гулқарамнинг мозаика вируси (CaMV)нинг 35S – РНК промоторидан фойдаланилади. Бундай танлов бир вақтнинг ўзида икки хил муаммони ҳал этиш имконини беради: биринчидан, икки паллалар ўсимликлар промоторлари бир паллалар геномида кўп ҳолларда фаолият юритолмайди, аксинча, 35S CaMV промотори ҳар қандай ўсимлик геномида транскрипцияни таъминлайди. Иккинчидан, кўпгина эукариот промоторлари анча кучсиз бўлиб, CaMV нинг 35S промотори унинг назоратидаги геннинг юқори даражаги экспрессиясини таъминлайди. Кўпгина ҳолларда ўсимлик хужайрасига ўсимлик генини трансформация қилишда оксил маҳсулоти ажралиб чиқишини ошириш учун унинг промоторини жуда кучли бўлган CaMV нинг 35S промотори билан алмаштирилади. CaMV 35S-промотори конститутив бўлиб, трансген ўсимликнинг барча тўқималарида унинг назоратидаги геннинг кучли экспрессиясини таъминлайди. Айнан шунинг учун CaMV 35S-промотори ўсимликлар трансформациясида қўлланиладиган вектор конструкциялар ичида энг кўп қўлланилади. Кейинги йилларда баъзан CaMV 35S кетма-кетлигини икки қарра кўпайтирилган нусхаси, сунъий олинган MAC - промоторидан ҳам фойдаланилмоқда.

Сўнгги пайтларда ўсимлик генларининг тўқимага ҳос промоторлари катта аҳамият касб этмоқда. Бу промоторларнинг CaMV 35S промоторидан афзаллиги шундаки, бундай промоторлар назоратидаги генлар маълум бир тўқималардагина экспрессия бўлади. Масалан, пататин промотори назоратидаги ҳар қандай ген фақат картошка ўсимлиги туганагига экспрессия бўлади, чунки пататин оксили – картошка туганаклари захира оксили бўлиб, унинг генлари фақат туганаклардагина экспрессияланади. Тўқимага ҳос промоторлар бегона оксил ўсимликнинг маълум бир аъзолари учун зарур бўлган ҳолларда қўлланилади. Масалан, ўсимликлар илдизини баъзи бир тупроқ патогенларидан химоя қилишда илдизга ҳос промоторлардан фойдаланиш қулай, чунки улар ўсимликларнинг патогенлар билан муносабатга киришувчи фақат ер ости қисмидагина химоя оксили синтезланишига олиб келади. Ўсимликлар учун бундай промоторлардан фойдаланиш бирмунча қулайдир.

Шунингдек индуцибел промоторлардан ҳам фойдаланилади. Конститутив CaMV 35S промоторидан фаркли равишда бундай промоторлар назоратидаги генлар ҳар доим ҳам экспрессия бўлавермасдан, фақат маълум

шароитлардагина экспрессия бўлади. Масалан, жароҳатланишда индуцирланадиган промоторлар, металл ионлари (мис, темир, ва х.к.) иштирокида юзага чиқадиган металл-индуцибелларини келтириш мумкин. Шундай қилиб, бундай промоторлар назоратидаги генларнинг «киритилиши ва ўчирилиши» осон бошқарилади. Индуцибел промоторлар нафақат ўсимликларда, балки, умуман, ген муҳандислигида кенг қўлланилади. Тўқимага хос ва индуцибел промоторларнинг камчилиги уларнинг фаоллигининг пастлигидадир.

Промоторлардан ташқари трансгеннинг экспрессияланишга унинг ўсимлик геномига интеграция бўлиш жойи ҳам таъсир кўрсатади. Т-ДНК кетма-кетлиги геномнинг исталган қисмига ўрнаша олади деб ҳисобланса-да, қўллаб тадқиқотларда бу ҳодиса тасодифан амалга ошмаслиги исботланган. Қўпинча Т-ДНК ген экспрессияси амалга ошмайдиган гетерохроматин участкаларига ўрнашади ва трансген ҳар қандай кучли промотор таъсирида ҳам транскрибированмайди. Буни такрорий трансформациялар орқали ҳам англаб олиш мумкин.

Трансген ўсимликлар олишнинг илк босқичларида бегона генлар экспрессиясининг нишон белгилари – репортер генлардан фойдаланилади. Одатда, репортер генларнинг махсулотлари оддий усуллар билан осон аниқланади. GUS деб номланувчи репортер генидан кенг фойдаланилади, у β- глюконаза ферментини кодирлайди ва субстратга қўшилганда уни оч хаво рангли бирикмага қадар парчалайди. Бундан ташқари *gfp* рецептор гени экспрессия бўлганда осон аниқланадиган флуоресцент оксилни ҳосил қилади. Одатда, рецептор геннинг экспрессияси трансген ўсимликда функционал генинг экспрессияланиш даражаси билан ўзаро мос келади.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 5. Ген муҳандислиги ферментлари. Транскриптаза

Режа:

1. Ген муҳандислиги ферментлари
2. ДНК полимеразалар
3. Рестриктазалар

Ген муҳандислиги ферментлари. Ген муҳандислиги ферментлари ДНК молекулалари билан турли хил муолажаларни ўтказишга ёрдам бериб, уларни тегишли жойидан қирқиш, турли хил бўлақларини улаш, табиатда мавжуд бўлмаган янги хилдаги кетма-кетликларни синтез қилишда

қўлланилади. Қуйида ген муҳандислигида фойдаланиладиган асосий ферментларни кўриб чиқамиз.

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

Махсус термостабил ДНК полимеразалар Tth ва Taq - полимеразалар иссиқ гейзерларда яшовчи бактериялардан ажратиб олинган бўлиб, полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули ёрдамида ДНКнинг исталган бўлаги устида кўплаб ишлар - амплификацияни амалга ошириш имконини берди. ПЗР усули асосида Taq - полимераза ётади, у ген муҳандислиги-нинг эски усуллари нафақат соддалаштириш, балки, алоҳида генларни ва яхлит геномни ҳам молекуляр нишонлашни амалга оширишга шароит яратди.

Баъзи вируслардан РНК га боғлиқ ДНК полимераза, яъни тескари транскриптаза ёки *ревертаза* деб номланувчи махсус ДНК полимераза ажратиб олинган. Ревертазалар ДНК нинг комплементар занжирини матрица РНК сида ҳам синтезлай олади. Ревертазалар ёрдамида қДНК-мРНК нинг ДНК нусхаларини олиш мумкин. қДНК генларининг тузилишини ўрганиш бу генларнинг геномдаги тўлиқ нусхаларини аниқлаш имконини беради.

ДНК лигаза қўшни нуклеотидлар орасидаги фосфодиэфир боғларини тиклаш сўқали ДНК бўлақларини боғлаш кўби битта асосий вазифани бажаради. Бу жараён лигирлаш деб аталади. Ген муҳандислигида кўпинча лигирлаш учун Т4 фагининг ДНК-лигазасидан фойдаланилади. Т4 лигаза ёрдамида ДНК нинг ҳар қандай бўлаги “ёпишқок учли” ёки “тўмтоқ учли” қисмлари бириктирилади. Бу энг кўп қўлланиладиган ферментлардан биридир.

Нуклеазалар-нуклеин кислотлар молекулалари гидролизи реакцияларини катализловчи ферментларнинг йирик гуруҳи. ДНК ёки РНК молекулалари нуклеазалар таъсирида бўлақларга ёки алоҳида нуклеотидларга парчаланиб кетади. Нуклеазаларнинг хужайрадаги дастлабки вазифаси – ҳаётий жараённинг айна вақти учун кераксиз бўлган молекулалари (масалан, мРНК ни трансляциядан сўнг) деградациясини ва нуклеин кислотларни бегона молекулалардан ҳимоя қилиш (бактерия фаг билан зарарланганда фаг ДНК сини бактерия нуклеазалари томонидан парчалаб юборилиши) дан иборат.

Нуклеазаларни уларнинг таъсирига кўра, гуруҳларга ажратиш мумкин. Нуклеазалар нафақат ДНК молекулалари (ДНКазалар) ёки РНК

(РНКазалар)молекулаларига, ёки ДНК ва РНК га бир вақтнинг ўзида (олтин ранг ловия нуклеазаси) бир хилда таъсир этиши мумкин. Нуклеазалар бир занжирли (S1 нуклеазаси) ёки қўш занжирли (экзонуклеаза III) ДНК молекулалари, ёки гибрид ДНК-РНК молекуласи (рибонуклеаза H) га таъсир этиши мумкин.

Бундан ташқари нуклеазаларни икки типга: экзонуклеазалар ва эндонуклеазаларга бўлиш мумкин. Экзонуклеазалар, одатда, молекулаларни 5' ёки 3' эркин учларидан бошлаб гидролизласа, эндонуклеазалар ДНК молекуласи бўлаги ёки халқасимон ДНК молекуласининг ички кетма-кетликларидан бошлаб парчалайди.

Рестриктазалар. Ген муҳандислигида фойдалилиги нуктаи назаридан махсус эндонуклеазалар алоҳида гуруҳни ташкил этади.

Генлар устида бевосита муолажалар ўтказиш усулларининг такомиллаштирилиши рестрикция эндонуклеазалар (рестриктазалар)нинг очилиши билан боғлиқдир. 1953 йилда *Escherichia coli* нинг алоҳида штамм ДНК си бошқа штамм хужайраси (масалан, B штамм ДНКси C штамм хужайраси) га киритилганда, одатда, генетик фаоллик кўрсата олмайди. Чунки у махсус ферментлар-рестриктазалар билан тезда бўлакларга бўлиб юборилади. Ҳозирги вақтда турли хил микроорганизмлардан мингдан ортиқ ҳар хил рестриктазалар ажратиб олинган. Ген муҳандислигида 200дан ортиқ тури кенг қўлланилмоқда.

Рестриктазалар эндонуклеазаларнинг ДНКни муайян махсус кетма-кетликлари *рестрикция сайтлари* (нукталари)ни ҳосил қилиб гидролиз қиладиган гуруҳи ҳисобланади. Ҳар бир рестриктаза ўзининг рестрикция сайтини танийди ва ДНКни рестрикция сайти изчилликлари ичидан ёки унинг атрофидан бошлаб қирқади (3-жадвал). Шундай қилиб, муайян бир рестриктаза таъсирида битта ва айнан ўша ДНК кетма-кетлиги ҳар доим ҳам бир хилдаги бўлаклар йиғиндисини ҳосил қилади. Рестриктазаларни номлашда фермент ажратиб олинган бактерия турининг латинча номини бош ҳарфлари ва қўшимча белгиларидан фойдаланилади. Чунки бир турдаги бактериялардан бир неча хил рестриктазалар ажратиб олинган бўлиши мумкин. *Escherichia coli*-EcoR I, EcoR V, *Haemophilus influenzae* -Hinf I, *Treptomyces albus* - Sal I, *Thermus aquaticus* - Taq I.

Рестриктазалар нуклеотид кетма-кетликларини қирқишига кўра, бир неча га бўлинади. I-типдаги рестриктазалар рестрикция сайтларини танийди, ин таниб олган сайтдан ихтиёрий масофада (бир неча ўндан то бир неча минг нуклеотид жуфтларга қадар) қирқади. Бундай рестриктазаларни ген муҳандислиги муаммоларини ҳал этишда кўллаб бўлмайди. III-типдаги рестриктазалар ҳам I-типдаги рестриктазаларга ўхшайди, улар ДНКни таниб олинган сайтдан 20-35 н.ж. масофада гидролиз қилади, шунинг учун ҳам амалий мақсадларда кам фойдаланилади.

Рекомбинант молекулалар олиш учун асосан II-типдаги рестриктазалар қўлланилади. Бундай рестриктазаларнинг асосий тавсифи шундаки, уларнинг таниш сайти ва қирқиш жойи бир-бирига мос келади.

