

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

**МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ  
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ  
БИОЛОГИЯ–ТУПРОҚШУНОСЛИК ФАКУЛЬТЕТИ  
БИОКИМЁ КАФЕДРАСИ**

**ХАМДАМОВА НИГОРА АЗАМЖОН ҚИЗИ**

**ДНК КЛОНЛАРИНИ ЯРАТИШ УСЛУБЛАРИ**

**мавзусида**

**Биокимёвий тадқиқот методлари фанидан**

# **КУРС ИШИ**

**Бажарди:  
Текширди:**

**Хамдамова Нигора  
Рўзметова Дилдора**

**ТОШКЕНТ-2015**

## Мундарижа

	<b>КИРИШ</b>	<b>3</b>
<b>1-БОБ</b>	<b>АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ</b>	<b>5</b>
<b>1.1.</b>	Ген муҳандистлигида ДНК клонларини яратилиши	<b>5</b>
<b>1.2.</b>	Ген муҳандислигининг ривожланиш тарихи	<b>6</b>
<b>1.3.</b>	Ген инженериясида ген клонларини яратиш муаммоси	<b>9</b>
<b>II-БОБ</b>	<b>ДНК КЛОНЛАРИНИ ЯРАТИШДАГИ</b>	<b>13</b>
	<b>ТАДҚИҚОДЛАРНИНГ МАНБАЛАРИ ВА УСУЛЛАРИ</b>	
<b>2.1.</b>	Рекомбинант ДНК олиш технологияси ҳақида умумий тушунча	<b>13</b>
<b>2.2.</b>	Рекомбинант ДНК олиш технологиясида фойдаланиладиган фермент тизимлари	<b>18</b>
<b>2.3.</b>	ДНК клонларини яратишда қўлланиладиган плазмида, фаг векторлари, транспозонлар	<b>26</b>
<b>2.4.</b>	Ген муҳандислиги ва ДНК клонлашда қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи	<b>18</b>
<b>2.5</b>	Вектор система яратиш шартлари	<b>29</b>
<b>2.6</b>	Рекомбинант ДНК олиш усуллари	<b>31</b>
<b>2.7</b>	Трансформация ва танланиш жараёни	<b>32</b>
<b>2.8</b>	Генлар банкни яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси	<b>38</b>
	<b>ХУЛОСА</b>	<b>42</b>
	<b>АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ</b>	<b>44</b>

---

## КИРИШ

**Мавзунинг долзарблиги.** Хозирги кунда ген мухандистлигида ДНК клонларини яратиш, рекомбинант ДНК олиш энг илғор, истиқболли соҳа сифатида диққатга сазовордир.

Аниқланишича ХХІ аср бошида дунё аҳолисининг сони 5 млрд бўлган бўлса, ХХІ асрнинг охирига бориб бу кўрсаткич ошиб 10 миллиардга етиши кутилмоқда. Ривожланиб боргани сари инсон эҳтиёжлари ошиб бормоқда. Бу эҳтиёжларни қондириш учун классик технологияларнинг қуввати етишмайди. Чунки аҳолини озиқ-овқат ва кийим-кечак, энегия билан таъминлаш, кўпгина касалликларни аниқлаш, даволаш муаммолари долзарблашиб бормоқда. Эҳтиёжларнинг кўпчилигини янги биотехнологияларни қўлланиш натижасида қондириш мумкин. Масалан, қанд касаллигини даволаш учун ген инженерияси, генларни клонлаш усули билан одам инсулинини ишлаб чиқариш, тупроқда ва сувда захарли пестицид колдикдарини парчалайдиган микроорганизмлар яратиш, атмосфера азотини ўзлаштирувчи генларни кўчириб ўтказиб тупроқни азотли ўғитлар билан бойитиш, зарарли ҳашаротларга ва патоген (касалик чақирувчи) микроорганизмларга чидамли, экологияни асровчи трансген ўсимлик навларини яратиш, серсут, гўштдор қорамол зотларини кўпайтириш ўзининг дастлабки самараларини бермоқда. Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг институтларида ген ва хужайра инженериясига асосланган муаммолар тадқиқ қилинмоқда[.]

Бугунги кунда ДНК клонларини яратилишида бир қанча ижобий натижаларга эришиш билан бир қаторда салбий оқибатларга олиб келувчи натижалар ҳам кузатилмоқда. ДНК клонларини яратилишининг барча организмларга мос мукамал услублари хали такомиллашмади. Хозирда фақатгина, асосан микроорганизмлар ва ўсимликлар устида иш олиб борилмоқда. Қисман чорвачилик ва паррандачилик мақсадида хайвонлар устида ҳам кўплаб тажрибалар амалга оширилмоқда. Бироқ бу борада

инсонлар устида олиб бориладиган тадқиқотлар маълум даражада чекланган бўлиб, фақат малум бир органларни ўзини ДНК си асосида “Органлар фабрикаси”ни яратиш, имплантация қилиш устидаги буюк тадқиқотлар давом етмоқда. Ҳозирги вақтда кун тартибида ОИТС (СПИД), гепатит С ва парранда гриппининг қўзғатувчиси H5N1 вирусига қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди

**Ишнинг мақсади ва вазифаси.** Белгиланган мавзунини ўрганишдан асосий мақсад ҳозирда фан янгиликларидан ҳисобланмиш ДНК клонларини яратиш ва уни инсоният ҳаётига тадбиқ этиш борасида қилинаётган ишлар билан танишиш, ген инженерияси ҳақида умумий тушунчалар олиш ва ДНК клонларини яратиш методларини ўрганишдир.

## I-БОБ. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ

### 1.1

### Ген

#### муҳандистлигида ДНК клонларини яратилиши

Маълумки, бир молекула оксил моддасининг биологик синтезига жавобгар бўлган, ДНК занжиридаги нуклеотидлар қаторига **ген** деб аталади. Мураккаб биологик жараён кетма-кетлиги бошқаришда иштирок этадиган, гинетик тузилиши бўйича деярли бир-бирига ўхшаш бўлган бир неча генлар-генлар **мажмуаси** ёки оиласини ташкил этади.

Организмлар генлари ёки генлар мажмуасини инсон манфаатларини кўзлаган ҳолда манипуляция қилинишига **ген инженерияси** ёки генетик инженерия деб аталади. Ген инженерияси соҳасининг масади генларнинг ички тузилишини ва хромосомада тутган ўрнини етиёжга мос равишда ўзгартириб, уларнинг фаолиятини идора етишдир. Натижада ҳар қандай тирик мавжудотни, албатта имконият даражасида, масадга яна ҳам кўпирок мувофилаштириш йўли билан саноат миёсида оксил моддалар ишлаб чиқариш, ўсимлик ва ҳайвон турларини инсон етиёжига мос равишда ўзгартириш, ирсий ва юқумли касалликларни аниқ ва тез ташхиз қилиш, ҳамда сабабларни анилаш усуллари яратилмоқда.

XX асрнинг 70 – йилларида малекуляр генетика ва биокимёда янги тажриба технологияси – **генетик (ген) муҳандислик** яратилди. Бу усулнинг асосида хужайрадан ташқарида рекомбинант ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оқибатида генларни соф ҳолда ажратиш, уларни модификация қилиш, бирини иккинчисига улаб “генлар мажмуаси” яратиш, оқибатда бутунлай янги хусусиятига эга бўлган оксил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оксиллар муҳандислиги деб аталди. Вектор ген билан лигаза ферменти ёрдамида бириккандан кейин рекомбинант ДНК ҳосил бўлади. Сўнг бу бирикма (вектор ген) микроорганизм хужайрасига юборилади (*трансформация*) ва у ерда *амплификация* (кўпайиш) амалга ошади. Натижада, бир геннинг бир неча

нусхаси – *клон* ҳосил бўлади. Шунинг учун ҳам бу йўлни *клонлаш* деб аталади.

Бироқ бу усулда бактерияларга клонлаштирилган инсон, ҳайвон ёки ўсимлик генлари тўғридан-тўғри бактерияда фаолият кўрсата олмайди.

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

ДНК клонларини яратиш усуллари ҳамда рекомбинант ДНК технологияси тиббиёт учун зарур бўлган инсон организмида синтез бўладиган ва доривор модда сифатида ишлатиладиган оксил ва пептидларни синтез қилишни йўлга қўйиш катта аҳамият касб этади. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида аминокислоталар (треонин, прольин ва ҳ.к.), ферментлар, гормонлар (инсулин, самотатроп), антибиотиклар ва бошқа биологик фаол моддаларнинг супер-продуцентлари олинган.

Ҳозирда Американинг Эмбрекс компанияси ва миллий институти билан биргаликда фан ва техникани ривожлантириш мақсадида 4,7 миллионлик гранд асосида товук тухумини клонлари яратилди. Кўп тухум берадиган товук тухумининг ядросини нормал тухум хужайрага киритиб имплантация қилиш асосида 95 -100 % гача клонлар яратилди. Бундан ташқари, ҳозирда соя, маккажўхори, пахта, каноп, помидор ўсимликлари устида иш олиб боришмоқда. Маскова институти картошканинг иммунитетни оширувчи таркибида интерферрон сақлаган навларини клонлаштириш устида иш олиб бормоқдалар. Шу асосида ўсимликларнинг пестецид, гербецидларга, қурғоқчиликка, совуққа, турпоқдаги оғир метал тузларига чидамли, таркибида витаминлар сақлаган навларини яратиш устидаги ишлари давом етмоқда.

## **1.2 Ген муҳандислигининг ривожланиш тарихи**

Генетик муандислик биокимё ва молекуляр генетиканинг турли соҳаларида жуда кўп тадиотчиларнинг иши сифатида қабул қилинди. Кўп

йиллар давомида, макромолекулаларнинг асосий синфи бўлмиш оксилларни кўриб чиқилди ва ҳатто генларни “оксил табиатлидир” деб тақлиф етилди. Фақат 1944 йилда, Эйвери, Мак Леод ва Мак Карти генетик маълумот ташувчиси ДНК эканлигини кўрсатдилар. Ўша пайтда нуклеин кислоталарни интенсив равишда ўрганиб борилди. Ўн йилдан сўнг, 1953 йилда, Д. Уотсон ва Ф. Крик ДНК нинг иккиспиралли моделини яратганлар. Шу йил молекуляр биологиянинг туғилган йили ҳисобланади.

Ўз навбатида, 50-60 йилларда генетик код хусусиятларини аниқлиб, 60-й охирида унинг универсаллиги эмпирик тасдиланган еди. Асосий объектлар *E. coli*, вируслар ва плазмидлар бўлиб, шу асосида молекуляр генетикада интенсив ривожланиш кузатилди. Плазмида ва вирусларнинг бутун ДНК молекулалари юқори даражада ўрганиш, тозалаш усуллари ишлаб чиилди, улардаги репликация сайтлари аниқланди. 70-йилларда бир қатор ДНК га таъсир етувчи, ундаги реакцияларни катализловчи ферментлар очди. Генетик муандислик методларни ривожлантиришда энг муҳим ферментлар рестриктаза ДНК лигазлардир ва полимеразалардир.

Генетик муҳандислигининг ривожланиш тарихи уч босичга бўлинади:

**Биринчи босқич**, *in vitro* шароитида рекомбинат ДНК молекулалари ишлаб чиқаришнинг асосий имкониятлари яратилди. Ушбу ишлар турли плазмидалар орқали гибрид олиш билан болиқ. Бошқа тур ва бактерия штаммлари ҳамда уларнинг яшовчанлиги, барарорлиги ва вазифасининг ДНК молекуласига боғлиқлигини билган ҳолда рекомбинат молекулалар яратиш имкониятлари мавжудлиги исботланди.

