

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

**ТОШКЕНТ КИМЁ ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

# **МОЛЕКУЛЯР БИОЛОГИЯ**

**фанидан маърузалар матни**

**ТОШКЕНТ - 2012 й.**

### **Тузувчилар:**

Р.М.Артикова “Биотехнология” кафедраси доценти, б.ф.н.  
М.С. Тошмухамедов - ТКТИ, “Биотехнология” кафедраси мудири

### **Такризчилар:**

Ш.С.Тошмухамедова – М.Улуғбек номидаги ЎзМУни “Микробиология ва биотехнология” кафедраси профессори, б.ф.д.

М.Р.Зокирова– Тошкент Кимё технология институти “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси ” кафедраси доценти, б.ф.н

Маърузалар матни “Биотехнология” кафедрасининг 2012 йил 18 апрел 12-сонли мажлисида кўриб чиқилиб, факультет Илмий-услубий Кенгашида кўриб чиқиш учун тавсия қилинди.

**Кафедра мудири , проф.**

**М.С.Тошмухамедов**

Маърузалар матни “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” факултети Илмий-услубий Кенгашининг 2012 йил 20 март 5 -сонли мажлисида тасдиқланди

**Факультет Илмий услубий Кенгаши раиси,  
т. ф. д, доцент**

**Ш.А.Муталов**

Маърузалар матни “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” институт Илмий-услубий Кенгашининг 2012 йил 19-апрелдаги 6 -сонли мажлисида тасдиқланди.

**Институт Илмий услубий Кенгаши раиси, доц.**

**Юнусов М.**

## 1-МАВЗУ

### КИРИШ. МОЛЕКУЛЯР БИОЛОГИЯ ФАНИ ВА УНИНГ ВАЗИФАСИ.

Режа:

- 1.Молекуляр биологиянинг пайдо бўлиш ва ривожланиш тарихи.
- 2.Молекуляр биологиянинг илмий тадқиқот методлари.
- 3.Молекуляр биология фанининг назарий ва амалий аҳамияти.

Молекуляр биология фани ҳаётни пайдо бўлишини молекуляр даражада ўрганади, яъни тирик организмларнинг асосий хоссалари, ўсиши ва ривожланиши, кўпайиш ва дифференцияланиш, ирсият ва иммунитет, ҳаракатланиш ва ташқи муҳитга мослашиш ва бошқа жуда кўп биологик макромолекулаларнинг молекуляр асосини ўрганишга ва тушунтиришга қаратилган фан.

Молекуляр биологиянинг фан тариқасида дунёга келиши Жеймс Уотсон билан Жеймс Крикнинг кашфиётига боғлиқ. Бу олимлар томонидан ДНК дезоксирибонуклеин кислотасининг модели кашф этилган, яъни ДНК молекуласи кўш спирал тузилишга эга эканлигини исбот қилдилар (1953). Бу кашфиёт ирсий белгилар қандай сақланади ва авлоддан-авлодга қандай ўтади, деган муаммоларни ҳам ҳал қилиш имкониятини берди. «Транскрипция» ва «Трансляция» механизмлар аниқланди. Сўнгра генетик кодларни «молекуляр генетикадаги» муаммолари ҳал қилинди. Генетик код муаммосини ҳал қилиниши аввало қайси нуклеотид ёки нуклеотидлар тўплами қандай аминокислотани ифодалаши мумкин, деган масалани ҳал қилишдан иборат.

1953 йилда Гамов (АҚШ) генетик код 3 та нуклеотид тўпладан (триплетликоддан) ташкил топган бўлиши керак, деган ғояни илгари сурди. Ҳақиқатан ҳам, бунда 4 хил нуклеотид ёрдамида 64 та комбинация ҳосил қилиш мумкин. 1961 йил бошларида инглиз олими Крик генетик код муаммосининг математик анализига асосланиб, код ҳақиқатда ҳам триплетли характерга эга, деган хулосага келган. Триплет Крик ифодасига кўра кодон деб номланган.

Молекуляр биология комплекс фан ҳисобланади, чунки у юксак молекуляр органик бирикмаларнинг тузилиши ҳақидаги энг сўнгги илмий маълумотларига асосланади.

Молекуляр биология энг муҳим биологик макромолекулаларнинг турли шакллари ва уларнинг эволюция формаларини ўрганади. Бу фан энг аввало нуклеин кислоталарнинг, оксиллар ва бошқа макромолекулаларнинг структурасини, шунингдек энг муҳим хужайра компонентлари (хромосом) ядро, плазматик мембрана, митохондриялар, Гольжи комплекси, лизосомалар, рибосомаларнинг структуравий тузилиши билан уларнинг бажарадиган функцияси орасидаги боғланишни ўрганади.

Шундай қилиб, молекуляр биология эволюция қандай боришини, унинг механизмини очиқ беради, яъни жонли организмлар учун хос бўлган ривожланиш феноменини ҳам молекуляр текисликда оксиллар ва нуклеин кислоталарнинг ўзаро муносабати, реакциялари шаклида ифодалайди.

Молекуляр биологиянинг илмий тадқиқот ишларида кенг қўлланиладиган методлари ва асбоблари: электрон микроскоп, ультрацентрифуга, рентген-структура анализи, хроматография, электрофорез, нишонланган атомлар ва хаказо

XX асрнинг иккинчи-ярмида кўплаб мамлакатларда ўлимга сабабчи бўлган турли юқумли касалликлар (вабо, ўлат, чечак) йўқотилди. Аммо кейинги вақтда юқумли касалликлар камайган бўлса, рак, юрак қон томир системаларининг жароҳатланиши, моддалар алмашинуви касалликлари, рухий ва наслий (ирсий) касалликлар жуда ҳам кўпайди. Тирик системаларнинг структуравий тузилиши ва функциясини мукаммал ўрганилгандагина, касалликларнинг табиатини тўғри аниқланади ва даволанади ёки касалликларни олдини олиш мумкин.

## **2-МАВЗУ**

### **НУКЛЕИН КИСЛОТАЛАР ВА УЛАРНИНГ ТУРЛАРИ**

Режа:

1. Нуклеин кислоталарнинг кашф этилиши
2. Чаргофф қоидаси
3. ДНК таркиби

Нуклеин кислоталар янги биологик модда сифатида 1868йили швейцариялик биолог Фридрих Мишер томонидан кашф этилган. У йирингни ташкил қиладиган қон элементлари-лейкоцитлар (“йиринг хужайралари”) ядросидан фосфорга бой номаълум бирикмалар ажратиб олиб, унга нуклеин номини беради. Бу бирикма кислота хоссасига эга бўлганидан кейинроқ нуклеин кислота деб аталадиган бўлган. Лекин узоқ вақтгача бу бирикмалар биологлар эътиборини жалб қилмайди, хужайрадаги аҳамияти ўрганилмайди ва асосан химиявий объект сифатида тадқиқ қилиб келинади. 1891 йили немис олими Кёссель бу моддани гидролиз қилиб, у уч хил компонентдан: пурин ва пиримидинлар қаторига кирадиган гетероциклик азот асослари, углевод ва фосфат кислотадан ташкил топганлигини аниқлайди. Шу олимнинг ўзи нуклеин кислоталарнинг икки хили мавжуд эканлигини кўрсатди. Кейинроқ улар таркибига кирадиган углевод компоненти-пентозанинг рибоза ёки дезоксирибоза бўлишига қараб, рибонуклеин кислота (РНК) ва дезоксирибонуклеин кислота (ДНК) номини олди. Ундан илгари нуклеин кислоталарнинг биринчи хили олинган манбаига қараб ачитқи ёки цитоплазма нуклеин кислота, иккинчи хили буқоқ беzi (тимус) дан ажратиб олингани учун томонуклеин кислота ёки ядро нуклеин кислотаси деб аталар эди.

Нуклеин кислоталарни гидролиз қилиб, улар полимер бирикма ва мономерлари азот, углед ва мономерлари азот асоси, углевод ва углед ва фосфат кислотадан ташкил топган нуклеотидлар, бинобарин, РНК-рибозополинуклеотид ва ДНК-дезоксирибозополунуклеотид эканлиги тасдиқланди. Аммо 1950-йилларгача нуклеин кислота молекуласи тўрт хил нуклеотидларнинг тартибли такрорланиши-тетрануклеотидлардан иборат,

деган фикр қабул қилинган эди. Бу тушунчанинг нотоғри эканлигини турли манбалардан ажратиб олинган ДНК молекулаларининг нуклеотил таркибини синчиклаб ўрганиб, улар орасида катта фарқ мавжуд эканлигини аниқлаган америка олими Э.Чаргафф исботлади. Нуклеин кислоталарнинг аниқ тузилиши 50-йиллардан кейин, уларнинг биологик функцияси, биосинтези ва бошқа хоссаларини тадқиқ этиш жараёнидагина тўла тушунила бошланди, ҳозирги кунда ҳам бу ишлар давом этади. Нуклеин кислоталарнинг ҳужайра ичида тарқалиши ва биологик роли ҳақида муҳим маълумотлар ҳам цитологиянинг айрим усули –*цитохимия* ёрдамида ва классик генетикада хромосома назарияси ўрнатилиши билан тўплана бориб, бу йўналишда 40-йилларда улуғ кашфиётга олиб келди.

Йигирманчи йилларнинг охирида ҳужайра ядросидаги хромосомада дезоксирибонуклеин кислота кўп миқдорда топилишига чуқур эътибор бера бошланди. Аввало гистохимиявий фёльген реакцияси (фуксин сульфит кислота билан қизил ранг ҳосил қилиш)дан фойдаланиб, ДНК хромосомаларда, РНК цитоплазмада жойланиши аниқланди. Худди шу йиллар ирсий белгиларнинг наслдан-наслга ўтиши хромосомаларда жойлашган генларга боғлиқ эканлигини тасдиқловчи фактлар ирсиятнинг хромосома назарияси узил-кесил қабул қилинишига олиб келади. Шунинг билан бирга генлар ферментларни идора қилиши, яъни биохимиявий жараёнларни бошқариши ҳақида кўлаб маълумотлар тўплана бошланди. Мана шу йиллар инглиз олими Фрэд Гриффитс пневмококкларнинг касаллик кўзғатмайдиган тури ҳужайраларни уларнинг касаллик кўзғатадиган, лекин қайнатиш йўли билан ўлдирилган, яъни касаллик кўзғатиш қобилятини йўқотган ҳужайралари билан қўшиб каламуш танасига киргизилса, касаллик пайдо бўлишини кузатди. Бу тажриба бактериянинг бир турига хос хусусият (касалликни кўзғатиш) унинг nobуд қилинган ҳужайрасидан иккинчи турига ўтиб, унинг тирик ҳужайраларни ўзгартиришини тасдиқлади. Бу ҳодиса *микроблар трансформацияси* деб аталиб, nobуд қилинган ҳужайрада тирик ҳужайрани ўзгартира оладиган қандайдир омил (трансформация чақирувчи фактор) мавжуд деган хулоса туғилишига сабаб бўлади.

Бу фараз кенг тадқиқот қилиниб келса ҳам, трансформирловчи агентнинг химиявий табиати деярли яна 10 йилгача номаълум бўлиб қолди. Фараз этилган факторни тозалаш ва унинг химиявий табиатини аниқлаш устида олиб борилган тадқиқотлар 1944 йил улуғ кашфиётга олиб келди. Мана шу йили америкалик олим Эвери ўзининг касбдошлари Мак Леод ва Мак Картилар билан 10 йиллик ишлари якунини эълон қилди. Бу машҳур мақолада пневмококкларнинг бир турини иккинчи турга айлантирадиган модда ДНК эканлиги ҳақида хабар берилди. Демак, ДНК белгини ташувчи молекула, чунки nobуд қилинган пневмококкларнинг касаллик кўзғатиш хусусияти ДНК молекуласига ва ДНК таъсирида бу хусусият тирик, лекин касаллик кўзғатиш хусусиятида маҳрум бактерияларга узатилади ва ҳужайра кўпайганда наслдан-наслга ўтади. Шубҳасиз бу кашфиёт туфайли молекуляр биология пойдеворига салмоқли хисса қўшди. Бу йиллар асосий тадқиқотлар бактериялар, вируслар ўтказилиб, улар ирсий

хоссасининг сақланиши, кўчирилиши, трансформациясининг молекуляр механизмини аниқлашда қатор-қатор муҳим кашфиётларга олиб келди. 1941 йилда “ бир ген-бир оксил” формуласи фанда умумий қоида сифатида қабул қилинади. Бидл ва

Татум кашф етган бу қоиданинг маъноси генлар оксил (фермент)лар синтезини идора қилиши принципини аниқлаб беришдадир. Бактерияларни емирувчи, яъни *бактериофаг* деб аталувчи энг майда микроорганизмларнинг ирсий материали ҳам ДНК эканлиги исботланди.

ДНК молекуласининг химиявий таркибини ўрганиш ҳам янги муҳим босқичга кўтарилди. ДНК таркибига кирадиган тўрт хил нуклеотидни турли организмлардан ажратиб олинган ДНК молекулаларида текшириш азот асослари аденин (А), гуанин (Г, G), цитозин (Ц, C) ва тимин (Т) маълум нисбатда муайян бўлишини тасдиқлади. Кашфиёт америка олими Э.Чаргафф номи билан боғлиқ бўлганидан бу нисбий муносабатлар *Чаргафф қоидаси* деб аталади. Одатда ДНК молекуласида пурин ва пиримидин асосларининг бир-бирига нисбати ҳамма организмларда ҳам қатъий ва 1 га тенг. Демак, молекулада пурин асослари (А, G) нинг жами пиримидин асослари (C, T) нинг жамига тенг, яъни уларнинг нисбати 1 га тенг:

$$\frac{A}{T} = 1; \frac{G}{C} = 1$$

Демак, ДНКнинг нуклеотид таокиби иккита нуклеотиднинг қўш: А билан Т, G билан C нинг бирга келиши билан белгиланади. Бу қўш нуклеотидлар молекулада турли нисбатда бўлганидан баъзан ДНКда АТ, бошқа ҳолда GC кўпроқ бўлиши мумкин. Бу муносабатларни аниқлаш ДНКнинг таркибига қараб турларни фиологенетик характерлаш имкониятини беради. Рус академиги А.Н.Белозерский жуда кўп бактериялар, сувўтлар, юксак ўсимликлар ва ҳайвонлар нуклеин кислоталарнинг нуклеотид таркибини текшириб ДНК нинг нуклеотид таркиби организмлар эволюцион системасининг характеристикасидан бири бўлиб хизмат қилиши мумкин эканлигини кўрсатди.

Тўпланган маълумотлар ДНК нинг полимер занжиридаги генетик ахборот тўрт мономерлар звеноларининг бирин-кетин келиш тартибида ёзилган, деган концепцияни ифодалаш имконини берди. Бу вақтгача ДНК молекуласининг дастлабки рентгенограммалари инглиз олимлари М.Уилкинс ва Р.Франклин томонидан олинган эди. Жадаллик билан олиб борилган тадқиқотлар 1953 йили Дж. Уотсон ва Ф. Крик томонидан ДНК қўш спиралли моделининг яратилиши билан якунланди.

ДНК молекуласининг ўз-ўзидан кўпайиш ғояси унинг молекуласининг қўш спиралли моделидан келиб чиқиши табиий эди. Бу жараён *репликация*, яъни *нусха кўчириш* деб аталади. Ва табиий шариотда энг содда бажарилишини вирусларда кузатиш қулай. Репликацияни бажарувчи фермент ДНК –полимераза 1957йили А.Корнберг томонидан кашф этилиб, кейинроқ у шу ферментдан фойдаланиб, ДНК молекуласини сақловчи тирик мавжудот-вирусни жаҳонда биринчи бўлиб сунъий равишда синтез қилишга муяссар бўлди.