Баъзи рестриктазалар ва улар таниб кесадиган изчилликлар

Микроорганизм	Қисқа номи	Изчиллик 5'→3' 3'→5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	Bam HI	G [↓] GATCC CCT [↓] AG [↑] G
<i>Brevibacterium albidum</i>	Bal I	TGGCCA ACC [↑] GGT [↓]
<i>Escherichia coli RY13</i>	Eco RI	G [↓] ATTC CTTAA [↑] G
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae II	PuGCGC [↓] Pu Pu [↑] CGCGPu
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	GG [↓] CC CC [↑] GG
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Hha I	GCG [↓] C C [↑] GCG
<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	Hind II	GTPu [↓] PuAC CAPu [↑] PyTG
<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	Hind III	A [↓] AGC TT TTCGA [↑] A
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	CTT [↓] AAC CAA [↑] TTG
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa II	C [↓] CGG GGC [↑] C
<i>Providencia stuarti 164</i>	Pst I	CTGCA [↓] G G [↑] ACG TC
<i>Streptomyces albus G</i>	Sal I	G [↓] TCG AC CAGCTG
<i>Xanthomonas arzyae</i>	Xor II	CGATC [↓] G G [↑] CTAGC

II-типтаги рестриктазалар муайян нуклеотид кетма-кетликларни ДНК дан таниб олади ва уни рестрикция сайти изчиллиги ичидан: бошлаб гидролизлайди. II-типтаги рестриктазаларнинг рестрикция сайтлари 180° айланишдаги симметрик кетма-кетликлар - палиндромлардан иборат.

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5' EcoR I рестриктазаси рестрикция сайти.

5' TAGA 3'

3' ATCT 5' Taq I рестриктазаси рестрикция сайти

II-типтаги рестриктазалар рестрикция сайтлари ўлчами ва олинадиган ДНК бўлаклари узунлигига кўра, бир неча синфга бўлинади:

1) майда бўлакка бўлувчилар – рестрикция сайтлари тўртта нуклеотид жуфтликлардан иборат;

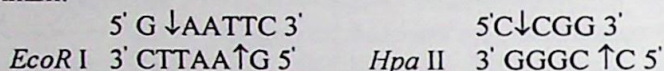
2) ўрта бўлакка бўлувчилар – 6-8 н.ж. рестрикция сайтлари;

3) йирик бўлакка бўлувчилар - 10-14 н.ж. рестрикция сайтлари

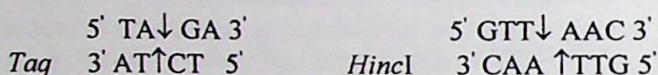
II-типтаги рестриктазаларни ДНК кетма-кетликларини бўлакларга бўлишига қараб икки гуруҳга киритиш мумкин, чунки улар. Бири танилган

кетма-кетликнинг симметрия ўқи бўйлаб, бошқаси эса силжиб, «погонлар» ҳосил қилади. Биринчи ҳолатда «тўмтоқ» учлар ҳосил бўлса, иккинчисиди «ёпишқоқ» учлар ҳосил бўлади; яъни бўлақлар ўз учларида бир занжирли ўзаро комплементар қисмларга эга бўлади.

Рестриктазалар билан қирқилган «ёпишқоқ» учли бўлақларнинг ҳосил бўлиши:



Рестриктазалар билан қирқилганда «тўмтоқ» учли бўлақларнинг ҳосил бўлиши:



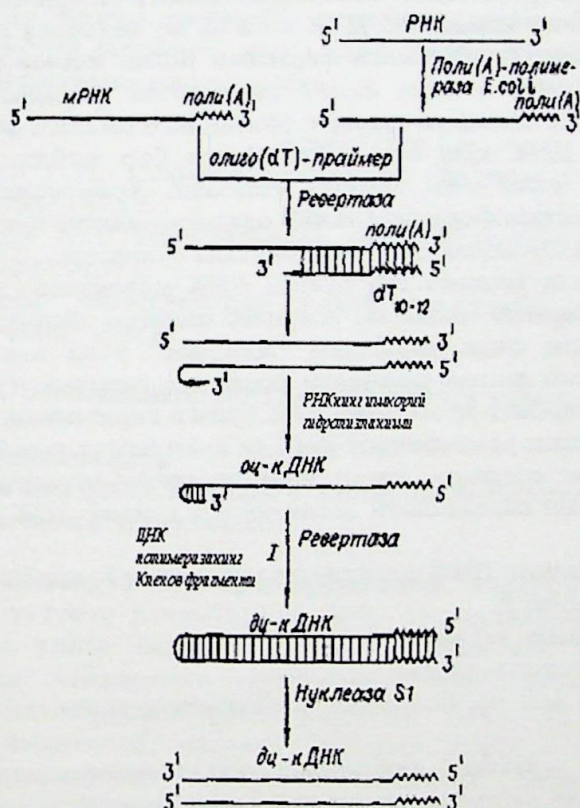
Бир хил «ёпишқоқ» учларга эга ДНК бўлақлари бир-бири билан ДНК лигазалар ёрдамида бириктирилиши мумкин, бунда рестрикция нукталари қайта тикланади. «Тўмтоқ учли» бўлақлар қандай рестриктаза билан ҳосил бўлган бўлишига қарамасдан бир-бири билан бирика олади. «Ёпишқоқ учли» бўлақлар рекомбинант ДНКлар яратишда жуда қулайдир, чунки ДНК лигаза бўлақларини ҳеч қандай истисносиз бир-бирига бирикишини таъминлайди.

Рестриктазаларнинг фермент фаоллиги фаоллик бириклариди ўлчанади. Бу оптимал шароитда λ фаг ДНК сини 1мкг миқдорини 1 соат ичида тўлиқ гидролизланиши учун сарф бўладиган фермент миқдорига тенгдир. Рестрикциянинг оптимал шароити ҳар бир рестриктаза учун алоҳида бўлиб, у рН, ион кучи, тегишли ионлар мавжуд бўлиши, реакцияни амалга ошириш ҳароратига боғлиқ бўлади. Рестриктазалар ген муҳандислигида қўлланиладиган асосий ферментлар ҳисобланади.

Қайтар транскриптаза м-РНКни ДНКнинг комплементар занжирига транскрипциялаш учун ишлатилади. Геноми бир занжирли РНК молекулаларидан иборат бўлган ретровируслар ўрганилганда ретровирус ички хужайравий ривожланиши жараёнида хужайра хўжайин хромосомасига 2 занжирли ДНК кўринишида ўз геномининг интеграция босқичини босиб ўтиши аниқланган. 1964 йили Темин РНК-матрицада комплементар ДНКни синтезловчи фермент борлигини аниқлаган. Ушбу РНКга боғлиқ ДНК-полимераза қайтар транскриптаза ёки ревертаза деб номланган.

Қайтар транскриптаза реакциясини РНК фаолликка эга бўлган кучли ингибиторлардан фойдаланган ҳолда махсус шароитларда олиб борилади. Бунда РНК молекулаларининг тўлиқ ҳажмли ДНК-нусхалари олинади. Праймер сифатида поли (А)-тутувчи мРНК нинг қайтар транскрипциясида олиго (dT), 3'-поли (А) учига эга бўлмаган РНК молекулалари учун эса кимёвий синтезланган олигонуклеотидлар ишлатилади. мРНКда ДНКнинг комплементар занжири синтезлангандан ва РНК бузилгандан кейин ДНКнинг 2 занжири синтезланади.

Матрица сифатида қДНКнинг биринчи занжири бўлиши мумкин. Бу реакция ревертаза сингари *E.coli* нинг ДНК-полимеразаси ёрдамида катализланиши мумкин. Синтез тугагандан сўнг қДНКнинг 1- ва 2-занжирлари шпилька тугуни билан ковалент боғланган ҳолда қолади. Бу тугун эндонуклеаза S1 билан парчаланadi. Хосил бўлган икки занжирли ДНКни клонланаётган векторларга киритиш, ДНКнинг гибрид молекулалари таркибида қўпайтириш ва кейинги тадқиқотларда ишлатиш мумкин.



РНК молекуласининг икки занжирли ДНК- нусхасини синтезлаш схемаси

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 6. Нуклеин кислоталар билан ишлаш усуллари. Рекомбинант ДНК конструкциясини яратиш

Режа:

1. Нуклеин кислоталар билан ишлаш усуллари
2. Рекомбинант ДНК олишнинг усуллари

Нуклеин кислоталар билан ишлаш усуллари. Сунъий шароитда рекомбинант ДНК олиш ва генларни клонлаш илк бор 1972 йилда АҚШ олимлари *Бойер* ва *Коэн* томонидан амалга оширилган. Бу олимлар *E.coli* бактериясининг хромосома ДНК сига ва шу бактерия плазмидасига алоҳида идишларда *EcoRI* рестриктаза ферменти билан ишлов берганлар. Плазида таркибида фақат 1 дон *EcoRI* рестриктаза ферменти таниб кесадиган махсус нуклеотидлар изчиллиги бўлганлиги сабабли фермент плазмиданинг халқасимон ДНК кўш занжирини фақат бир жойдан кесиб, плазмидани «ёпишқоқ» учли очик ҳолатга ўтказди. Хромосома ДНК молекуласида *EcoRI* рестриктаза ферменти таний оладиган махсус нуклеотидлар изчиллиги қандай бўлса, бу молекула шунча бўлакка бўлинади.

Турли хил ўлчамга эга бўлган ДНК молекуласи электрофорез услуби ёрдамида ажратиб олинади. Ажратиб олинган «ёпишқоқ» учли хромосома ДНК си бўлаги очик ҳолатдаги «ёпишқоқ» учли плазида ДНК си билан аралаштирилиб лигаза ферменти ёрдамида тикилади (уланади). Натижада плазида таркибига хромосома ДНК бўлаги киритилади.

Шу боисдан рекомбинант ДНК га қуйидагича тариф бериш мумкин: ҳар қандай тирик организм ирсий молекуласининг исталган бўлагини вектор молекулаларига бирикишдан ҳосил бўлган сунъий ДНК - рекомбинант ДНК дейилади.

Рекомбинант ДНК олишнинг усуллари. Рекомбинант ДНК олишнинг учта усули мавжуд:

- коннектор усули;
- рестриктаза-лигаза;
- линкер молекулаларидан фойдаланиш усули.

Коннектор усулида - рекомбинацияда иштирок этувчи ДНК бўлагининг 3' учига дезоксинуклеотидил-трансфераза ферменти ёрдамида маълум узунликдаги олиго (dA) - сегменти уланади. Иккинчи учига эса олиго (dT) - сегменти уланади. Бу ДНК бўлаклари аралаштирилганда dA ва dT сегментларнинг водород боғлари асосида комплементар бирикиши туфайли халқасимон ДНК структураси ҳосил бўлади. Ҳосил бўлган ДНК даги бир занжирли бўш жойлар ДНК-полимераза I ферменти ёрдамида тўлдирилади.

Рестриктаза-лигаза усули - энг содда ва осон рекомбинант ДНК олиш усули ҳисобланади. Бу усулда ДНК молекуласи ва вектор плазида «ёпишқоқ» учлар ҳосил қилувчи рестриктаза билан қирқилади ва аралаштирилган ҳолда маълум шароитда реассоциация қилинади. Комплементарлик хусусиятига кўра ДНК молекулалари ўзаро водород

боғлари ёрдамида бирикиб халқасимон структура ҳосил қилади ва ДНК занжирининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади.

Линкер молекулаларидан фойдаланиш усулида - ДНК молекуласига ва вектор плазмидига Т4 фаг ДНК-лигаза ферменти ёрдамида махсус нуклеотид кетма-кетлигига эга бўлган линкер молекула уланади. Олинган икки турдаги ДНК молекуласи рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилиб, аралаштирилган ҳолда реассоциация қилинади. ДНК ва вектор плазмиди молекулаларининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Шу йўсинда рекомбинант ДНК молекуласи ҳосил бўлади.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 7. Векторларнинг турлари, уларга қўйиладиган талаблар Режа:

1. Вектор молекулалар
2. Бактерия плазмидаларидан клонлашда фойдаланиш
3. Фаглар асосидаги векторлар

Вектор молекулалар. Трансформация. Таркибида қўшимча ирсий ахборотлар тутувчи рекомбинант ДНК молекулаларини хужайраларга киритиш ва унинг барқарорлигини сақлаш ген муҳандислигининг асосий калит операцияси ҳисобланади. Буни амалга ошириш учун вектор молекулалардан фойдаланилади. Агар, ДНК шундайлигича хужайрага киритилса, масалан бактерия хужайраларида ферментлар уларни нуклеотидларга парчалаб ташлайди. Баъзи ҳолларда ДНК хужайрага кириб ўрнашиши мумкин, лекин хужайранинг бўлиниш жараёнида у наслдан-наслга берилмай йўқолиб кетади. Рекомбинант ДНК хужайранинг генетик аппаратининг ташкил қилувчи қисмига айланиши учун, у геномга бирикиши (хромосомага интеграция) ва шунинг ҳисобига репликацияланиши ёки автоном репликацияланиш хусусиятига эга бўлиши керак.