**Иккинчи босқич**, Прокарёт хромосомаларнинг генлари ва турли плазмидаларнинг барқарорлиги ва ҳаётчанлиги ўрганилди ҳамда улар асосидаги рекомбинат ДНК молекулаларидан оксил ажратиб олиними ўрганилди.

**Учинчи босқич** - векторни ДНК молекуласига киритиш бўйича иш бошланиши, эукаретик генларнинг ўрганилиши, асосан ҳайвонларда

(хужайра генетик аппарати ва ундаги ДНКни кўчириб ўтказишда узатувчи ва қабул қилувчи генлар ўрганилди) амалга оширилди.

Расман, генетик муандислик туғилган сана 1972 йил этиб белгиланди. Бу кунда Стенфорд университетидан П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер ва уларнинг шогиртлари томонидан вирус SV40, бактерияфағлар ва *E. coli* ДНК бўлагини ўз ичига олган биринчи рекомбинат ДНК яратилган.

### 1 жадвал

<b>Ген клонларини яратишнинг тарихий босқичлари</b>
Биринчи ген <b>1973 йил</b> клонланган
Биринчи бактерия генларини клонлаш экспрессияси <b>1974 йил</b> амалга оширилди
Биринчи гибридома <b>1975 йил</b> яратилган
Рекомбинант ДНК технологиясидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш <b>1976 йил</b> бошланган
Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида олинган микроорганизм штамларини патентлаш ҳақидаги қарор <b>1980 йил</b> қабул қилинган
Моноклонал антитело тўпламларидан фойдаланиш мумкинлиги тўғрисидаги қарор <b>1981 йил</b> қабул қилинган. Биринчи марта генларнинг автоматик синтезатори сотувга чиқарилди
Тиббиётда рекомбинант ДНК - инсулини ва ҳайвонлар учун биринчи рекомбинант ДНК дан фойдаланишга <b>1982 йил</b> рухсат берилди
Биринчи маротаба ген экспрессиясидан бир ўсимликдан бошқа турида фойдаланиш мумкинлиги <b>1983 йил</b> исботланди



## 1.3

## Ген

**инженериясида ген клонларини яратиш муаммоси**

Ген мухандислигида клонлаш ютуқлари саноат кўламида ва қишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Хусусан, наслдор қоромол клонлари яратилмоқда, тупроқда ва сувда захарли 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 диагностик марказлар ташкил етилмоқда, шунингдек, ген терапия усуллари такомиллаштирилмоқда.

Бугунги кунда ДНК клонларини яратилишида бир қанча ижобий натижаларга эришиш билан бир қаторда салбий оқибатларга олиб келувчи натижалар ҳам кузатилмоқда. ДНК клонларини яратилишининг барча организмларга мос мукамал услублари хали такомиллашмади. Хозирда фақатгина, асосан микроорганизмлар ва ўсимликлар устида иш олиб борилмоқда. Қисман чорвачилик ва паррандачилик мақсадида хайвонлар устида ҳам кўплаб тажрибалар амалга оширилмоқда. Бироқ бу борада инсонлар устида олиб бориладиган тадқиқотлар маълум даражада чекланган бўлиб, фақат малум бир органларни ўзини ДНК асосида “Органлар фабрикаси” яратиш, имплантация қилиш устидаги буюк тадқиқотлар давом етмоқда. Хозирги вақтда кун тартибида ОИТС (СПИД), гепатит С ва парранда гриппининг кўзғатувчиси H5N1 вирусига қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди.

ДНК клонларини яратиш усуллари муаммолари билан шуғулланадиган олимларнинг асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараёни асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан

боғлиқ эмас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оксил моддаларини керакли меъёрда ушлаб туриш, уларни модификацияга учраб, микроорганизм хужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғлиқдир[3].

Инсон клонини яратиш биринчи навбатда бу этик муаммодир. Инсон – бу табиат мўжизаси, Оллоҳнинг бебаҳо неъматиди. Қолаверса, бунга дин ҳам қатъий қарши, улар инсонни ишлаб чиқариш махсулотига айланишини хохламасликлари ҳақида фикр билдирмоқдалар. Тиббиёт еса, агар клон яратилса ҳам уларнинг тана аъзолари фақат қурилиш материяли бўлиб хизмат қилиши керак деб ҳисоблайди, бу орқали минглаб инсонлар ҳаётини сақлаб қолиш мумкин, лекин ҳозир бунга ҳам рухсат йўқ. Бу борада кўплаб олимлар "тана таъмирлаш тўпламлари" яратиш имконини муҳокама қилинди: янги туғилган чақалоқлар тўқималарини таминловчи хусусий генларини банкда музлатилган ҳолда сақлаб, керак вақтда клон яратиб оламиз деб ҳисобладилар. Бедаво касалликларни даволаш учун ушбу тўпламлардан кўчириб тўқималар ҳосил қилиш мақсадида яратилган бўлиши мумкин. Мисол учун янги туғилган чақалоқлардан ДНК асосида тўқималар олинган ва улар лозим қадар сақланди. Керак вақтда олиб ишлатилади. Бироқ ўша даврда АҚШ президенти Билл Клинтон унга қарши эканлиги ҳақида фикр билдириб, тадқиқотларни 5 йилга тўхтатиш ҳақида қонун чиқарди.

1997 йил 23-февралда Англиянинг Еденбург шаҳридаги Рослин институтида шотландиялик олим Ян Вилмут биринчи бўлиб ген инжинерлиги ёрдамида Долли деб номланган қўйнинг клонини яратди ва бу ихтироси жуда кўп шов-шувларга сабаб бўлди. Бу тажрибага қадар ядроси олиб ташланган зиготага бошқа эмбрионал хужайралардан олинган ядро кўчирилиб ўтказилар ва оксил бўлган трансплант тухум хужайра ўғай она бачадонига имплантатсия қилинар эди. Вилмут эришган натижаларнинг Гёрдон тажрибасидан ва боша юқорида келтирилган натижалардан фарқи, у илк бор ядроси олиб ташланган қора бошли қўйнинг овоцитларига оқ бошли қўйнинг елинидан олинган хужайранинг ядросини, яъни вояга етган организмнинг

соматик хужайрасидан ажиратилган ядрони киритди. Ҳосил бўлган сунъий зигота урғочи кўйнинг тухум йўлида ривожланиб морула босқичини ўтагач қора бошли кўйнинг бачадонига трансплантация қилинди. Бундай усул билан ҳосил қилинган 277 та зиготадан фақат биттаси эмбрионал ривожланишнинг барча стадияларини ўтаб Долли кўзичоғи туғилишига олиб келди. Тажрибанинг энг ажойиб томони шундаки, табақалашган ситоплазма билан зиготанинг ядроси уйғунлашган ҳолда фаолият кўрсатиши шу пайтгача ҳеч ким томонидан исботланмаган эди. Олим буни мумкинлигини тажриба орқали исботлаб берди. Лекин 2003-йил бу кўзичоқ ўпка шамоллашидан вафот этди, яъни у 7 йил яшади ва бемахал ўлим топди. Долли ўлиmidан сўнг ундан тулум ясаб, Еденбург музейига қўйишди, энди бу клон бир умр яшайди.

1 расм



Шундан кейин, рус олимлари касбий осётр баликларининг клонларини яратиш устида иш олиб бордилар, АҚШ да маймунларни клонини яратиш бўйича тажрибалар ўтказилганда яхши натижага эришилмади, бунда баъзан ДНК ошиб кетади ё камайиб, балки шунинг учундир одам клонини яратиш мувофақият билан тугашига ишониш қийиндир. Шунга қарамай, вояга етган организм соматик хужайра ядросидан клон яратишда фойдаланиш айрим мулкдор шахсларда ўз шахсини колонини яратиш истагини уйғотди. Албатта

бу йўл билан жисмонан ҳар қандай одам клонини яратиш мумкин, лекин руҳан ва ақл жиҳатдан яратилган клон оригинал егасига ўхшаш – ўхшамаслиги назарий жиҳатдан муаммодир.

1998 йил инглиз олими Арпад Пустаи биринчи марта генетик ўзгартирилган картошка яратиб каламушга едиришганида жиддий оқибатларга олиб келган еди. Бунда каламушнинг ички органлари ва иммун тизими зарарланиб, ҳайвонда ичак тракти, жигар, милкларида ўзгаришлар пайдо бўлган. Аммо енг дахшатлиси - мия ҳажми камайган. Шунинг учун кўпгина мамлакатлар генетик ўзгартирилган махсулотлар яратилишига ва четтан кириб келишига қарши.

Ҳозирда турли хил фикрлар мавжуд: агар клон яратилса ҳам ундан онгли мавжудот пайдо бўладими ёки маняк, террористларнинг иккинчи тури пайдо бўладими? Уларни тарбиялаш, атроф муҳитга мослаштириш қандай кечади? Улардан донор сифатида фойдаланамиз деб ундан ҳам кўпроқ фожеаларга сабабчи бўлинмасмикинми?

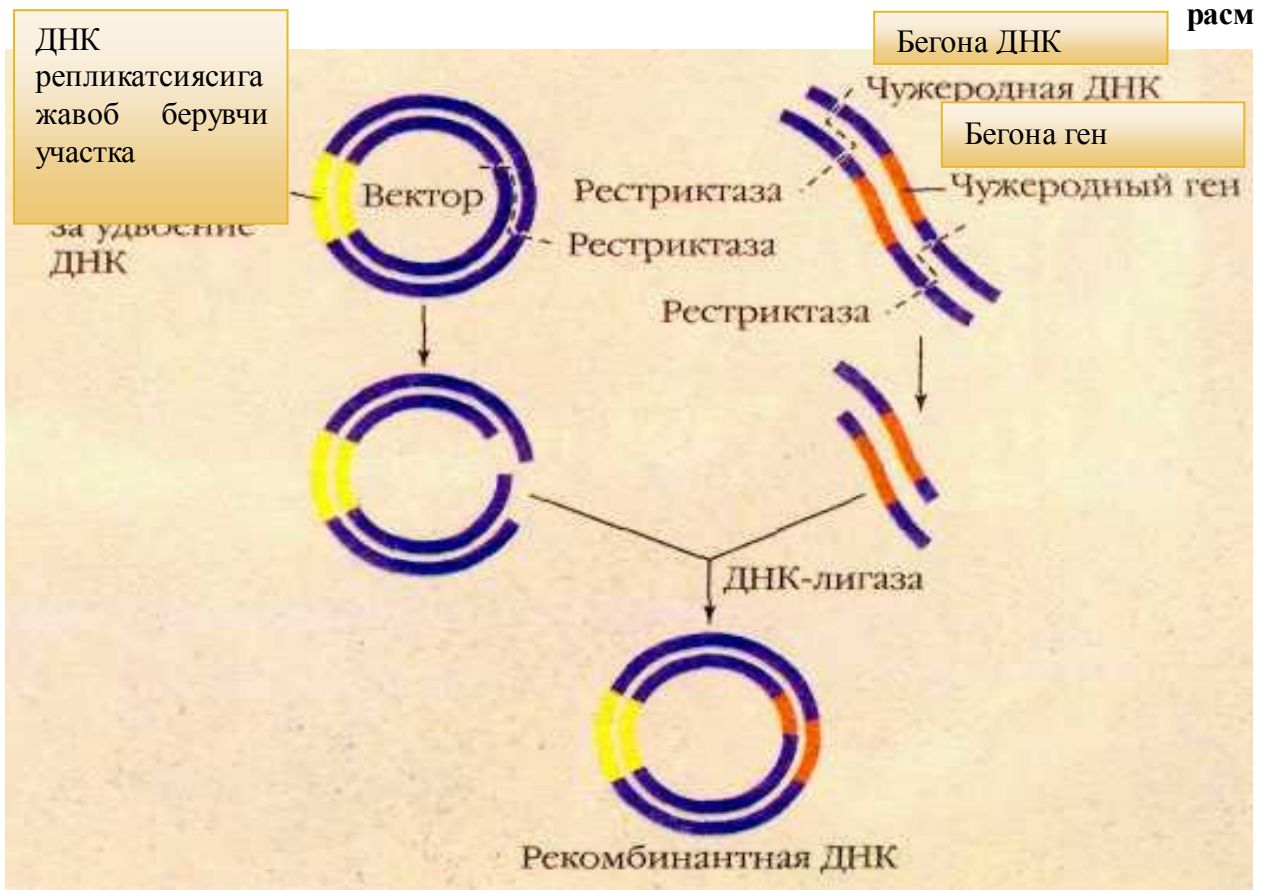
Парижда малекуляр биологияда клонлаш устида ишлар олиб борилмоқда. Улар бу орқали авлодларда кузатиладиган ирсий касалликларни бартараф этишда соғлом генлардан битта клон яратиш керак, деб ҳисоблайдилар. Бундан ташқари, фарзанд кўрмаганлар учун ёки гомосексуаллар учун ҳам клон яратиш мумкин деб ҳисоблайдилар.

