

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

ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

**ОЗИҚ-ОВҚАТ МАХСУЛОТЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИ
ФАКУЛТЕТИ**

БИОТЕХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ АСОСЛАРИ”

ФАНИДАН

РЕФЕРАТ

МАВЗУ: Биотехнологияда ген мухандислиги

Бажарди: Тургунов А.

Текширди: Н.А.Хўжамшукуров

Тошкент-2013

Режа:

1. Микроорганизмлар асосида биотехнологик жараёнлар яратиш усуллари.
2. Ген мухандислигининг моддий асослари. Нуклеин кислоталар. Транспозонлар. Геном. Транскрипция. Трансдукция.
3. Плазмидалар.
4. Бактериофаглар. Генни ажратиш усуллари. Генни кўчириб ўтказиш усуллари.

Микроорганизмлар асосида биотехнологик жараёнлар яратиш усуллари

Биотехнология саноатида продуцент сифатида прокариотлар – (бир хужайрали, ядроси мукамал бўлмаган организмлар) – бактериялар, актиномицетлар, риккетсийлар ва тубан эукариотлар (бир ва кўп хужайрали, ядроси мукамал, хромосомалари махсус липопротеид табиатли мембраналар билан ўралган) – ачитки ва мицелиал замбуруғлар, энг содда жониворлар ва сув ўтлари ҳамда уларни ҳар хил усуллар (селекция, мутагенез, хужайра ва ген муҳандислиги) орқали олинган мутантларидан фойдаланилади.

Бугунги кунда биотехнологик жараёнларда табиатда тарқалган 100 мингдан ортиқ туркумга мансуб бўлган микроорганизмлардан фақатгина бир неча юзтаси ишлатилади холос.

Микробиология саноатида ишлатиш учун тавсия этиладиган продуцентларга катта талаблар қўяди, уларнинг умумийлари қуйидагилардан иборат:

- ✓ *ўсиш тезлигининг баландлиги,*
- ✓ *арзон озиқа муҳитида ўсиши,*
- ✓ *бошқа микрофлорага ва фагга чидамлилиги,*
- ✓ *юқори ҳосилдорлиги.*

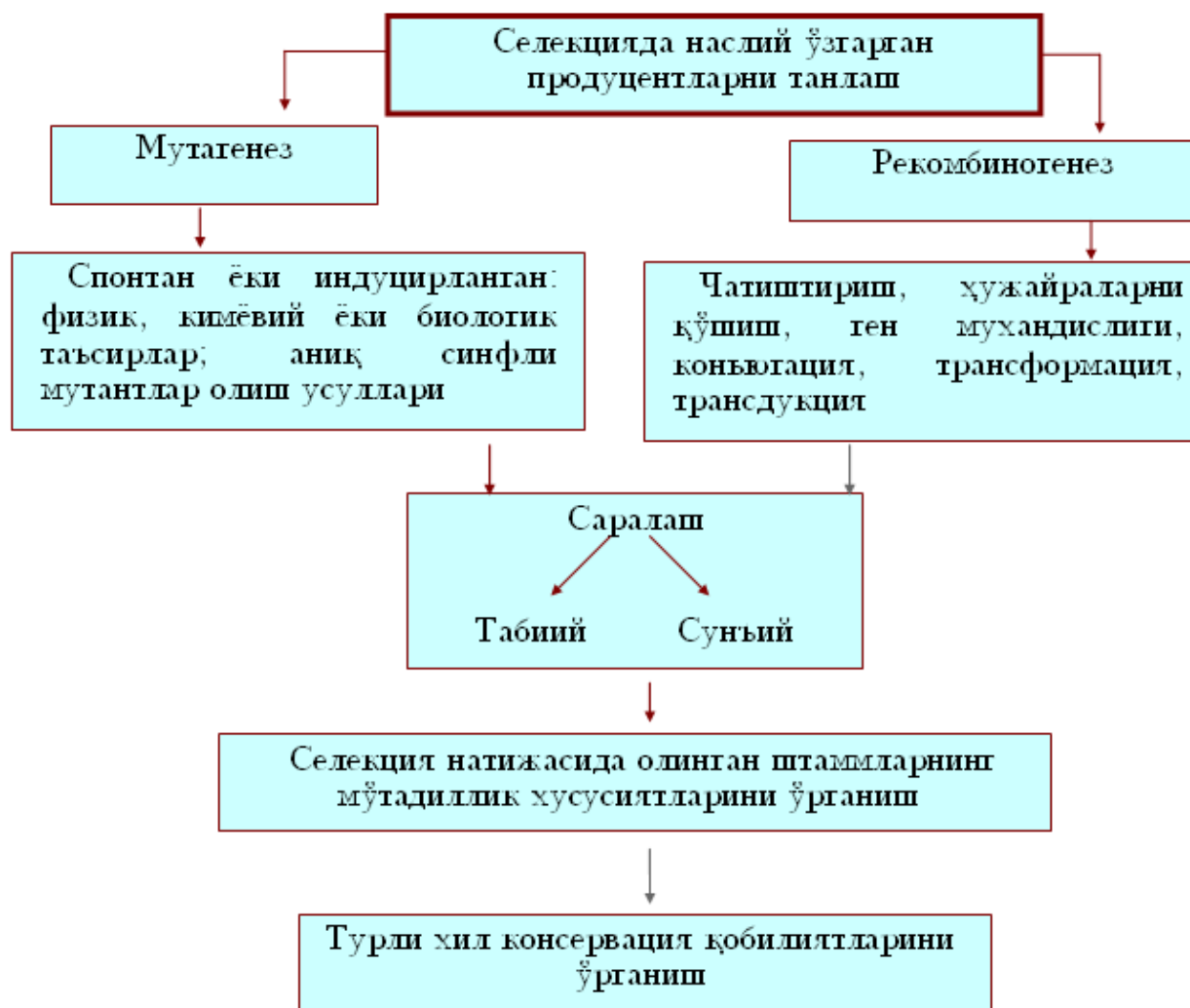
2. Продуцентларни яратиш усуллари

Микроорганизмларнинг табиий штаммларини ҳосилдорлиги кўпинча талаб даражасидан паст бўлади.

Ҳосилдор штаммлар яратиш учун йўналтирилган селекция - усулидан фойдаланилади (1-чизма).