Бегона ДНКнинг репликацияси, экспрессияси ва трансформацияси (бошқа организмга кўчишини)ни таъминловчи ДНК молекуласи *вектор* деб аталади. Вектор хужайрага қўшимча ирсий ахборот киритилишини амалга оширади. Вектор сифатида плазмидалар, бактериофаглар, мобил элементлар ва ҳайвонларнинг вирусларидан фойдаланиш мумкин.

Ҳозирги вақтда жуда кўп векторлар яратилган бўлиб, уларни бир нечта типга бўлиш мумкин:

1. Клонлаш учун векторлар. Бундай векторларга бириктирилган ДНК фрагментларни репликациялаш орқали сони (амплификацияси)ни кўпайтириш учун фойдаланилади. Бундай мақсадлар учун бактерия плазмидлари ва фаглар қўлланилади. Геномнинг катта ўлчамдаги фрагментларини клонлаш учун эса бактерия ва ачитки хромосомалари асосида яратилган (ВАС ва YAC) сунъий векторларидан фойдаланилади.

2. Экспрессион векторлар. Улардан генларнинг муайян кетма-кетлигини аниклаш ва уларнинг оксил маҳсулотларини аниқсаноқ прокарот организмлар учун таҳлил қилиш, муайян оксилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Кўп сонли экспрессион тизимлар мавжуд. Шунингдек сут эмизувчилар, ўсимликлар ва ачиткилар хужайраларида генлар экспрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган. Эукарот организмлар учун яратилган экспрессион векторлар полиаденилланиш сайти ва мазкур организмда ишлаш қобилятига эга промотордан иборат экспрессион кассетага эга бўлади.

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

Вектор молекулаларнинг таркибида маркер ген бўлиши, бу ген хужайрада вектор иштирок этаётгани ҳақида маълум қилувчи фенотип бериши яъни вектор селектив ирсий белгига эга бўлиши керак. Кўпинча селектив белги сифатида табиатда кенг тарқалган антибиотикка чидамлилиқ генидан фойдаланилади. Бу генларнинг оксил маҳсулотиферментлар антибиотикларни модификациялайди ва уларнинг таъсирини инактивациялайди (кучсизлантиради). Масалан, *prtlI* гени канамицин антибиотигини инактивацияловчи неомицинфосфотрансфераза генини кодирлайди. Бактерия хужайраси *prtlI* гени иштирокида канамицинга нисбатан чидамлилиқ ҳосил қилади ва шу антибиотик иштирок этуви озика муҳитларида ўсиб, клон ва хужайралар колонияси ҳосил қилади. Одатда таркибида *prtlI* гени бўлмаган хужайралар бундай озика муҳитларда ўса олмайди ва нобуд бўлади. Демак, вектор конструкция таркибида *prtlI* генини тутиши вектор иштирок этаётган хужайраларни аниклаш ва уларни танлаб олиш имконини беради.

Escherichia coli хужайраларига вектор конструкциялар трансформацияси Таркибида бегона ДНК фрагментлари тутувчи вектор конструкциялар *E.coli*нинг махсус штаммлари хужайраларига

трансформация қилиш учун фойдаланилади. Вектор плазмидаларнинг бактерияларга трансформацияси хужайраларнинг ДНК молекулаларини қабул қилиш қобилятига асосланган (компетентлигига). *E.coli* хужайраларига трансформациялаш асосан кальций шоки ёки электропорация усулларида бирини қўллаш орқали амалга оширилади. Иккала ҳолатда ҳам бактерия мембранасининг ДНК молекулалари учун ўтказувчанлиги ошади.

Вектор молекуласи учун қуйидаги асосий талаблар қўйилади:

1) вектор бегона ДНК фрагментларини ўзига бириктириши учун бир нечта рестриктазалар учун ягона рестрикция сайтлари тутиши зарур.

2) вектор репликация бошланиш нуктаси изчиллигини тутиши ҳисобига муайян хужайраларда репликацияланиши шарт.

3) вектор маркер ген изчиллигини тутиши зарур. Бу генлар вектор конструкцияни тутувчи хужайралар селекциясини енгиллаштиради.

Бактерия плазмидаларидан клонлашда фойдаланиш. Бактерия хужайрасида хромосома ДНКсидан ташқари, кўп нусхада халқасимон ДНК молекулалари ҳам мавжуд. (1-25 м.н.ж.). Бундай халқасимон молекулалар *плазмидалар* деб аталади. Баъзи плазмидалар таркибида антибиотикга чидамлилиқ генларини тутати. Хужайрада плазмидаларнинг кўп нусхада ҳосил бўлиши натижасида антибиотикларни биокимёвий нейтралловчи ферментларнинг синтези ошади ва хужайранинг антибиотикка чидамлилиги ортади.

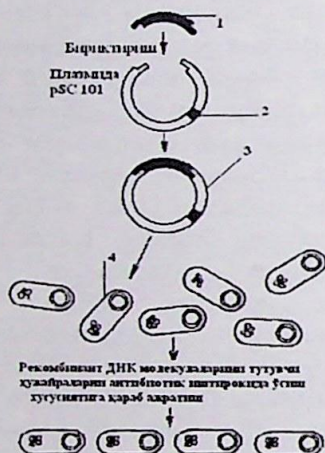
Юқорида баён этилганидек, кальций ионлари иштирокида таркибида плазмидаси йўқ бактериялар томонидан плазмидалар осон ютилади. Бактериялар хужайрасида фақат бир типдаги плазмидалар иштирок этиши мумкин.

Хужайрадаги плазмидалар нусхасининг сони ўзгариб туради. Бу хужайранинг ва плазмидаларнинг ирсий хусусиятларига боғлиқ. Баъзи турдаги плазмидалар хужайрадаги сони 10-200 нусха бўлгунига қадар кўпайишни давом эттиради. Бошқа турлари эса бактерия хромосомасининг кўпайиш тезлигида репликацияланади. Бундай типдаги плазмидалар хужайрада бир дона ёки бир нечта бўлиши мумкин. Клонлаш учун фақат биринчи типдаги плазмидалар асосидаги векторлардан фойдаланиш мақсадга мувофиқдир.

Плазмидалардан вектор сифатида биринчи марта 1973 йилда П.Берг лабораториясида фойдаланилган. Тажрибалар унча катта бўлмаган (~9 м.н.ж.), тетрациклинга чидамлилиқ генни тутувчи *E.coli* плазмидаси рSC 101 да олиб борилган. Плазида таркибида фақат бир дона *EcoRI* рестриктаза ферменти таниб кесадиган сайт (махсус нуклеотидлар изчиллиги) бўлганлиги сабабли, фермент плазмиданинг халқасимон қўш занжирини фақат бир жойидан кесиб «ёпишкок» учли очик халқа ҳолатига ўтказди. Плазида рSC 101нинг ДНКси ичак таёқчаси учун бегона ДНКнинг *EcoRI*-фрагментлари билан аралаштирилади. ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида бегона ДНК фрагментлари ва рSC 101

плазмида ягона рекомбинант молекулага бирлаштирилади. Сўнгра бу рекомбинант плазмидани *E.coli*нинг компетент хужайраларига қўшилганда у бактерия хужайрасига киради. Рекомбинант плазмидани тутувчи хужайралар тетрациклинли селектив муҳитда ажратилади. (4-расм).

Бу тарихий тажриба ген муҳандислиги ишларини бошланишига асос бўлди. Про- ва эукариот хужайраларига турли ДНК фрагментларни киритиш ва янги хусусиятли хужайралар олиш бўйича тажрибалар ўтказиш имконияти туғилди.



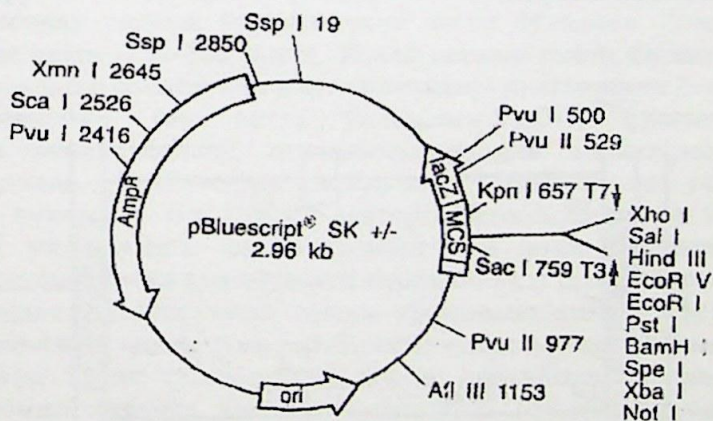
4-расм. ДНК фрагментларини плазмидалар ёрдамида клонлаш бўйича тажриба схемаси.

1-бириктирилаётган гетерологик ДНК; 2-антибиотикка чидамлик бўйича маркер; 3-ДНКнинг рекомбинант молекуласи; 4-рекомбинант ДНКни бактерия хужайрасига киритиш.

Ҳозирги вақтда табиий векторлар асосида фойдаланиш қулай бўлган вектор конструкциялари яратилган. Улардан pUC типи векторлари ва уларнинг ҳосилалари (pBluescript, pGEM) кенг тарқалган бўлиб, улардан клонлаш учун ҳам, шунингдек экспрессиялаш учун ҳам фойдаланиш мумкин. Унча катта бўлмаган pUC векторлари (~2,7 м.н.ж.) таркибида репликация бошланиш нуқтаси изчиллигини (ori-сайт) тутиб, бу уларга бактерия хужайрасида мустақил репликацияланиш имконини беради. pUC векторида клонлашни осонлаштириш учун кўп фойдаланиладиган рестриктазалар учун такорланмас рестрикция сайтларини акс эттирувчи сунъий синтезланган полилинкер изчиллиги мавжуд. (5-расм).

Полилинкер вектордаги бегона ген иштирокининг қулай маркери ҳисобланган lac Z генига ўрнатилган. lac Z гени X-gal субстратни парчалаш хусусиятига эга (β -галактозидаза ҳосилалари) β -галактозидаза

генини кодирлайди. Бунда бактерия хужайралари ранги ок рангдан мовий ранггача ўзгаради. Полилинкернинг унча катта бўлмаган изчиллиги (100-20 м.н.ж.) β -галактозидаза оксили синтезига таъсир этмайди. Бегона ДНК фрагментини клонлаш учун *lac Z* гени экспрессиясини барбод қилувчи pUC-вектори полилинкерига бириктирилади. ДНК уланган вектор тутувчи хужайралар X-gal субстратни парчалайди ва бундай бактерия хужайралари бошқа ген уланмаган бўш плазмида вектори тутувчи мовий ранг хужайралардан фаркли ок рангда қолади. pUC векторлар ва уларнинг ҳосилаларининг ок-мовий ранг селекцияси клонлаш жараёнини анча осонлаштиради, чунки вектор плазмидага бегона генларни улаш жуда кам ҳолларда муваффақиятли чиқади. Аксарият ҳолларда 10-30та лигирланган молекулалардан фақат биттаси рекомбинант бўлади, яъни ўзининг таркибида бегона фрагмент тутади ва фақат мовий ранг селекцияси ёрдамидагина рекомбинант ДНК тутувчи бактерия клонларини аниклаш мумкин.

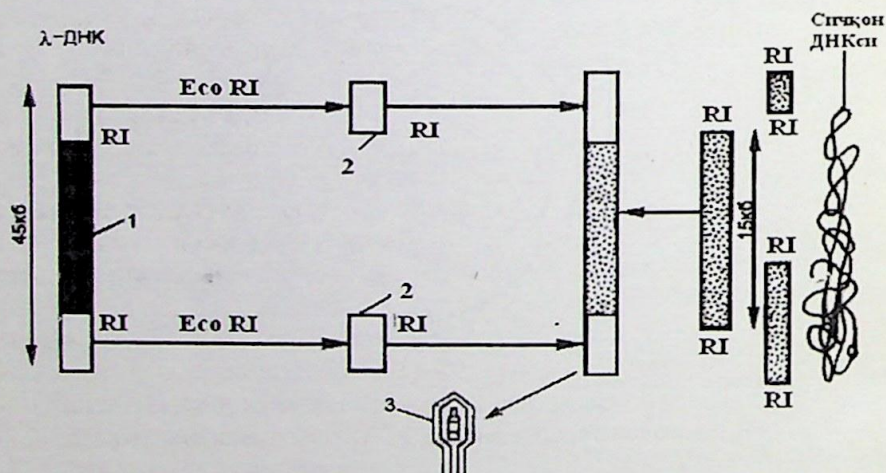


5-расм. Клонлаш учун pBluescript SK вектори
(MCS –полилинкер изчиллиги; Amp^R-ампицилинга чидамлилики гени
(селектив маркер)

pUC векторлар таркибида клонланган генларнинг транскрипциясини таъминловчи регулятор изчилликдан иборат махсус экспрессион кассеталар тутади.