Ҳозирги вақтда, ноёб қорамолларни клонлаш устида тажрибалар олиб борилмоқда, бу қишлоқ хўжалигида фойда келтиради. Бундан ташқари, “қизил китоб” га киритилган ҳайвон ва ўсимликларни шу йўл билан сақлаб қолиш устида иш олиб борилмоқда.

## II-БОБ. ДНК КЛОНЛАРИНИ ЯРАТИШДАГИ ТАДҚИҚОДЛАРНИНГ МАНБАЛАРИ ВА УСУЛЛАРИ

### 2.1. Рекомбинант ДНК олиш технологияси ҳақида умумий тушунча

**ДНК рекомбинацияси.** *Рекомбинация* – лотинча *re* – қайтадан ва *combinatio* – бирлаштирмақ сўзларидан келиб чиққан бўлиб, бу турли ДНК молекулаларининг специфик тарзда узилиши ва боғланиши орқали генетик материаллар алмашилишидан ташкил топган. Рекомбинант ДНК олиш технологиясида умумий ҳолатдаги ягона усуллар ишлаб чиқилмаган, бироқ кўпгина ҳолатларда рекомбинант ДНК олиш технологияси қуйидаги схема асосида амалга оширилади (2-расм).



Рекомбинант ДНК олиш технологиясининг асосий босқичлари қуйидаги кўринишда амалга оширилади:

1. Донор организм хужайрасидан табиий ДНК молекуласи ажратиб олинади (бунда олинган ДНК молекуласи клонланувчи ДНК, ўрнатилувчи ДНК, ДНК-нишон, бегона ДНК деб ҳам аталади). Сўнгра ДНК фрагменти ферментатив гидролиз натижасида узилади ва бошқа ДНК занжирига (клонлаш вектори) уланади. Хосил бўлган, янги рекомбинант ДНК клонланувчи *ДНК га боғланаган вектор конструкция* деб аталади.

2. Хосил қилинган вектор конструкция хўжайин – хужайра (*реципиент*) таркибига киритилади. Бу ерда ДНК занжири репликацияланади ва нусхаланади. Бу жараён *трансформация* деб аталади.

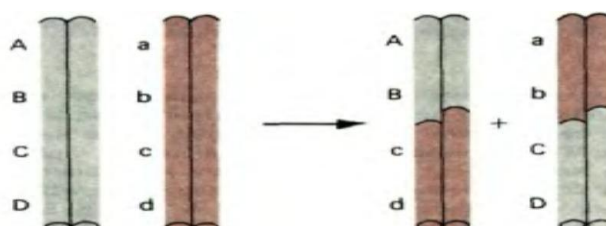
3. Таркибида рекомбинант ДНК мавжуд бўлган хужайралар (*трансформацияланган хужайралар*) ажратиб олинади.

4. Хўжайин хужайра таркибида клонланган ген кодловчи янги махсулот – специфик оқсил молекулалари хосил қилинади.

ДНК рекомбинациясининг учта тури мавжуд ҳисобланади:

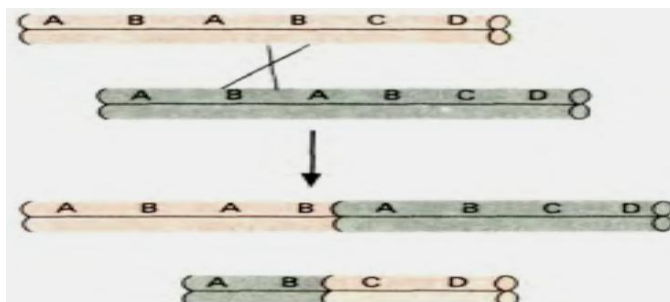
1. *Умумий рекомбинация ёки гомологик рекомбинация;*
2. *Сайт – специфик рекомбинация;*
3. *Тасодифий ёки гомологик бўлмаган рекомбинация.*

**Умумий рекомбинация** жараёни ўзаро ўхшаш бўлган ёки гомологик нуклеотидлар кетма – кетлиги соҳалари бўйича амалга ошади. Ушбу ДНК рекомбинацияси жараёни кўп ҳолатларда *гомологик рекомбинация* ёки *кроссинговер* деб ҳам аталади. Умумий рекомбинация жараёнида ДНК занжирида иккита гомологик соҳаларнинг ажралиши кузатилиб, ҳар бир сегментнинг охириги қисмлари бўйича ўзаро боғланиш амалга ошади ва бунда хосил бўлган иккала молекула таркибида ДНК рекомбинациясида иштирок этувчи иккала фрагментларнинг қисмлари мавжуд бўлиши таъминланади (3-расм).



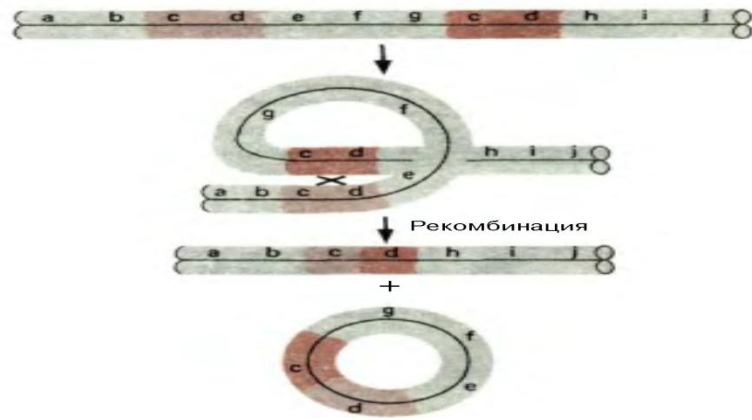
**3-расм. ДНК занжирининг гомологик рекомбинацияси ёки кроссинговер.**

ДНК занжирида ушбу кўринишдаги рекомбинацияда соҳаларнинг ажралиши ва ўзаро бирлашишида жуда кам ҳолатларда ўзаро мос тушмаслик ҳолати ҳам қайд қилинади. Одатда, ДНК умумий рекомбинацияси турли хил ДНК молекулаларининг ўзаро гомологик ёки аллел соҳалари ўртасида амалга ошади, бироқ айрим ҳолатларда бу турдаги ДНК рекомбинацияси ўзаро гомологик бўлган, лекин ўзаро аллел бўлмаган соҳалар ўртасида ҳам амалга ошиши кузатилади. Ушбу ҳолатда ДНК рекомбинация маҳсулотларидан бири ДНК соҳасини йўқотади, бошқа бири эса «қўшимча қисм»га эга бўлиб қолади. Ушбу кўринишдаги ДНК рекомбинацияси одатда *тенг бўлмаган кроссинговер* ҳам деб аталади (4-расм).



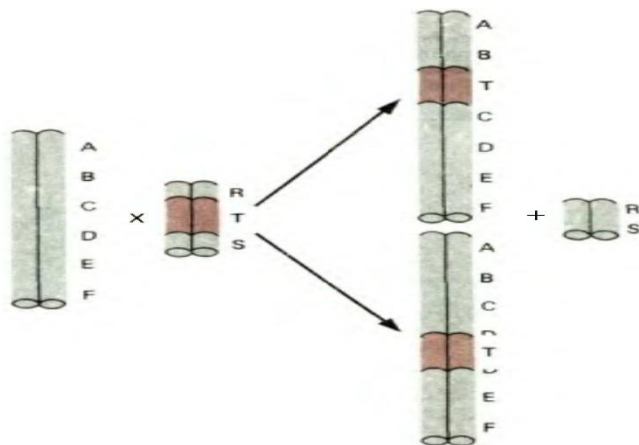
**4-расм. ДНК занжирининг тенг бўлмаган ҳолатдаги кроссинговер рекомбинацияси.**

Айрим ҳолатларда ДНК рекомбинацияси битта хромосоманинг ўзининг аллел бўлмаган соҳалари ўртасида ҳам амалга ошиши кузатилади, масалан бу ҳолат ДНК таркибидаги такрорланувчи кетма – кетлик соҳалари бўйича амалга ошиши мумкин (5-расм).



5-расм. ДНК молекуласи ичида амалга ошувчи рекомбинация.

Айрим ҳолатларда эса рекомбинация жараёнида реципрок бўлмаган ҳолат кузатилиб, ҳосил бўлган якуний маҳсулотнинг бири дастлабкисидан бирига ўхшаш бўлиши, иккинчиси эса фарқланиши кузатилади. Ушбу кўринишдаги рекомбинация ҳолати *ген конверсияси* деб аталади. **Сайт – специфик рекомбинация** жараёнида иккала рекомбинацияланувчи ДНК молекулалари бўйича ёки битта ДНК молекуласининг ўзида узилиш соҳалари (сайтлари) ва боғланиш соҳалари ўзаро етарлича даражада қисқа специфик гомологик нуклеотидлар кетма – кетлигидан ташкил топган бўлиб, ўз навбатида 25 тадан ортиқ бўлмаган нуклеотидлардан ташкил топади. Ушбу кўринишдаги қисқа кетма – кетлик рекомбинацияда қатнашувчи ДНК молекулаларининг фақат биттасида ёки иккаласининг таркибида ҳам бўлиши мумкин (6-расм).