Бунинг учун кимёвий мутагенлар ёки радиацион нурлардан фойдаланилади. Селекция ва танлов ишлари баъзида йиллаб вақт эгаллайди ва натижада микроб ҳосилдорлигини 100 ва ундан ҳам кўпроқ маротабалаб ошириш мумкин бўлади. Масалан, ҳозирги даврда саноат усулида ишлатиб келинаётган пенициллин антибиотиғи синтез қиладиган продуцентнинг фаоллиги дастлабки штаммларга қараганда 10 минг маротабадан ошиб кетган.

Юқори фаолликга ёки ҳосилдорликга эга бўлган штамм яратиш учун селекционер, табиий штаммни генетик материалларини ўрганиш борасида ўта мураккаб, ўта нафис ишларни амалга ошириши лозим бўлади. Бунда, генларни рекомбинацияси билан боғлиқ бўлган барча усуллардан, хусусан: конъюгация, трансдукция, трансформация ва бошқа генетик жараёнлардан фойдаланишга тўғри келади (2-чизма).

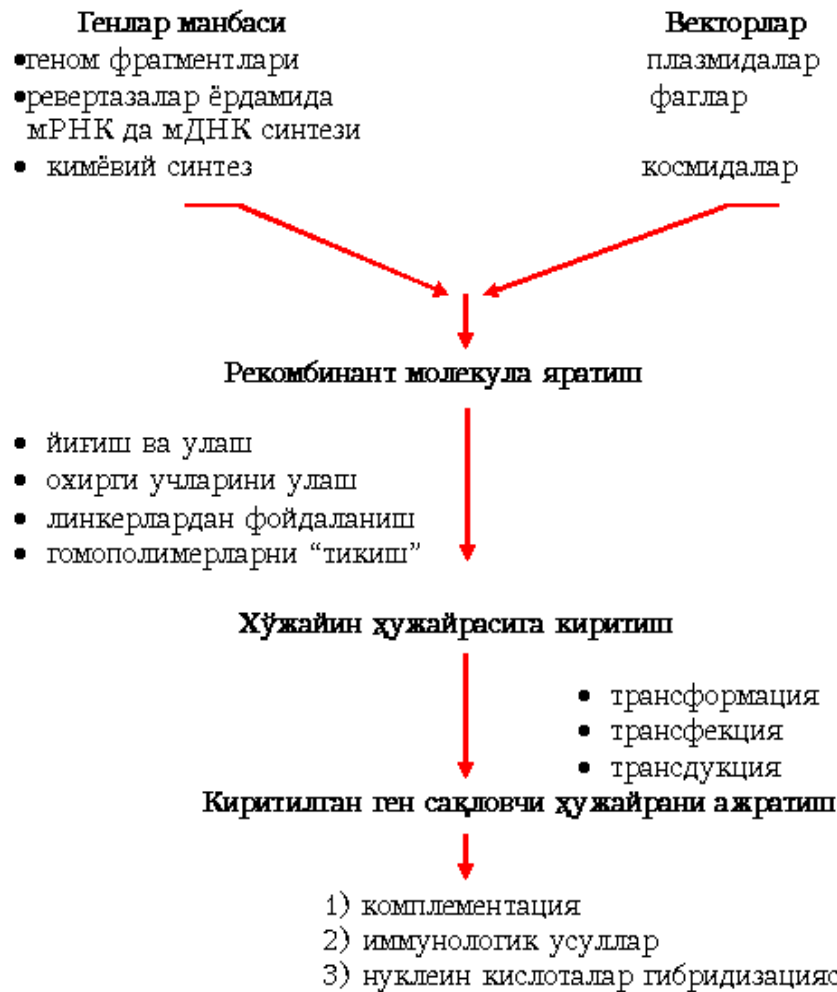


1-чизма. Микроорганизмлар селекцияси

Масалан, конъюгация усули (бактериялар орасида генетик материаллар билан алмашиш), нефт қолдиқларини фаол парчаловчи *Pseudomonas putida* штаммини яратишда самарали фойдаланилган эди.

Кўпинча трансдукция (бактерия вируслари-бактериофаглар ёрдамида бир бактериядан бошқа бактерияга генлар ўтказиш) ва амплификация (керакли генларни нусха сонини кўпайтириш) усулларида кенг фойдаланиш орқали ҳар хил физиологик фаол моддалар синтез қилувчи ҳосилдор штаммлар яратилган. Кўпгина микроорганизмларда антибиотик синтез қилувчи генлар ва уларни бошқарувчилари хромосомаларда эмас, балки плазмидаларда (хромосомадан ташқаридаги ДНК) жойлашган бўлади. Бундай пайтда амплификация орқали хужайрадаги плазмидалар сонини кўпайтириш орқали штаммларни ҳосилдорлигини ошириш мумкин.

Селекция ишларини яна бир йўли бу ҳар-хил бактериялар протопластларини бири-бирига бирлаштириш натижасида генетик рекомбинантлар олиш йўлидир (3-чизма).