1950-йилларда оксил синтези рибосомаларда бажарилиши тасдиқланди. Лекин ДНК дан ахборотни рибосомаларга кўчирадиган воситачи(информацион РНК) мавжуд деган тушунча фақат 1961 йили Ф.Жакоб ваЖ.Моно томонидан баён қилинган.

Нуклеин кислоталар функциясини ўрганишдаги асосий босқичлардан бири ахборотнинг ДНК да ёзилиш усули ва уни оксил структурасига узатиш принципи яъни генетик кодни расшифровка қилиш бўлди. Бу кашфиётгача РНК нинг уч хили: информацион, яъни матрица РНК си (м-РНК), рибосома РНКси (р-РНК) ва транспорт РНКси (т-РНК) мавжуд эканлиги улар оксил синтезида иштирок этиши аниқланган.

Генетик коднинг мазмуни шундан иборатки, оксил молекуласидаги ҳар бир аминокислотага учта нуклеотиддан иборат триплет мувофиқ келади. Оксил синтези рибосомаларда кечар экан, уларга бириккан матрица РНКси (м-РНК) да тегишли аминокислотага мувофиқ кодон рибосомага активланган аминокислотани ташувчи транспорт РНКси (т-РНК) нинг антикодони билан вақтинча боғланиб, ҳар бир аминокислотани ДНК да ёзилган ахборот РНК воситасида реализация қилинади. Ахборот оқимининг ДНК-РНК-оксил йўналишида узатилиши молекуляр биологиянинг асосий постулатидир.

Генетик код этилиши билан нуклеин кислоталарнинг тузилиши ва функциясини ўрганишда янги босқич очилади: ДНК молекуласи хужайрада специфик ферментлар-эндонуклеазалар, рестриктазалар томонидан махсус жойларида узилиши, уланиши турли модификацияларга дучор бўлиши, РНК матрицасида ДНК синтезланиш феномени (тескари транскрипция) ва унинг ферменти аниқланади. Мана шундай механизмлардан фойдаланиб 1972 йили П.Берг бир-биридан фарқ қиладиган иккита вируслар ДНКсини хужайрадан ташқарида улашга эришади. Шунинг билан турли организмларнинг генетик материали яъни улар ДНК молекулаларининг маълум фрагментларини улаш, чатиштириш (рекомбинатция) орқали янги, сунъий организмларни яратиш имконини берадиган ажойиб соҳа-генетика инженерлиги пайдо бўлди.генетика инженерлигининг асосий курули рестриктазалар жуда ҳам специфик ферментлардир.ДНК фрагментларини олиш учун рестрикцион эндонуклеазалардан, уларни улаш учун ДНК-лигазалардан фойдаланилади. Ирсий белгиларни ташувчи бундай рекомбинирланган ДНК ни хужайрага киритиб ёт ахборотни амалга ошириш, репликация,транскрипция, оксил синтезини таъминлаш усуллари ишлаб чиқилди. Ёт организмларда, масалан, бактерияларда ҳайвонлар тегишли генларнинг ўқилиши (экспрессияси) ни таъминлайдиган системаларни тузиш, тайинланган белгиларга эга тирик организмлар яратиш имконини туғдирди. Тез орада бундай имкониятлар биотехнологияда амалга оширила бошланди. Одатда ҳайвонлар организмда ва одамларда синтезланадиган хилма-хил оксилларни биосинтез қилиш қобилиятига эга микроблар олинди, хусусан рекомбинирланган генлардан фойдаланиб одам учун зарур гормонлар ва ферментлар – инсулин, ўсиш гормони, интерферон ва бошқалар олина бошланди. Бу соҳа кенг микёсда шиддатли ривожланмоқда.

**3-МАВЗУ**  
**НУКЛЕИН КИСЛОТАЛАР ВА УЛАРНИНГ ФИЗИК КИМЁВИЙ**  
**ХОССАЛАРИ**  
**РЕЖА:**

1. Нуклеотидлар-нуклеин кислоталарнинг структура элементлари
2. Азот асослари-пуринлар ва пиримидинлар
3. Рибоза ва дезоксирибоза
4. ДНКнинг физик-кимёвий хоссалари

Ҳар бир тирик организмда нуклеин кислоталарнинг ҳар икки тури-рибонуклеин кислота (РНК) ва дезоксирибонуклеин кислота (ДНК) мавжуд. Фақат вируслар буларнинг бир турини, ё ДНК, ёки РНК ни тутати. Нуклеин кислоталар оксиллар билан бирга ҳаётнинг моддий асосини ташкил қилади. Улар бир-бири билан ҳар томонлама узвий боғлиқ, аммо уларнинг ҳужайрадаги ўрни ва функцияси тубдан фарқ қилади: оксиллар ассосан қурилиш ва ҳужайранинг ишчи органлари материали, нуклеин кислота эса информацион материал, у организмнинг тузилиши, ўсиши, ривожланишига тегишли ахборотнинг сақланиши, такрорланиши, алмашинуви ва наслдан-наслга ўтишини таъминлайди.

Узоқ аجدодлардан миллиард йиллар давомида узилмай келган ахборот биополимерлар бу икки турининг ўзаро келишиб ишлаши жараёнида амалга ошади. Ҳаётнинг маъноси ҳам наслини сақлаш, ўз-ўзини такрорлаш бўлса, бу жараён нуклеин кислотада нуклеотидларнинг бирин-кетин келиши тартиби шаклида химиявий тилда ёзилган ахборотни оксил молекуласида аминокислоталар тартибига ўтказишда амалга оширилади. Демак, нуклеин кислотадаги рамзий буйруқ организмнинг реал оксилларида ифодаланади. Оксил эса ҳар қандай ҳужайранинг морфологиясини ҳам, функциясини ҳам белгилайди. Демак, нуклеин кислоталарнинг биологик роли чексиз буюқдир. Барча нуклеин кислоталар юксак молекуляр бирикмадир. Улар энг кичик вакиллариининг молекуляр массаси 25 минг атрофида бўлса, энг катталариники 1млрд.га етади. ДНК молекулалари ҳужайрадаги энг катта молекулалар қаторига киради.

**Нуклеотидлар-нуклеин кислоталарнинг структура элементлари.** РНК ҳам, ДНК ҳам нуклеотидлар деб аталадиган мономерладан тузилган, шунинг учун нуклеин кислоталар полинуклеотидлар дейилади. Ҳар бир мононуклеотид бир-биридан фарқ қиладиган учта химиявий компонентдан: аорганик фосфат, моносахарид рибоза ёки дезоксирибоза ва азот асоси: пурин ёки пиримидин асосидан ташқари топган. ДНК ва РНК молекулалари таркибига кирадиган моносахарид ва азот асослари бирмунча фарқ қилади. ДНК таркибидаги моносахарид дезоксирибоза бўлганидан унинг мононуклеотидлар ҳам дезоксирибоза мононуклеотидлар, ДНК нинг ўзи дезоксирибоза-полинуклеотид; РНК эса рибозомононуклеотидлардан ташкил топган рибозополинуклеотидлар. Азот асосларида фарқи пиримидин асосларига оид бўлиб, РНК таркибига урацил,



ДНК таркибига эса тимин киради. Бу фарқлар қуйидаги жадвалда кўрсатилган.

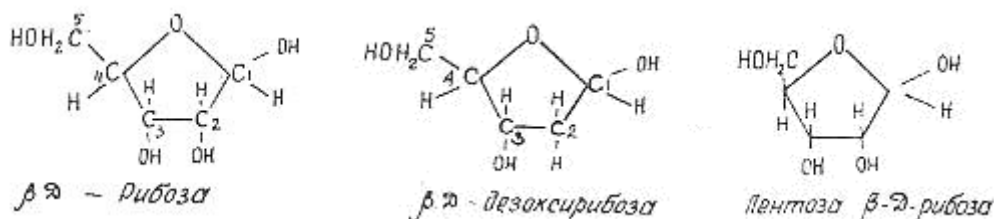
1-жадвал

### Нуклеин кислоталарнинг таркиби

| Компонентлар        | РНК             | ДНК            |
|---------------------|-----------------|----------------|
| Фосфат кислота      | Фосфат кислота  | Фосфат кислота |
| Углевод-моносахарид |                 |                |
| Пентоза             | Рибоза          | Дезоксирибоза  |
| Азот асослари       | Аденин, Гуанин  | Аденин, Гуанин |
| Пурин асослари      | Урацил, Цитозин | Цитозин, Тимин |
| Пиримидин асослари  |                 |                |

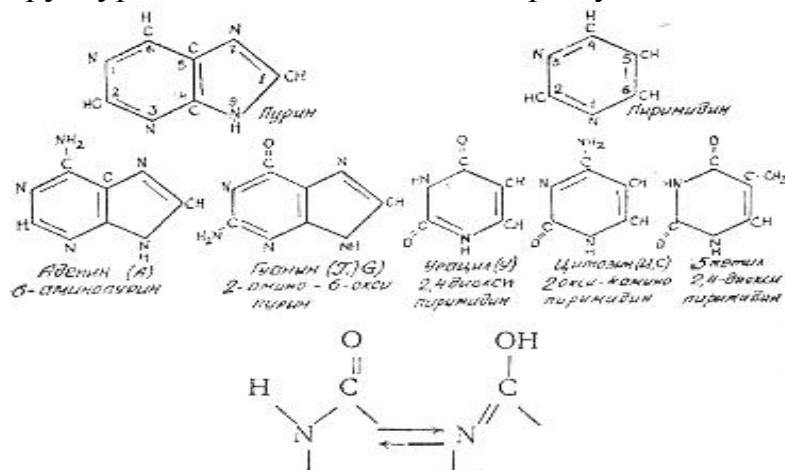
Қуйида бу компонентлар ва уларнинг бирикишида ҳосил бўладиган нуклеотидлар билан танишамиз.

### Рибоза ва дезоксирибоза.

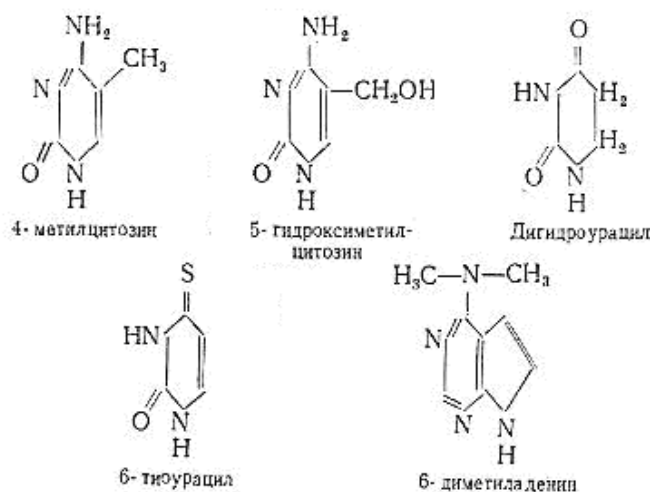


Бу иккала моносахарид ҳам бешта углерод атоми тутадиган пентозалар бўлиб, альдопентозалар қаторига киради ва фураноза структурасига эга. Улар орасидаги фарқ фақат иккинчи углерод атомига тегишли. Рибозада 2-углерод ОН билан боғланган, дезоксирибоза ОН гуупа ўрнида Н атоми туради, яъни 2-углерод О атомидан маҳрум, шунинг учун ҳам унинг номига “дезокси” префикси қўшилган. Кўпинча бу структуралар ёзилганда углерод атомлари ҳалқада кўрсатилмайди.

**Азот асослари-пуринлар ва пиримидинлар.** РНК ва ДНК таркибига кирадиган азот асослари-пуринлар-аденин (А) ва гуанин (Г, G) ва пиримидинлар-цитозин (Ц, C), Тимин (Т) ва урацил (У, U) дир. Уларнинг структураси ва систематик номлари қуйида келтирилган:

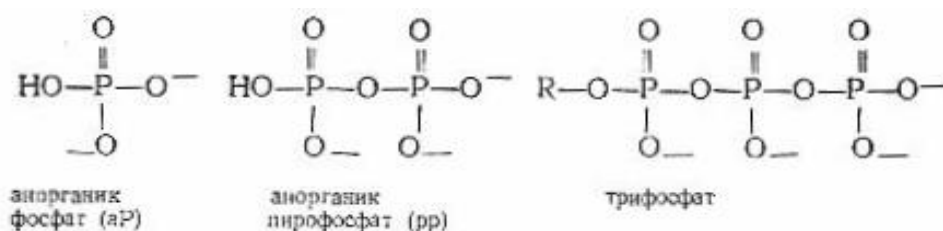


Улар учун кето-енол таутомерия маълум. Асосий азот асосларидан ташқари, нуклеин кислоталар таркибида кам миқдорда бир нечта сийрак минор асослар ҳам учрайди. Улар қаторида ДНК таркибида топилган 5-метилцитозин, 6-метиладенин, 5-гидроксиметицитозин, транспорт РНК да топилган тιοурацил, дегидроурацил, нуклеотид, псевдоуридинлар киради:

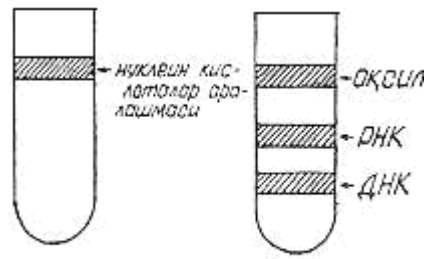


### Фосфат группа

Нуклеотидлар таркибида ортофосфат киради. У молекулада битта (моно-), иккита (ди-) учта (три-) бўлиши мумкин.



**ДНК нинг физик-химиявий хоссалари** ДНК молекуласи ядрога жуда зич жойлашган бўлади. Унинг турли аралашмаларини бир-биридан ва РНК дан ажратиш ва умуман тиғизлигини аниқлаш учун сахароза ёки цезий хлорид эритмаларининг тиғизлик градиенти (фарқи)да центрифугалашда фойдаланилади. Бунинг учун сахароза эритмасини центрифуга пробиркасида катта тезликда айлантириб, пробирка бўйича концентрациялар фарқи ҳосил қилинади. Иккинчи вариантда градиент олдиндан яратилмайди. CsCl ни центрифугалаш жараёнида узлуксиз тиғизлик градиенти ўзи шаклланади. Энди пробиркадаги эритма нуклеин кислоталар аралашмаси солиниб центрифугалаш давом этилса, айрим фракциялар пробиркадаги эритманинг тегишли тиғизлик баландлигида тўхтайди. Центрифугалаш тугагандан сўнг ультрабинафша нурларнинг ютилишига қараб фракцияларнинг миқдори белгиланади.



Нуклеин кислоталарни тиғиз-  
лик градиентиде ажратиш.

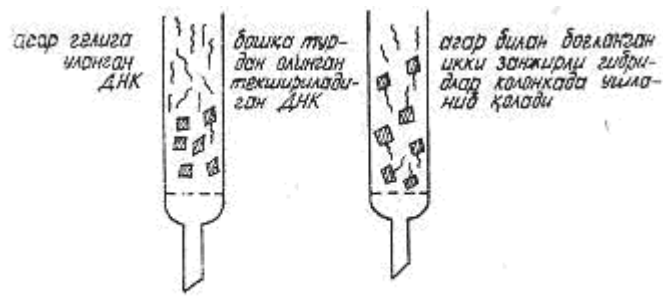
Эритманинг маълум градиентиде молекулалар сузиб юриши унинг сузиш тиғизлиги дейилади. ДНК молекулаларининг сузиш тиғизлиги 1,69-1,73 орасида ва физик ҳолати ва химиявий таркибига боғлиқ. Аввало маълумки, унинг буюклиги молекуладаги Г+Ц асослар миқдорига мутаносиб. Бу тушinarли, чунки Г-Ц орасида учта водород боғлар бўлиши уларни икки водород боғлар билан бириккан А+Г қўш асосидан тиғизроқ қилади. Иккинчидан, табиий ДНК нинг тиғизлиги денатурланган, яъни иккита занжири тўла ёки қисман ажралиб кетган ДНК дан камроқ бўлади. Хуллас, ДНК нинг сузиш тиғизлигини турли шароитда текшириб, унинг таркиби, денатурация даражаси ҳақида муҳим маълумот олиш мумкин.