Фаглар асосидаги векторлар. Космидлар. Вас- ва Yac- векторлар. Бактерия плазмидалари асосидаги векторлар клонлаш учун кенг қўлланилади, лекин уларнинг битта муҳим камчилиги бор, бу сигимининг кичиклигидир. Бундай векторларда ўртача 7-8 м.ж.н. узунликдаги фрагментларни клонлаш мумкин, эукариот генлари изчиллиги эса (~10-25 м.ж.н.) узунроқ бўлади. Бундан ташқари

генларнинг кодирловчи қисми атрофида жойлашган регулятор изчилликларни ўрганиш учун геномни кенгрок клонлаш зарур. Бундай катта фрагментларни клонлаш учун эса плазмида векторлари тўғри келмайди. Чунки катта ўлчамдаги хромосома ДНКси (~9 м.н.ж.дан ортиқ) уланган плазмидалар барқарор бўлмайди ва репликация жараёнида аста секин ўлчами камайиб боради. λ бактериофаги асосида таркибига 22 м.ж.н. узунликдаги бегона ДНК фрагментларини тутувчи вектор конструкция яратилган. λ бактериофаг асосида клонлаш учун бундай векторларни яратишда фаг ДНК молекуласининг марказий қисми фагнинг *E.coli* да кўпайиши учун зарур эмаслиги эътиборга олинган ҳолда рестриктазалар ёрдамида фаг геномидан кесиб олинганда репликация учун зарур бўлган фагнинг ўнг ва чап елкаси ўзгармасдан қолиши керак. Фаг елкалари бошқа фрагментлардан алоҳида ажратилиб, клонлаш учун вектор сифатида қўлланилади. Кесилган фаг ДНКси ўрнига ўлчами 9-21 м.ж.н. бўлган бегона ДНК уланади. Бактерияларда фақат фагнинг иккала елкаси ва бегона ДНК тутувчи фаглар кўпаяди (6-расм). Бунда олинган фаг рекомбинант ДНКси 30 м.ж.н. дан кам бўлмаслиги керак.



6-расм. Бактериофаг λ асосидаги векторда ДНКни клонлаш.

1- Фагнинг репликацияси учун зарур бўлмаган ДНК фрагменти; 2-фагнинг бактерия хужайраларида репликацияланиши ва фагнинг кейинги тахланиши учун жавобгар генларни тутувчи ДНК фрагментлари; 3-бегона ДНК фрагментларини тутувчи бактериофаг.

Янада узунроқ генларни ёки ёнма-ён генлар гуруҳини ажратиш ва ўрганиш учун катта ўлчамдаги (~30-45 м.н.ж.) ДНК фрагментларини клонлаш зарур. Бундай фрагментларни клонлаш учун катта сизимга эга

махсус вектор конструкциялар яратилган бўлиб, улар *космидлар* деб аталади. Космидлар дурагай молекулалар бўлиб, фаг геномининг махсус *cos*-участкасини тутати, шунинг ҳисобига улар λ фагининг бош қисмига жойлаша олади. Уларнинг плазмидалар каби репликацияланиши учун имкони яратади. Космидларнинг ўлчами фаг векторлариникига нисбатан кичкина, ҳаммаси бўлиб 5 м.ж.н., космидларга 30-45 м.ж.н. узунликдаги генларни улаш мумкин. Бундай рекомбинант ДНК тутувчи фагнинг бошчалари фаглар каби кўпая олмайди. Улар билан *E.coli* хужайралари трансформацияланади. Эукариот ДНКсини тутувчи *cos*-сайт ўрнатилган дурагай молекула *E.coli* да плазмидалар сингари кўпаяди ва ҳар бир фаг заррачалари индивидуал бактериал трансформант колониясини ҳосил қилади.

100 м.ж.н. дан ортиқ узунликдаги ДНК фрагментларини клонлаш махсус яратилган ВАС ва YAC векторларида амалга оширилади. *ВАС-векторлар* бактериянинг F-плазмидаси асосида олинган бўлиб, бу плазмидаларнинг бактерия хужайраларидаги репликацияси ва нусхасининг кўпайишига жавобгар генларни ва клонлашни осонлаштирувчи қатор қўшимча нуклеотид кетма-келикларни тутати. ВАС –векторлар сиғими ўзининг унча катта бўлмаган ўлчамида (~7 м.ж.н) жуда катта -100-300 м.ж.н. Унинг сиғими геном библиотекасини яратишда клонлар сонини кўп марта камайтириш имконини беради.

YAC-векторлар ҳам катта ўлчамдаги ДНК фрагментларини клонлашда фойдаланилади, ачитқининг сунъий минихромосомасини намоён қилади. YAC-вектор центромер, теломер ва репликация бошланиш нуктасига эга. Бундай векторга бегона ДНКнинг 100 м.ж.н. дан ортиқ узунликдаги фрагментларни ҳам улаш мумкин. Бундай минихромосома ачитқи хужайрасига киритилганда репликацияланади ва митоз бўлинишда ўзини бошқа ачитқи хромосомалари каби тутати.

Геном библиотекаси (генлар банки) - мазкур организмнинг ДНК изчилликлари тўлиқ тўпламининг вектор таркибида клонланишидир. Бутун геномни алоҳида қисмларга ажратиш (фрагментациялаш) ген муҳандислиги ишларини енгиллаштиради, алоҳида изчилликларни, турли геномларнинг муайян қисмларини қиёсий таҳлил қилиш ва асосийси индивидуал генларни ажратиш ҳамда улар билан ишлаш имконини беради.

Геном ДНКси фрагментлари юкори молекуляр хромосома ДНКсини рестриктазалар ёрдамида гидролизлаш йўли билан олинади. ДНК гидролизи учун рестриктазалар шундай танланиши керакки, олинган фрагментлар бир-бирини ёпиши ва уларнинг узунлиги вектор ўлчамига мос келиши лозим. Олинган фрагментлар фаг елкалари билан лигирланади ва фаг заррачаларининг олдиндан тайёрланган тайёр бошчаларига жойлаштирилади. Генлар банки шундай усулда олинади. Генлар банки фаг банки кўринишида 70 °C ҳароратда хлороформ остида сақланади. Шундай усулда генлар банкини ўн йиллаб сақлаш мумкин.

Олинган геном клонларини кўпайтириш, шунингдек керакли клонни кидириб топиш ишларини амалга ошириш учун фаг библиотекаси билан бактерия хужайралари зарарланади ва зарарланган хужайралар Петри ликобчасидаги агарли муҳитга экилади. Сут эмизувчилар хужайрасининг тўлиқ гаплоид тўплами $3 \cdot 10^9$ жуфт асос тутати. 15 минг жуфт нуклеотид сизимдаги векторда библиотека 1 млн. атрофида фаг заррачалари тутати. Миллионлаб фаг бляшкаларини текшириш, бутун геномдан зарур ген иштирокини аниқлаш имконини беради. Айнан шундай тарзда кидирилаётган ген изчиллигини тутувчи фаг заррачаларини аниқлаш, фақат шу изчиллик ДНКсини кўпайтириш ва кейинги изланишларни амалга ошириш мумкин.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 8. Мева-сабзавот экинларини ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ўсимликларнинг сифат кўрсаткичларини яхшилаш ва ҳосилдорлигини ошириш

Режа:

1. Ўсимликларни сифат кўрсаткичини яхшилаш вазифалари.
2. Ўсимликлар фотосинтез фаоллигини ошириш

Ўсимликларни сифат кўрсаткичини яхшилаш вазифалари.
Ўсимликларни сифат кўрсаткичини яхшилаш вазифаларидан асосийси-ўсимликларда синтезланадиган, уларнинг озиқавийлиги ва техник қийматни белгилайдиган маҳсулотлар, яъни, оксиллар, ёғлар, полисахаридлар ва бошқа моддаларнинг сифатини яхшилашга қаратилгандир.

Бошқали ўсимликларда эндоспермнинг захира оксиллари алоҳида ўрин тутати. Захира оксиллар, асосан структураси, нуклеотид таркиби билан бирига ўхшаш, мультигенлар оиласига бириктирилган бир неча генлар томонидан кодирланади. Одатда, бу генларнинг экспрессияси қатъий тўқима спецификлигига эга ва уруғ ривожланишининг маълум бир босқичида амалга ошади. Кўпинча ўсимликларнинг захира оксиллари таркиби инсон ва ҳайвонлар озиқаси учун мувозанатланмаган аминокислоталар таркибига эга бўлади. Чунки, дуккакларнинг захира оксиги – легуминлар метионин аминокислотаси, бошқалилар оксиги – проламинлар – лизин, триптофан ва треонин аминокислоталарининг миқдори камлиги билан характерланади. Бу аминокислоталарнинг танқислиги уруғнинг озиқавий қийматни пасайтиради.

Оксилларнинг аминокислоталар таркибини анъанавий усуллар билан яхшилаш анча мураккабдир, чунки кишлок ҳўжалиги учун зарур

хусусиятларни белгиловчи генлар кўпинча зарарли хусусиятларни чакирувчи генлар билан бириккан ҳолда ирсийланади. Ўсимликлар селекциясида маккажўхори ва арпа дони таркибида лизин микдори анча юкори бўлган опак-2, хайпроли типдаги мутантларининг қўлланилиши, дон сифатини яхши натижа бермади, чунки мутант формаларда лизин микдорининг ошиши асосий заҳира оксиллар зеин ва гордеинлар синтезини ўғирлайди, натижада, ўсимликларнинг ҳосилдорлиги пасайиб кетади.

Шунинг учун ген-муҳандислик усуллари қўлланилиши геномига фақат фойдали генлар киритилган янги навларни яратишда муҳим аҳамият касб этади. Масалан, проламин генларига кўшимча лизин кодонларининг киритилиши лизинга бой оксилларнинг синтез бўлишига ва оксилнинг озиклик қийматнинг ошишига олиб келади.

Ўсимликлар сифатини ген-муҳандислик технологиялари ёрдамида яхшилаш ва улардан сифатли маҳсулотлар олиш бир неча босқичларни ўз ичига олади:

- 1) заҳира оксиллар генларини клонлаш;
- 2) оксилларнинг тўқимага ҳослиги ва вақтинча экспрессияси механизмини ўрганиш ва бундай махсус экспрессияни бошқарувчи ва белгиловчи ДНК изчиллигини аниклаш;
- 3) аминокислоталар таркибини яхшилаш мақсадида заҳира оксиллар генлари нуклеотид кетма-кетлигини мақсадли ўзгартириш;
- 4) ўзгартирилган ген тутувчи векторлар яратиш;
- 5) такомиллашган генларни ўсимликларга киритиш;
- 6) генлар экспрессиясини ва маҳсулот сифатини синондан ўтказиш;

Геннинг нуклеотид кетма-кетлиги унинг оксил синтези бошқарувида иштирок этувчи элементларини аниқ ўрганишни ўз ичига олувчи тайёргарлик босқичисиз амалга ошмайди.