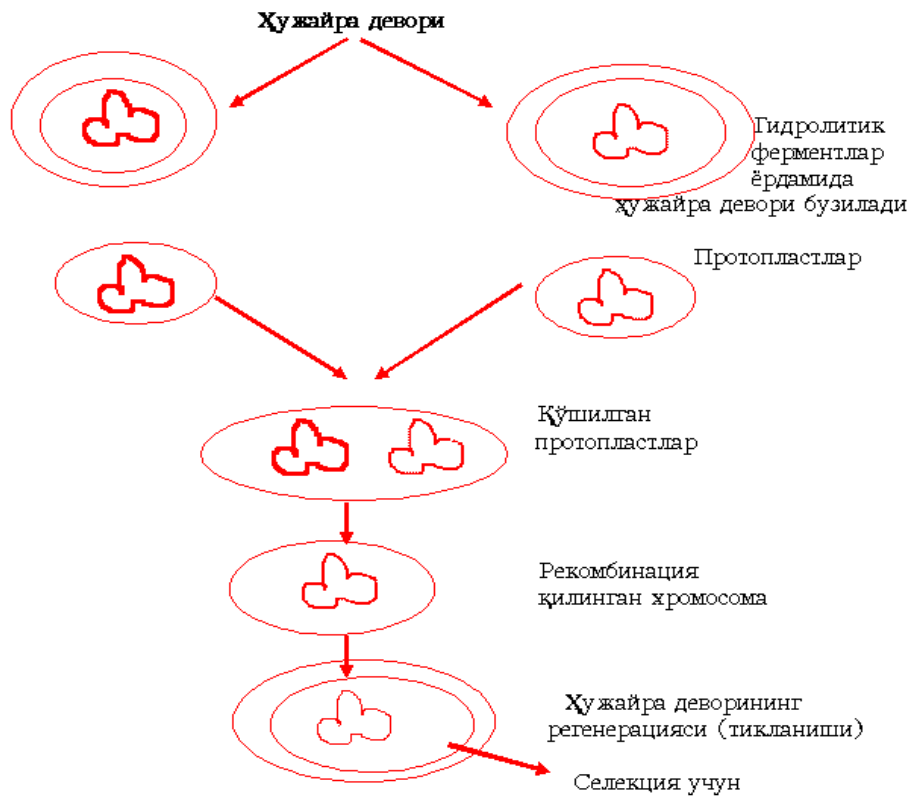
2-чизма. Генларни клонлаш стратегияси

Масалан: *Streptomyces reptomyces* бактериясининг икки хил штамmlаридан олинган протопластларни бир-бирларига бирлаштириш оқибатида С-рифамицин синтез қилувчи ҳосилдор штамм яратилган. Рифампицин синтез қилмайдиган *Nocardia mediterranei* штамmlари протопластларини бир-бирларига қўшиш оқибатида рифампицинни 3 янги ҳосиласини синтез қилувчи штамм яратилган.

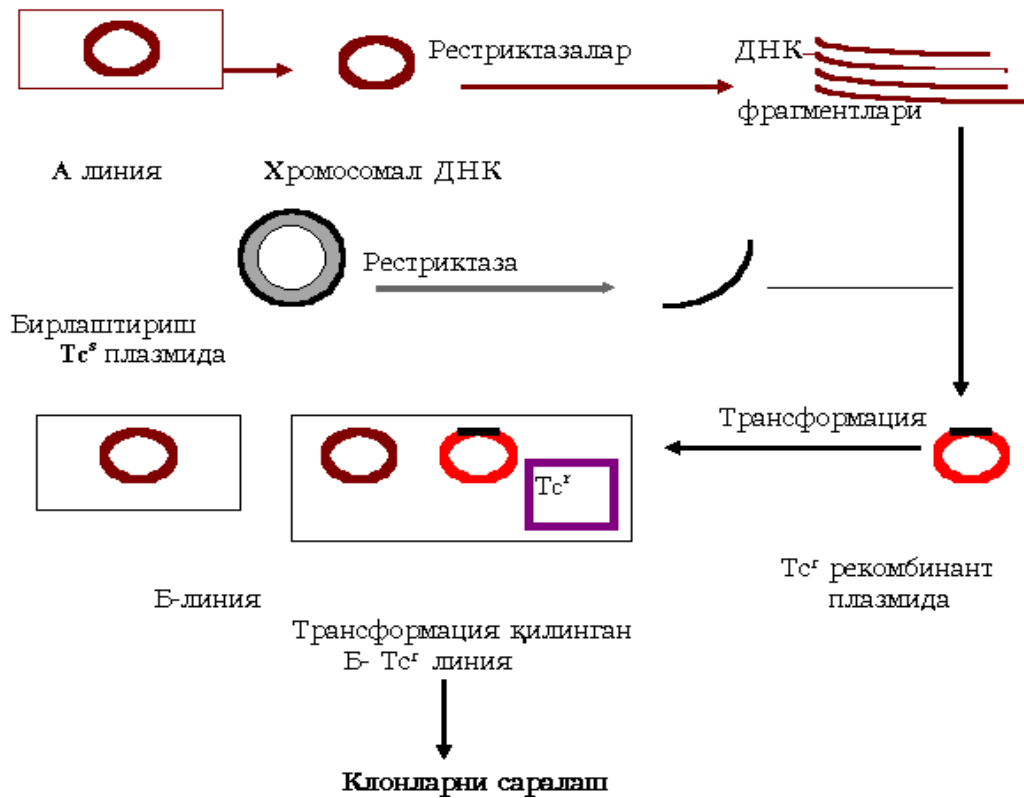
Протопластларни қўшилиши орқали табиий шароитда бир-бирлари билан қўшилмайдиган микроорганизмларни генетик материалларини бирлаштириш ҳам мумкин.

Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш

Ўтган асрнинг 70 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) муҳандислик яратилди. Бу усулнинг асосида ҳужайрадан ташқарида рекомбинант ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оқибатида генларни соф ҳолда ажратиш, уларни модификация қилиш, бирини иккинчисига улаш, “генлар мажмуаси” яратиш, оқибатида бутунлай янги хусусиятига эга бўлган оқсил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оксиллар муҳандислиги деб аталади (4–чизма).



3-чизма. Протопластларнинг қўшилиши орқали махсулдор мутант штаммлар олиш механизми



4-чизма. Плазмида ДНК си ва бактерия хужайрасидан фойдаланиб, генни клонлаш чизмаси

Вектор ген билан лигаза ферменти ёрдамида бириккандан кейин рекомбинант ДНК ҳосил бўлади. Кейин, бу бирикма (вектор ген) микроорганизм ҳужайрасига юборилади (трансформация) ва у ерда амплификация (кўпайиш) амалга ошади.

Натижада бир геннинг бир неча нусхаси – клон пайдо бўлади. Шунинг учун ҳам бу йўлни клонлаш деб аталади.

Агар клонлаш мақсадида ҳамма генлар сақловчи одам ДНК си ишлатилса, одамнинг ген кутубхонаси (клонотека) ҳосил бўлади.

Бу усулда бактерияларга клонлаштирилган инсон, ҳайвон ёки ўсимликлар генлари тўғридан-тўғри бактерияда фаолият кўрсата олмайди.

Ишлаш учун эса, уларни бактериядан ажратиш, бактерия генини бошқарувчиси (регулятор) билан жиҳозлаш ва қайтадан бактерияга киритиш зарур.

Бугунги кунда ҳар хил генлар сақловчи ва керакли махсулот синтез қилувчи бир қатор трансген бактериялар яратилган ва муваффақият билан ишлатилиб келинмоқда.