ДНК натив ҳолатдан денатурирланган ҳолатга ўтганлиги аниқлашда бир канча усуллардан фойдаланиш мумкин. ДНК молекуласидаги азот асослари ультрабинафша нурлар зонасида 260 нм да интенсив ютиш қобилиятига эга. ДНК занжири бузилганда ютиш кучи ортади. Гиперхром эффект деб аталадиган бу феномен денатурация жараёнида нур ютадиган асосларни тўсиб турган структураларнинг четланишига боғлиқ.

Молекуладаги водород боғларини узувчи барча ташки таъсир ДНК ни денатурациялайди. Денатурирловчи агентлардан энг кучлиси иситишдир. ДНК иситилганда, унинг иккита занжири бир-биридан ажралади, ечилади. Бу ходиса тор температура доирасида содир бўладиган уни *юмшаш* дейилади. ДНКнинг 50% денатурирланган температура *юмшаш температураси* деб аталади. ДНК нинг юмшаш температураси азот асосларининг нисбати (Г+Ц ва А+Т) га боғлиқ. Молекулада Г+Ц қўш асослар қанча кўп бўлса, юмшаш температураси ҳам А+Т никидан шунча юқорироқ бўлади, чунки Г+Ц қўш асосида учта иккилик боғ бор.

Тез қизитиш билан денатурирланган, яъни иккита занжирга ажратилган ДНК секин совитилса, ажралган занжирлар қайтадан бирикиб, қўш занжирда ДНК ни ҳосил қилади. Бу ходиса *ренатурация* деб аталади. Турли занжирлар ўзаро комплементарлик асосида бирикиши мумкин, бирикиш даражаси уларнинг гомологиясига боғлиқ. ДНК молекуласининг иккита занжири тўла бирикади, чунки улар 100% бир-бирига гомологдир.

ДНК нинг бир занжири билан унинг транскрипти (яъни унинг асосида транскрипция қиланган РНК) ҳам тўла бирикади. Бу жараён дуранайланиш (чатишиш) деб аталади.



Дурагайлаш (гибридаш) усулида ДНК молекулаларининг бир хиллигини аниқлаш.

Демак, иккита занжир орасида гомология қанча яқин бўлса, дурагайланиш ҳам шунча тўла бўлади. Буни дурагайлаш усули ёрдамида аниқлаш қабул қилинган. Бу усул бўйича нуклеин кислоталарнинг иккита занжири ўртасидан гомологиянинг нисбати бу занжирлардаги нуклеотид асосларнинг комплементарлигини текшириш йўли билан белгиланади. Бунинг учун денатурирланган (бир занжирли) ДНК агар пластинкасига уланиб, колонкага киритилади. Энди шу колонкага бошқа турдан олинган нишонланган ДНК ёки матрица РНК эритмаси қўшилади. Комплементарлик асосида ҳосил бўлган дурагайлар агарли колонкада ушланиб қолади, боғланмаганлари ундан ўтиб кетади. Ушланиб қолган радиоактивликнинг миқдори гомология даражасини кўрсатади. Дурагайлаш усули илмий тадқиқот учун, практика учун ҳам катта аҳамиятига эга. Бу усулдан фойдаланиб, молекулаларнинг, улар олинган турларнинг генетик яқинлик даражасини аниқлаш мумкин.

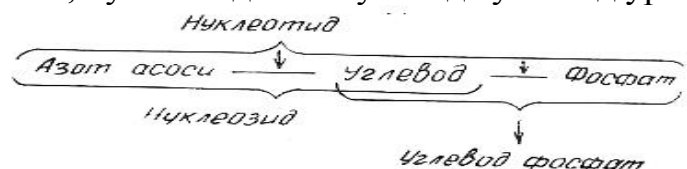
#### 4-МАВЗУ

### НУКЛЕИН КИСЛОТАЛАРНИНГ БИРЛАМЧИ СТРУКТУРАСИ. ДНК РЕПЛИКАЦИЯСИ

Режа:

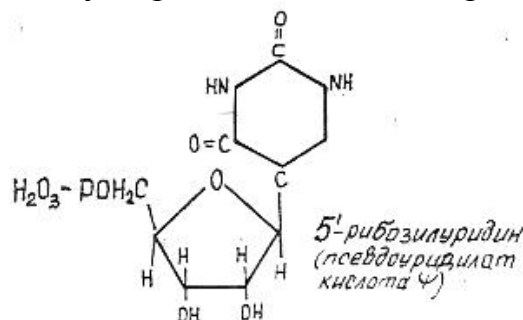
1. Нуклеотидлар структураси
2. Аденозинтрифосфатнинг хужайра энергетикасидаги роли
3. Полинуклеотидларнинг тузилиши
4. Нуклеин кислоталарнинг нуклеотид таркиби.
5. ДНК репликацияси

**Нуклеотидлар структураси.** Нуклеотидлар структурасига азот асоси, углевод қолдиғи ва фосфат кислота киради. Учта компонент молекулада: А-У-Р тартибда жойлашган. Нуклеотидни икки хил гидролизлаш йўли билан бу тартибни аниқ тасдиқлаш мумкин. Биринчи хил гидролизда углевод билан фосфат кислота орасидаги боғ узилиб, азот асоси ва углеводдан иборат гликозид ҳосил бўлади. Иккинчи хил гидролизда азот асоси эркин ҳолда ажралиб углевод билан фосфат кислотадан иборат моносахарид фосфат ҳосил бўлади. Демак, нуклеотид молекуласида углевод ўртада жойлашган:

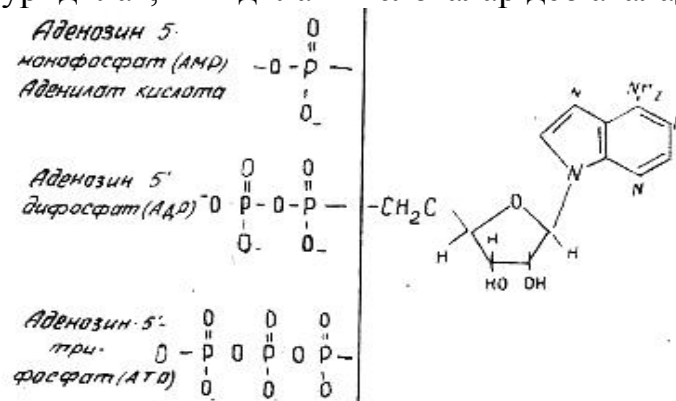


Нуклеотид таркидидаги азот асослари ва углерод компонентлардаги атомларни аниқ белгилаш мақсадида рибоза ва дезоксирибоза молекуласидаги углерод ватомлари номерлари устига штрих қўйилади. Нуклеозидлар таркибидаги азот асоси номига қараб аденозин, гуанозин, уридин ва цитидин, ДНКда учрайдиган дезоксирибозонуклетидлар дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин ва тимидин деб аталади. (Тимидин номида дезокси олд қўшимча йўқлигини сабаби тимин рибоза билан ҳосил қилган нуклеотид деярли учрамайди.)

Нуклеотидлар молекуласидаги углевод (рибоза ёки дезоксирибоза) ўзининг 1-углерод атоми билан пурин асосларининг 9-, пиримидин асосларнинг 1-азотига бириккан. Юқорида айtilган псевдоуридилат кислота бундан мустаснодир. Унинг молекуласида рибозанинг 1-углероди урацилнинг 1-азоти билан эмас, балки 5-углерод атоми билан бириккан:

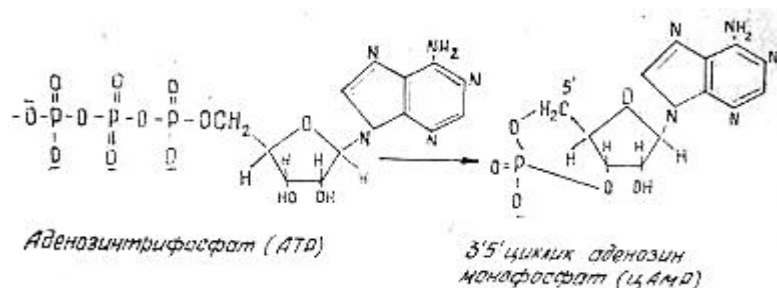


Нуклеозид нуклеотид молекуласининг фрагментиدير. Унга фосфат кислота бирикиши билан нуклеотид ҳосил бўлади. Фосфат кислота қолдиги нуклеозиднинг углевод компонентини 5-углеродига бирикади. Бириккан фосфат кислота қолдиқларининг сонига қараб нуклеозидмонофосфат, нуклеозиддифосфат, нуклеозидтрифосфатлар фарқ қилинади. Нуклеотидларнинг бу уч хили доим хужайрада мавжуд. Нуклеотидлар номенклатураси икки хил асосда тузилиши мумкин, уларни нуклеотидларнинг фосфат эфири сифатида қаралганда, аденозин унумларини аденозин 5-монофосфар (АМР), аденозин 5-(АДР), аденозин 5-трифосфат (АТР) деб аталади. Ёки кислотали фосфат группаси бўлганидан уларни нуклеозидларнинг кислота унумлари сифатида аденилат дезоксиаденилат, уридилат, тимидилат кислоталар деб аталади.



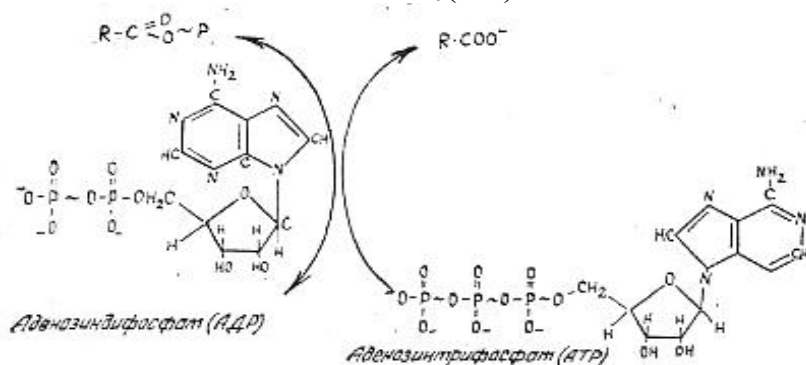
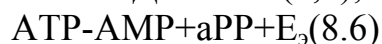
**Аденозинтрифосфатнинг хужайра энергетикасидаги роли.** Нуклеозид 5-трифосфатлар биринчи навбатда нуклеин кислоталар синтези учун зарур. Улар полинуклеотид занжирининг ҳалқаларини ташкил

килади. Бундан ташқари, жуда кўп каталитик реакцияларда кофермент сифатида иштирок этади. Барча трифосфонуклеотидлар орасида аденозин 5-трифосфат алоҳида аҳамиятга эга. Ундан аденилатциклаза ферменти таъсирида 3,5-циклик аденилат (3,5-циклик аденозин монофосфат) ҳосил бўлади. Бу циклик нуклеотид биологик актив моддалар, асосан гормонлар таъсирининг элчиси сифатида ҳужайра метаболизмини идора қилишда ҳал қилувчи роль ўйнайди. Циклик АМР дан ташқари, 3,5 циклик гуанозин монофосфат (цГМР) ҳам гормон элчиси сифатида биохимиявий жараёнларни ростлаб туришда иштирок этади ва кўпинча ц АМР нисбатан тесқари таъсир кўрсатади.



Лекин аденозинтрифосфатнинг биоэнергетик жараёнлардаги ўрни унинг барча функцияларидан бениҳоя юксак туради АТР барча тирик ҳужайраларда энергияни сақловчи ва ташувчи молекула вазифасини бажаради. АТР нинг бундай ажойиб ўзига хос фуекцияси унинг таркибидаги фосфат кислота қолдиқлари орасидаги химиявий боғлар юксак энергияли боғбўлиши, яъни уларузилганда химиявий боғлар узилганига қараганда 4-5марта ортиқ энергия ажралишига боғлиқ.. АТР молекуласида бундай боғлардан иккита, АДР да битта бор. Бундай боғлар тўлқинли чизик билан кўрсатилади. АТР нинг парчаланиши энергия сарфланиши зарур:

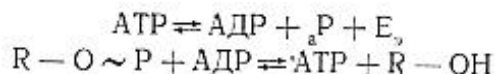
Гидролиз АТР-АДР+аР+Е(7,0); Е<sub>3</sub><sup>-</sup> эркин энергия (ккалларда)



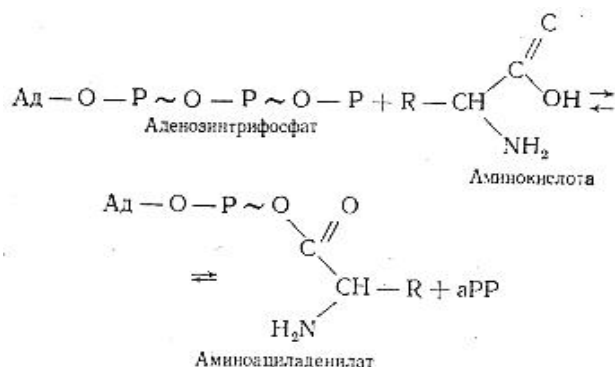
Синтез учун зарур энергияни энергияга бой бошқа молекула етказди, масалан, ацилфосфатлар. АТРнинг юксак потенциали группалар бир молекуладан иккинчисига кўчирилган ортофосфат, пиррофосфат, қолдиқлари билан бирга узатилади; бундай кўчириш реакцияларида АТР парчаланиб, эркин анорганик фосфат ёки пиррофосфат ҳосил бўлмайди ва энергия ажралиб иссиқлик шаклида ёйилмайди. Ҳужайрада энергияга бой бўлган бирикмалар (ёғ кислоталар, углеводлар) парчаланганда ажраладиган энергия макроэргик боғ шаклида оралиқ маҳсулотларда ушланади ва АДР фосфорирланиб

(анорганик фосфат бириктириб) АТР ҳосил қилиши учун сарфланади. Шундай қилиб, ҳужайрада химиявий энергия алмашинувининг универсал йўли макроэргик фосфатни кўчириш ва анорганик фосфатни боғлашга асосланган.

Оксидланиш реакцияларининг энергияси ҳисобига анорганик фосфатнинг боғланиши фосфорловчи оксидланиш деб аталади, у митохондрияларда кечади:

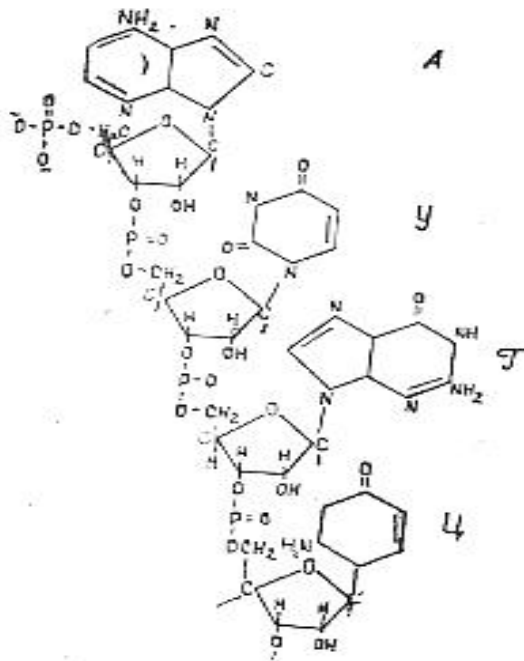


АТР нинг юксак потенциали яна АМР қолдигини кўчириш билан кечадиган турли синтетик реакцияларда сарфланади. Бу жараён синтетаза (фосфокиназа) ферментлари иштирокида пиродифосфат кислота ажралиши билан боради.