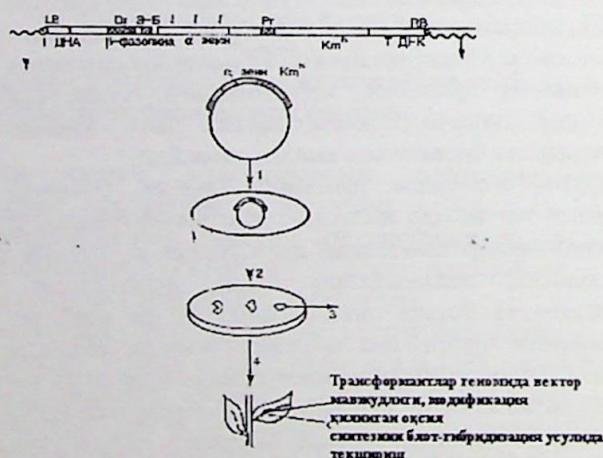
Дунё олимлари томонидан донли, бошоқли ва бошқа бир катор ўсимликлар заҳира оксилларининг ўнлаб генлари ўрганилган. Ҳозирги кунда тадқиқотчилар томонидан арпа гордеини, буғдой α ва β - глиадинлари ва глютенини, маккажўхори зеини, дуккакдилар легуминлари, картошка пататини ва бошқа оксилларнинг 10 га яқин генлари клонланган. Баъзи генларнинг нуклеотид кетма-кетликлари аниқланган. Заҳира оксилларни ажратишнинг умумий режаси қуйидагиларни ўз ичига олади: 1) мос м РНК ни олиш ва қисман тозалаш; 2) комплементар кДНК синтезлаш ва клонлаш; 3) генлар банкидан заҳира оксиллар генини нуклеотид кетма-кетлигини ажратиш.

Заҳира оксиллар синтези аниқ бошқарувга эга: генлар фақат битта тўқимада (фақат бошоқдилар проламини доннинг эндоспермида) ва уруғ ривожланишининг қисқа даврида экспрессияланади. Заҳира оксиллар генларини ўрганиш, улар тузилишининг умумийлигини ва ўз ўрнида уларнинг бир хил функцияларни бажаришини кўрсатади.

Кўпчилик заҳира оксиллар генларида интронлар бўлмайди. Бундан ташқари, уларда транскрипция бошланиш нуктасидан 300 н.ж. оралигида эндосперм-бокс деб номланган 25 нуклеотид жуфтликдан иборат махсус

кетма-кетлик асосида жойлашган. Эндосперм-бокс функциясини аниклаш, айнан мазкур 25-нуклеотид жуфтлик-нинг мавжуд бўлиши дон эндосперми а захира оксиллари генларининг тўқимага ҳос экспрессиясини амалга ошириш боғлиқ бўлишини кўрсатади. Шунингдек, олдида эндосперм-бокс изчиллиги жойлашган ҳар бир геннинг махсулоти, фақат донда ёки уруғда синтезланади ва уни такомиллашган проламин оксиллар генлари кетма-кетлигини тутувчи вектор таркибига киритишдан мақсад уларнинг дон ёки уруғ таркибида сақланиб қолишини таъминлашдан иборат.

Аминокислоталар таркиби яхшиланган оксилли трансген ўсимликлар олишнинг кейинги босқичини такомиллаштирилган α -зеини мисолида кўриш мумкин. Маккажўхорининг α -зеин оксили лизиннинг миқдори камлиги билан характерланади. Бу эса оксилнинг озиклик қийматни пасайтиради. α -зеин гени кетма-кетлигига йўналтирилган – олигонуклеотид мутагенези усули орқали лизиннинг қўшимча кодонлари киритилади. Олинган α -зеиннинг модификация қилинган гени лизин тутувчи оксил экспрессиясини амалга оширади. Бундай тадқиқот биринчи марта α -зеин кетма-кетлигига янги кодонлар киритилиши бўйича амалга оширилган (7 – расм). Ҳозирда бундай янги триплетларни киритилиб, оксилларнинг аминокислоталар таркибини ўзгартириш (яхшилаш) одатий ҳол бўлиб қолмоқда.



7 - расм. Лизинли кодонлар билан бойитилган α -зеини гени кўчириб ўтказилган трансген тамаки ўсимлигини олиш схемаси.

1-агробактериялар трансформацияси; 2-ўсимлик хужайралари трансформацияси; 3- канамицин антибиотиги қўшилган озиқа муҳитида танлаш; 4-регенерация

Такомиллаштирилган α -зеин гени трансформация учун қўлланиладиган торнинг Т-ДНК қисмига клонланган. Шунингдек, вектор конструкция кибида эндосперм-бокс ҳам бўлиб, у α -зеиннинг уруғда тўқимага ҳос прессиясини юзага келтиради. Ўтказилган тадқиқотларда

такомиллаштирилган α -зеини гени билан трансформацияланиб, лизин билан бойитилган маккажўхори ўсимликлари олинган. Модификация қилинган оксил трансген маккажўхори ўсимлиги уруғларида фаол синтезланади. Натижада донининг сифати яхшиланган маккажўхори тизимларини олишга муваффақ бўлинди. Кейинчалик бу трансген тизимлар анъанавий селекция усуллари ёрдамида янги нав ва дургайлар олишда қўлланилиши мумкин.

Трансген буғдой ўсимликлари ҳам шу каби усуллар ёрдамида олинган. Ўсимлик геномига глютенин оксили юқори молекуляр суббирлигининг нуклеотид изчиллиги ўзгартирилиб модификация қилинган гени киритилганда, модификацияланган оксиллар синтезини фаоллаштиради ва тегишли захира оксиллар таркиби ва даражасига таъсир этиб, бу буғдойнинг дон сифатини яхшилашга олиб келади.

Оксиллар таркибини яхшилашнинг яна бир усули бу бир паллали ва икки паллалиларнинг захира оксиллари генлари изчиллиги асосида химер генларни конструкциялашдир. Бунда дастлабки материал сифатида арпа гордеини В1 ва дуккакдилар легумини В4 генларидан фойдаланилди. Бундай химер генга эга конструкция (қурилма) билан тамаки ўсимлиги трансформация қилиниб, трансген ўсимликлар тизими олинган.

Шундай қилиб, ген муҳандислиги усуллари ёрдамида донли экинларнинг эндосперм оксиллари таркибини ўзгартиришни амалга ошириш мумкин экан.

Шунингдек захира оксиллари ўзгартирилган ўсимликларни олиш билан бирга трансген ўсимликлардан “озикабон” вакциналар ишлаб чиқарувчилар сифатида ҳам фойдаланиш мумкин. Масалан А-С иммуноглобулини, энтеротоксин, вабонинг В-токсини, В-гепатитнинг юза оксили антигенини синтезловчи тамаки, картошка ўсимликлари олинган. Трансген ўсимликлардан олинган оксиллар, хайвон хужайраларидан олинган оксиллар каби антигенлик ва физиологик хусусиятларга эга бўлади. Ҳозирги вақтда трансген ўсимликлар ёрдамида одамда учрайдиган В гепатитига қарши вакциналаш (эмлаш) синондан ўтказилмоқда. Бундан келиб чиқиб, трансген ўсимликлардан фойдаланиб, келажакда арзон ва биологик фаол вакциналар олиш мумкин, деган хулосага келиш мумкин.

Захира оксиллари модификацияланган дуккакли-дон экинларининг трансген шакллари яратиш билан бирга бир қатор мойли экинлар, биринчи навбатда рапснинг мой кислоталари таркибини яхшилаш борасида ҳам илмий-тадқиқот ишлари олиб борилмоқда. Рапс уруғлари таркибида мой миқдорини юқори бўлиши билан характерланади, аммо унинг таркибидаги специфик узун занжирли эрук кислотаси ва шунингдек, глюкозинолатнинг миқдори кўплиги рапс мойининг таъм хусусияти ва озиклиги салбий таъсир этади. Ген муҳандислиги ёрдамида ва селекциялаш усуллари орқали рапснинг мой кислоталари молекуласи узунлигини назорат қилиб, эрук кислотаси улушини камайтирувчи ва рапс мойининг сифатини яхшиловчи ген киритилган навлари яратилган. Шу каби тўйинмаган боғларнинг миқдори юқори бўлган модификацияланган мой кислоталар олиш бўйича ишлар олиб борилмоқда, бу янги, қимматли мой кислоталар кислоталар синтезловчи ўсимликлар олиш имконини беради. Бундан ташқари, ўсимликлар таркибида

мой кислоталар таркибининг ўзгариши, уларнинг бир қатор ҳашаротларга, паст ҳарорат таъсирига чидамлилигини ошириши аниқлашган.

2001 йилда мой кислоталари таркиби модификацияланган соя, рапс, маккажўхорининг трансген ўсимликлари навлари дала синовларидан ўтказилди.

Ўсимликлар фотосинтез фаоллигини ошириш. Селекциянинг истикболли йўналишларидан бири - бу янги навларнинг ҳосилдорлигини оширишдир. Қуйидаги йўналишларда фотосинтез фаоллигини ошириш ва алоҳида моддалар синтезини кўтаришда ген муҳандислиги ишлари жадал олиб борилмоқда.

Фотосинтетик фаолликни оширишда ўсимликлар фотосинтезининг C_3 генига C_4 генини киритиш йўналиши бўйича изланиш амалга оширилмоқда. Маккажўхори фотосинтез тизими мезофилл барглари хужайрасида атмосфера CO_2 фиксациясида иштирок этувчи фосфоенолпируваткарбоксилазанинг C_4 гени клонланди ва агробактерия трансформацияси тизими (PEPS) орқали шоли ўсимлигининг C_3 генига ўтказилди. Олинган трансген ўсимликларнинг таҳлили шуни кўрсатдики, шоли хужайрасида ферментлар фаоллиги маккажўхориникига нисбатан 2-3 барабар юқори бўлиши, фотосинтез фаоллигини тезлаштириб, ҳосилдорликни оширишга олиб келган.

Фотосинтез жараёнида иштирок этувчи генларни клонлаш ва улардан фойдаланишидан ташқари, хужайрада хлоропласт миқдорини назорат қилувчи генлар ҳам ажратиб олинган. Бундай генлардан фойдаланиш фотосинтез даражасини ўзгартиришга олиб келади. Бошқача ёндошиш орқали эса ҳар бир хлоропластдаги хлорофилларнинг миқдорини оширишга эришилган. Яна *a/b* хлорофилларни специфик тарзда бириктирувчи модификацияланган оксиллар олинган. Трансген ўсимликларда бу оксиллар экспрессиясининг амалга оширилиши биомасса миқдорини сезиларли даражада кўпайтишига олиб келади.

Олиб борилаётган ишларнинг бошқа йўналиши трансген ўсимликларда метаболизмнинг ўзгартириш билан боғлиқдир. Маккажўхори углерод метаболизи регуляциясидаги асосий ферменти сахарозофосфатсинтетаза (SPS-ген) генини бошқа ўсимликлар геномига киритилганда, ўсимликларнинг углерод алмашинуви таъсир этади ва ҳосилдорлигини оширади. Ҳозирги вақтда помидор, картошка, рапс, ғўзанинг шундай трансген навлари олинган.

1999–2000 йилларда трансген ўсимликлардан фойдаланиш рухсат этилган АҚШ, Канада ва яна бир қанча шу каби мамлакатларда ҳосилдорликни оширувчи ва ҳосил бўлган маҳсулотнинг сифатини яхшиловчи турли хил генлар трансформация қилинган маккажўхорининг еттита, буғдойнинг битта трансген навлари дала синовларидан ўтказилиб, кишлоқ хўжалиги ишлаб чиқаришда фойдаланилмоқда.

Ўсимликлар ҳосилдорлиги ва сифатини оширувчи генларни трансформация қилиш билан бирга 1998-2001 йилларда тижоратбоп трансген гулларнинг дастлабки тўртта нави олинган бўлиб, уларга АСС-синтетаза

гени киритилиши натижасида гуллаш жараёни тезлаштирилган чиннигул нави ва антоциан биосинтези ўзгартирилган генли учта (иккита чиннигул ва битта хризантема) гуллари гулкўрғонидаги тожибарглариининг ноанъанавий рангларини олишга муваффақ бўлишган.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 9. Гербицидларга чидамли трансген мева сабзавот экинлари олиш

Режа:

1. Гербицидларга чидамли ўсимликлар олишнинг йўналишлари

Гербицидларга чидамли ўсимликлар олишнинг йўналишлари. симликлар биотехнологиясининг асосий йўналишларидан бири гербицидлар таъсирига чидамли маданий ўсимликлар олишдир. Гербицидлар кенг таъсир спектрига эга бўлиб, бегона ўтларни йўқотади, шу билан биргаликда экинларга ҳам салбий таъсир кўрсатади.

Гербицидларга чидамли ўсимликлар олиш икки йўналишда олиб борилади: биринчидан, гербицидларга чидамли ўсимлик шакллариининг тўғридан-тўғри селекцияси (асосан, гербицидга чидамли ўсимликларни ёввойи турлари билан чапиштириш оркали), иккинчидан, экспрессияси гербицидга бардошлиликка олиб келувчи генларини кўчириб ўтказиш йўли билан трансген ўсимликлар олиш. Гербицидларга чидамли трансген ўсимликлар олишда гербицидларга чидамлиликини юзага келтиришнинг молекуляр механизмлари, шунингдек бу хусусиятни белгиловчи бактерия ва ўсимлик генларини ажратиш олиш тўғрисидаги маълумотлар назарий асос бўлиб хизмат қилади.