Шу сабабли ҳам табиий штаммлар ёрдамида олинадиган махсулотлар (биринчи авлод махсулотлари) билан бир қаторда трансген штаммлар ёрдамида рекомбинант оқсиллар (иккинчи авлод махсулотлари)ни саноат миқёсида ишлаб чиқариш йўлга қўйилган. Биологик махсулотларни учунчи авлоди – табиий оқсилларнинг вазифаларини тўлиқ бажара оладиган, аммо табиий бўлмаган махсулотларни синтез қилиш натижасида пайдо бўлади.

Ген–муҳандислиги усуллари (рекомбинант ДНК технологияси) тиббиёт учун зарур бўлган, қимматбаҳо оқсил моддалари ишлаб чиқариш ёки кўп тонналик оқсил моддалари ишлаб чиқариш жараёнларида кенг қўлланиб келинмоқда. Энг аввало инсон организмда синтез бўладиган ва доривор модда сифатида ишлатиладиган оқсил ва пептидларни синтез қилишни йўлга қўйиш катта аҳамият касб этади.

Ген муҳандислиги муаммолари билан шуғиланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараённи асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ эмас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оқсил моддаларини керакли меъёрда ушлаб туриш, уларни модификацияга учраб, микроорганизм ҳужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғлиқдир.

БИОТЕХНОЛОГИЯДА ГЕН МУХАНДИСЛИГИ

Ҳозирги вақтда қайси продуцент микроорганизмдан фойдаланган ҳолда фойдали махсулотлар олиш мумкинлигини аниқ кўрсатиб бериш мумкин. Агарда бундай продуцент бўлмаса, қай тариқада ва қандай шароитда юқори даражада исталган турдаги махсулотни олиш хусусиятни намоён қилувчи продуцентни яратиш мумкинлигини олдиндан айтиб бериш имкониятлари мавжуддир.

Биотехнологик ишлаб чиқаришда бугунги кунда микроорганизмларни минглаб штаммларидан фойдаланилмоқда.

Ўзбекистон республикаси мустақилликка эришгандан сўнг қишлоқ хўжалиги, халқ хўжалиги ва озиқ-овқат ишлаб чиқариш соҳасига бўлган муносабат тубдан ўзгарди. Шу боисдан озиқ-овқат махсулотлари ишлаб чиқариш соҳаси мутахассислари жаҳон халқ хўжалигида кенг кўламда қўлланилаётган биотехнология фанини замонавий кўринишларидан бири бўлган ген муҳандислиги усуллари мукамал эгаллашилари ва амалиётга тадбиқ эта олишлари лозим.

Биотехнологияда ген муҳандислиги соҳасини ўрганишдан мақсад, тирик организмлар ирсий белгилари хақидаги ахборот жойлашган ДНК молекуласининг тузилиши ва роли, ген молекуляр биологияси; генетик муҳандисликнинг моддий асослари: трансформация, трансдукция, кўчиб юривчи генетик элементлар-транспозонлар, плазмидлар, вируслар, бактериофаглар, рестриктазалар, рекомбинант

ДНК олиш, генларни клонлаш, хужайра мухандислиги, хужайра ва тўқималарни сунъий шароитда ўстириш технологияси; генетик мухандисликнинг ўсимликлар селекциясида қўлланилиши; ген мухандислигига асосланган биотехнологиянинг аграр саноатдаги илмий-техник тараққиётни тезлаштиришдаги роли; гибридомалар олиш технологияси ва унинг қишлоқ хўжалигида ва чорвачиликда қўлланилиши ҳамда генетик мухандисликнинг истиқболлари ҳақидаги аниқ билимларни ўрганишдан иборат.

Ушбу фаннинг асосий вазифаси замонавий ген мухандислиги ютуқларини халқ хўжалиги амалиётида кенг қўламда қўллашдан иборат. Тирик организмлар ирсий ахборотини сунъий йўл билан маълум мақсадга мувофиқ ўзгартириш жараёни генетик мухандислик фанининг асосий усткурмаси ҳисобланади. Генетик мухандислик хужайра, хромосома ва ген даражасида амалга оширилади:

1. Хужайра даражасидаги генетик мухандислик икки хужайрани ўзаро қўшиш йўли билан амалга оширилади.
2. Хромосома даражасидаги генетик мухандислик хужайра ядросига қўшимча хромосомалар киритиш орқали амалга оширилади.
3. Ген даражасидаги генетик мухандислик ёки ген мухандислиги энг мураккаб бўлиб, қуйидаги босқичлар асосида амалга оширилади:
 - а. Қимматли хўжалик аҳамияти касб этадиган ген функцияси орқали қидириб топилади, ажратиб олинади, клонланади ва тузилиши ўрганилади.
 - б. Ажратиб олинган ген хромосома ДНК си билан рекомбинацияланувчи бирор фаг геноми, траспозон ёки плазмид ДНК си билан бириктирилиб вектор конструкция яратилади.
 - с. Вектор конструкция трансформация усули билан хужайрага киритилади ва трансген хужайра олинади.

Трансген хужайрадан сунъий равишда етук ўсимлик ўстирилади. Ушбу усулдан фойдаланиб ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар хужайраларидан трансген формалар олиш мумкин.

Биотехнологияда ген мухандислиги ютуқларини чуқур ўрганиш ва улардан оқилона фойдаланиш трансген ўсимликлар ва ҳайвонлар олиш биотехнологиясининг юзага келишида асосий омил бўлиб хизмат қилди. Бу усул билан қимматли хўжалик аҳамиятига эга бўлган бир қатор ўсимликлар ва наслдор қорамол клонлари яратилди.

Хужайра мухандислиги усуллари билан 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 (1-жадвал).

1-жадвал.

Янги биотехнологиянинг дастлабки асосий 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 штамmlарини патентлаш ҳақидаги қарор қабул қилинган. |
| 1981 йил | Моноклонал антителла тўплamlаридан фойдаланиш мумкинлиги тўғрисидаги қарор қабул қилинган. Биринчи марта генларни автоматик синтезатори сотувга чиқарилди. |
| 1982 йил | Тиббиётда рекомбинант ДНК - инсулини ва ҳайвонлар учун биринчи рекомбинант ДНК дан фойдаланишга рухсат берилди. |

1983 йил

Биринчи маротаба ген экспрессиясидан бир ўсимликдан бошқа турида фойдаланиш мумкинлиги исботланди.

Илмий ишлар давом эттирилмоқда. Ҳозирги вақтда кун тартибида ОИТС (СПИД) га қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди.