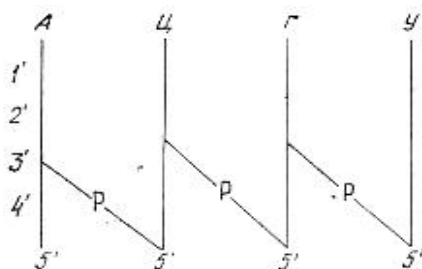
**Полинуклеотидларнинг тузилиши.** Нуклеин кислоталар химиявий тузилиши бўйча молекуляр масса 20000 дан бир неча миллионгача бўлган поленуклеотидлардир. РНК ДНК га нисбатан анча содда, молекуляр массаси ҳам кичикроқ, таркибига кирадиган моноклеотидлар сони 70 дан 100 мингача, ДНК да эса 100 миллионгача етади.

Поленуклеотид молекуласида моноклеотидлар ўзаро фосфат кислота орқали боғланган. Фосфат группа иккита қўшни нуклеотидларнинг углевод қолдиқларини 3- ва 5-атомлари билан эфир боғлари ҳосил қилганидан у 3-5 фосфодиэфир деб аталади. Полинуклеотид занжир шохланмаган узун тузулма ҳосил қилганидан унинг бир учиди эркин 5 OH, иккинчи учиди эркин 3 он бўлади. Полинуклеотидларда моноклеотидларнинг бирин-кетин келиши (изчил жойлашуви) унинг бирламчи структурасини таш қил қилади. Уни аниқлаш жуда ҳам муҳим ва катта қизиқиш туғдиради, чунки нуклеотидларнинг нуклеин кислота молекуласидаги жойлашиш тартиби химиявий код бўлиб, уларнинг биологик функциясини ифода қилади.



Бу схемада тетрануклеотид формуласи келтирилган, чапда 5-учи фосфат группа тутади, ўнг учиди 3-углерод эркин ОН группа тутади. Полинуклеотид занжири узун бўлганда унинг формуласини бундай тўла ёзиш анча машаққатли иш. Шунинг учун нуклеин кислотанинг формуласини қисқартирилган шаклда ёзиш қабул қилинган. Бунда ҳар бир нуклеотид битта бош ҳарф билан ифодаланади: N-умуман нуклеотид; А,Г,Ц,У,Т(А,Г,С,У(С)-цитозин,У(У)-урацил, Т(Т)-тимин.Бунда фосфат Т)-конкрет нуклеотидлар:А(А)-аденин, Г (G)-гуанин, Ц кислота қолдиғи (P) олдинда бўлса, у мономернинг 5-учини, орқада бўлса 3-учини билдиради. Нуклеозидларни вертикал чизиқлар шаклида ифодалаб, 1-учида азот асоси, 5-учида фосфат группа ва унинг 3-ўриндаги С билан боғланганлиги кўрилади (қуйидаги формулага қаранг).

Яна ҳам соддароқ ёзилганда у қуйидаги кўринишда бўлади:  
pApЦpГpУ ёки pAЦГУ



Нуклеин кислоталарнинг бирламчи структурасини ўрганиш ҳозирги вақтда жуда ҳам такомиллаштирилган ва автоматлаштирилган.Аввало РНК ва ДНК ни ҳужайралардан, ҳужайрадан кичик фракциялардан ёки вируслардан ажратиб олиш, тозалаш усуллари ишлаб чиқилади. Нуклеин кислоталар таркибида фосфат кислота бўлганидан улар кислота хоссасига эга ва физиологик шароитда манфий зарядланган бўлади.

Ҳужайрада улар мусбат зарядга эга оқсиллар (асосан гистонлар) билан бирикиб, нуклеопротеид шаклида учраганидан биологик материал



майдаланган (гомогенлаштирилган) дан сўнг нуклеин кислотанинг оксил билан ҳосил қилган комплекси бузилади. Бунинг учун майдаланган материал Na Cl нинг кучли эритмаси ёки фенол билан ишланиб, ажралиб чиққан нуклеин кислота этанол билан чўктирилади. Бу жараён оксилни денатурлайдиган компонент (масалан, натрий додецил сульфат ёки натрий салицилат) иштирокида ўтказилса, центрифугалашда денатурланган оксил фенол фазасида, нуклеин кислоталар эса сув муҳитида қолади. Сўнггра нуклеин кислоталар совуқда этанол билан чўктирилади.

Ҳозирги вақтда РНК билан ДНК аралашмасини компонентларга ажратиш учун ион алмашинувчи, адсорбцион, гель- ичига кирадиган ва аффин хроматография ва концентрация градиентида ультрацентрифугалаш усуллари қўлланилади. Бу ва бошқа (масалан, гибридизация) усуллар амалий қўлланмаларда батафсил келтирилади.

**Нуклеин кислоталарнинг нуклеотид таркиби.** Нуклеин кислоталарда азот асослари- А,Г,Ц,У,Т ларнинг процент нисбатини ўрганиш бир қатор муҳим кашфиётларга олиб келади. Полинуклеотидлар таркибидаги нуклеотидларни аниқлаш учун нуклеин кислота тўла гидролиз қилиниб, ҳосил бўлган нуклеотидлар хроматографик усулда (одатда, ион алмашинувчи устунчада) анализ қилинади. Полимерни мономерларга парчалаш учун нуклеин кислоталар гидролизини катализловчи нуклеазалар деб аталадиган ферментлардан фойдаланилади.

Ҳар бир РНК ва ДНК молекуласи айни нуклеотидлар таркибига эга бўлса ҳам, бу унинг структурасини ягона ўзига хос (уникал) характеристикаси эмас. Нуклеин кислотанинг ўзига хослигини фақат таркибидаги асосларнинг изчил жойлашуви ифодалайди. Аммо ДНК молекулалари нуклеотидлари таркиби учун уларнинг ажратиб олинган манбаидан қатъи назар муҳим умумий қонуниятлар маълум: уларнинг нуклеотид таркиби юқорида келтирилган Чаргафф қоидаларига бўйсунди, яъни ДНК молекулаларида:

Пурин асослари (А+Г) сони пиримидин асослари (Ц+Т) га тенг, яъни пуринларнинг пиримидинларга нисбати бирга тенг. Аденин қолдиқларининг сони тимин қолдиқлари сонига тенг, яъни адениннинг тиминга нисбати бирга тенг (А/Тқ1). Гуанин қолдиқларининг сони цитозинга нисбати бирга тенг (Г/Цқ1). Бу қоидалар ДНК молекуласининг фойиздаги структурасини аниқлашда ғал қилувчи аҳамиятга эга бўлади.

**ДНК репликацияси.** ДНК биосинтези-генлар репликацияси, яъни организм белгиларининг юзага чиқишидир. Гетерополимер бўлган информатсион макромолекулалар генетик информацияни ўзининг бирламчи структураларида сақлайди ва ташиydi. ДНК молекуласида нуклеотидлар изчил жойлашган бу информация репликация ҳам транскрипцияда амалга ошади. Генетик информациянинг реализация қилиниши ДНК

Молекуласида нуклеотидлар тартиби шаклида ёзилган буйруқ (кўрсатма)ни оксил молекуласи синтезида аминокислоталар тартибга айлантиришдан иборат. Информация оқими қуйидаги йўналишда кечади:

ДНК→РНК→оксил→хужайра→организм

Ҳозирги замон биологиясининг асосий постулати ДНК РНК ни яратади, РНК оксилни. ДНК нинг ўзи информация хазинаси, у оксил синтезида бевосита иштирок этмайди. ДНК фақат хужайра циклида, бола хужайралар пайдо бўлишидагина иккита занжирга ажралади ва бунда ҳар бир занжир мувофиқ етишмаган комплементлар занжир синтезланиб, битта ДНК молекуласидан иккита молекула яратилади. Бу фундаментал жараён хужайралар бўлиниши, белгиларнинг наслдан-наслга ўзгармай ўтиш асосида бўлиб, репликация, нусха олиш деб аталади. Ирсий информация амалга ошишининг иккинчи босқичи оксил синтезини бошқарадиган уч хил РНК молекулаларини синтез қилишидир. Бу жараён транскрипция (кўчириб ёзиш) дейилади. Молекуляр биологиянинг “марказий догма”си  $\text{ДНК} \rightarrow \text{ДНК} \rightarrow \text{РНК} \rightarrow \text{оксил}$  принципига мувофиқ, информация оксилга ўтар экан, унинг орқага қайтмаслиги қайд қилинади.

Кўп асрлар давомида номаълум бўлиб келган организм ирсий бегиларининг наслдан-наслга ўтиш муаммоси ДНК молекуласининг икки занжирли тузилиши ва бу занжирлар тузилиши ва бу занжирлар бир-бирига комплементар эканлиги кашф этилгандан сўнг, тез суръатлар билан ишланиб, қисқа вақт ичида ҳал бўлди.

Уотсон ва Крик гипотезасига мувофиқ, ДНК қўш спиралининг ҳар битта занжири комплементар бола занжирлар репликацияси учун матрица сифатида хизмат қилади. Шунинг эслатиб ўтиш керакки, макромолекулаларнинг аниқ қайтадан яратилиш ва ирсий информацияни узатилиш ғояси биринчи бўлиб Россияда Н.К.Кольцов томонидан ишлаб чиқилган эди. 1927 Кольцов хужайралар кўпайишида хромосомалар («ирсий молекулалар») матрица асосида ўз-ўзидан кўпаяди, деган гипотезани эълон қилди. Лекин у йилларда у йилларда ҳали оксилларнинг функционал аҳамияти ҳақида маълумот етарли бўлмагандан, бу хусусият ДНК га эмас, оксил молекуласига тааллуқли деб фараз қилинган эди. Шундай бўлса ҳам, макромолекулаларнинг автокаталитик йўл билан янгидан пайдо бўлиши ҳақидаги фикрнинг ўзи шубҳасиз, башоратдир.

**ДНК биосинтези.** 1956йили Америка олими Артур Корнберг бир занжирли ДНК дан матрица сифатида фойдаланиб, унинг қўш занжирини синтез қиладиган ДНК-полимераза ферментини очди. 1950 йиллар охирида М.Мезельсон ва Ф.В.Шталь оқилона экспериментлар қилиб, ҳар бир янги ДНК молекуласининг ҳар бир занжири олдинда мавжуд (тайёр) молекуладан, иккинчиси эса янгидан синтез қилинган эканлигини очиқ-ойдин тасдиқлаб берди. Бундай механизм ярим консерватив синтез деб аталади, чунки ҳар бир бола ДНК да фақат битта она занжир сақланади. Олинган натижалар репликациянинг консерватив усулини тўла инкор қилади, чунки акс ҳолда, бир бола ДНК си иккала бошланғич занжирни тутиши, бошқаси эса иккита янги синтезланган занжирдан иборат бўлиши керак. Унинг исботи қуйидаги мисолдан осон кўрилади.

Мезельсон ва Шталь аввало ичак таёқчаларини азот манбаи ягона  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  бўлган озиқ муҳитида ўстириб, микроб танасидаги барча оддий азот  $^{14}\text{N}$  ни унинг стабил оғир изотопи ( $^{15}\text{N}$ ) билан алмаштирган. Бундай муҳитда

Ўстирилган ДНК нинг ҳамма азоти ҳам  $^{15}\text{N}$  билан алмашди. Бундай ДНК табиий контрол бактериялар ДНК сидан анча оғир, чунки уларнинг ДНК сидаги барча азот  $^{15}\text{N}$  дир. Бу иккала ДНК ни ультрацентрифугада осонлик ажратиш мумкин. Энди бу оғир азот тутувчи микробларни ювиб, озиғи  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  бўлган муҳитда ўстирилиб хужайралар сони икки марта кўпайтирилганда улардан ДНК ажратиб центрифуга қилинса бир генерациядан кейинги ДНКнинг ультрацентрифугадаги анализи 50%  $^{14}\text{N}$  ДНК дан оғир битта зонани кўрсатди. Бошқа ҳеч қандай жияк йўқ эди. Демак биринчи бўлишдан кейин ДНК нинг барча молекулалари 50%  $^{15}\text{N}$  ва 50%  $^{14}\text{N}$  дурагай ДНК дан иборат эканини кўрсатди. Икки бўлиниш циклидан кейин олинган ДНК анализини кўрсак (хужайраларнинг иккинчи авлоди) фақат иккита зона топилади. Бир олдинги дурагайга тўғри келади: 50%  $^{14}\text{N}$  ДНК ва 50%  $^{15}\text{N}$  ДНК иккинчисидан жияк 100%  $^{14}\text{N}$  ДНК дан.

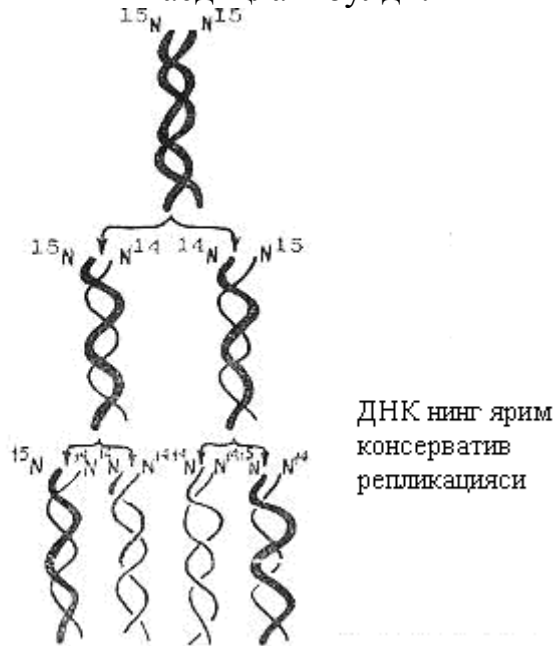


Мезельсон ва Шталь тажрибаларида бошланғич ва ҳо-  
снл бўлган ДНК молекулаларини ультрацентрифугалаб тигизлик  
мувозанатида ажратиш.

Бу маълумотлар шуни аниқ кўрсатадики, она ДНК нинг ҳар икки занжири янги комплментар занжирлар синтези учун матрица бўлиб хизмат қилади.

Транскрипция қилинадиган қисмнинг узунлиги дурагайлаш усули билан аниқланади.

Хромосомалар репликациясини тушунишда иккинчи муҳим қадам репликация бошланган жойдан ҳар иккала занжир ҳам бир вақтда репликация қилинишини тасдиқлаш бўлди.



Аввало ҳалқали ДНК тутадиган бактерияларда (Е.соли), сўнгра эукариот хужайраларда ҳам радиоактив тимидин билан ўтказилган тажрибалар репликация жараёнида ДНКнинг иккала занжири ҳам бир вақтда синтезланишини тасдиқлади. Гап шу ердаки, агар Е.соли ўсаётган муҳитга  $^3\text{H}$ -

тимидин қўшилса у ҳужайрада dTTP га айланиб репликация давомида истеъмол қилинади. Бу тажрибаларни ўтказган Кейрнс ДНК репликациясининг моделини таклиф қилди. Бу моделнинг асосий хусусияти шундан иборатки, ДНК молекуласи репликация бошланишининг нуқтаси деб аталадиган специфик участкага эга.