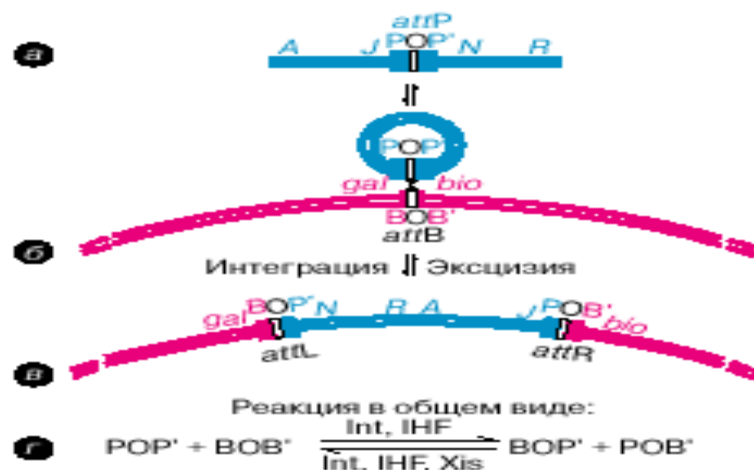


6-расм. ДНК занжирининг сайт – специфик рекомбинацияси. Бунда специфик сайт (соҳа) рекомбинацияда иштирок этувчи ДНК



фрагментларининг фақат биттасида келтирилган. Рекомбинацияда специфик хисобланаган сайтлар T – соҳанинг охириги қисмида жойлашган бўлиб, соҳанинг ўзи эса ДНК занжирида тасодифий кетма – кетлик асосида, масалан В ва С соҳалар (юқорида кўрсатилган) ўртасида ёки D соҳа (қуйи қисмда акс эттирилган) доирасида рекомбинацияланиши мумкин.

Бунда биринчи вариантга мисол қилиб, эукариот ва прокариот хужайраларида айрим ҳаракатчан элементларнинг транспозицияси жараёнини келтириш мумкин, иккинчи вариантга мисол қилиб эса *E.coli* хромосомаларида  $\lambda$  – фагининг ДНК молекулаларининг интеграция – ажралиш жараёнларини келтириш мумкин. Сайт – специфик рекомбинация жараёни ёрдамида ачитки хужайраларида жуфтлашиш типлари алмашилишида хромосомалар таркибида ДНК занжирининг дастурлаштирилган асосда қайта ташкилланиш механизмлари амалга ошади. Шунингдек, бу типдаги рекомбинация жараёни антителоларнинг турли хиллик хусусиятларини ҳам таъминлайди. Шунингдек, тадқиқотлар давомида ДНК занжирининг умумий рекомбинация тури амалга ошишида ҳоҳлаган гомологик кетма – кетликлар бўйича бир хилдаги фермент комплекслари талаб қилиниши аниқланган, сайт – специфик рекомбинацияда эса ҳар бир ҳолатда ўзига хос ферментлар комплекслари функция бажариши кузатилиши таъкидланган.



**7-расм. λ фагининг сайт специфик рекомбинацияси кўриниши.** Бу ерда иккита кўш ҳолатдаги ДНК занжири акс эттирилган. Кўк рангда фаг ДНК занжири кўрсатилган, қизил ранг билан *E. coli* ҳалқасимон шаклдаги хромосомаси таркибида attP ва attB сайтлар бўйича P, P' ва B, B' кетма – кетликлар ифодаланган. A, J, N ва R – фаг генларини ифодалайди.

**Гомологик бўлмаган рекомбинация.** ДНК занжирида ўзаро гомологик бўлмаган нуклеотидлар кетма – кетлиги бўйича амалга ошувчи рекомбинация прокариот ва ачитқилар хужайраларида кам учрайди, бу турдаги рекомбинация жараёни сут эмизувчилар хужайраларида кенг тарқалган ДНК рекомбинация тури ҳисобланади. ДНК занжирининг гомологик бўлмаган ҳолатда рекомбинациясига мисол қилиб, вирус ёки плазмида ДНК занжирининг хайвон хужайраси ДНК занжири таркибига тасодифий ҳолатда қўшилиши жараёнини келтириш мумкин.

Рекомбинант ДНК олиш технологияси молекуляр биология, энзимология соҳасида эришилган илмий ютуқлар асос сифатида фойдаланилади, шунингдек бу жараён давомида нуклеин кислоталар, бактерияларнинг молекуляр генетикаси, хромосомадан ташқарида жойлашган бактерия элементлари (плазмидалар) ҳақидаги билимлардан фойдаланилади. Рекомбинант молекулаларнинг конструкциясида бир бутун комплекс ферментлар тизимидан фойдаланилади.

Шунингдек, рекомбинант ДНК олиш технологиясида махсус фермент тизимлари фойдаланилади.

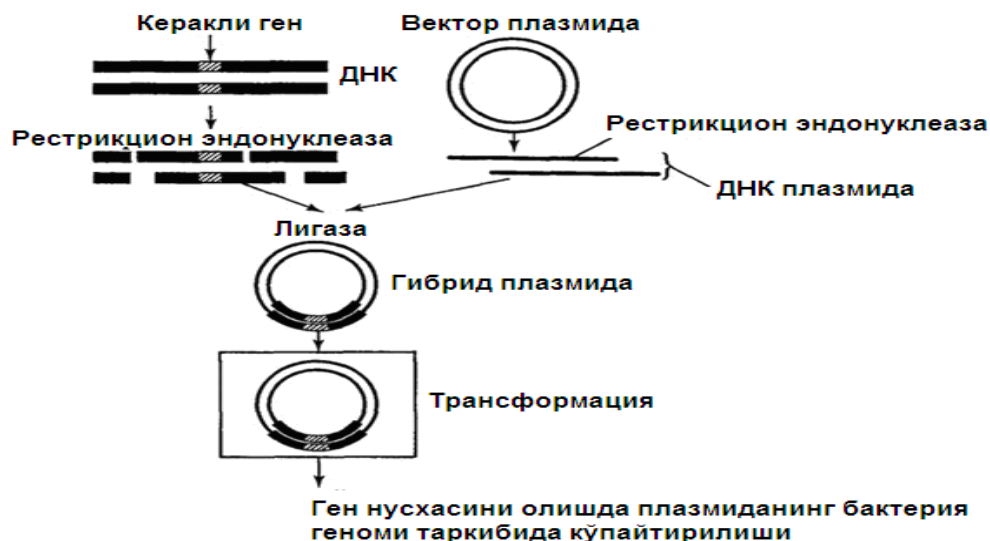
## **2.2. Рекомбинант ДНК олиш технологиясида фойдаланиладиган фермент тизимлари**

Рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ва ДНК клонларини яратишда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

- ДНК фрагментларини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);

- ДНК матрицасида ДНКни (полимеразалар) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи, тикувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

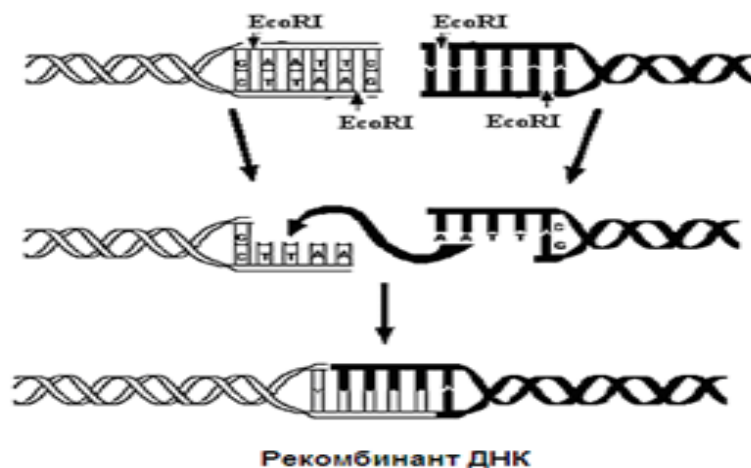
**Рестриктазалар.** Клонирлаш учун ген муҳандистлигида фойдаланиладиган ферментлар ичида рестриксиа эндонуклеазалари – *рестриктазалар* муҳим аҳамиятга эга. Биринчи марта бактерияларда ДНК рестриксиа-модификация системасининг бир қисми сифатида очилган, кейинчалик эса бу ферментлар, рестриксиа сайтлари деб аталган, булар маълум нуклеотид кетма-кетликлари мавжуд бўлган икки занжирли ДНК молекулаларини гидролизлайди[18]. Рестриксион эндонуклеазаларнинг кашф қилиниши йўналишидаги дастлабки тадқиқотлар 1953-йилда амалга оширилган, бунда *E. coli* бактерия штаммида маълум бир ДНК молекуласи киритилган ҳолатда ДНК молекуласининг кичик фрагментларга ажралиши қайд қилинган. 1966-йилда бу ҳодиса асосида бевосита хўжайин бактерия хужайраси таркибида ДНК молекуласининг специфик тарзда репликация жараёнидан кейин метилланган соҳаларга эга бўлиши, фрагментларга узилишга қаршилик қилиши аниқланган. Бактерия хужайраси таркибида рестриксион – модификация жараёни амалга оширишида ҳар бир бактерия штаммида ДНК модификацияловчи фермент – метилаза ва ДНК молекуласини узувчи фермент тизими – рестриксион эндонуклеаза мавжудлиги аниқланган. [19]



**8-расм. Рестриксион эндонуклеаза ферменти иштирокида керакли генни трансформациялаш жараёнининг умумий схематик кўриниши.**

Бу иккала фермент тизими ДНК занжири таркибида нуклеотидлар кетма – кетлигини 4 – 8 жуфт нуклеотидлар асосида таниб олиши (таниш сайти) амалга ошади. Бунда **метиლაза** ферменти ДНК занжири таркибида маълум бир нуклеотидлар (аденин ёки цитозин) асослари быйича модификасияни амалга ошириб, ДНК молекуласининг рестриксион эндонуклеазалар таъсирида узилиши ва бегона геном материалининг геном таркибига киришига қаршилик кўрсатиши аниқланган [13]. Рестриктаза ферментининг ДНК занжирида метилланмаган соҳалар быйича узишни амалга ошириш механизми Мезелсон ва Юан томонидан 1968 йилда аниқланган[19]. Рестриксион эндонуклеаза ферменти юқори даражада спесификлик хусусиятини намоён қилади. 1970 йилда Смит ва Вилкокс томонидан *Naemophilus influenzae* хужайраси таркибида ДНК молекуласини қатъий тартибда тегишли нуклеотидлар соҳаси быйича кесилишини амалга оширувчи фермент аниқланган ва Hind III деб номланган. Бу фермент рестриксион эндонуклеаза ферментининг биринчи марта тоза ҳолатда ажратиб олинган намунаси ҳисобланади[27]. 1973 йилда Смит ва Натанс томонидан рестриксион эндонуклеаза ферментлари номенклатураси қоидалари ишлаб чиқилган бўлиб, қуйидаги пунктларни ыз ичига олган:

1. Ҳар бир рестриксион эндонуклеаза ферментининг номланишида уни ажратиб олинган бактерия авлоди номидан фойдаланилади. Масалан, *Streptomyces albus* – *Sal*, *Escherichia coli* – *Eco* кўринишида[18].
2. Шунингдек, талаб қилинган ҳолатларда бактерия штамми кўрсатилади – масалан, *Eso B*.
3. Битта бактерия шужайраси таркибидаги турли хилдаги фарқланувчи рестрикция – модификация тизимлари рим рақамлари билан ифодаланади. Масалан, *Hind II*, *Hind I*, *Hind III* (*Haemophilus influenzae*)[18].
4. Рестриктазалар R ҳарфи билан (*R Hind III*), метилазалар – M ҳарфи билан белгиланиши қабул қилинган (*M Hind III* [27]).