Ген муҳандислиги биотехнологиясининг ютуқлари саноат кўламида ва қишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Хусусан, антибиотиклар, аминокислоталар, витаминлар ва гормонлар ишлаб чиқарилмоқда, наслдор қоромол клонлари яратилмоқда, тупроқда ва сувда заҳарли пестицид қолдиқларини парчалайдиган микроорганизмларни трансген штаммлари олинмоқда, атмосфера азотини ўзлаштирувчи микроорганизмлар генлари асосида тупроқни азотли ўғитлар билан бойитиш муаммоси ечилмоқда, зарарли хашаротларга ва патоген микроорганизмларга чидамли, экологияни асровчи трансген ўсимлик навлари етиштирилмоқда, ирсий касалликларни тезкор ташхис қилиш учун диагностикаумлар тайёрланмоқда, шунингдек, ген терапия такомиллаштирилмоқда.

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

1. ДНК, РНК ва оқсил молекулаларининг биосинтези.

ДНК репликацияси.

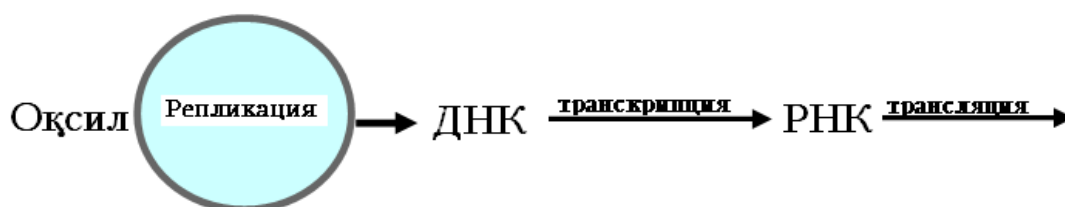
Тирик организмда олдиндан мавжуд қолип асосида янги ДНК молекуласининг яратилиши нуклеин кислоталарининг синтезланиш йўлидир. Мавжуд ДНК молекуласидан нусха олиш репликация деб аталади.

Репликация жараёни ДНК-полимераза I, II, III, ДНК-лигаза ва ревертаза ферментлари ёрдамида амалга ошади. гер-белок ёрдамида ДНК қўш занжири ажралади ва ДНКга боғланадиган оқсил молекулалари ёрдамида ДНКнинг ажралган занжирлари стабил ҳолатда сақланиб турилади. ДНК-полимераза III ферменти ДНК нинг 3' учидан 5' учигача ДНКнинг битта занжирини тўла синтез қилиш қобилиятига эга. ДНК синтези фақат ДНК нинг 3' учидан 5' учига қараб бориши туфайли ДНК нинг иккинчи занжири праймаза, ДНК-полимераза I ва ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида амалга ошади.

Праймаза (ревертаза) ферменти ёрдамида ДНК нинг иккинчи занжири синтези учун праймер синтез қилинади ва ДНК-полимераза III ферменти ёрдамида праймер нуклеотидлар кетма-кетлигидан ДНК синтези бошланади ва ДНК-полимераза I ферменти ёрдамида бу нуклеотидлар кетма-кетлиги бир оз узайтирилади. Кўплаб ҳосил бўлган ДНК фрагментлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Бу жараён ДНК нинг иккинчи занжири тўла синтез бўлгунча давом этади. Янги ДНК занжири тайёр ДНКнинг нусхасига, матрицасига қараб тузилади. Бу жараёнда матрица вазифасини ДНК қўш занжирининг бир ипи бажаради.

РНК синтези жараёни транскрипция деб аталади. Ҳар учала типдаги РНК синтези турли типдаги РНК-полимераза (РНК-полимераза I, II, III) ферментлари ёрдамида амалга оширилади. рРНК синтези РНК-полимераза I ферменти, иРНК РНК-полимераза II ферменти ва тРНК ҳамда кичик ўлчамли ядро РНК си молекулалари РНК-полимераза III ферменти ёрдамида амалга оширилади. Ҳамма РНК молекулалари синтези учун ДНК нинг битта ипи матрица вазифасини ўтайди.

Оқсил синтези рибосомаларда ўтади. Рибосома ҳужайра метаболизми учун зарур бўлган оқсиллар синтезини ДНК дан олинган информация асосида кодлаш механизмига мувофиқ амалга оширади (1-расм) .



1-сурат. Биологиянинг асосий қонунияти

ДНК занжиридан олинган иРНК нуклеотидлар тартиби шаклидаги информация рибосома ёрдамида оқсил молекуласидаги аминокислоталар тартибига кўчирилади. Оқсил синтези жараёни трансляция (таржима қилиш) деб аталади. Нуклеин кислоталарда ҳар бир аминокислоталарни танийдиган ва танлаб бириктириб олиб ташишда воситачилик қиладиган бирин-кетин учта нуклеотидлар комбинацияси мавжудки, бу ўз навбатида аминокислота коди, оқсил коди, кодон, кенг маънода генетик код деб юритилади.

Оқсил молекуласига кирадиган аминокислоталар 20 та бўлганлигидан кодонлар сони ҳам 20 дан кам бўлиши мумкин эмас. Бунда ҳосил бўладиган комбинациялар сони $64-4^3$, кодланадиган аминокислоталар сонидан анча кўп, лекин маълум бўлдики 20 та аминокислотадан 18 таси биттадан ортиқ 2, 3, 4, ва 6 кодон билан кодлана олар экан. Бундан ташқари, учта кодон УАА, УАГ, УГЦ аминокислоталарни кодламайди ва полипептид занжирининг тугаганидан дарак беради, улар терминаторлар «тугатувчилар» деб аталади. Полирибосомаларда оқсил синтези иРНКнинг 5' охиридан бошланиб 3' охирида тугайди. Оқсил синтези тугагач иРНК рибосомадан ажралиб чиқади ва рибосома иккита субпарчаларга диссоциацияланади.

Мутация жараёни ва ДНК репарацияси.

ДНК молекуласи структурасини ташқи номуқобил омиллар таъсирида ўзгариши мутация дейилади. Мутацияга учраган ДНК молекуласида ирсий ахборот ўзгаради ва организмнинг мўтадил ҳолатда яшашига кескин таъсир кўрсатади. Тирик организмнинг мутант формалари вужудга келади. Бошқа организмлардан фарқли ўлароқ ўсимлик ва микроорганизмларнинг хўжалик аҳамияти юқори бўлган мутант формалари халқ хўжалигида кенг кўламда фойдаланилади (2-жадвал).