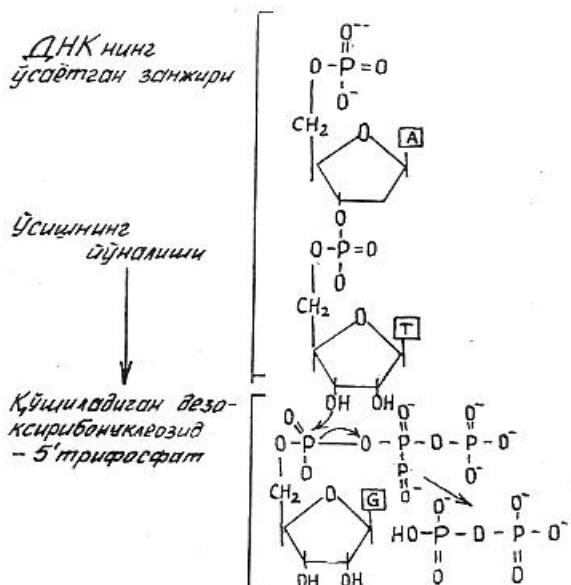


Мана шу ерда ДНК структурасини қатъий аниқ жойда ёядиган махсус шарнир механизми борки, у бир вақтда репликация қилиш учун икки занжирни ҳам очади. Ҳосил бўлган репликация “айриси” қўш занжир бўйлаб икки занжирнинг нусхаси олинмагунча ҳаракат қилади. сўнгра эукариот ДНК репликацияси бир вақтда жуда кўп (уларнинг сони 1000дан ҳам ортиқ) нуқталарда бошланиши тасдиқланди. Бундай нуқталарининг ҳар биридан бир вақтда қарама қарши томонларга қараб иккита репликатив айри ҳаракатда бўлади. Натижада бутун эукариот хромосоманинг репликацияси жуда тез ўтади. ДНК репликацияси асосан А.Кормберк кашф этган. Бир ДНК-полимераза ферменти таъсирида ўтади. У субстрат сифатида дизоксирибонуклеотид трифосфатларни истеъмол қилиб, дизоксирибонуклеотид тид қолдиқлари ДНК занжирининг учига уланиши катализлайди.

Бу ерда: dNMP дизоксирибонуклеозид 5, монофосфат ; d NTP- дизокси-рибозонуклеозид-трифосфат.

Агар бу олдбирикмаларнинг тўрт хилидан биттаси бўлмаса ҳам ДНК синтезланмайди. Дизоксирибонуклеозид 5-трифосфатларнинг биттаси ҳам тегишли 5-ди ёки монофосфатлар билан алмаштирилиши ҳам мумкин эмас. ДНК-полимераза ишлаши учун  $Mg^{2+}$  ионларига муҳтож.

ДНК полимераза янги дизоксирибонуклеотидларнинг  $\alpha$ -фосфатнинг ДНК нинг тайёр занжирининг эркин 3-гидроксил группасига боғланишини катализлайди бинобарин ДНК синтези  $5 \rightarrow 3$  йўналишида боради. ДНК таркибида ҳар бир янги фосфодиэфир боғ ҳосил бўлиши учун зарур энергия олдмоддалар- дизоксирибонуклеозид 5-трифосфатларнинг  $\alpha$  ва  $\beta$ -фосфат группалари орасидаги пиродифосфат боғларининг узилиши билан таъминланади.

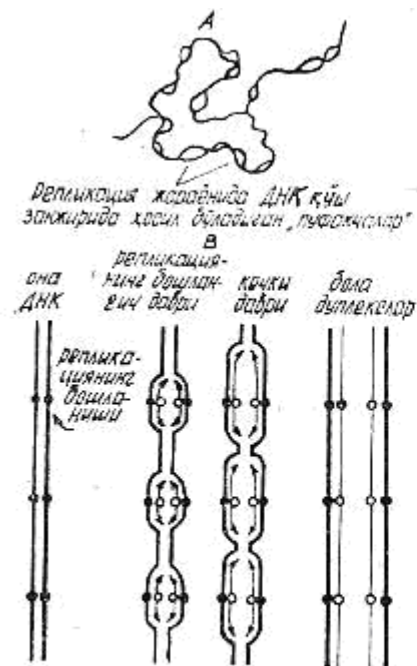


Корнберг ва унинг ходимлари ДНК молекуласининг тайёр намунаси ДНК-полимеразага нима учун лозим эканлигини текшириб, у ДНК-полимераза реакцияда иккита муҳим вазифа бажаришини аниқладилар: бир-намуна (затравка, томизғи), иккинчиси- матрица сифатида. ДНК-полимеразанинг ўзи намуна бўлмаганда янги ДНК синтезини бошлай олмайди.

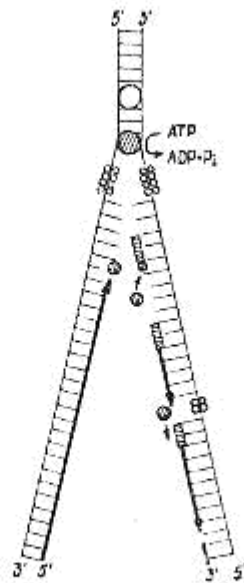
ДНК репликацияси учун фақат ДНК-полимераза ферментининг ўзи етарли эмас. Бугунги кунда ҳам репликация жараёнининг тўла ва аниқ тасвири йўқ, бу жараёнда маълум функцияни бажарадиган йигирмадан ортиқ фермент ва оксиллар иштирок этса керак. Репликациянинг ўзи бирин-кетин кечадиган бир қанча босқичлардан иборат. Бу босқичларнинг ҳаммаси жуда катта тезликда, олий даражада аниқ ўтади.

ДНК нинг қўш спирали зич ўралган тузилма ва қодлайдиган асослар бураманинг ичида бўлганида репликация қиладиган ферментлар матрицанинг нуклеотидлар қаторини “ўқиши” учун она ДНК сининг занжирлари ҳеч бўлмаса калта бир бўлимида ечилган бўлиши лозим.

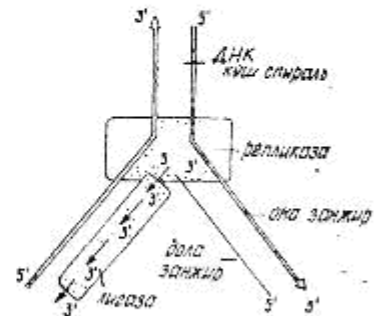
Қўш занжир ўримининг ёзилиши-ечилиши ва иккала занжир янгидан қўшилиб кетмаслиги учун уларни бир-биридан маълум масофада тутиб вазифасини бир нечта махсус оксиллар бажаради. Хеликаза (helix-бурама сўзидан олинган) номли ферментлар ДНК нинг калта участкаларини ёзади, ажралган занжирлар қайтадан қўшилиб кетмаслиги учун ДНК-боғловчи оксиллар; репликация жараёнида занжирлар жуда тез ечилишида узилиб кетмаслиги учун топоизомераза (прокариотларда гираза, *hpa*s-айланиш сўзидан) ва яна бир қатор фермент ва оксиллар, матрицалар ва инициаторлар иштирок этади.



Репликация жараёнда ДНК қыш занжиринда ҳосил бўладиган «пуфакчалар».



ДНК бир занжирини узилиб қисқа фрагментлар шаклида репликацияси.



Репликациянинг умумий схемаси

Занжирларнинг ёйилишида ҳар бир қўш асослар ажралиши учун икки молекула АТР нинг гидролиз энергияси сарф бўлади. Умуман, ДНК нинг ёйилиши ДНК репликациясининг энг қизиқарли ва энг мураккаб муаммоларидан биридир.

Йигирмадан ортиқ репликатив ферментлар ва факторлардан иборат тўла комплекс ДНК-репликаза системаси ёки қисқача реписома деб аталади. Е.солі хужайраларида маълум даражада бир-биридан фарқ қиладиган учта ДНК-полимераза мавжуд. Улар I, II, III полимеразалар деб белгиланади. I ва III полимеразалар бола занжирининг узайишини таъминлашидан ташқари, экзонуклеазалик активлигига ҳам эга, яъни ДНК молекуласининг ҳар икки учидан ҳам охириги нуклеотидларни ажрата олади. Е.солі хужайрасида ДНК занжири элонгациясига асосан III ДНК-полимераза жавоб беради. II ДНК –полимеразанинг функцияси ҳозирча аниқланган эмас.

ДНК молекуласининг ҳар иккила занжирининг бир вақтда репликация қилиниши бир қатор янги муаммоларни келтириб чиқарди. Улардан бири ДНК- полимеразалар янги мономерларни фақат ДНК нинг 3-учига боғлашгагина қобил эканлигидан келиб чиқади. Унда ДНК нинг 5-учидан бошланадиган синтез қандай ўтади? Бунинг учун алоҳида механизм ва махсус фермент борми ёки битта ферментнинг ўзи занжирнинг 3-учидан ҳам, 5-учидан ҳам узайтира оладими? Бу саволларга япон олими Рейджи Оказакининг муҳим кузатишлари жавоб берди.



1969 йили бу олим ҳар иккала занжир бир вақтда репликация қилинганда, бир занжир узлуксиз, иккинчи янги занжир эса калта фрагментлар шаклида синтезланишини кашф этди. Узлуксиз синтезланадиган занжир “бошловчи”, узилиб синтезланадиган “қолоқ” занжир деб аталади. Сўнгра Оказаки фрагментларининг синтези учун томизғи (затравка) сифатида РНК нинг кичик бўлакчалари керак эканлиги ҳам маълум бўлди, чунки ДНК-полимеразанинг ўзи занжирни инициирлай олмайди. Рибонуклеозид трифосфатлардан 5→3 йўналишидаги боғланиш *примаза* деб аталади. РНК затравка калта бир занжирли РНК бўлиб, унинг 3-учига изчилик билан дезоксирибонуклеотид қолдиқлари бирикади. Энг кейинги вақтда ҳар иккала занжир ҳам калта фрагментлар шаклида синтезланиши исботланди.

Репликация бир неча инициа нуқталарида бошланади ва ҳар бир репликация айриси иккала томонга ҳаракат қилади. Қўш спиралнинг айрилиши занжирнинг биттасини танлаб, унга уланадиган “айрувчи оксиллар таъсири” туфайли боради. Ҳосил бўлган 1000-2000 та нуклеотиддан тузилган Оказаки фрагментлари, сўнгра *лигаза* ферменти ёрдамида бир-бирига уланади.

Репликация ҳалқали ДНК молекулаларида ўзига хос механизм билан боради, бунда бошқа ферментлар қатнашади. Лекин жараён шу қадар мураккаб бўлишига қарамай жуда тез суръатда ўтади: 1 минутда битта репликатив айриқ 45000 қўш нуклеотидни боғлайди. Унинг барча нозик деталлари мукаммал ўрганилганига ҳайратда қоласиз. Оказаки ферментлари ДНКнинг кечиккан занжирига ДНК-лигаза ёрдамида 3-5 дифосфоэфир боғлар орқали уланади. Дифосфоэфир боғини ҳосил бўлиши энергия сарф қилинишига муҳтож. Бу энергия НАД + ёки АТР нинг приофосфат боғини бир вақтда узилиши билан уланган.



Репликация жараёнида хатолар, яни бир нуклетид ўрнига бошқасининг жойлашиши жуда кам учрайди. Е. солі ДНК си учун 1 хато 10-10 нуклетидга тўғри келади.

## 5-МАВЗУ

### РНК СТРУКТУРАСИ ВА УНИНГ СИНТЕЗИ. ТРАНСКРИПЦИЯ ЖАРАЁНИ

Режа:

1. РНКнинг типлари ва учраши
2. Матрица РНК си.
3. Транспорт ва рибосома РНК лар
4. Транскрипция жараёни
5. Эукариот информацийон (матрица) РНК.
6. Кэпирлаш

Бажарадиган функциясига қараб, РНК лар асосан уч синфга бўлинади: мессенжер (элчи)-информацийон РНК (м-РНК), рибосомол РНК (р-РНК) ва транспорт (танишувчи) РНК (т-РНК). Улар ҳам иккиламчи ва учламчи структурага эга. Вируслар РНК си м-РНК га жуда ўхшаш бўлади.

Эукариот хужайраларда РНК ядрога, цитоплазмада ва цитоплазма органеллалари (рибосома, митохондрия, хлоропластлар)да бўлади. Ядро РНК синтезланадиган асосий жойдир. Барча РНК типларининг функцияси тирик хужайрада ДНК да ёзилган генетик информацийни маълум ўзгаришлар билан кўчириб олиб (дезоксирибоза ўрнига рибоза, тимин ўрнига урацил), алмаштириб оксил синтез қиладиган жойга (рибосомаларга) етказиш ва оксил синтези жараёнида шу информацийни амалга ошириш (трансляция), таржима қилишга қаратилган. Ичак таёқчасида РНК сининг типлари куйидаги нисбатда бўлади: м-РНК~2, т-РНК~16% ва р-РНК~82%.

РНК нинг типлари

| РНК ларнинг хоссалари |                      |                   |                                        |                                        |
|-----------------------|----------------------|-------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Синф                  | Седиментация тезлиги | Молекуляр массаси | Нуклеотид қолдиқларининг тахминий сони | РНКнинг хужайрадаги умумий миқдори (%) |
| м-РНК                 | 6—25 s               | 25000—1000000     | 75—3000                                | ~2                                     |
| т-РНК                 | 4                    | 23000—30000       | 73—93                                  | ~16                                    |
| р-РНК                 | 5                    | 35000             | 100                                    |                                        |
|                       | 16                   | 550000            | 1500                                   | ~82                                    |
|                       | 23                   | 1100000           | 3100                                   |                                        |

РНК нинг ҳар уч типи ҳам оксил синтезида иштирок этади, лекин уларнинг ҳар бирининг бу жараёнда махсус, такрорланмас функцияси бор.

Эукариот хужайраларда РНК нинг бошқа типлари ҳам топилган, лекин уларнинг функцияси ҳали аниқланган эмас, шунинг учун уларнинг белгилари ҳам йўқ. Уларнинг баъзилари ядрога, бошқалари цитоплазмада учрайди.

РНК турли типларининг функциясини куйидагича тасвирлаш мумкин:



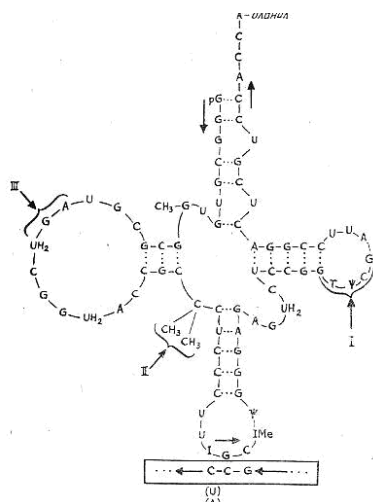


**Матрица РНК си.** РНК нинг бу типи информатсион РНК деб ҳам аталади. У транскрипция жараёнида ДНК нинг занжирларидан бирида ҳосил бўлиб, унинг айрим бўлагининг аниқ нусхасини ташкил қилади, фақат углевод компоненти бўйича фарқ қилади (дезоксирибоза ўрнига рибоза) ва тимин ўрнига урацил тутаяди. РНК нинг бу типи ДНК даги информацияни ташувчиси бўлгани учун информатсион РНК (и-РНК) деб аталса, матрица РНК си м-РНК номи билан юритилиши оқсил синтезида матрица (қолип, андаза) сифатида хизмат қилгани учун берилган. Информатсион РНК энг узун РНК ва унинг умри жуда қисқа: синтезланган жойи-ядродан цитоплазмага ўтиб рибосомага жойлашади ва полипептид занжир учун матрица бўлиб хизмат қилади.