Гербицидларнинг таъсири ўсимлик хужайралари метаболизмини тўхтатиб қўйиш оркали намоён бўлади: биокимёвий жараёнларнинг ингибирланиши (тўхтатилиши) энг аввало, фотосинтезнинг (атразин, симазин, диурон) ва аминокислоталар (глифосат, сульфонилмочевина, биалофос) синтезининг ингибирланишида ўз ифодасини топади. Гербицидга чидамлилики унинг фермент-нишон билан ўхшашлиги ёки гербицид молекуласини бевосита ингибирланиши натижасида келиб чиқади.

Хужайралар селекцияси усули оркали петуньянинг мутант тизимлари яратилган, улар глифосат гербицидига 20 карра чидамлироқдир. Шунингдек, беданинг 600 мкМ L фосфинотрицин гербициди иштирокида ўсишга мослашган хужайра суспензияси билан селекция қилиниб, чидамли тизимлари яратилган.

Ген мухандислиги усуллари ёрдамида гербицидлар таъсирига чидамли ўсимликлар яратишда толерантлик (юкори даражада чидамлилик) механизмларини ўрганишга асосланади ва қуйидаги боскичларни ўз ичига олади; ўсимликлар хужайрасида гербицидлар таъсир этадиган нишон аникланади, баъзи гербицидлар таъсирига чидамли, резистентлик генлари манбаи бўлган ўсимликлар, бактериялар танланади, бу генлар идентификация қилиб олиниб, ажратилади, клонланади, трансген конструкциялар яратиш учун уларнинг экспрессияси ўрганилади.

Атразин гербицидининг таъсири *pbcA* гени томонидан кодирланадиган хлоропласт мембранаси оксиди (Q_h) билан бирикишига асосланади. *pbcA* гени баъзи бегона ўтлар геномидан ажратилган. Аникланишича, гербицидга чидамлилик *pbcA* генида нуктали мутация юзага келиши билан боғлиқ бўлиб, бу оксид таркибидаги серин аминокислота қолдигини глицин билан алмашилишига олиб келади. Бундай алмашилиш Q_h оксидида гербицидни фермент – нишон билан боғланишининг кескин камайишига олиб келади. Натижада гербицидга чидамлилик пайдо бўлади. Ўсимликлар трансформацияси учун мутант *pbcA* гени вектор конструкцияга киритилиши натижасида атразинга чидамли трансген ўсимликлар олинган.

Айнан шу нарса, яъни, *E.coli*нинг *aroA* гени кодирлайдиган EPSP – синтетаза оксидида аланиннинг аргининга алмашилиши туфайли глифосат гербициди таъсирига чидамлилик белгисини юзага келтириши аникланган. Бу эса мутант *aroA* гени билан тамаки, помидор, қанд лавлаги, картошка ўсимликлари хужайраларига трансформация қилиш ва гербицидга чидамли трансген ўсимликлар олиш учун фойдаланилган.

Ўсимлик геномига бактериянинг *bar* генини киритилганда BASTA гербицидига чидамлилик келиб чиқади ва бу ген кодирлайдиган – фосфинотрицинацетилтрансфераза оксиди гербициднинг фаол компоненти фосфинотрицинни ацетиллаши ва натижада унинг инактивациясини юзага келтириши аникланган. Шу тарзда шоли (1995), маккажўхори (1995), буғдой (1994) ва бошқа ўсимликларнинг трансген навлари олинган. Сўнгги вақтларда *bar*- гени ген мухандислик векторларида селектив маркер сифатида қўлланилмоқда.

Шоли геномига *B. subtilis* бактериясидан ажратилган протопорфириногенсинтетаза (Protox) ферментини кодирловчи ген киритилганида у трансген ўсимликнинг дифенилэфир катори гербицидларига чидамлилигини оширган. Бунда антигербицид таъсири механизми кўрсатилган: Protox оксиди экспрессиясининг ошиши гербицид таъсирини нейтраллайди, бу эса унда гербицидга чидамлиликни ортишига сабаб бўлади. Киритилган ген нусхалари сони ва бардошлилик даражаси ўртасида ўзаро тўғридан-тўғри боғлиқлик борлиги ҳам аникланган.

Ҳозирги вақтда Шимолий Америка ва Европада гербицидларга чидамли, маккажўхори, ғўза, шоли, соя, буғдой, картошка ва помидор, зигир каби қишлоқ хўжалиги учун асосий бўлган экинларнинг 20 га яқин трансген навларидан фойдаланишга рухсат этилган. Қулупнай, қанд лавлаги ва баъзи улли экинларнинг трансген навлари дала синовларидан ўтказилмоқда. Дунё

бўйича гербицидларга бардошли трансген ўсимликларнинг нав ва дурагайлари 34 млн. гектар ерга экилади. Бу умумий экинлар экиладиган майдонларнинг 80 %и ни ташкил этади.

Умуман олганда, трансген ўсимликларни олиш биотехнологиянинг жадал ривожланаётган йўналишларидан биридир. Генетик модификацияланган ўсимликлардан фойдаланиш рухсат этилган мамлакатларда 2001 йилнинг феврал ойига келиб, 18 хилдаги экинларнинг 78 та трансген навлари дала синовларидан ўтказилди ва агротижорат мақсадларида фойдаланишга рухсат этилди.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 10. Фитопатогенларга чидамли трансген ўсимликлар яратиш усуллари

Режа:

1. Ген муҳандислигида касалга чидамли ўсимликлар яратишнинг усуллари

Ген муҳандислигида касалга чидамли ўсимликлар яратишнинг усуллари. Фитопатоген таъсирларга қарши ўсимликларда бир канча химоя реакциялари механизмлари кучга киради. Бунда ўсимликнинг фаол жавоб реакцияси икки асосий йўналишда бориши мумкин: биринчидан инфекцияга жавобан патогенларнинг ҳаёт фаолиятини чекловчи, улар учун захарли бўлган бирикмаларнинг синтези бошланади ва натижада уларнинг ҳалок бўлишига олиб келади. Иккинчидан, химоя жавоби сифатида структуравий тўсиклар яратилиб, бу тўсиклар ўсимликларнинг зарарланиши, патогенларнинг тарқалишини олдини олади. Бу эса хужайра деворларининг лигнификацияланиши ёки гидроксипролинга бой гликопротеидлар ва бошқа бирикмалар ҳисобига мустаҳкамланиши орқали амалга ошади, улар экстенсинлар деб аталиб, тўкималарни фитопатогенлар томонидан шикастлашидан химоя қилади.

Вирус, бактерия, замбуруғли инфекцияларга жавобан специфик PR (pathogen related proteins), шунингдек улар орасида ҳар томонлама мукамал ўрганилган хитиназа ва β 1,3 глюконаза оксиллари индуцирланади.

Бу ферментлар замбуруғ ва баъзи бактерияларнинг ўсишини тўхтатади, уларнинг хужайра деворини қисман гидролизлайди.

Хитиназа ва глюконаза оксилларининг фунгицидларга таъсири, ҳамда ушбу оксилларнинг алоҳида генлар томонидан кодирланишига оид маълумотлар кўплаб тажрибаларда аниқланган. Шунинг учун хитиназа ва глюконаза генлари фитопатогенларга чидамли трансген ўсимликлар олиш

бўйича ген мухандислиги тадқиқотларида фойдаланилмоқда. Ҳозирги кунда кўпчилик ўсимликларнинг хитиназа гени тутувчи трансген ўсимликлари - тамаки, ғўза, маккажўхори, помидор, картошка, беда, шоли, турнепс, рапс ва бошқа ўсимликларнинг CaMV 35S промотори назоратида хитиназа генини экспрессияловчи трансген навлари олинган. Бу ўсимликларда замбуруғли инфекцияларга чидамлиликини нафақат лаборатория шароитида, балки дала шароитида ҳам кузатилган. Бундан ташқари, хитиназанинг глюконаза билан биргаликдаги таъсири самарадорлиги юқори бўлади, шунинг учун иккала гени тутувчи трансген ўсимликлар жуда катта агрономик аҳамиятга эгадир. Ҳозирги вақтда тамаки, рапс, помидор, картошканинг *Rhizoctonia* га, тамакининг *Cercospora nicotianae*га юқори даражада чидамли трансген ўсимликлари олинган.

Фунгицид таъсирга эга бўлган бошқа гуруҳ бирикмалари-гуруҳига паст молекуляр (40-50 к Да) оксиллардан иборат ўсимликларнинг цистеин оксиллари, галактуроноза ингибиторлари, ўсимлик дефенезлари, MF – оксил гуруҳлари. Бу оксилларнинг барчаси одатда ўсимликларнинг турли хил замбуруғли ва бактерия инфекцияларига чидамлилигини специфик бўлмаган ҳолатда оширади.

Мазкур оксилни экспрессияловчи трансген ўсимликлар замбуруғли инфекцияларга қандай даражада чидамли бўлса, вирусли инфекцияларга нисбатан ҳам худди шундай хусусиятга эга бўлади.

Вирус – ўсимлик муносабати жараёнини ўрганиш мобайнида жуда кўп усуллар қўлланилган. Фақатгина бир канча усуллари биргаликда қўллаш орқалигина вирусли инфекцияларга чидамли ўсимликлар олишга эришилган. Сўнгги йилларда бу йўналишда сезиларли силжиш пайдо бўлди, бу геномнинг тузилишини ва ташкилланишини, вирус генларининг функцияланишининг тўлиқ ўрганиш билан боғлиқдир. Ҳозирги вақтда ген мухандислиги технологияси асосида вирусли инфекцияларга чидамли трансген ўсимликлар олишнинг турли усуллари мавжуд, бу эса вирус қобиғи юза оксили гени билан трансформация қилинган трансген ўсимликлар олиш имконини беради, натижада инфекция ўтишининг камайишига ва вирус кўпайишини тўхтатишига олиб келади. Мазкур усул билан тамаки ва картошка ўсимликларига тамаки мозаика вируси оксил қобиғи генини трансформация қилиш, трансген ўсимликларда турғун антивируслик хусусияти пайдо бўлишига олиб келган.

Ҳозирги вақтда тамакининг нафақат ТМВ (тамаки мозаика вируси)га, балки ковок мозаика вирусига ҳам чидамли тизимлари ҳам олинган. Шунингдек, картошка ва маккажўхорининг барглариининг буралиши вирусларига, арпанинг паканалик вирусига чидамли навлари ҳам олинган. Ковокнинг учала вирусга ҳам чидамли нави олинган ва экилмоқда.

Патогенларга чидамли ўсимликлар олишнинг яна бир усули - замбуруғ ва микробларга қарши таъсирга эга бўлган фитоалексинлар биосинтези (йўли) ферментларини кодирловчи генларининг ўсимлик хужайраларига трансформациясидир. Бу генларни картошка ва помидор ўсимликларига

киритилганда, фитифтороз ва фузариозга, тамакида эса кулранг чириш касалликларига қарши чидамлилики сезиларли даражада ортиган.

Ҳозирги кунда картошканинг Y вируси (PVY)га ва барг буралиши (PLRV)га вирусларига чидамли 4 та тижоратбоп трансген навлари, қовоқнинг учта вирусга ҳам бир вақтнинг ўзида чидамли нави, папаянинг айланасимон вируси (PVY) га чидамли навлари яратилган.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 11. Стресс таъсирларга бардошли трансген мева-сабзавот экинлари олиш

Режа:

1. Мева-сабзавот экинларининг стресс омилларига чидамлилигини ошириш усуллари

Мева-сабзавот экинларининг стресс омилларига чидамлилигини ошириш усуллари. Атроф-муҳитнинг қурғоқчилик, ортиқча намлик, юқори ёки паст ҳарорат каби таъсирлари, тупроқ шўрланиши, кислоталилик даражасининг ошиши сингарилар кишлоқ хўжалик маҳсулотларининг маълум қисмининг нобуд бўлишига сабаб бўлади. Шунинг учун стресс таъсирларга бардошли ўсимликлар навларидан фойдаланиш катта иқтисодий самарадорликка эга бўлиб ҳисобланади.