2-жадвал.

Ауксотроф мутантлар ёрдамида L-аминокислоталарининг бирламчи метаболитларини олиниши

| Аминокислота | Продуцент | Тансиқ модда | Субстрат | Культурал суюқликда аминокислоталар микдори, г/л |
|----------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------|--|
| L-лизин | <i>Breviobacterium flavum</i> | Треонин, метионин ёки гомосерин | Глюкоза сахароза | 60-100 |
| L-трионин | <i>Escherichia coli</i> | Лизин, метионин, изолейцин | Глюкоза | 20 |
| L-орнитин | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | Аргинин | Глюкоза | 26 |
| L-фенил-аланин | <i>Arthrobacter parafineus</i> | Тирозин | H-алканлар | 15 |
| L-тирозин | <i>Corynebacterium sp.</i> | Фенилаланин | H-алканлар | 19 |
| L-валин | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | Изолейцин | Глюкоза | 11 |

Инсон организмидаги мўтацион ўзгаришлар оғир касалликларни келиб чиқишига сабаб бўлади (оқ қон касаллиги).

Мутацияга учраган ДНК молекуласини асл ҳолатига қайтиш жараёни ДНК репарацияси дейилади. Репарация жараёни ДНК аза, ДНК-полимераза II ва ДНК-лигаза ферментлари иштирокида амалга оширилади. Бу ферментлар тизими ёрдамида ДНК структураси дастлабки мўтадил ҳолатига қайтади.

2. ГЕН МУХАНДИСЛИГИНИНГ МОҲИЯТИ ВА ВАЗИФАЛАРИ

Вируслар билан прокариот ҳужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидлар ва мўтадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар қўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтказадиган ситема -плазмидлар ҳам бор . Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халқали молекулалар -плазмидлар ва мўтадил вируслар вектор деб аталади (4-жадвал).

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

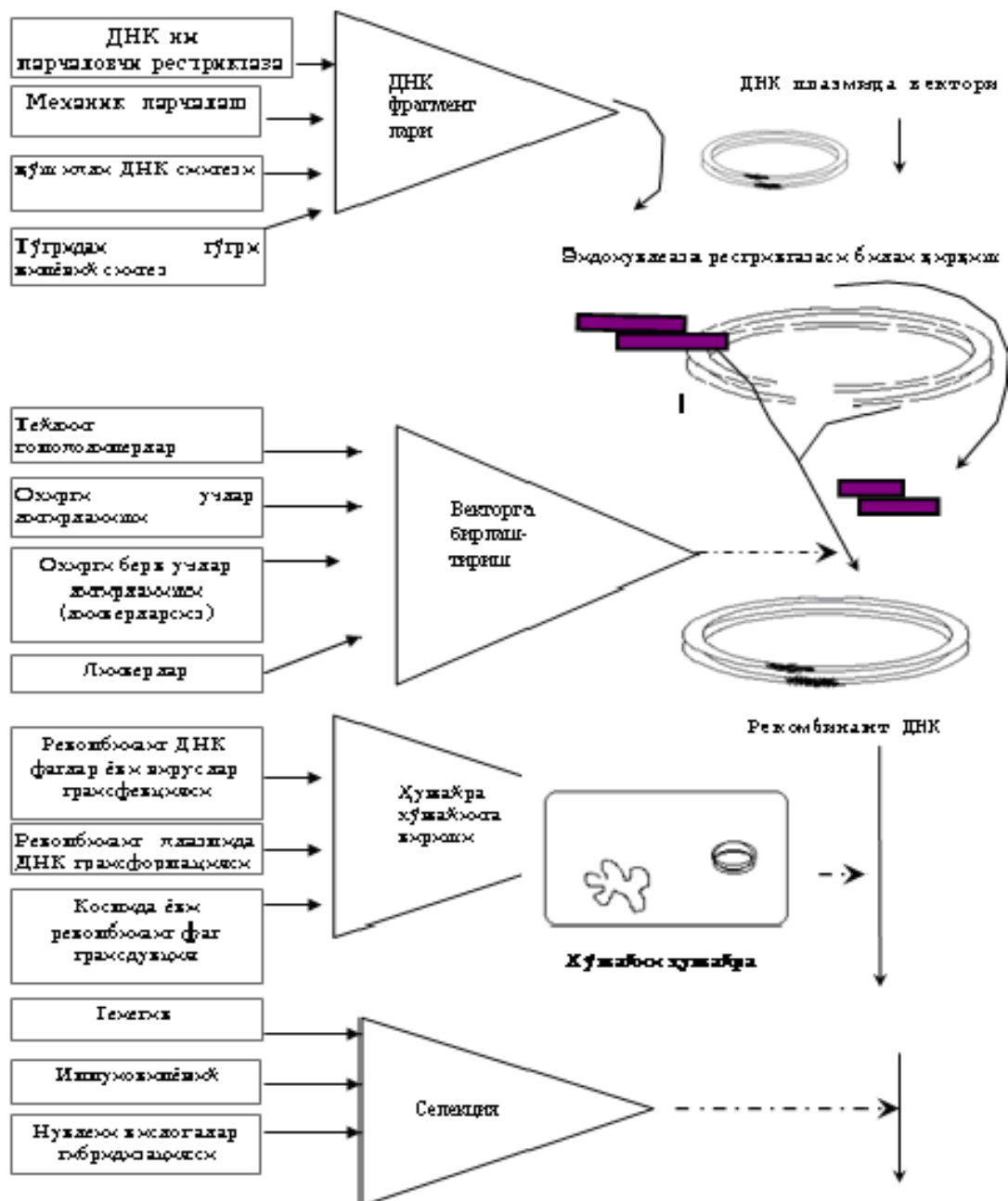
Бу ғояларнинг амалда юзага чиқиши ген мухандислиги ёки генетик мухандислик деб аталадиган ва катта истиқболга эга бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

4-жадвал

| Векторлар | Нусхалар миқдори | Ўлчами, минг нуклеотидлар |
|--|------------------|---------------------------|
| клонлаш учун плазмид векторлари: pBR 322 pACY 184 | 40-50 ~20 | 4,4 4,0 |
| клонлашда махсус катталикдаги векторлар: λ Chron 4A космида pHC 79 | 100-200 ~20 | 41,8 6,4 |
| генлар экспрессияси учун плазмид 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 эмас қисмини олиб ташлаш, керак бўлган қисмларини бошқа генлардан ёки синтез йўли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофиқ организмга киритиб (масалан одамнинг инсулин генини микроб ҳужайрага ёки сичқоннинг ўсиш гармони генини каламушга), зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳақозо ғоялар ва технологияларнинг йиғиндисидир (6-чизма).