**Транспорт ва рибосома РНК лар** – т-РНК лар энг кичик РНК бўлиб, барча тирик ҳужайраларда мавжуд ва оқсил синтези учун зарур компонентдир. Турли т-РНК лар 70 дан 85 гача моноклеотидлар тутаяди, ўртача молекуляр оғирлиги 25000.

Ҳар бир ҳужайрада ҳар бир аминокислота учун камида битта т-РНК мавжуд. Битта ҳужайрада 50дан 70гача т-РНК бор, бинобарин, битта аминокислота учун иккита ёки кўпроқ, лекин специфик т-РНК тўғри келади. т-РНК кўп турларининг шакли органелларга, келиб чиқиш манбаига боғлиқ. т-РНК нинг келиб чиқиш ва спецификлиги учун ёзилишида кўрсатилади, масалан, т-РНК<sub>вал</sub> – валин т-РНК<sub>си</sub>, РНК вал ачитқи-унинг ачитқидан олинганини кўрсатади.

50 дан ортиқ турли т-РНК ларнинг бирламчи структураси аниқланган. Энг биринчи бўлиб ачитқининг аланин т-РНК си 1965 йил Холлэй томонидан кашф этилган эди. Унинг таркибида бир нечта нодир нуклеотидлар мавжуд бўлиш улар изчил жойлашувини аниқлашни қулайлаштиради. Бирламчи структурада қўш асосларнинг максимал бўлиши, беда барги номи билан маълум иккиламчи структурани беради. Бу структуранинг бир қатор характерли белгилари бор. Уларда учта ҳалқа ва тўртта устунча мавжуд. Антикодон ҳалқаси махсус аминокислотага мос келадиган учта нуклеотид триплет тутаяди. т-РНК ўзининг антикодони билан матрицанинг кодонига бирикади.

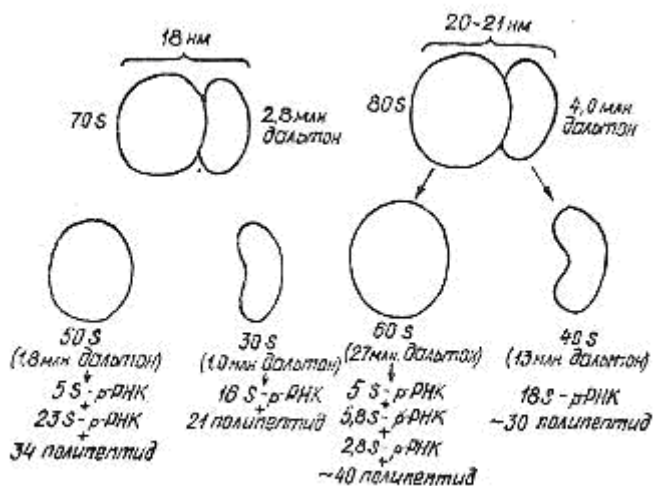


тРНК молекуласининг беда барги модели

Иккинчи ҳалқада тимин-псевдоуридин ( $\psi$ ) нуклеотидлар ва дигидроуридин учрайди.

Оқсил синтезининг асосий ўрни бўлган рибосомалар иккита субъединица (кичик бўлақлар) дан тузилган. У жуда ихтисослашган мураккаб тузилма. Унинг диаметри тахминан  $200 \text{ \AA}^0$  (20нм), Е. Солі рибосомаси энг яхши ўрганилган, унинг массаси 2500кД, седиментация коэффиценти 70 S

Эукариот ҳужайралар цитоплазмасининг рибосомалари бир оз йирик бўлади. Интакт эукариот рибосоманинг седиментация коэффиценти 80 S, у диссоциланган 60 S ва 40 S субъединицалар ҳосил қилади. Кичик бўлақчи 18 S РНК, катта бўлақча эса учта: 28 S, 7,8 S (анъанага кўра у 5,8 S РНК деб белгиланиб келади) ва 5 S РНК молекулалари тутди. Прокариот ва эукариот рибосомаларнинг характеристикаси келтирилган.

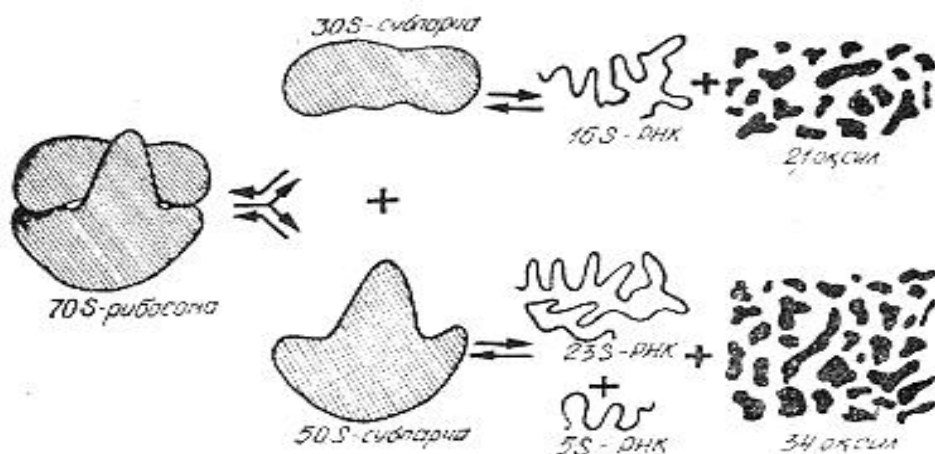


Прокариот ва эукариот рибосомаларнинг схем атик тузиллиши.

Интакт комплекс кичик бўлақ (субъединица) ларга диссоциланади, уларнинг ўзи РНК ва оқсил молекулаларига ажралади. Рибосомалар таркибига кирадиган барча оқсил ва рибосома молекулаларининг бирламчи структураси тўла ўрганилган:

5 S р-РНК 120 мошонуклеотид, 16 Sp-РНК 1542 та ва 23 S р-РНК 2904 та нуклеотид тутди. Улар рибосома каркасини тузишда ташқари, оқсил молекулалар билан специфик муносабатда бўлади.

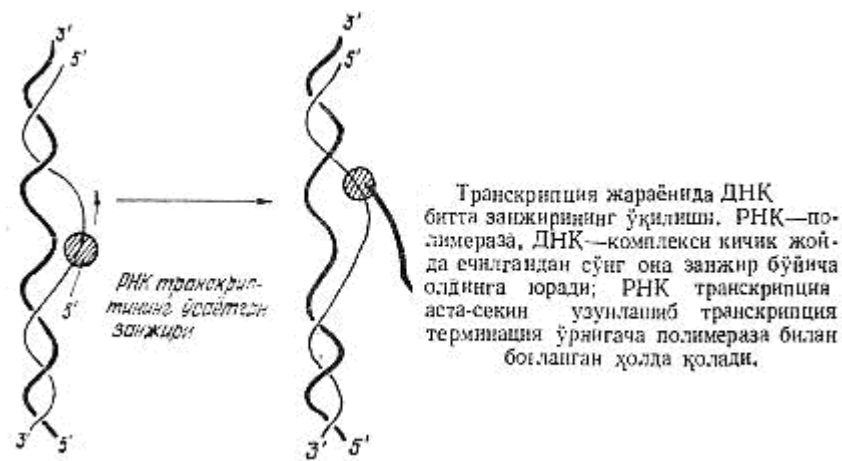
Рибосома таркибидаги бу компонентлар, шу жумладан, оксил молекулалари ҳам фақат биттадан нусхада мавжуд. Шубҳасиз, рибосомалар



реконструкцияси ҳужайрада кечадиган табиий жараён, шунинг учун уни “тўплаш, йиғиштириш” ҳам дейилади. Агар тўла диссоциациядан сўнг компонентлар қайтадан йиғиштирилса, улар ўз-ўзидан саранжомланиб, интакт субъединицаларни ва сўнгра бутун рибосомани ҳосил қилади.

**Транскрипция жараёни.** Генлар транскрипцияси РНК ҳосил бўлишига олиб келади. РНК нинг ҳамма турлари ҳам ядрога синтезланади. ДНК матрицасида кечадиган ҳамма синтезлар ДНК да ёзилган ахборотга мувофиқ амалга ошади. РНК нинг барча турлари т-РНК, р-РНК ва м-РНК синтезланишида, ДНК асосларнинг тартиби РНК асослари тартибини белгилайди.

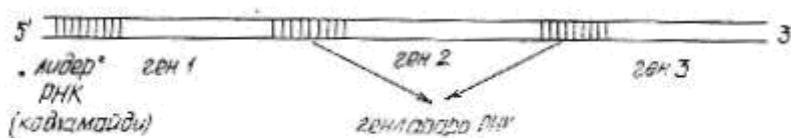
Полинуклеотид занжири фақат рибозонуклеотид трифосфатлардан синтезланади ва бу жараёнда аноргик пирофосфат молекулалари ажралиб чиқади. РНК синтези бир неча босқичда бажарилади: а) инициация (бошланғич), в) полимеризация ва з) ТЕРМИНАЦИЯ (тугаш). Реакциянинг бошланиши учун махсус оксил – сигма фактор тугаши учун тугатувчи терминатор-кодон иштирок этади. Транскрипция ДНК қўш спиралининг бир занжирида амалга ошади. Бунинг аввало полимераза ферменти ДНК молекуласининг инициация сигнали берадиган нуқтасига бирикади, бу ерда қўш боғ ечилиб қўш занжирнинг фақат биттаси ўқилади. Нусхаси олинadиган шу занжир бўйича полимераза 5 дан 3 га томон йўналиб 3→5 шаклда борадиган РНК занжирини ҳосил қилади. ДНК матрицасида янги синтез қилинган махсулот (РНК молекулалари) *транскрипт* деб аталади.



Полинуклеотид занжири катта тезликда синтезланади. Масалан, транскрипция қилинганда бир секундда 50 нуклеотид бирикади. Ичак таёқчаси хромосомаси транскрибирланишида 90-95% матрица РНК си пайдо бўлиб, хромосоманинг қолган қисми т-РНК, р-РНК лар, ген ишлаши учун зарур бошқа поленуклеотидлар: лидерлар, спейсерлар ва занжирнинг думидаги нуклеотид қаторларини кодирлайди.

Матрица РНК лари полипептид занжирини кодлайди. Улар бир занжирли турли узунликка эга полинуклеотид. У моногенли (бир цистронли), яъни битта оксилнинг синтезини таъминлашга мўлжалланган ёки полигенли (полицистронли), бактериялардан асосан бир нечта оксилларни кодирлайдиган бўлади.

Бактериал транскрипцияда ҳосил бўладиган м-РНК доимо полипептидни кодирлаш учун керак бўлганидан кўпроқ нуклеотид тутади. Бунинг сабаби шундаки, м-РНК 5-учида кодирламайдиган полинуклеотид “лидер” гурпуага эга. Унинг узунлиги 25 дан 150 асосгача. Полиген м-РНК транскрибирланмайдиган генлараро соҳаларни ёки спайсерларни ҳам сақлайди. Улар балки транскрипция суръатини тартибга солишда иштирок этса керак.



Прокариот ҳужайра полиген м-РНК снинг схематик тасвири.

Матрица РНКси ДНКга мухтож РНК-полимераза томонидан синтезланади. Фермент ДНКга мухтож ДНК-полимеразага ўхшашдир. ДНКнинг икки занжиридан фақат биттаси транскрибирланади. Эукариот ҳужайра ядросида уч хил РНК-полимераза мавжуд.

Уларнинг маҳсулоти

I РНК-полимераза

5,8s-18s ва 28s р-РНК

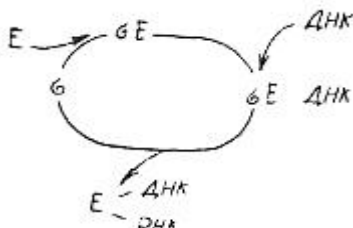
II —>>—

м-РНК

III —>>—

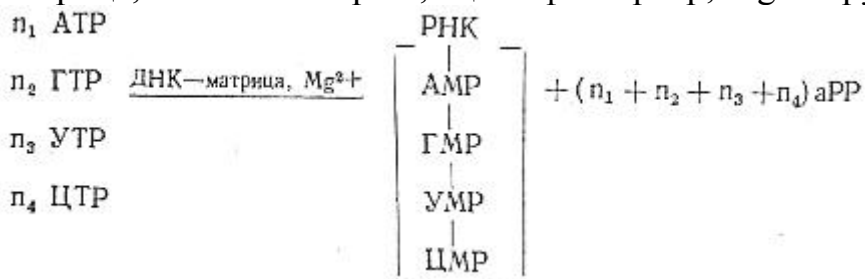
т-РНК 5 s р-РНК

РНК нинг барча типлари ҳам мана шу полимераза ферменти томонидан бажарилади. Прокариотларда бу битта ферменти томонидан бажарилади. Прокариотларда бу битта фермент – E. coli полимераза системасининг молекуляр массаси ~ 700 000. У янги синтезланаётган РНК занжирига оддий нуклеотидларнинг баъзи аналогларини ҳам киритиш қобилиятига эга (масалан, ЦТР, УТР, ГТР лар ўрнига 5Вг УТР, 5Вг, ЦТР, 5F- УТР). РНК синтези учун иккита оксил фактори керак, улардан бири сигма фактор  $\delta$  фақат РНК занжири синтезининг инициацияси учун зарур, иккинчиси нуклеотидлараро боғларни ҳосил қилади. РНК- полимераза реакциясининг инициацияси (сигма цикли) қуйдагича.



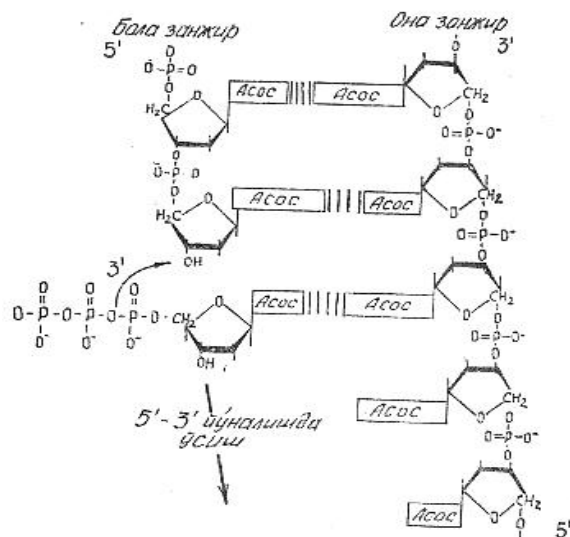
Бу ерда: E-фермент РНК-полимераза;  $\delta$ -сигма фактор.

РНК-полимераза жуда юксак константа билан ДНК матрицанинг икки занжиридан бирида матрицали ДНК нинг айрим қаторлари-промотор қисмлари билан боғланади. Бир неча нуклеотидлар қаторидан ташкил топган промотор синтезнинг йўналишини ва ДНК дан РНК га кўчирилиб ёзилиши лозим бўлган биринчи асосни белгилайди. Реакциянинг бориши учун рибозонуклеотид трифосфатларнинг ҳамма хиллари, РНК затравка, ДНК матрица, РНК-полимераза, оксил факторлар,  $Mg^{2+}$  зарур:



Ҳосил бўлган аРР тездан гидролизланади ва реакцик РНК синтези томон боради. РНК-полимераза занжирни 5'-3'-йўналишда узайтиради. РНК-полимераза икки занжирли ДНК билан энг актив бўлади. Транскрипция давомида занжирнинг ўсиши қўш асослар ДНК дуплексининг транскрипция қилинаётган жойидагина эриса (ечилса) керак м-ДНК билан РНК транскрип орасидаги боғланиш вақтинча, транскрипция тугаши билан ДНК матрицаасослари қайтадан қўшилади. Шундай қилиб, транскрипция тўла консерватив бўлиши билан репликация жараёнида фарқ қилади.