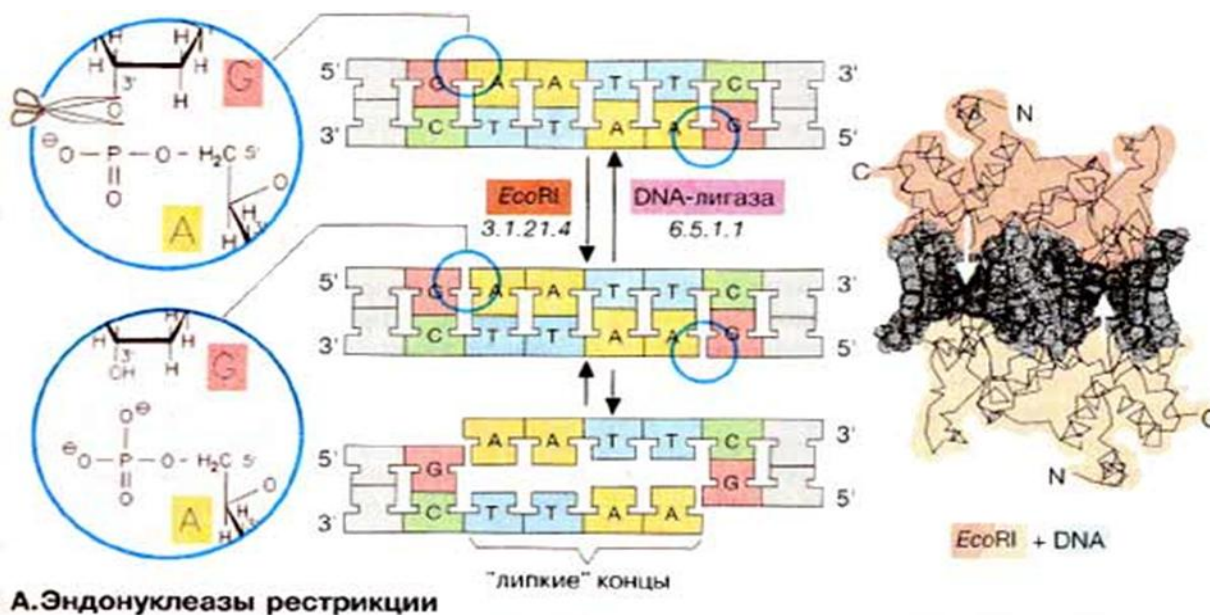
**9-расм. *E.coli* бактерия хужайрасидан ажратиб олинган *EcoRI* рестриксион эндонуклеаза ферментидан рекомбинант ДНК олиш технологиясида фойдаланиш схемаси.**

1978 йилда Робертс томонидан рестриксион эндонуклеазаларни ўрганиш бўйича тадқиқотлар давомида қуйидаги ҳолатларда номланишга ўзгартиришлар киритиш таклифи берилган:

*Haemophilus parainfluenzae* – *Hpa I*.

*Haemophilus parahaemolyticus* – *Hph I*.

**10-расм**



Рестриктазалар номи бактериялар тури номининг биринчи шарфлари билан белгиланади, масалан, *Eco* – *E. coli*.

Хар бир рестриктаза тўрт ёки кўпроқ махсус нуклеотид жуфтларни таниб олиб боғланади ва ДНК молекуласини кесади. Айрим рестриктазалар ДНК қўш занжирини қайчи сингари шартта икки бўлакка 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 (3-жадвал).

Шу билан бирга қўш занжир ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар ҳам мавжуд (*Aat II*, *Acc III*, *Ara 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 муҳандислиги ва ДНК клонлашда кенг қўлланилади.

Бир турдаги рестриксион эндонуклеаза ферменти таъсирида ДНК молекуласи 5'-охирги учлар бўйича ёпишқоқ учларни юзага келтириши кузатилса, бошқа типдаги рестриктаза иштирокида узилишда эса 3'-охирги қисмлар бўйича учлар ҳосил бўлиши қайд қилинади (13-расм).

5'-TTT<sup>^</sup>AAA-3'

5'-G<sup>^</sup>AATTC-3'

5'-GACGT<sup>^</sup>C-3'

3'-AAA<sup>^</sup>TTT-5'  
Тўмтоқ учлар

3'-CTTAA<sup>^</sup>G-5'  
5'-Ёпишқоқ учлар

3'-C<sup>^</sup>TGCAG-5'  
3'- Ёпишқоқ учлар

**11-расм. ДНК молекуласининг рестриқцион эндонуклеазалар таъсирида узилиш усуллари.**

Ҳозирги кунгача 500 дан ортиқ хилма хил рестриктазалар тоза ҳолда ажратиб олинган ва ўрганилган. Одатда, микроорганизм ирсий моддасининг хромосомаси бир нечта 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 рестриқцион эндонуклеазалардан фойдаланиб, кўплаб бўлақларга бўлиш мумкин[3]. Полимераза занжирли реакция (ПСР) усулининг ривожланиши билан рестриктазалар ёрдамида амплифицирланган олигонуклеотидларни парчалаш зарурати туғилмоқда, яъни рестриқсия сайти ўз учлари бир ёки бир неча нуклеотидлари билан фланкирланган сайтлари миқдорига боғлиқ равишда рестриқсия сайтларини парчалаш хусусиятидаги аниқ боғлиқлик аниқланган. Рестриктазаларнинг бундай хусусиятини икки занжирли ДНК молекуласи охириги учларида рестриктазалар таний оладиган сайтни ўз ичига олувчи калта бир занжирли участкалари ҳосил бўлиши билан ДНК нинг иккиламчи спиралининг локал эриши юз беради. Бундай локал эришни олигонуклеотидларнинг рестриқсиясини ўтказиш вақтида реакцион аралашма ҳаракатини ишга тушириш билан олдини олиш мумкин. Бу маълумотлар амалий ген муҳандислиги учун катта аҳамиятга эга бўлгани учун улар 2-жадвалда кўрсатиланган[18].

**2-жадвал**

**Айрим тарқалган рестриктазалар ёрдамида ДНКни қисқа кетма-кетликларга узиш самараси.**

Рестриктазалар	Рестриқсия сайти атрофидаги олигонуклеотидлар	Занжир узунлиги	Инкубациядан сўнг олигонуклеотидларни узулиш фоиизи
----------------	---	-----------------	---

	кетма кетлиги		2 soat	20 soat
<i>Bam</i> HI	CGGATCCG	8	10	25
	CGGGATCCCG	10	>90	>90
	CGCGGATCCCGC	12	>90	>90
<i>Bgl</i> III	CAGATCTG	8	0	0
	GAAGATCTTC	10	75	>90
	GGAAGATCTTCC	12	25	>90
<i>Cla</i> I	CATCGATT	8	0	0
	GATCGATC	8	0	0
	CCATCGATGG	10	>90	>90
	CCCATCGATGGG	12	50	50
<i>Eco</i> RI	GGAATTCC	8	>90	>90
	CGGAATTCCG	10	>90	>90
	CCGGAATTCCGG	12	>90	>90
<i>Hind</i> III	CAAGCTTG	8	0	0
	CCAAGCTTGG	10	0	0
	CCAAGCTTGGG	12	10	75
<i>Nhe</i> I	GGCTAGCC	8	0	0
	CGGCTAGCCG	10	10	25
	CTAGCTAGCTAG	12	10	50
<i>Pst</i> I	GCTGCAGC	8	0	0
	TGCACTGCAGTGCA	14	10	10
<i>Pvu</i> I	CCGATCGG	8	0	0
	ATCGATCGAT	10	10	25
	TCGCGATCGCGA	12	0	10
<i>Sac</i> I	CGAGCTCG	8	10	10
<i>Sac</i> II	GCCGCGGC	8	0	0
	TCCCCGCGGGGA	12	50	>90
<i>Sma</i> I	CCCGGG	6	10	10
	CCCCGGGG	8	10	10
	CCCCCGGGGG	10	0	50
	TCCCCCGGGGGA	12	0	>90
<i>Spe</i> I	GACTAGTC	8	10	>90
	GGACTAGTCC	10	10	>90
	CGGACTAGTCCG	12	0	50
	CTAGACTAGTCT AG	14	0	50
<i>Sph</i> I	GGCATGCC	8	0	0
	CATGCATGCATG	12	0	25



	ACATGCATGCATGT	14	10	50
<i>Xba</i> I	CTCTAGAG	8	0	0
	GCTCTAGAGC	10	>90	>90
	TGCTCTAGAGCA	12	75	>90
	CTAGTCTAGACTAG	14	75	>90
<i>Xho</i> I	CCTCGAGG	8	0	0
	CCCTCGAGGG	10	10	25

**Изох:** Қалин курсив билан рестирикция сайтлардаги кетма кетлик кўрсатилган. [18].

**Лигазалар.** 1961 йили Мезельсон ва Вейгл фаг бир мисолида рекомбинациянинг моҳияти ДНК молекулаларининг кесилиши ва кейинчалик бирлашишидан иборатлигини кўрсатганлар. Бу ДНК ва РНК фрагментларини тикилишида қатнашадиган ферментларни топишга сабаб бўлган. 1967 йили бундай фермент топилган ва улар ДНК-лигазалар деб номланган. Бу фермент нуклеин кислотанинг 2 занжирли молекуласидаги фосфодиэфир боғни катализлайди. Бошқача айтганда, ДНК-лигазалар ёнма-ён жойлашган нуклеотидлар аро боғ ҳосил қилиб бирлаштиради. ДНК-лигазалар ДНК репарацияси жараёнларида, репликацияда жуда керакдир.

ДНК-лигазалар кофакторга бўлган зарурияти ва таъсир қилиш хусусиятига қараб 2 типга ажратилади:

1. *E.coli* нинг ДНК-лигазаси кофактор сифатида дифосфопиридиннуклеотид,
2. Т4- фагининг лигазаси эса  $Mg^{2+}$  иштирокида АТФ ни ишлатади[5].  
Ген мухандистлигида Т4-фагидан олинган лигазалар кўп ишлатилади.

**Қайтар транскриптаза** РНК асосида ДНК ни ҳосил қилиш бўлиб, 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)-тутовчи 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. Ҳосил бўлган икки занжирли ДНКни клонланланаётган векторларга киритиш, ДНКнинг гибрид молекулалари таркибида кўпайтириш ва кейинги тадқиқотларда ишлатиш мумкин.

Маълумки, тирик организм хужайраларида ферментлар биологик катализаторлар сифатида муҳим аҳамиятга эга ҳисобланади. Ҳозирги кунда хужайраларда функция бажарувчи асосий ферментларнинг структуравий ва функционал фаоллик механизмлари етарлича даражада ўрганилган. Жумладан, ДНК молекуласи рестрикция – модификация жараёни амалга ошишида иштирок этувчи рестрикция эндонуклеаза (рестриктаза) ферменти структура тузилиши ва функцияси ҳақида етарлича даражада батафсил маълумотлар йиғилган. Ҳозирги вақтда рестриктаза ферменти биотехнология жараёнларда илмий тадқиқотларда ва шунингдек амалий жиҳатдан муҳим ҳисобланган ферментлардан бири ҳисобланади (7-расм).