Айрим ДНК молекулалари генлар бир туринг кўп нусхасини ҳосил қилиш учун илгаридан ҳужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатилган клонирлаш техникасининг молекулаларига мослаштирилган варианти қўлланади. Ҳужайра линияларининг бир хиллигини клонирлаш усули билан кучайтириш мумкин. Клон деб бирдан-бир олд ҳужайрадан келиб чиққан ҳужайралар популяциясига айтилади. Клонирлаш асосан мутант ҳужайралар олиш учун ишлатилади. Молекуляр клонирлаш ДНК нинг аниқ бир намунасини тоза ҳолда кўпайтиришдан иборат.



6-чизма. Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

2.1. Транспозонлар

Транспозонларнинг кашф этилиши генетик мухандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлди. Кўчиб юривчи генетик элементлар-транспозонларни ўсимлик организмда АҚШ олимаси Барбара Мак Клинтон, микроорганизмларда АҚШ олими Ахмад Бухорий ва ҳашаротларда Россия олими Георгий Георгиев кашф этган. Кўчиб юривчи генетик элементлар айна вақтда транспозицион элементлар ёки транспозонлар деб ҳам аталади. Транспозонлар хилма-хил структурага эга бўлсалар-да, барча транспозон молекулаларининг икки четидан махсус нуклеотидлар изчиллиги, марказий қисмда эса ДНК молекуласининг белгиланган жойида "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб нотекис кесувчи транспозаза ферментини синтез қилувчи ген мавжуддир.

Транспозаза ферменти хужайрадаги ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесади ва айна пайтда транспозон учларига қовуштиради. Ҳосил бўлган хромосома ДНКси ва транспозон ДНКсидан иборат қовушма хужайра ДНК

бўлақларини боғловчи фермент лигаза таъсирида ўзаро боғланади. Транспозонларнинг ҳужайра ДНКсига интеграцияси қуйидагича амалга ошади.

Транспозонлар хромосомада ўз ўрнини ўзгартирганда ирсият ҳам ўзгаради. Одатда яшаш муҳити кескин ўзгарганда транспозонларнинг кўчиб юриши ортади. Шу сабабдан кўчиб юривчи генетик элементлар иштирокида ген мухандислигига асосланган кўпгина биотехнологик жараёнлар яратилган.

Ген мухандислигида қўлланиладиган плазмид ва фаг векторлар, рестриктазалар

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

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

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

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

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

Табиатда бирор микроорганизм ҳужайрасига ташқаридан ёт генетик материал кирса, у дарҳол ҳужайра нуклеаза ферментлари орқали парчалаб ташланади.

ДНК молекуласини майда бўлақларга бўлувчи ферментлар кесувчи эндонуклеазалар ёки рестриктазалар деб аталади. Ҳар бир рестриктаза тўрт ёки кўпроқ махсус нуклеотид жуфтларни таниб олиб боғланади ва ДНК молекуласини кесади. Айрим рестриктазалар ДНК қўш занжирини қайчи сингари шартта икки бўлақка бўлади. Бундай рестриктазаларга Alu I, Dra I, Hae III, Hpa I, EcoR V, Hinc II, Pvu II, Rsa I, Sca I, Sma I ва бошқаларини мисол қилиб келтириш мумкин (5-жадвал).

Шу билан бирга қўш занжир ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар ҳам мавжуд (Aat II, Acc III, Apa I, Bam HI, EcoRI, Hind III ва бошқалар). Бу рестриктазалар функцияси жиҳатдан транспозага ўхшашлиги кўриниб турибди. Шунинг учун ҳам бу рестриктазалар ҳосил қилган "ёпишқоқ" учлардан фойдаланиб, ҳар хил ДНК бўлақларини бир - бирига боғлаш осонлашади. Ана шу хусусияти туфайли бу хил рестриктазалар ген мухандислигида кенг қўлланилади.

Ҳозирги кунгача 500 дан ортиқ хилма хил рестриктазалар тоза ҳолда ажратиб олинган ва ўрганилган.

Одатда микроорганизм ирсий моддасининг хромосомаси бир неча миллион нуклеотид жуфтлари изчиллигидан иборат. Ўсимлик ёки ҳайвон геноми бир неча юз миллиондан то 1 миллиардгача нуклеотид жуфтлари изчиллигидан тузилган. Бундай буюк молекулани юқорида қайд қилинган хилма - хил рестрикция эндонуклеазалардан фойдаланиб кўплаб бўлақларга бўлиш мумкин. Эндонуклеаза иштирокида парчаланган ДНК бўлақлари электрофорез мосламасида махсус молекуляр "элак" тешикларидан юқори кучланишли электр майдони таъсирида молекуланинг заряди ва ўлчамига биноан ажратилади. ДНК бўлағи махсус бўёқ билан бўйаш натижасида ультрабинафша нурлари ёрдамида оддий кўз билан кўрилади.

5-жадвал.

Ген муҳандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

| Рестриктазалар | Рестриктаза олинган микроорганизмлар | Рестриктазаларнинг "аниқлайдиган" ва кесадиган охириги учлари |
|-----------------------|---|--|
| Eco RI | Escherichia coli RI | -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- |
| Hind III | Haemophilus influenzae | -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- |
| Sal I | Streptomyces albus | -G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G- |
| Bam I | Bacillus amyloliquefaciens | -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- |
| Hpa II | Haemophilus parainfluenzae | -C-C-G-G- -G-G-C-C- |
| Alu I | Arthrobacter luteus | -A-G-C-T- -T-C-G-T- |
| Haem III | Haemophilus aegyptius | -G-G-C-C- -C-C-G-G- |
| Sma | Serratia marcescens SD | -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- |

ДНК нинг майда бўлақлари электр майдонида гел ғовақларидан йирик бўлақларга нисбатан тез ҳаракат қилгани учун уларнинг стартдан босиб ўтган масофасини ўлчаб ДНК бўлагининг катта-кичиклиги аниқланади. Электрофорез мосламасида бир-биридан фақат бир нуклеотид кам ёки кўплиги билан фарқланувчи ДНК бўлагини ажратиш мумкин. Рестрикция эндонуклеаза ферментларининг очилиши ва электрофорез мосламасида ДНК бўлақларини ўта аниқлик билан бир-биридан ажратишнинг такомиллашуви гигант ДНК молекуласидан исталган ДНК бўлагини ажратиш олиш имконини беради.