Ўсимликларнинг кўпгина стресс ҳолатларга қўниқиш реакцияси – бир қанча генларнинг биргаликдаги ўзаро мослашувчан (синхрон) таъсирига боғлиқдир. Шу боисдан ген муҳандислиги изланишлари учун стресс омиллар томонидан кўзғаладиган биокимёвий жараёнлардан фойдаланиш мақсадга мувофиқдир. Маълумки, узок вақт сувли стресс таъсирига учраган ўсимликларда бир қатор содда органик молекуляр бирикмалар-пролин, глицинбетаин ва бошқа моддалар тўпланиб, улар осморегулятор ҳамда осмопротекторлар ҳисобланади.

Ўсимликлар ва бактерияларнинг стресс таъсирларга жавоби ўхшашлиги аниқланган: иккала ҳолатда ҳам хужайрада осмопротектор молекулалари синтез бўлиб, унинг таъсир механизми цитоплазма ва атроф-муҳит ўртасида осмотик тенгликни юзага келтириш, бундан ташқари, стресс таъсирлар шароитида оксилларни қисман мўтадиллаштиришдан иборатдир. Осмопротектор молекулалари синтезининг биокимёвий йўли ўхшашлиги стрессларга бардошли, трансген ўсимликлар олишда бактерия генларидан фойдаланиш имконини беради.

E. coli геномидан стрессга жавоб реакцияси сифатида юзага чиқадиган пролин биосинтези йўли бўлиб, уларнинг ферментларини кодирловчи, иккита *proBosm* ва *proA* генлари ажратилган. Бу бактерия генларининг экспрессияси ўсимликлар геномида пролин синтезини оширишга олиб келган. Олинган трансген тамаки ўсимликларида назорат ўсимликларга нисбатан пролин синтезининг ошганлиги ва тўпланиб борганлиги қайд қилинган. Трансген ниҳолларнинг илдиз ҳосил қилиш ва 20 г/л (350 мМ) микдордаги тузли муҳитда ҳам ўса олиш хусусияти сақланиб қолган.

Глицинбетаин синтезини катализловчи бетаинальдегиддегидрогеназа (BADH) гени ажратиб олинган. Бу генни экспрессияловчи трансген тамаки ўсимликлари тузнинг юқори микдорига чидамлилиқ хусусиятига эга бўлган.

Юқори ҳароратга бардошлилик *fad7* гени билан боғлиқ бўлиб, у оксил мой кислоталари метаболизмига таъсир этади. Шолининг таранген навларида бу геннинг инактивацияси натижасида ўсимлик юқори ҳароратда ўса олиш ва икки соатгача +47°C га қадар чидамлилиқ белгисини намоён қилиши мумкин.

Ҳозирги кунда газон майсаларининг сув танқислиги ва шўрланишга чидамли трансген навлари дала синовларидан ўтказмоқда, уларни кейинчалиқ (характерли бундай белгили ноқулай шароит мавжуд абиотик фонга эга) шахарларда ўстириш кўзда тутилмоқда.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 12. Генетик ахборотни бир томонлама схемасини ифодаловчи ақида

Режа:

1. Генетик ахборот ташилишига масъул молекуляр механизмлар
2. Транскрипция ва трансляция
3. ДНК синтези

Америкалик олимлар Уотсон ва Крик 1953 йилда ўзларининг оламшумул янгиликлари, яъни ДНКнинг иккиламчи структурасини аниқлашлари ва матрица синтезини тушунтириб беришлари билан ген инженерлигини алоҳида фан сифатида ривожланишига асос солдилар.

ДНКнинг қўш спирали репликация давомида ДНК иплари бўйлаб иккига ажралади, махсус фермент-полимерлар она ДНКнинг аниқ нусхасини қўчирадилар. Натижада хужайра бўлиниши олдида 2 та бир хил ДНК молекулалари ҳосил бўлади ва улардан бири хужайра бўлингандан сўнг қиз хужайрага ўтади. Қиз хужайра она хужайра ташиган ахборотни ташийди ва у

бажарган функцияларни бажаради. Шундай қилиб тирик организм хужайраларида ўзига хос реакция – **матрица синтези** рўй беради. Молекулаларнинг бири – матрица, иккинчиси эса шу матрица асосида тузилади. ДНК репликацияси, барча турдаги РНК ва иРНК структурасига мос равишда оксил молекулаларининг тўпланиши, буларнинг барчаси матрица синтезининг вариантлари бўлиб, доимо нуклеин кислоталар иштирокида амалга ошади.

Худди шу механизм билан РНКнинг йиғилиши амалга ошади, фақатгина 2 та спирал эмас, балки битта спиралники. Бу жараён **транскрипция** дейилади. Демак, хужайрадаги ахборот оқимини матрица синтезининг реакциялари амалга оширади, яъни, **ДНК репликацияси** (ирсий ахборотни киз хужайраларга узатиш учун керак), **транскрипция** (хужайра ядросида и-РНКни синтези) ва **трансляция** (рибосомалар ёрдамида и-РНКда оксил занжирларини йиғилиши).

Организмнинг ирсий хусусиятларини ўзгартириш билан трансген ўсимлик ва ҳайвонлар яратиш ва уларни клонлаш имкони туғилган.

Эукариотлар хужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан овальбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информатив РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872 та нуклеотиддан 1158 тасигина оксилнинг 386та аминокислотасини кодлаши, шу билан бирга 5'-учдаги 64 та нуклеотид ва 3'-учдаги 650 та нуклеотид трансляцияланмаслигини аниқланган. и-РНКдан овальбумин генига мос келувчи ДНК нусхасини олиб уни плазмидага жойлаштирганлар ва уни *E.coli* хужайрасида клонлаштирганлар. Франциялик олимлар эса ДНК нусхасини рестриктазалар ёрдамида парчаланмаслигини аниқлаганлар, чунки улар ушбу ферментлар танийдиган 6 та нуклеотидли ДНК кетма-кетлигини ўзида тутмаганлар. 1977 йили франциялик олимлар овальбуминнинг информатив РНКси билан транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фараз қилганлар. Геннинг узлукли тузилиши кейинчалик бошқа генларда ҳам кузатилган.

Кейинчалик Шамбон ва Курильскини кўрсатишларича, овальбумин генининг ДНКси и-РНК билан қисман бирлашади: ДНКнинг 7 та участкаси РНК билан гибридланмайди ва мРНКда учрамайдиган геннинг ушбу участкалари **интронлар** деб аталади. Интронлар овальбуминни кодлайдиган ДНК кетма-кетлигини 8 та фрагмент - **экзонларга** ажратади.

Интронлар геннинг маълум бир қисмида учрайди, ҳажми катта бўлиб 100 дан бир неча минг нуклеотидлар жуфтдан иборатдир. Ўртача ҳисоблаганда интронлар экзонлардан узунроқдир.

Ҳозиргача ўрганилган сут эмизувчилар, қушлар ва амфибияларнинг гени тузилиши яхлит кўринишда эмаслиги аниқланган, яъни улар экзонлар ва интронлардан тузилгандир. Фақатгина гистон ва интерферонларнинг генлари бундан мустаснодир. Яхлит бўлмаган генлар булардан ташқари ҳашоротлар ва ачитқиларда, ҳамда ДНКси мавжуд ва эукариот хужайралар ядросида кўпаядиган вирусларда топилган.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 13. Мева сабзавот экинлари ген мухандислигининг хал қилинмаган муаммолари

Режа:

1. Ген мухандислигида келажакда хал қилинадиган масалалар

Ўсимликлар ген мухандислиги тобора тараккий этиши билан бир қаторда бир қанча муаммолар хал этилмай қолмоқда. Бундай муаммолардан бири - ўсимликлар геномига ўлчамли катта бўлган генларни (10 м.н.ж.дан кўп) ёки бир нечта функционал генларни бир пайтнинг ўзида киритишнинг қийинлиги билан боғлиқдир. Бу трансформация учун қўлланиладиган векторларнинг ҳажми билан боғлиқдир. Сўнгги вақтларда ўсимликлар трансформацияси учун фойдаланиладиган кўпчилик генларнинг, айниқса, эукариот генлари катта ўлчамга эга (5 –15 м.н.ж) билан ажралиб туради. Бундан ташқари вектор конструкциялар ўзининг таркибидан танланган генлардан ташқари селектив генлар ҳам тутиши зарур. Баъзи ҳолатларда ўлчамларини қисқартириш мақсадида геннинг кДНК изчиллигидан фойдаланиш мумкин. Аммо, кДНК – нусхалари *in vivo* даги ўзига хос сплайсинг ёки одатда биринчи интронда специфик регулятор изчилликларининг иштироки сабабли ҳар доим ҳам қўлланермайди. Ўсимликлар трансформациясини чекловчи асосий омиллардан бири - зарур белги бир неча генлар томонидан кодирланади ва бундай хусусиятга эга бўлган трансген ўсимликларни олиш ҳозирча бир оз техник муаммоларга эга.

Бегона генларнинг экспрессияси масаласи алоҳида муаммо бўлиб кўпинча икки – бешта авлоддан сўнг актив транскрипцияланувчи ген экспрессияланишдан тўхтади. Мантиқан бу тушунарли ҳолдир, ўсимлик ҳужайраси ўзининг метаболизми учун бегона бўлган, одатда бактериал келиб чиқишга эга оксилни фаол (масалан, кучли конститутив 35 СаMV промотори туфайли) экспрессиялайди. Кўпинча, трансгеннинг инактивацияланиши регулятор изчилликларнинг метилланиши ёки қайсидир оксилнинг промотори билан ўзаро таъсири натижасида репрессияланиши туфайли юзага келади. Бундай инактивация қилинган трансгенни фаоллаштиришнинг иложи йўқ. Вақт ўтиши билан трансгеннинг бундай “индамаслиги”нинг ўтиб кетишини тахмин қилиш қийин, чунки бу бир қанча омиллар, жумладан, оксилнинг изчиллиги ва ўсимлик геномига бирикадиган аниқ жойи билан боғлиқ. Бу муаммони эҳтимол, бир неча марта трансформациялаш йўли билан ўсимлик геномида турли хил интеграция

жойларига эга бир хил вектор конструкциялари тутувчи турли тизимлар олиш билан ҳал этиш мумкин.

Трансгенез бўйича олиб борилаётган ишларнинг секин ривожланишидаги асосий сабаб самарали генларни ажратиш, идентификация қилиш, генлар банкини яратиш бўйича олиб борилаётган изланишлар ривожланиш даражасининг пастлиги ва ген муҳандислиги илмий базасининг чекланганлиги билан боғлиқ бўлиб қолмоқда.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мавзу – 14. Гидролитик ферментлар ва фермент ингибиторларини синтез учун жавобгар генларни киритиш орқали трансген ўсимликлар олиш **Режа:**

1. Ўсимлик хужайраларига генларни киритиш
2. Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси

Ўсимлик хужайраларига генларни киритиш. Ўсимлик хужайраларига генлар турли усул билан киритилади:

Икки паллали ўсимликлар учун табиий вектор, яъни агробактериялар плазмидаси мавжуддир. Бир паллали ўсимликлар учун ҳам ушбу усулдан фойдаланилади, лекин бу усул озрок қийинчиликлар туғдиради.

Агробактерияларга нисбатан чилчамли бўлган ўсимликларда эса генлар бевосита физик йўл билан киритилади. Булар: микрозаррачалар билан «хужум» қилиш ёки балластик метод; электропорация, полиэтиленгликол билан ишлов бериш; ДНКни липосома таркибида ўтказиш ва бошқалар.

Энг қулай метод микрозаррачалар билан «хужум» қилиш методи ҳисобланади. Юқори тезликда заррачалар ядрога бевосита кириб, трансформация самарадорлигини оширади. Шу усул билан ДНКга эга бўлган хужайранинг бошқа органеллалари – хлоропластлар ва митохондрияларни ҳам трансформациялаш мумкин.

Охириги вақтларда комбинацияланган трансформация методи – агролистик методи ҳам яратилиб, амалда қўлланилмоқда. Бунда бегона ДНК тўқимага бирор-бир физик йўл, масалан баллистик йўл билан киритилади. Киритилаётган ДНК да Т-ДНК вектор ва маркер гени, ҳамда вирулентликнинг агробактериал гени бўлиши керак. Ўсимлик хужайрасида вирулентлик генини вақтинчалик экспрессияси оксиллар синтезига олиб келади. Бу оксиллар плазмидадан Т-ДНКни тўғри кесиб, уни агробактериал трансформациядаги сингари хужайин геномига жойлаштиради. Сўнг *in vitro*

да таркибида хужайраларнинг кўпайиши учун зарур бўлган фитогормонли озуқа, мухитига экилади. Озуқа мухитиде одатда трансген ўсимликлар чидамликка эришиши учун селектив маркер бўлиши керак.