### 2.3 ДНК клонларини яратишда қўлланиладиган плазмида, фаг векторлари, транспозонлар

Бактерия ва тубан эукариот организмлар хужайраларида асосий хромосомадан ташқари, кичик ўлчамга эга бўлган ҳалқасимон ёки чизиксимон структурали, автоном кўпайиш (репликация) хусусиятига эга бўлган қўшимча ДНК малекуласи 1952- йилдан **плазмидалар** деб аталади. Плазмида ДНК си хужайра геномининг 1-3% ини ташкил этиб, кўпи билан 3-10 тагача генларни ўзида сақлайди. Ирсий аппаратнинг шу кам қисмининг ўзи одатда бактериялар хромосома кодламайдиган муҳим генетик белгиларни кодлайди. Масалан, улар бактерия хужайраларини конюгатсиялаш учун керакли информацияни сақлайди. Улар хужайранинг озуқа манбаи сифатида коплаб мураккаб бирикмаларни сарфлаши учун ёрдам беради, ҳамда турли токсик агентларга нисбатан, айниқса антибиотикларга чидамлилигини таъминлайди. Шу сабабдан рекомбинант ДНК олиш таҳлилида вектор сифатида плазмидалардан фойдаланилади[1].

Плазмидалар ўз хусусиятига кўра иккига бўлинади:

*Биринчиси* - транспозон ёки бактериофаг ирсий молекуласи каби хужайра асосий хромасомасининг махсус ДНК изчиллигини кесиб, рекомбинация бўла оладиган плазмидалар. Бундай рекомбинацияланувчи плазмидалар трансмиссибл, яъни наслдан-наслга ўтувчи плазмидалар деб аталади. Трансмиссибл плазмида асосий хромосомага бириккандан кейин ўз мустақиллигини йўқотади. Асосий хромосомадан мустақил равишда ўз-ўзини репликация қила олмайди. Айни пайтда бундай плазмидаларда жойлашган генлар асосий хромосомада ўз фаолиятини бажаради. Хужайра бўлинганда рекомбинацияланувчи плазмида генлари асосий хромосома генларига бириккан ҳолда наслдан-наслга ўтади. Бундай кучли назорат остида кўпаювчи плазмидалар *эписомлар* дейилади.

*Иккинчи* - тоифа плазмидалар автоном ҳолда репликацияланувчи плазмидалар деб аталади. Бундай плазмидалар асосий хромосомага бирика олмайди, асосий хромосомалардан мустақил равишда ўз-ўзини репликация

йўли билан ўнлаб ва ҳатто юзлаб марта кўпайтира олади. Автоном плазмидалар бактерия ёки замбуруғ бўлинганда қиз хужайралар орасида тасодифий равишда тақсимланади. Шу билан бирга автоном плазмида бир хужайрадан иккинчисига хужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидан ўта олади.

Вируслар билан прокариот хужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг хужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар қўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия хужайрасига кўчириб ўтказадиган система -плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халқали молекулалар - плазмидалар ва мўътадил вируслар **вектор** деб аталади. Вектор ген билан лигаза ферменти ёрдамида бириккандан кейин рекомбинант ДНК ҳосил бўлади. Кейин, бу бирикма (вектор ген) микроорганизм хужайрасига юборилади (трансформация) ва у ерда амплификация (кўпайиш) амалга ошади.

### 3 жадвал

#### Кенг қўлланиладиган баъзи бир векторлар тавсифи

Векторлар	Нусхалар микдори	Ўлчами, нуклеотидлар сони
pBR 322	40-50	4,4
pACY 184	~20	4,0
λ Chron 4A	100-200	41,8
космида pHС 79	~20	6,4
p trp ED5-1	40-50	6,7

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

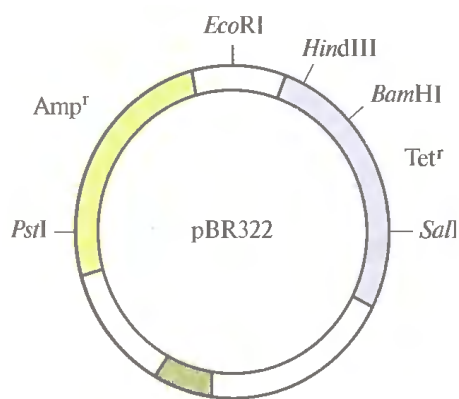
**КЛОН - деб бирдан-бир олдинги хужайрадан келиб чиққан хужайралар популяциясига айтилади.** Клонлаш асосан мутант хужайралар олиш учун ишлатилади. Молекуляр клонлаш ДНК нинг аниқ бир намунасини тоза ҳолда кўпайтиришдан иборат.

Плазмидалар автоном тарзда репликацияланувчи генетик элементлар сифатида клонланувчи ДНК узатилиши жараёнида, яъни рекомбинант ДНК олиш технологиясида вектор сифатида фойдаланиш имкониятлари юқори ҳисобланади.

Бироқ, табиий шароитларда кўпинча ҳолатларда плазмидалардан «юқори даражадаги сифатли» вектор сифатида фойдаланиш имкониятлари чекланганлиги таъкидланган. Бунда плазмидалардан вектор сифатида фойдаланишда қуйидаги хусусиятларига катта эътибор қаратилади:

1. Плазмиданинг ўлчамлари унча йирик бўлмаслиги, масалан *E.coli* бактерияси хужайрасида экзоген ДНК занжирининг киритилиши плазмиданинг ўлчамлари 15 та нуклеотид кетма – кетлиги узунлигидан ортган ҳолатларда самарадорлиги пасайиши қайд қилинган.
2. Плазмида таркибида рестрикция сайтининг хусусиятлари.
3. Плазмида таркибида реципиент хужайраларни танишда битта ва ундан ортиқ сондаги генетик маркерларнинг мавжудлиги.

Шу сабабли генетик инженерия соҳасида рекомбинант ДНК яратиш технологиясида қўллаш мақсадларида плазмидаларни модификацион ўзгартириш ишлари амалга оширилади.



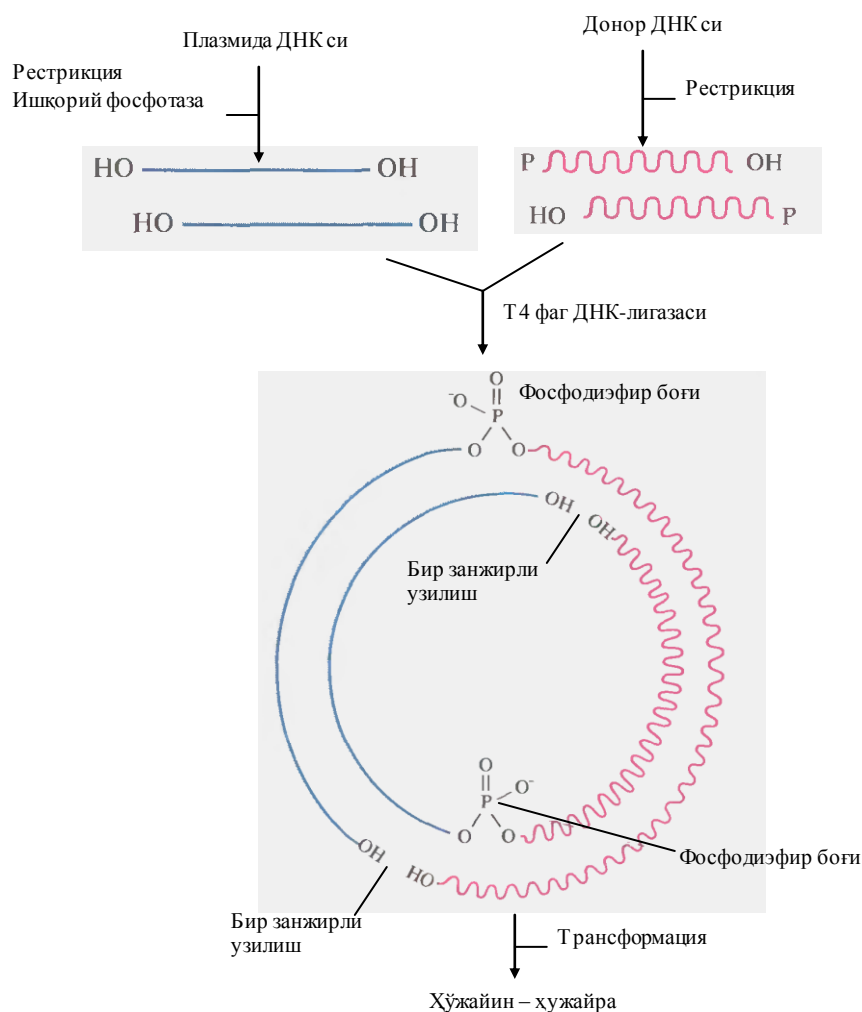
Репликация бошланувчи *ori* сайт

**12-расм. *pBR322* плазмида векторнинг генетик харитаси.** Узунлиги 4361 та нуклеотид кетма – кетлиги масофасига тенг бўлган плазмида таркибида ампициллинга чидамлилик хусусиятини кодловчи ген соҳаси – *Amp<sup>r</sup>* ва тетрациклинга чидамлилик хусусиятини кодловчи ген соҳаси – *Tet<sup>r</sup>* ген соҳалари – *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I ва *Pst*I репликация сайтлари аниқланган.

### 2.5. Вектор система яратиш шартлари

Вектор система яратишда вектор система куйидаги генлар наборига ега бўлиши керак:

1. Унинг таркибида селектив маркер гени бўлиши керак. Масалан, неомицин фосфотрансфераза ферментини кодловчи генлар набори. Ушбу ген ўсимлик хужайрасига каномицинга барқарорлигини ошириш учун зарур. Ушбу селектив маркер генини промотр назороти остида жойлаштириш лозим. Шунда ушбу ген генларнинг самарали экспрессияланишини тامينлайди. Экспрессия – гени кўчириб ўтказиш.
2. Вектор система таркибида репликация инициация сайти бўлиши керак. Бу вектор системани *E.coli* таркибида кўпайишини тامينлайди.
3. Вектор система ўнг фланкага ега бўлиши керак.
4. Вектор система таркибида полилинкер бўлиши керак. Полилинкер сайт бу керакли генларни маълум участкада жойлаш учун керак.



**13-расм. Бегона ДНК молекуласининг плазмида ДНК си таркибга бирикиши жараёни.** Рестриктаза ферменти ва ишқорий фосфотаза билан ишлов берилган плазмида ДНК занжири тегишли ген соҳасига эга бўлган ва рестриктаза билан ишлов берилган донор ДНК си билан аралаштирилади. Мухитга ДНК-лигаза ферменти қўшилади. Бу ерда тўртта бир занжирли узилишлардан 2 таси жараённи тўлик қониқтиради ва ҳосил бўлган конструкция фосфодиэфир боғлари ҳосил бўлиши натижасида нисбатан барқарор ҳолатга келади. Гибрид ДНКси хўжайин – хужайра таркибига киритилганидан кейин репликация жараёни амалга ошиши натижасида янги ҳалқасимон молекулалар узилишсиз ҳолатда репликацияланади.

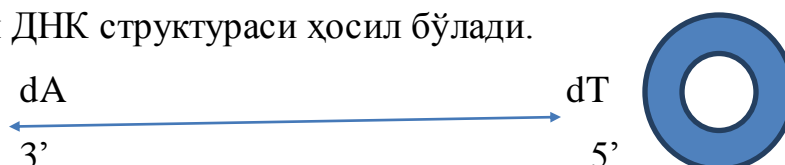
### Рекомбинант ДНК олиш усуллари

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;
- 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.