Хулоса қилиб айтганимизда ген муҳандислиги биотехнологиясининг моддий асосларига бактерияларнинг клонлаш, трансформация ва трансдукция жараёнлари, транспозонлар, плазмидалар ва рестрикция эндонуклеаза ферментларини тўла фундаментал асосларини ўрганиш киради. Юқорида қайд қилинган биологик фаол моддалар ген муҳандислиги биотехнологиясининг амалий жараёнларида ўта қимматли омил ҳисобланади.

Рекомбинант ДНК олиш усуллари

Сунъий шароитда рекомбинант ДНК олиш ва генларни клонлаш илк бор 1972 йилда А+Ш олимлари Бойер ва Коэн томонидан амалга оширилган. Бу олимлар E.coli бактериясининг хромосома ДНКсига ва шу бактерия плазмидасига алоҳида идишларда EcoRI рестриктаза ферменти билан ишлов берганлар. Плазмида таркибида фақат 1 донга EcoRI рестриктаза ферменти таниб кесадиган махсус нуклеотидлар изчиллиги бўлганлиги сабабли фермент плазмиданинг халқасимон ДНК қўш 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 ДНКси бўлаги очик ҳолатдаги «ёпишқоқ» учли плазмид ДНКси билан аралаштирилиб лигаза ферменти ёрдамида тикилади. Натижада плазмид 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 учта усули мавжуд-коннектор усули, рестриктаза-лигаза ва линкер молекулаларидан фойдаланиш усули. Коннектор усулида рекомбинацияда иштирок этувчи ДНК бўлагининг 3' учига дезоксинуклеотидилтрансфераза ферменти ёрдамида малум узунлик даги 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 тулдирилади.

Рестриктаза-лигаза усули энг содда ва осон рекомбинант ДНК олиш усули ҳисобланади. Бу усулда ДНК молекуласи ва вектор плазмида «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 плазмидага T4 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 плазмида молекулаларининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Шу йусинда рекомбинант ДНК молекуласи ҳосил бўлади.

Вектор молекулалар, генлар библиотекасини яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси

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 молекулалар ген муҳандислиги биотехнологиясида генларни клонлашда ва трансформация қилишда асосий иш курали бўлиб хизмат қилади.

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

Хўжалик аҳамияти қимматли бўлган генларни ажратиш учун ген библиотекази тузилади. Хромосомал ДНК асосида ген библиотеказини тузиш қуйидагича амалга оширилади:

ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилади ва маълум шароитда реассоциация қилинади. Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади. Олинган рекомбинант ДНК бактерия хужайрасига трансформация қилинади. Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига эътибор бериш керак. Бу кўрсаткич қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади,

$$\ln(1-p)$$

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

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

Генларни клонлашда кўпинча кДНК библиотекасини тузиш мақсадга мувофиқдир. Бу ҳолда махсус поли (Y) ва олиго (dT) колонкалари ёрдамида учларида поли (A) нуклеотидлар кетма-кетлигини сақловчи 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 парчланади 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 парчланади ва икки занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади. Шу йусинда ҳосил бўлган кДНК молекуласи вектор молекулаларига уланган ҳолда клонланади.

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100°C ҳароратда 5 мин., 0,2 N NaOH эритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза фильтрига бириктирилади. Олинган фильтр $[\text{г}^{-32}\text{P}]$ АТФ нуклеотида билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

Молекуляр гибридизация жараёнида фильтрага бириккан рекомбинант ДНК молекуласига комплементарлик қонунияти асосида нишонланган иРНК молекулалари бирикади.

Ҳосил бўлган гибрид ДНК молекуласи денатурация қилиниб нишонланган иРНК молекуласи ажратиб олинади (элюция ёрдамида). Олинган иРНК молекуласи хужайрасиз оқсил синтез қилиш тизимида текшириб курилади. Ҳосил бўлган оқсил молекуласининг идентификация қилиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади.

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

1. Бакай С.М. Биотехнология обогащения кормов мицелиальным белком. Киев. Урожай 1987.
2. Биотехнология кормопроизводства и переработки отходов. Рига: Зинатие, 1987.
3. Быков В.А. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М. Высшая школа, 1987.
4. Гаврилова Н.Н. Липиды микроорганизмов для кормовых целей. М., ВНИИСЭНТИ, 1985.
5. Глележа А.А. и др. Микробные ферменты в народном хозяйства – Вильнюс: Мокслас, 1985.
6. Давронов К. Микроблар дунёси. Тошкент: ТошДАУ, 2001.
7. Давронов Қ.Д., Хўжамшукуров Н.А. Умумий ва техник микробиология. Тошкент, Ўзбекистон энциклопедияси, 2004. – 279 б.
8. Удалова Э.В. и др. Энзиматическая конверсия растительно сырья и отходов сельскохозяйственного производства. М. ВНИИ систем управления, экологических исследований и научно-технической информации, 1990.
9. Хазин Д.А. Производство кормового белка и его использование в кормлении сельскохозяйственных животных. М. ВНИИТЭИ, 1987.
10. Алексеев В.В, Синюгин О.А. Техничко-экономическая оценка традиционной, атомной и альтернативной энергетике. - Российский химический журнал Т.41.№6.-М.:1997.
11. Баадер В., Донэ Е., Брендерфельд М. Биогаз-теория и практика.-М.:1982.
12. Гриднев П.И. Энергетические аспекты процесса переработки навоза в анаэробных условиях //Механизация и автоматизация производственных процессов ферм крупного рогатого скота. Сб. научных трудов ВНИИМЖ.- Подольск:1987, С.97-104.
13. Заварзин Г.А. Биогаз и малая энергетика. Природа,1987,№1.
14. Ковалев А.А. Ножевникова А.Н. Технологические линии утилизации отходов животноводства в биогаз и удобрения.-М.: Знания, 1990.