Шу билан бирга РНК-полимераза ишлаганда, ДНК-полимеразанинг аксича, матрица тўла боғланиш холда сақланади ва қайтадан фойдаланиши мумкин, яъни соф каталитик вазифани бажаради. Реакция схема равишда қуйидагича ёзилган:



РНК занжирлари элонгациясини антибиотик актиномицин специфик ингибирлайди. РНК боғлаништранскриптларнинг кўпчилиги биологик актив эмас. Уларни м-РНК, т-РНК, р-РНК ларнинг олд махсулоти деб қараш мумкин. Улар кейинги ўзгаришлар (посттранскрипцион модификациялар)га дучор бўлиб етишган шаклларга айланади. Бу ўзгаришлар: 1) узун занжирли олд махсулот (транскрипт) ни фрагментларга бўлиш; 2) учларига нуклеотидларни улаш ва 3) нуклеотидларни специфик модификация қилишдан иборат. Бу ўзгаришлар кичик РНК лар (т-РНК ва р-РНК лар) да бир хил, м-РНК да бошқа хил йшл билан ўтади, эукариот РНК нинг трансформацияси хам прокариотларникидан фарқ қилади. Албатта асосий трансформацияларнинг маъноси ва принципи хамма организмларда хам умумий қонуниятга асосланган бўлади.

Транспорт РНК ва рибосома РНК лан бошланғич транскриптарнинг маълум нукталаридан специфик экзо- ва эндонуклеазалар томонидан фрагментация қилинишидан хосил бўлади. Бунда битта бош махсулотдан фақат битта т-РНК молекуласи, баъзан эса иккита, хатто учта хам хосил бўлиши мумкин. Т-РНК ларнинг – ССА – 3 учи бир хил етишади. Одатда, бош махсулот фрагментациясидан олдин т-РНК асослари модификацияга учрайди: метилланади, сульфурланади, дезаминланади, гидрирланади, рибоза ва урацил орасидаги нормал С-Н боғ псевдоурацил (ψ) хосил қиладиган С-С соғга айланади. Бундай модификациялар аниқ нуклеотидларда, маълум ўринларда, специфик ферментлар таъсиридагина ўтади. Улар т-РНК молекулалари структураси ва функциясининг принципиал хусусийлиги учун зарур бўлса керак.

Рибосома РНК лар фрагментациядан сўнг бошқа хеч қандай модификацияга учрамайди.

**Эукариот информацион (матрица) РНК.** Эукариотлар ядросида синтез қилинган м-РНК ҳали етишган, ўз функциясини бажаришга тайёр шаклда эмас. Уларнинг кўпчилиги уч босқични ўтади: 1) 5'-учини кэпирлаш ва матилирлаш; 2) 3'-учини полиадренилирлаш ва 3) генни кодирламайдиган қисмлар (интронлар) ни кесиб ташлаб экзонларни улаш.

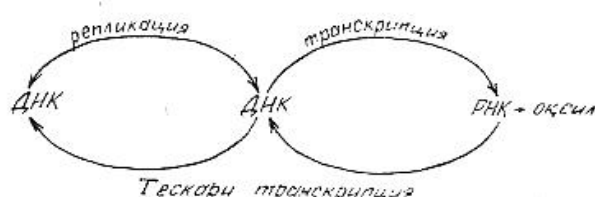
**Кэпирлаш** (бошига қалпоқ кийдириш) м-РНК нинг 5'-учидаги ррр Ар қолдиғига Gr қолдиғи қўшиб 5'-5 учфосфат туркум ҳосил қилишдан иборат. G қолдиғи N-метилланган вааденил қолдиғининг 2'ОН ҳам метилланган. 3'-учига ҳам бир нечта АМР қолдиғи бирикиб, охирги полиаенил қаторни ташкил қилади. Бу модификацияларнинг маъноси ҳали тўла ёритилган эмас.

м-РНК процессингининг энг муҳим кутилмаган хусусияти 1977 йилда аминокислоталар қаторини қодловчи ахборатнинг узлуксиз бўлмай қодирламайдиган қаторлар билан узилганлигини яъни генлар узилган бўлишини кашф этилиши бўлди.

Транскрипцияда узилган геннинг тўла нусхаси, яъни РНК нинг бошланғич транскрипти олинади. Кейин тор специфик ферментлар ёрдамида қодирламайдиган участкалар (улар интронлар деб аталади) кесиб олиниб, қодирловчи сегментлар (экзонлар) бир-бирига уланади. Уланиш бошланғич транскриптда интрон-экзонлар қандай жойлашган бўлса, худди шу тартибда бажарилади. Кесувчи ферментлар эндонуклеазалар, уловчилар эса лигазалардир.

Прокариот матрица РНК си генларнинг тўла нусхаси, уларда ҳеч қандай ўзгаришлар бўлмайди, ҳеч бир қандай ўзгаришлар бўлмайди, ҳеч бир қисми кесиб олинмайди. Эукариот м-РНК процессинги давомида интронларнинг четлатиши шундай ўтадики, бирин-кетин келадиган экзонлар ҳеч вақт жисмоний ажралмайди. Бу механизмда экзонларнинг уланадиган учларини яқинлаштирадиган махсус кичик ядро РНКси иштирок этади.

Тескари транскриптазининг комплементар ДНК яратиш хусусияти молекуляр биологиянинг асосий концепцияси: ДНК → ДНК → РНК → оксилни қайтадан қуриб чиқишга сабаб бўлади. Энди информация оқими фақат ДНК → РНК йўналишида бормай тескари томонга ҳам ўтади.



## 6-МАВЗУ

### ГЕНЕТИК КОД. ОҚСИЛЛАРНИНГ БИОСИНТЕЗИ. ТРАНСЛЯЦИЯ

Режа:

1. Генетик код ҳақида тушунча.
2. Маъноли ва маъносиз триплетлар.
3. Генетик код луғати ҳақида тушунча.
4. Аминокислоталарни активланишида т-РНКнинг аҳамияти.
5. Аминокислоталарни активланишининг икки босқичи ҳақида тушунча.
6. Трансляциянинг элонгация ва терминация босқичлари.

Бирон бир маълумотни шартли белгилар ёрдамида ифодалаш, одатда, кодлаш ёки код деб аталади. 1961 йилда Крик генетик кодни математик анализ қилди. Оқсил молекуласидаги ҳар бир аминокислотани ифодаловчи код триплетли бўлиб, у Крик ифодасига кўра кодон деб номланган.

Биологик коднинг кашф этилиши, т-РНКнинг адапторлик функциясини тадқиқ этиш натижасида бу юксак даражада оқилона механизмнинг пойдевори бўлган биологик код (аминокислота, оқсил коди) тушунчаси, унинг ишлаш усули ҳақида жуда самарали янги бир соҳа янги бир соҳа дунёга келди. Биологик код таълимотига кўра нуклеин кислоталарда ҳар бир аминокислотани танийдиган ва танлаб ташишда воситачилик қиладиган нуклеотидлар комбинацияси мавжудки, аминокислота ўзининг коди билан бевосита боғланмаса, ҳам, шу кодга комплементар, антикодон деб аталадиган нуклеотидлар комбинациясига эга нуклеин кислота билангина муносабатга киришади. Ҳар бир аминокислотани ўзи учун махсус кодони мавжуд бўлиши шарт, шундагина адаштирмай улар билан боғланади.

Оқсил молекуласига кирадиган аминокислоталар камида 20 хил бўлганидан кодонлар сони ҳам 20 дан кам бўлиши мумкин эмас. Демак 4 та нуклеотиднинг ўзи ёки иккита нуклеотиддан ҳосил бўладиган  $16(4^2)$  комбинация ҳам етарли эмас. Турли тадқиқот ва мулоҳазалардан сўнг код уч нуклеотиддан ибоат триплет табиатга эга эканлиги аниқланди. Албатта бунда ҳосил бўладиган комбинациялар сони  $64(4^3)$ , кодирланадиган аминокислоталар сонидан анча кўп маълум бўлдики, 20 та аминокислотадан 18 таси биттадан ортиқ (2,3,4 ва 6) кодон билан кодирланар экан.

Бу ҳолат коднинг айниганлиги деб аталади. У ахборотни тўғри ўқишга хилофлик қилмайди, балки репликация ёки транскрипция жараёнида пайдо бўлиши мумкин бўлган хатоларни четлатишга ёрдам беради. 64 та триплетдан учтаси УАА, УАГ ва УГЦА аминокислоталарни кодирламайди ва полипептид занжир синтези тугаганидан хабар беради, улар терминация сигналини беради.

**Генетик код универсалдир.** Ҳамма организмларда-эукариотларда, прокариотларда ва вирусларда ҳам барча кодонлар учун бирдай белгилардан фойдаланилади. Бинобарин, генетик код дунёда ҳаёт пайдо бўлгандан бери ўзгармай ҳукмронлик қилмоқда. Бунга 3 млрд йил бўлди. Аммо энг кейинги



йилларда бу догмага бир оз ўзгартириш киритишга тўғри келди. Митохондрияларнинг генетик системаси маълум биологик кодга тўла тўғри келмади. Унинг ДНКси (15669 нуклеотид) нинг айрим генлари нуклеотид тартиби полипептидларнинг аминокислота тартиби билан солиштирилганда коддан четлашишлар мавжуд эканлиги аниқланди.

Лекин бу ажойиб феноменнинг келиб чиқиши ва маъноси ҳали тушунилгани йўқ.

**Генетик код**

**Кодоннинг иккинчи нуклеотиди**

|                              | У                                             | Ц                                    | А                                                          | Г                                                   |                  |
|------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|
| Кодоннинг биринчи нуклеотиди | У<br>УУУ } Фен<br>УУЦ }<br>УУА } Лей<br>УУГ } | УЦУ } Сер<br>УЦЦ }<br>УЦА }<br>УЦГ } | УАУ } Тир<br>УАЦ }<br>УАА } терминатор<br>УАГ } терминатор | УГУ } Цис<br>УГЦ }<br>УГА } терминатор<br>УГГ } Трп | У<br>Ц<br>А<br>Г |
|                              | Ц<br>ЦУУ } Лей<br>ЦУЦ }<br>ЦУА }<br>ЦУГ }     | ЦЦУ } Про<br>ЦЦЦ }<br>ЦЦА }<br>ЦЦГ } | ЦАУ } Гис<br>ЦАЦ }<br>ЦАА } Глу<br>ЦАГ }                   | ЦГУ }<br>ЦГА }<br>ЦГА }<br>ЦГГ }                    | У<br>Ц<br>А<br>Г |
|                              | А<br>АУУ } Иле<br>АУЦ }<br>АУА }<br>АУГ } Мет | АЦУ } Тре<br>АЦЦ }<br>АЦА }<br>АЦГ } | ААУ } Асп<br>ААЦ }<br>ААА } Лиз<br>ААГ }                   | АГУ } Сер<br>АГЦ }<br>АГА }<br>АГГ } Арг            | У<br>Ц<br>А<br>Г |
|                              | Г<br>ГУУ } Вал<br>ГУЦ }<br>ГУА }<br>ГУГ }     | ГЦУ } Ала<br>ГЦЦ }<br>ГЦА }<br>ГЦГ } | ГАУ } Асп<br>ГАЦ }<br>ГАА } Глу<br>ГАГ }                   | ГГУ }<br>ГГЦ }<br>ГГА }<br>ГГГ }                    | У<br>Ц<br>А<br>Г |

Кодоннинг учинчи нуклеотиди

Жадвалдан кўриниб турибдики, бир хил аминокислоталарни ифодаловчи триплетлар бир-бирига ўхшаш бўлади. Масалан: валин аминокислотасини ифодаловчи триплетларнинг барчаси ГУ диплети, Аланинни ифодаловчи триплетлар ГЦ диплети билан бошланган бўлади.

У ахборотни тўғри ўқишга хилофлик қилмайди, балки репликация ёки транскрипция жараёнида пайдо бўлиши мумкин бўлган хатоларни четлатишга ёрдам беради.

Генетик код универсалдир. Барча организмларда – эукариотлар, прокариотларда ва вирусларда ҳам барча кодонлар учун бирдай белгилардан фойдаланилади. Барча кодон учта нуклеотиддан (триплетдан) иборат. Ёнма-ён турган кодонлар бир-бирини қопламайди, яъни биринчи кодоннинг охириги нуклеотида ундан кейинги кодоннинг бошланғич нуклеотида бўла олмайди. Информация маълум нуктадан бошланади.

Бир хил аминокислоталарни ифодаловчи триплетлар бир-бирига ўхшайди.

Аминокислоталар коди луғатида, кодирланаётган оқсил информацияси и-РНКда ёзилган бўлади.

Кодонлар 5' → 3' йўналишда ўқилади.

Кодонлардаги учинчи азот асос, биринчи ва иккинчи азот асосларига караганда камроқ спецификликка эгадир. Метионин аминокислотасини ифодаловчи кодон 1 та бўлиб, иницирловчи кодондир. Ахамият бериб

каралса, метионин ва триптофандан ташқари карийб ҳамма аминокислоталар биттадан ортиқ кодонларда ифодаланади.

ДНКдаги аминокислоталар коди шундай ёзилганки, у и-РНКдаги код сўзларига комплементар бўлиб антипаралел ҳолатдир, яъни Т қолдиғига А қолдиғи комплементардир ва А қолдиғининг ҳолати У қолдиғига комплементардир.

Масалан: Метионин учун: иРНК ва ДНК кодонлар куйидаги ҳолатда кўринади:

иРНК(5) АУГ(3)

ДНК (3) ТАЦ

Одатда кодонлар ва антикодонлар 5 — > 3, чапдан ўнгга қараб ёзилади.

**Оқсилларнинг биосинтези.** Оқсиллар биосинтези биохимия тарихида энг муҳим муаммолардан бири бўлиб келган. Бугунги кунда биз бу муаммо ҳақида кўп маълумотларга эгамиз лекин ҳозирча тўпланган ахборот бу соҳада билиши керак бўлган нарсаларнинг озгина қисмини қоплаши мумкин: оқсил синтези биосинтез жараёнлари орасида энг мураккаби бўлса керак, унинг айрим босқичларида полипептид занжир инициацияси, узайиши, тамомланиши ва оқсилларнинг етишишида юзга яқин ферментлар, махсус оқсил факторлар, умуман 200 яқин макромолекулалар иштирок этади. Бу макромолекулаларнинг кўпи рибосомалар уч ўлчовли мураккаб структурасининг ташкилий қисмларидир.

Оқсил биосинтези аппарати шу қадар мураккаб бўлишига қарамай, жараён жуда катта тезликда ўтади. Масалан, Е.солі ва 100та аминокислотадан иборат оқсил занжирининг яратилиши учун хужайра рибосомаларига 5 секундгина кифоя.

Оқсил синтези ҳақида ҳозирги тушунчаси 1950-йилларда қилинган учта муҳим кашфиётлар асосида шаклланган. Уларнинг биринчиси Пол Замечник томонидан оқсиллар синтез қилинадиган жой илгарироқ хужайра ичида топилган, сўнгра рибосомалар деб аталган рибонуклеопротеид парчалар эканлигининг кашф этилиши бўлди. Иккинчи кашфиёт Мэлон Хогленд ва Пол Замечник томонидан аминокислоталарни, кейинроқ транспорт РНК деб аталган, РНК нинг эрувчан термостабиль махсус типига АТР иштирокида бирикишининг аниқлашниши эди. Бу қатор учинчи муҳим кашфиёт Френсис Крик номи билан боғлиқ.. У оқсил синтезида т-РНК нинг адапторлик ролини белгилаб берди. т-РНК томонидан бундай функциянинг бажарилиши унинг молекуласини бир участкаси специфик аминокислота билан боғлана оладиган иккинчиси эса м-РНКда мана шу аминокислотани кодлайдиган калта нуклеотидлар қаторини таний оладиган бўлишидан келиб чиқади. Айни шу учта кашфиёт тездан оқсил синтезининг асосий босқичларини аниқлашга ва нихоясида аминокислоталар учун генетик таъминлашга олиб келди.