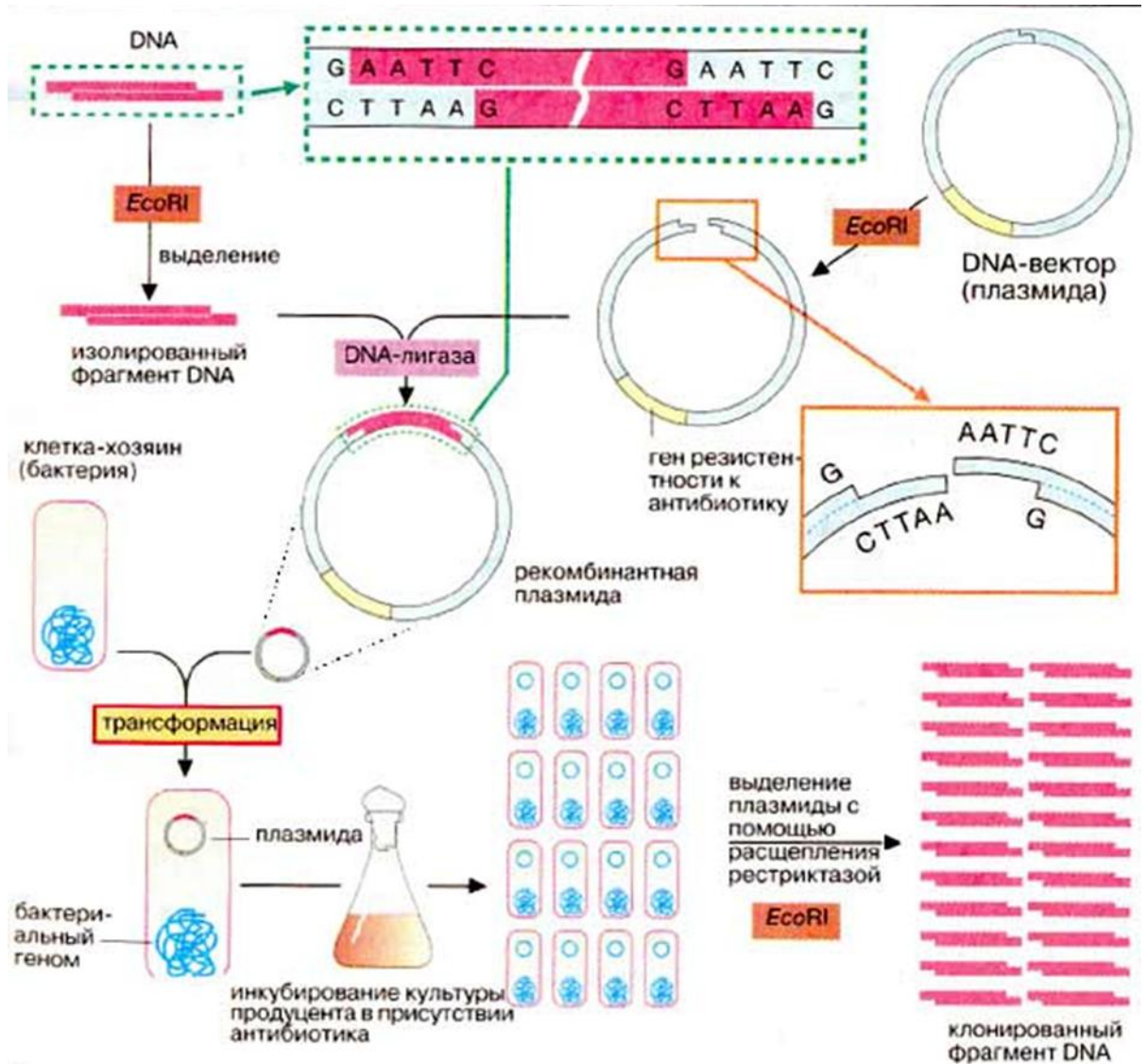
**Рестриктаза-лигаза усули** - энг содда ва осон рекомбинант ДНК олиш усули ҳисобланади. Бу усулда ДНК молекуласи ва вектор плазмида «ёпишқоқ» учлар ҳосил қилувчи рестриктаза билан қирқилади ва аралаштирилган ҳолда маълум шароитда реассоциация қилинади. Комплементарлик хусусиятига кўра ДНК молекулалари 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 йўсинда рекомбинант ДНК молекуласи ҳосил бўлади[6].

## 2.7. Трансформация ва танланиш жараёни.

Навбатдаги босқич давомида рекомбинант ДНК молекуласини хўжайин – хужайра таркибига киритиш жараёни амалга оширилади. Бу жараён *трансформация* деб аталади.





## Б. Клонирование ДНК

14 расм. Плазмида ДНКсина  $\lambda$  бактериофаг ва *E.coli* хужайрасига киритиш

Молекуляр даражадаги клонлашнинг асосий босқичи – рекомбинант ДНКни бактерия хужайрасига киритишдан ташкил топади. Олдин бу жараён кам даражада самарадорликка эгалиги қайд қилиниб, яхши даражада амалга оширилмаган. Ҳозирги вақтда тадқиқотчилар қўлида бактерияларнинг трансформацияланиши йўналишида самарали ҳисобланган – плазмида ДНК си асосида трансформациялаш усули мавжуд ҳисобланади, шунингдек *in vitro* шароитида  $\lambda$  бактериофаг ДНКсина инфекциян вирус қисмлари таркибига киритиш усули ишлаб чиқилган.

Бу жараёни амалга ошириш учун махсус ишлаб чиқилган усуллардан фойдаланилади, масалан хужайралар юқори ҳарорат таъсирида ишлов берилиб, муҳитга кальций хлор ( $\text{CaCl}_2$ ) эритмаси қўшилади. Бироқ, бу шароитда трансформация жараёни самарадорлиги жуда юқори қийматларга эга бўлмайди, одатда бу шароитда ҳар 1000 та хужайрадан 1 тасида трансформация жараёни амалга ошиши кузатилади.

Ушбу кўринишда, муҳитдаги хужайраларнинг кўпчилик қисми трансформацияга учрамайди, яъни таркибида рекомбинант ДНК молекулаларига эга бўлмаслиги қайд қилинади. Айрим бактерия хужайралари таркибида эса ишқорий фосфотазанинг дефосфорловчи таъсирига учрамаган ҳолатда қайта тикланган плазмида ДНК занжири юзага келиши кузатилади.

Юқорида таъкидлангани каби, таркибида репликация бошланишини таъминловчи ген соҳалари мавжуд бўлмаган ҳолатдаги хромосомадан ташқарида жойлашган ДНК занжири бактерия хужайраси таркибида репликацияга учрамайди. Ушбу кўринишда, бактерия хужайрасига кирган ҳолатдаги ДНК занжирининг барчаси хўжайин – хужайра геноми таркибида репликацияланиши эҳтимоллигига эга эмас.

Хўжайин – хужайра таркибида рекомбинант ДНК занжири шунингдек, муҳитда рестриктазалар таъсирида деградацияга учраши мумкинлиги қайд қилинган. Таркибида *RecA* генига эга бўлган хужайраларда экзоген ДНК занжирининг рекомбинацияси амалга ошмайди ва ташқаридан киритилган ДНК занжири гомологик рекомбинация жараёнида модификацияланмайди.

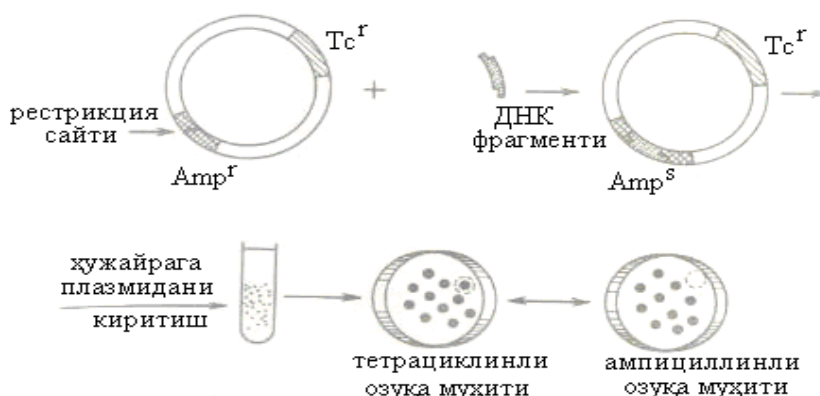
Шунингдек, навбатдаги босқичда таркибида рекомбинант ДНК мавжуд бўлган хўжайин – хужайраларни аниқлаш масаласи ҳал қилинади. Бунда аниқлаш жараёнида қўлланилувчи усул муҳитда хужайралар сони жуда кўп бўлган шароитда нисбатан самарали ва содда бўлиши талаб қилинади.

pBR322 вектор плазмидасидан фойдаланилган шароитда бегона ДНК фрагменти асосан *Bam*II сайтига уланиши кузатилиб, ушбу ҳолатда

трансформацияга учраган хужайраларни аниқлаш 2 та босқичда амалга оширилади.

Дастлаб, трансформация жараёни амалга оширилганидан кейин хужайралар таркибида ампициллин антиотиғи мавжуд бўлган озук муҳитига экилади. Бу кўринишдаги муҳитда таркибида фақат *Amp<sup>r</sup>* гени интакт ҳолатидаги ёки *pBR322* интакт плазмидалари ўсиш хусусиятини намоён қилади. Трансформацияга учрамаган хужайралар эса ампициллини антиотиғи мавжуд озук муҳитида ўсиш хусусиятига эга эмас. *pBR322* вектор плазмидаси таркибида *Tet<sup>r</sup>* ген соҳасида жойлашган *Bam*HI сайтига бегона ДНК фрагменти келиб бирикиши натижасида ушбу соҳада нуклеотидлар кетма – кетлиги бошланғич плазмидадагига нисбатан кескин тарзда ўзгариши оқибатида унинг тетрациклин антиотиғига нисбатан чидамлилиқ хусусияти йўқолади.

Ушбу кўринишда, таркибида гибрид плазмидага эга бўлган, яъни трансформацияланган хужайралар ампициллин антиотиғига нисбатан чидамлилиқ хусусиятини намоён қилиши, бироқ муҳитда тетрациклин антиотиғига нисбатан чидамлилиқ хусусиятига эга бўлмаслиги орқали фарқланади.



**15-расм. Вектор ёрдамида клонланувчи ДНК киритилган колонияларни аниқлаш**

Танлаш жараёнининг иккинчи босқичда бу иккала вариантдаги хужайралар ажратиб чиқилади. Ампициллинли муҳитда ўсган хужайралар тетрациклинли озуқа муҳитига ўтказилади. Юқорида таъкидланганимиздек, таркибида тертрациклин антибиотиғи мавжуд бўлган Петри чашкасидаги озуқа муҳитида ўстирилган интакт *pBR322* плазмидалари ампициллин ва тертрациклин антибиотикларига нисбатан чидамлилиқ хусусиятини намоён қилади. Тетрациклинли муҳитга эга озуқада ўстирилган *pBR322* плазмидаларида сезгирлик хусусияти намоён бўлиши эса бу плазмидаларнинг гибрид эканлигидан далолат беради.