Регенерация кўпроқ каллус боскичидан сўнг рўй беради. Сўнгра мухит тўғри танлай олинса органогенез бошланади. Униб чиккан куртаклар илдиз бериши учун бошқа мухитга ўтказилади.

Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси. Олимлар ўсимлик хужайрасига бегона генларни киритиш бўйича олиб борган тадқиқотларида янги ҳодисаларга гувоҳ бўлганлар. Аниқланишича, бир тажрибанинг ўзида бир хил ДНК конструкцияси билан трансформацияланган трансген клонлар киритилаётган ген экспрессияси бўйича фаркланар экан. Экспрессия даражаси кўпгина омилларга боғлиқ бўлиб, у айниқса киритилаётган геннинг ядро хроматинини қайси қисмига тушишига боғлиқ экан. Бундан ташқари, ядро геномига ДНК конструкцияланганда бир канча ўзгаришларга учрайди (дупликация, инверсия ва б.) ва бу экспрессиянинг пасайишига олиб келади. Яна аниқланишича, қўлланилаётган трансформация процедуралари хўжайин геноми учун ҳам бефарқ эмасдир.

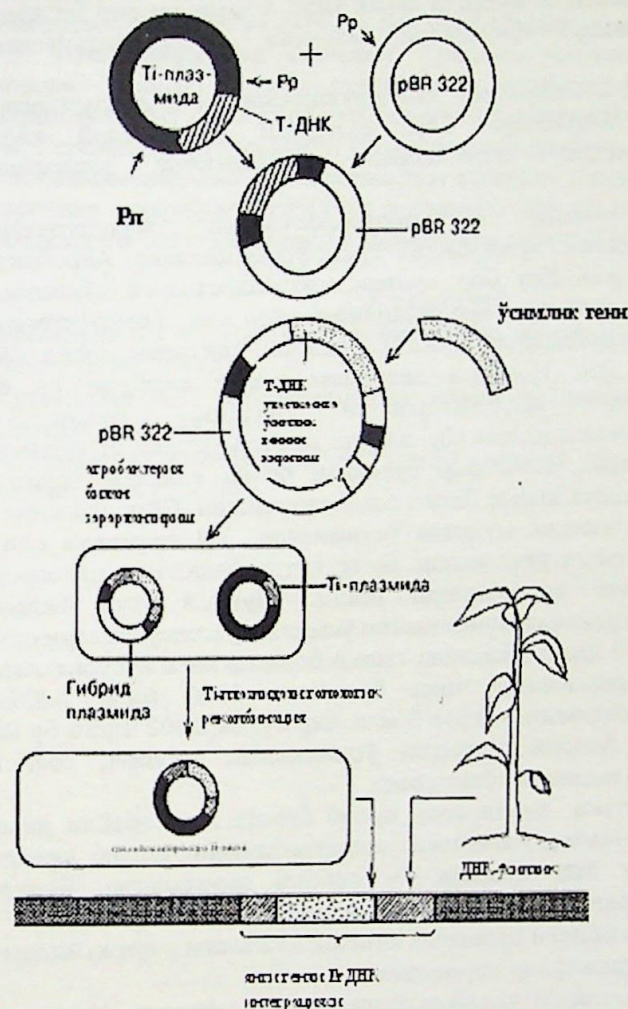
Биринчидан, трансгенни жойлашиши қайсидир хўжайин генини бирламчи структурасини бузиши билан биргаликда уни инактивациялайди.

Иккинчидан, ўсимлик геномига генлар агробактериал ёки физик ўтказилганда турли кўринишдаги қайта тузилишлар, хатто хромосома фрагментларининг транслокациясигача кузатилади. Буларнинг барчаси ўсимлик геномини нормал фаолият кўрсатишини ўзгартиради.

Ўсимликка керакли генни тутувчи *Ti*-плазмида кетма-кетлигини киритишнинг 2 хил методи яратилган:

1-метод – «оралик векторлар» методи (коинтегратив векторлар) – pBR 322 ичак таёқчасидан фойдаланишга асосланган (8-расм).

Ti-плазмидадан Т-ДНК рестриктаза¹лар ёрдамида кесилади ва *E. coli* да клонлаш учун pBR 322 плазмидасига жойлаштирилади. Т-ДНК плазмидали бактериялар кўпайтирилади ва плазмида ажратиб олинади. Сўнгра клонланган Т-ДНКга рестриктаза ёрдамида керакли ген жойлаштирилади. Ҳосил булган Т-ДНКли рекомбинант молекула яна бир бор катта микдорда кўпайтирилади, яъни ичак таёқчасида клонланади. Шундан кейин конъюгация ёрдамида тўлиқ *Ti*-плазмидани ташувчи агробактерия хужайрасига киритилади. Натив *Ti*-плазмидасининг Т-сегментлари ва оралик векторлар ўртасида гомологик рекомбинация рўй беради. Бунинг натижасида ген жойлаштирилган Т-ДНК нормал ДНК ўрнига натив *Ti*-плазмидага киради. Т-сегментга керакли генлар жойлашган *Ti*-плазмидани ташувчи *A. tumefaciens* хужайралари ҳосил бўлади. Уларнинг навбатдаги кўчирилиши агробактерияларга хос бўлган оддий йўл билан амалга оширилади.



8 -расм. Тi-плазмида асосида коинтегратив векторни яратилиши

Иккинчи метод бинар (қўш) векторлар системасини яратишга асосланган.

Охирги тадқиқотлардан маълум бўлишича, зарарлаш ва трансформация учун яхлит Тi-плазмида керак эмас, балки Т-ДНК нинг чекка участкаси ва Тi -плазмиданинг вирулентликка жавобгар бир участкасининг ўзи етарлидир. Бу иккала участка бир плазмидада бўлиши ҳам шарт эмас. Агар агробактерияда *vir* сегментли Тi-плазмида ва Т-ДНКли бошқа плазмида бўлса, бу бактериялар ўсимлик ҳужайрасини трансформациялаши мумкин. Бундай ҳолда исталган ген жойлаштирилган Т-ДНК ўсимлик геноми билан

интеграцияланади. Бунинг учун бактерия хужайраларида гомологик рекомбинация содир бўлиши керак эмас. Бегона генлар экспрессияси учун T-ДНКнинг махсус промотори, масалан нопалинсинтетаза промотори керакдир.

Ўсимлик хужайрасига конструкцияланган Ti-плазмидани киритишнинг бир нечта методлари бор. Булардан энг оддий табиий усул – конструкцияланган штаммларни ўсимликнинг зарарланган қисмига киритишдир.

Бошқа метод – протопластларни агробактериялар билан кокультивациялаш йўли билан трансформациялаш. Агробактериялар янги ажратиб олинган ёки бир кунлик протопластларга қўшилса, бактериялар бирлашмайди ҳам, трансформацияланмайди ҳам. Трансформациялаш учун 3 кунлик протопластларда хужайра девори қайтадан ҳосил бўлган бўлиши керак. Бу ҳол хужайра деворини ҳосил қилувчи ва бактерияларни бирлаштирувчи ингибиторларни қўшиш билан исботланган. Кокультивациялаш даври (бу даврда протопластлар агробактериялар билан агрегацияланади), яъни бир суткадан ортиқ вақтдан сўнг бирлашмаган бактериялар қайта ювиш билан олиб ташланади. Сўнг ўсимлик хужайралари гормонлар қўшилган муҳитда ўстирилади. 3-4 ҳафтадан сўнг колониялар гормонсиз муҳитга ўтказилади. Бу муҳитда фақатгина трансформацияланган хужайраларнинг колониялари ўсади. Шундай усул билан тамаки ва петуниянинг трансформацияланган ўсимлик-регенерантлари олинган.

Охириги 10 йил мобайнида ташқи бозорда янги хусусиятларга эга бўлган трансген ўсимликлар чиқа бошлади. 1996 йили АҚШда трансген ўсимликлар эгаллаган майдон 3 млн. акр бўлса, 2002 йилга бу майдон 80 млн акрга етди. Асосий трансген ўсимликлар: жўхори, соя, гербицид ва ҳашоротларга чидамли ғўзалардир.

Кундан-кунга аҳоли сони ортиб бораётгани сабабли инсоният олдида муҳим бир муаммо, озиқ-овқат маҳсулотларини ишлаб чиқариш масаласи турибди. Яна бир муаммо, бу тиббий даволашдир. Буларни трансген ўсимликлар яратиш билан ҳал қилиш мумкин.

Ген инженерлиги ёрдамида қишлоқ хўжалиги учун қуйидаги ўсимликлар яратиш учун таклифлар киритилган:

1. Ҳашоротларга чидамли ўсимликларни яратиш. Уларни яратиш учун ўсимликларнинг геномига *Basillus thuringiensis* (бу микроорганизм ҳашоротлар организмда ривожланиб тангақанотлиларда касаллик келтириб чиқаради, одамларга таъсир қилмайди)дан ажратиб олинган токсин гени киритилади. Токсинни синтез қиладиган ўсимликлар айрим зараркунандаларга нисбатан чидамли бўлади. Буларнинг бари далаларда пестицидларни ишлатишни ва атроф-муҳит ифлосланишини камайтиради.

2. Озиқ-овқат маҳсулотларини сифатини яхшилаш. Маълумки, қишлоқ хўжалиги экинларининг ҳаммасининг таркибида ҳам алмашмайдиган аминокислоталар ва витаминлар етарли миқдорда бўлмайди. Буларнинг ўрнини тўлдириш учун ўсимликларга витамин ёки аминокислоталарни

синтезлайдиган генлар киритилади. Ҳозирда таркибида каратиноид кўп бўлган трансген гуруч ва оксилга бой соя ўсимлиги олинган.

3. Товар сифатини яхшилаш. Гулларга пигмент синтезловчи генлар киритилиб ажойиб рангли гуллар ёки оксилларни флуоресценцияловчи генларни киритиб коронғуда нур берувчи декоратив ўсимликлар олинган.

4. Гербицидларга чидамли ўсимликларни яратиш.

5. Ўсимликларнинг чидамлилигини ошириш. Маълумки, айрим балиқ ва хашоротлар гидрофил оксиллар ажратади. Бу оксиллар гени иссиқсевар ўсимликларни совуққа чидамли қилиш учун уларга киритилади.

Адабиётлар

1. Шевелуха П.И. Сельскохозяйственная биотехнология. -М.: «Высшая школа» 1998. - 415 с.
2. Артомонов А.Д. Биотехнология агропромышленному комплексу. -М.: «Наука» 1989. -157 с.
3. Қ.Давронов. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. – Тошкент: 2008. -504 с

Мундарижа

№	Мавзунинг номи	Бети
1	Кириш. Мева-сабзавот экинларининг ген мухандислиги фанининг аҳамияти ва вазифалари	4
2	Мева-сабзавот экинларининг ген мухандисликни боскичлари	8
3	Ўсимликлар ген мухандислиги учун векторлар яратиш	9
4	Мева-сабзавот экинлари хужайрасига генларни трансформация қилиш усуллари	13
5	Ген мухандислиги ферментлари. Транскриптаза	19
6	Нуклеин кислоталар билан ишлаш усуллари. Рекомбинант ДНК конструкциясини яратиш	25
7	Векторларнинг турлари, уларга қўйиладиган талаблар	26
8	Мева-сабзавот экинларини ген мухандислиги усуллари ёрдамида ўсимликларнинг сифат кўрсаткичларини яхшилаш ва ҳосилдорлигини ошириш	33
9	Гербицидларга чидамли трансген мева сабзавот экинлари олиш	38
10	Фитопатогенларга чидамли трансген ўсимликлар яратиш усуллари	40
11	Стресс таъсирларга бардошли трансген мева сабзавот экинлари олиш	42
12	Генетик ахборотни бир томонлама схемасини ифодаловчи акида	43
13	Мева сабзавот экинлари ген мухандислигининг ҳал қилинмаган муаммолари	45
14	Гидролитик ферментлар ва фермент ингибиторларини синтез учун жавобгар генларни киритиш орқали трансген ўсимликлар олиш	46