Бунда ампициллинли озуқа муҳитида ўстирилган ва тетрациклинга нисбатан сезгирлик намоён қилган колониялар алоҳида ажратиб олиниб, улардан алоҳида хужайраалар асосида колониялар ҳосил қилинади. Шунингдек, тадқиқотларнинг маълум босқичда барча колониялар бирлаштирилиб такрорий текширишлар (скрининг) ўтказилиши ҳам мумкин.

### **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. Рер-оқсил ёрдамида ДНК қўш занжири ажралади ва ДНКга боғланадиган оқсил молекулалари ёрдамида ДНК нинг ажралган занжирлари турғун ҳолатда сақланиб турилади. ДНК-полимераза III ферменти ДНК нинг 3' учидан 5' учигача ДНК нинг 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 кўш занжирининг бир ипи бажаради.

ДНКнинг кўш спирали репликация давомида ДНК иплари бўйлаб иккига ажралади, махсус фермент-полимерлар она ДНКнинг аниқ нусхасини кўчирадилар. Натижада хужайра бўлиниши олдидан 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 оқсил молекулаларининг тўпланиши, буларнинг барчаси матрица синтезининг вариантлари бўлиб, доимо нуклеин кислоталар иштирокида амалга ошади.

#### ПТСР ва клонлаш

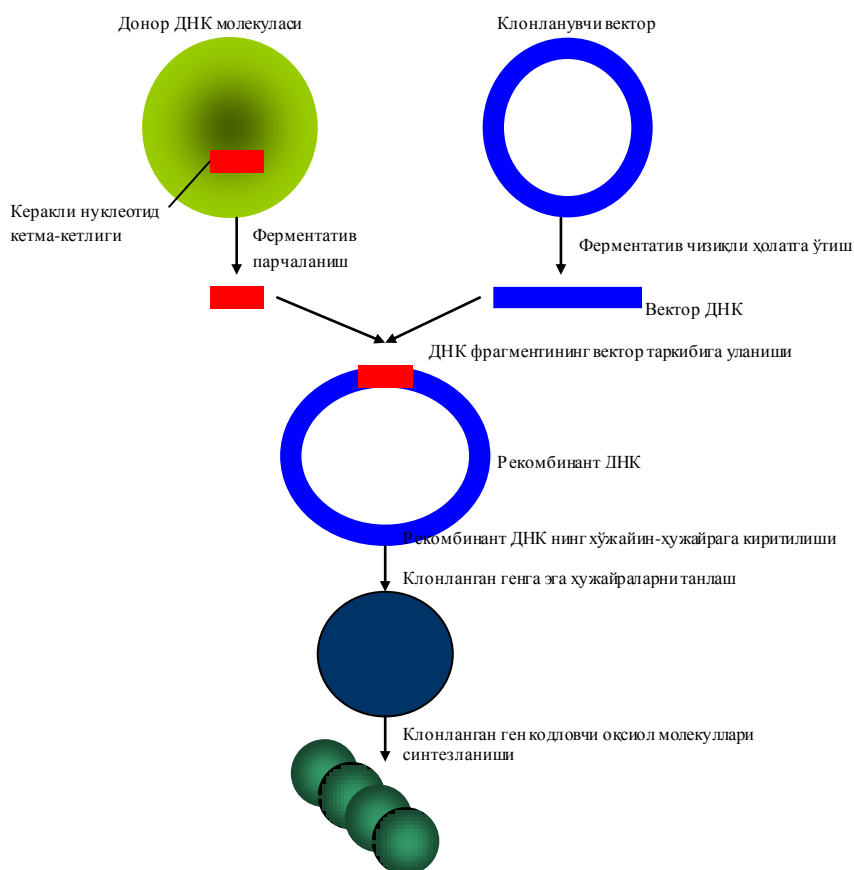
- Полимераза занжирли реаксия (ПТСР) молекуляр биология соҳасидаги асосий технологиялардан бири ҳисобланади. ПЗР- 1993 йил Нобел Мукофотида сазовор бўлган Др. Карй Муллис томонидан 1983-йил кашф қилинди.
- ПЗР бу сунъий шароитда ДНК нинг маълум бир қисми нусхасини жуда кўп марта синтез қилиш.

Йиллар давомида ПСР тирик тизимларида ген функцияси ўрганиш учун жуда муҳим бўлган клонлаш ёндашувларига бевосита таъсир кўрсатди. Клонланувчи ҳамма ДНК фрагментлари тўрт асосий босқичлардан иборат: изолатсиялаб киритиш ва вектор ДНК, рестраксия ферментларини ишлатиш учун “ёпишқоқ” охирли ДНК фрагментларини кесиш (қайсики, векторли

ДНК манбасини бўлагани), уланган охирларни лигирлаш ва ниҳоят қабул килувчи кужайраларга ДНК трансформатсияси, масалан, бактерия.

ПТСР клонлаш кўпгина ёндошишларни кўрсатади: ТА клонлаш, мустақил лигирланишли клонлаш (ЛИС), рекомбинатсия ёрдамида клонлаш ва ПСР воситасида клонлаш. Кўпроқ клонлашни қайси усули мос ҳисобланади? ПСР клонлаш усули икки факторга асосланиб – ишончилиги ва оддийлигига қараб танланади. Яна бошқа факторлар: қулайлиги, нархи, ёки иккинчи даражали оптимал шароитларда эффе́ктивлиги. Бу усулларда, яни осон назорат қилиш ва оптималлаштириш энг ишончилиги. Масалан, ТА клонлаш ва ЛИС да назорат қилиб бўлмас ўзгаришларни ўз ичига олади.

ПСР клонлаш гомологик жойлар кенгайтмаларига фойдаланиб, Бриксин ва Матсумура билан Эморй университети (Атланта, Жоржия, Исо) Биокимё кафедрасида ишланган, барча ПТСР воситачилигида клонлаш билан рекомбинат плазмид яратиш учун энг осон ва энг ишончли йўлидир. У қандай ишлайди? Биринчидан, мос тўғри ва тескари праймерлер фойдаланилади, киритилган ДНК бундай намунада амплифитсирланади: охирги ПТСР махсулот гомологик ДНК векторидан жой олади. Кейин вектор ва инсерт аралаштирилади. Денатуратсиядан кейин ва юмшатишгандан сынг вектор билан гибридизирланганда ва кейин ДНК полимераза Пщусион ёйилади, андоза сифатида вектор кетма-кетликни фойдаланилади. Бу полимераза олиш ДНК занжирлар фаолигига эга эмаслигини муштим. Бир нечта сиклдан сынг ПСР натижа бу реаксиялар ўзида плазмида икки ник(щар бир даври учун бир) ни бириктирганни кўрсатади. Янги плазмида кейин Э. соли щужайра компонентларини трансформатсиялайди, қайсики ДНК рестрикция ферментлардан фойдаланиб бартараф қилади.



### 16-расм. Плазида ДНК си ва бактерия хужайрасидан фойдаланиб, гени клонлаш чизмаси

Бунда рекомбинант ДНК клонланишининг умумий схемасида дастлаб донор ДНК занжири рестрицион эндоуклеаза ферменти иштирокида узилиб, клонланувчи вектор таркибига бириктирилади. Хосил қилинган конструкция хўжайин – хужайра таркибига киритилади. Хўжайин –хужайра таркибида трансформацияланган генлар таъсирида оқсил синтези натижасида трансформацияланган протеин молекулалари олиниши мумкин.

### 2.8. Генлар банкени яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси

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

ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилади ва нуклеотидлар 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 куйидаги формула ёрдамида ҳисобланади:

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

**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) учиди dA-dT қўш 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 парчаланаяди, 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 парчаланаяди ва икки занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади. Шу



йўсинда ҳосил бўлган кДНК молекуласи вектор молекулаларига уланган ҳолда клонланади.

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасида индивидуал генларни ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100<sup>0</sup>С ҳароратда 5 мин., 0,2 Н NaOH эритмасида 15 мин.), бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза фильтрига бириктирилади. Олинган филтр [<sup>32</sup>P] АТФ нуклеотида билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

Молекуляр гибридизация жараёнида филтрга 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 ҳужайрасиз оқсил синтез қилиш тизимида текшириб кўрилади. Ҳосил бўлган оқсил молекуласини идентификация қилиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади[4].

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

## ХУЛОСА

Ҳозирги кунда фаннинг кўпгина тармоқлари ривожланар экан ДНК ни клонлаш борасидаги тадқиқотлар ҳақиқий кашфиёт бўлди десам адашмайман. Боиси фойдали ўсимлик навлари, клонланган ҳайвон турлари, микроорганизмларнинг янги штаммлари халқ хўжалида, илмий тадқиқотлар олиб боришда самарали ўринга эга бўлиб келмоқда.

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

Яна шуни ҳам таъкидлаш керакки, ДНК ни клонлаш борасида Республикада амалга оширилаётган ишлар, хусусан трансген ўсимликлар ва микдооорганизмлар яратиш технологияси мамлакат ривожига сезиларли таъсир кўрсатмоқда. Жумладан, Тошкент Давлат аграр университети биотехнология кафедраси илмий лабораториясида картошкани клонал микрокўпайтириш усуллари орқали касалликларга, иссиққа, шўрланишга чидамли навларини яратиш бўйича илмий изланишлар олиб борилмоқда. Бу каби изланишлар Ўзбекистон Фанлар Академияси қошидаги Илмий текшириш Институт лобараторияларида ҳам амлга оширилмоқда.

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

Кундан-кунга аҳоли сони ортиб бораётгани сабабли инсоният олдида муҳим бир муаммо, озиқ-овқат маҳсулотларини ишлаб чиқариш, тиббий даволаш, энергетика масаласи турибди. Шундай экан бугунги кунда ДНК клонлаш технологияси асосий фан, саноат ва ривожда асосий ўринга эгадир.

## АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ:

1. Глорева Б. Клонирование ДНК. Методы // Москва “Мир” 1988.
2. Давронов Қ. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари// Тошкент 2008 б.64-65
3. М.Сингер. П.Берг. Гены и геномы. Том. 1. Москва. «Мир». 1998.
4. Агол В.И., Тольская Е.А. 1988. Рекомбинация между РНК-геномами. Молекуляр. биология.
5. Четверин А.Б. 1999. Новый взгляд на рекомбинацию РНК. Молекуляр. биология. 33,985-996.
6. Давронов Қ. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари// Тошкент 2008 б. 66-67
7. Давронов Қ. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари// Тошкент 2008 б. 67-70
8. Жиззах давлат педагогика институти. Биология ва уни уу кафедраси биотехнология маъруза матни// Жиззах. 2009 Б.15-18
9. Кольман Я. Рём К.Г. Наглядная биохимия // Москва “Мир” 2000. Стр.254-255
10. Комилов Х. М., Рахимов М. М., Одилбекова Д. Ю. Биотехнология асослари // EXTREMUM PRESS. 2010 б.180-183
11. Хўжамшукуров Н.А. “Биотехнология асослари” фанидан маъруза матни//.– Тошкент.: ТКТИ, 2007. б.16-17
12. Царева В. Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: учебник // ЭОТАР – Медиа. 2013. Стр.254-255
13. Царева В. Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: учебник // ЭОТАР – Медиа. 2013. Стр.256
14. [http://ru.wikipedia.org/wiki/Клонирование\\_\(биология\)](http://ru.wikipedia.org/wiki/Клонирование_(биология))
15. <http://www.medicalplanet.su/genetica/137.html>