Оқсил синтез м-РНК ни декодирлаш, яъни РНК молекуласида тўрт хил асосларнинг изчил келиши ёзилган ахборотнинг 20 хил аминокислоталарнинг оқсил молекуласида изчил келиш тилига

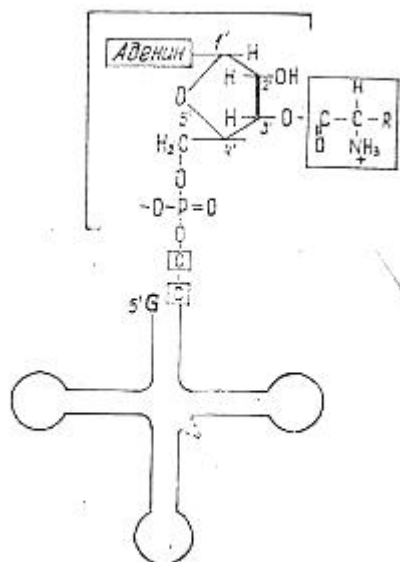
ўтказилишидир.Шунинг учун ҳам бу жараён трансляция (таржима қилиш) дейилади.

Генетик ахборотнинг ДНК дан узатилиши РНК ёрдамида бажарилишини 1961 йилда икки машҳур франциз олимлари Жакоб ва Моно кашф этдилар.Ундан кейинги йилларда Ниренберг, Корано ва Холли декодирлаш т-РНК нинг тегишли кодони томонидан специфик боғланишида юзага чиқишини код (аминокислотанинг нуклеотидлар тилидаги шифри, рамзи) триплет табиатига эга эканлигини тасдиқладилар.

**Трансляция** . Оксил синтезининг босқичлари. Бу жараён асосан 5 босқичда ўтади.

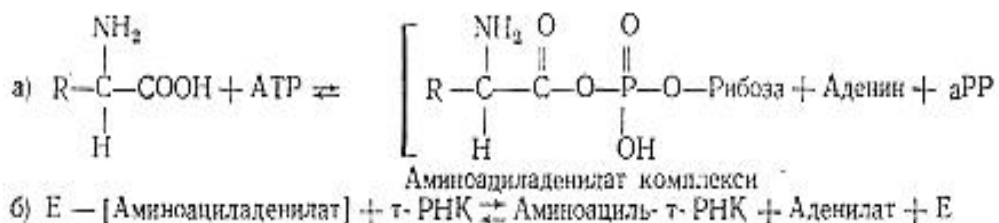
*Аминокислоталарнинг АТР ёрдамида активланиши* ва тегишли транспорт РНК га кўчирилиши оксил биосинтези учун энергетик асос яратади.

Бу икки жарён узлуксиз боғланган бўлиб битта энзим Е-специфик аминокацил-т-РНК –синтеза таъсирида кечади.Френсис Крик бу жараёнда т-РНК адапторлик ролини ўйнашини аниқлади.



Аминокислотанинг активланиши.

Бу босқич учун барча (20) аминокислота, 20 ёки ортиқроқ т-РНК, аминокацил-т-РНК-синтезазлар (Е), АТР ва  $Mg^{+}$  мужассам бўлиши зарур. Мазкур босқич куйидаги икки реакцияда боради:



Охирги реакцияда аминокацилли қолдиқ т-РНК синтезазлар специфик ферментлардир. Лекин *изоакцептор аминокацил тРНК синтезазлар* (АТС) ҳам мавжуд, яъни битта аминокислотани бир неча АТС ҳам ташиши мумкин. Шу билан бирга ферментнинг ўзи ҳам бир занжирли (масалан, Вал, Иле, Лей учун), бир хил бир нечта занжирли (Мет учун), учинчилар иккита ҳар хил

занжирлардан тузилган (Мет учун), учинчилар иккита ҳар хил занжирлардан тузилган (Гли, Трп учун) бўлади.

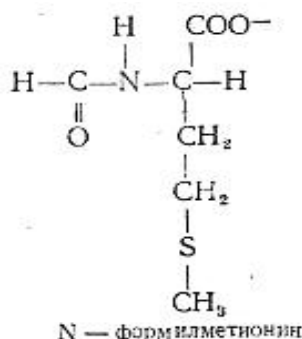
*Полипептид занжирининг инициацияси.* Инициация жуда мураккаб ва жуда муҳим босқич, бошлаб берувчи реакция. Бу босқичда оксил синтези учун лозим бўлган аппарат айрим компонентлардан еғилиб иш бошлашга таёрланади.

Трансляция жараёнининг маркази рибосомалардир. Бунинг учун у м-РНК билан боғланиши керак, рибосомалар эркин ҳолда бўлса, дарҳол кичик бирликларга ажралиб кетади. Трансляция жараёнида рибосома кичик бирликларидан йиғилади. Оксил синтези  $\text{NH}_2$  туркумдан бошланиб,  $\text{COOH}$  билан якунланади:  $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$ . Эукариот ҳужайраларда иницияловчи аминокислота сифатида N-формил метионин (т-РНК  $\text{f}^{\text{Met}}$ ) майдонга чиқади, демак синтезланадиган полипептид занжирининг N-учида (биринчи аминокислота)  $\text{f}^{\text{Met}}$  бўлади, яъни  $\text{f}^{\text{Met}}$  юкланган т-РНК, м-РНКда тегишли код (АУГ) топиб, ўзининг антикодони (УАЦ) билан боғланади. Реакция куйидаги тартибда ўтади:



Иккинчи реакцияда формил группа трансформилаза ферменти ёрдамида N-формилтетрагидрофолат (ТГ-фолат кислота, витамин) га кўчирилади:  $\text{N}^0\text{I} \text{ формил ТГФК} + \text{Мет-т-РНК}^{\text{Met}} \rightarrow \text{ТГФК} + \text{f}^{\text{Met}}\text{Мет-т-РНК}^{\text{Met}}.$

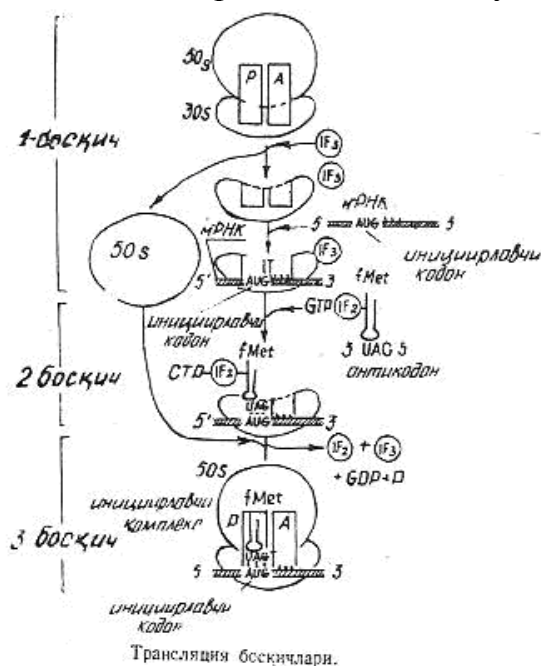
Трансформилаза эркин Мет ни трансформиллаш хусусиятига эга эмас, у фақат Мет-т-РНК таркибидаги Мет нигина формиллайди:



Метиониннинг аминогруппаси N-формил қолдиғи билан блокирлаш бундай аминокислотани полипептид занжирининг ички қисмларига киришига йўл қўймайди, лекин  $\text{f}^{\text{Met}}$ -т-РНК  $\text{f}^{\text{Met}}$  нинг рибосомада махсус инициация участкасига боғланишга имконият туғдиришади, бу участка билан на Мет т-РНК Мет, на бошқа аминокислота боғлана олмайди. Трансляциянинг айрим босқичларида яна қўшимча бир қатор оксил факторлар ( $\text{F}_1$ ,  $\text{F}_2$ ,  $\text{F}_3$ ) ва ГТР ҳам иштирок этади.

*Полипептид занжири синтезининг инициацияси* айнан бир неча даврларда ўтади. Биринчи даврда рибосоманинг 30S кичик парчаси инициация фактори 3 (IF-3) билан боғланади, бу фактор 30S кичик парчанинг 50S кичик парча билан боғланишига тўсқинлик қилиб туради. Сўнгра  $\text{F}_1$  фактор (IF-I нинг роли тўла аниқланган эмас) билан боғланган 30S кичик парча м-РНК билан шу тарзда боғланадики, м-РНК нинг инициация қилувчи кодони ( $5' \rightarrow \text{AGU} \leftarrow 3'$ ) 30S кичик парчанинг тайинли қисмига уланади.

Унинг тўғри ўрнашиши м-РНК да АУГ кодониغا яқин жойлашган инициирловчи сигнал томонидан таъминланади. Ҳосил бўлган комплекс фМет –фРНК-Мет-қўшиладиган жойни кўрсатади. Инициация жараёнининг иккинчи даврида бу комплексга 1F-2 ёрдамида яна 1F-3, ГТР факторлар ва N-формил метионил т-РНК бирикади. Инициациянинг учинчи даврида бу катта комплекс 50 S рибосома парчаси билан боғланади; айнан шу вақтда ГТР молекуласи ГДР ва аР га гидролизланади. Инициация факторлари 1F-3 ва 1F-2 ҳам рибосомадан ажралади. Мана энди *инициирловчи комплекс* деб аталадиган функционал актив 70 S рибосомага эга бўлинади.

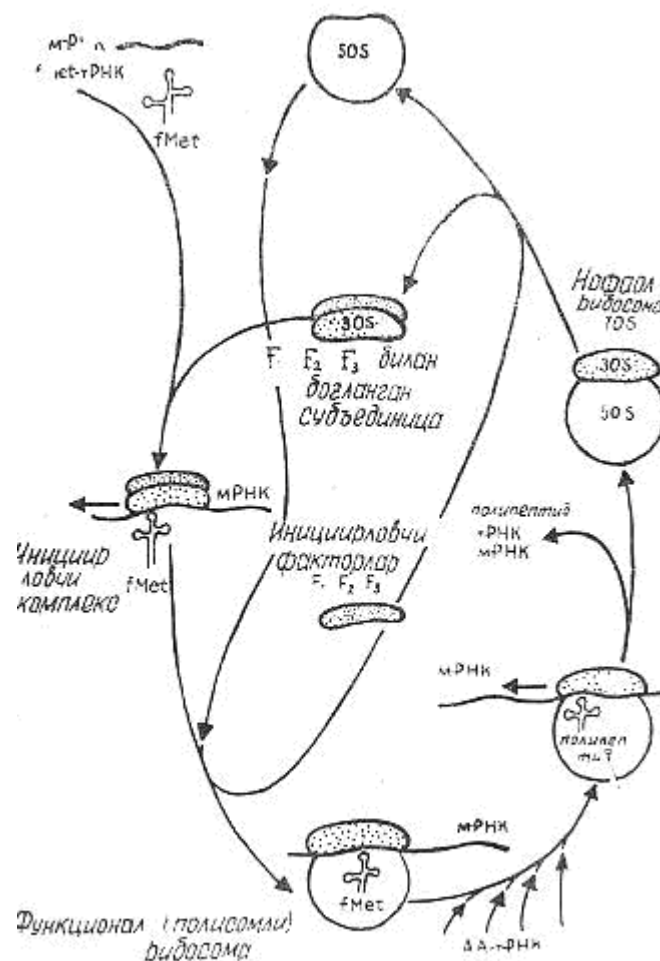


Рибосоманинг 50 S кичик бирлигида аминокислота ва ўсаётган полипептид занжирлар учун тегишли жойлар - сайтлар мавжуд. Улар аминотил (А) ва пептидли (П) сайтлар деб аталади. Трансляция давомида аввало аминокислота (т-РНК<sup>мет</sup>) ўзига специфик транспорт РНК орқали ўз сайтига ўтиради. Мана шу шаклда тайёр бўлган инициирловчи комплекс энди полинуклетид занжирининг узайишидан иборат элонгация даврига ўтади.

Трансляциянинг айрим босқичларида иштирок этадиган оксил факторлари: F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> ва энергия манбаи вазифасини бажарадиган ГТР бу мураккаб механохимиявий жараёнларда кузатиладиган таниб олиш, ҳаракат ходисалари билан боғлиқ конформацион ўзгаришлар учун зарур.

Элонгация такрорланадиган қайталма жараён бўлиб, биринчи босқичда навбатдаги аминацил-т-РНК (аа-т-РНК) элонгация фактори Ту (ЕГ- Ту) ва ГТР билан боғланади. Ҳосил бўлган уч компонентли комплекс т-РНК- Ту- ГТР 70S инициирловчи комплексга бирикади. Айни вақтда ГТР парчланади, Ту-ГДР рибосомадан четланади.

Кейин рибосоманинг А участкаси билан янги аа-т-РНК боғланади. Элонгациянинг иккинчи даврида II участкадан N-формилметионин қолдиқ уни ташиб юрган т-РНК дан пептидилтрансфераза ёрдамида кўчирилиши туфайли А участкадан дипептидил-т-РНК ҳосил бўлади. Бу жараёнларни куйида кўриш мумкин.



Трансляциянинг тўлиқ схемаси

Энди рибосоманинг А участкаси билан янги аа-т-РНК бирикади ва цикл такрорланаверади.

Элонгация циклининг учинчи даврида рибосома РНК бўйлаб 3-учига қараб бир қадам масофага силжийди. Бунда дипептидил т-РНК ҳам А участкадан II участкага кўчиб озод бўлган т-РНК цитозолга ўтади. Бу давр *транслокация* дейилади. Бу босқич учун транслокация фракцияси (транслоказа деб ҳам аталади) ва яна бир ГТР нинг гидролизи лозим.

Трансляциянинг охириги даври терминация (тугатиш) деб аталади. Оксил синтези полинуклеотид занжирида махсус терминирловчи кодонлардан бири – УАА, УАГ, УГА трипетларидан бири томонидан узилади.

Полипептид занжирининг С учига охириги аминокислота бириккандан кейин ҳам синтезланган оксил рибосома билан боғланган ҳолда қолади. Полипептид занжирининг т-РНК рибосомадан ажралиши специфик фактор – махсус ажратиш фактори (Р) таъсирида амалга ошади.

## 7-МАВЗУ

### ГЕНЕТИК АХБОРОТНИ ТАДБИҚ ЭТИШ ЖАРАЁНЛАРНИНГ ПРОКАРИОТ ВА ЭУКАРИОТЛАРДА ЎХШАШ ВА ФАРҚЛАНУВЧИ ТОМОНЛАРИ.

Режа:

1. Геномнинг ташкил этилиши
2. Вируслар, фаглар
3. Прокариот ҳужайралар геноми.
4. Эукариот ҳужайра геномининг тузилиши
5. Ген активлигининг регуляцияси.

Бир чизиқли, сўзлари учталаб нуклеотидлардан иборат, тўрт ҳарfli генетик код жуда кичкина ҳажмда бир олам информация сақлаш имконини беради. 1903 йилда Дания олими Иогансен фанга киритган ген атамаси бир қатор ўзгаришларга учради. Бу атама дастлабки вақтда ирсий белгининг пайдо бўлишига сабабчи, табиати номаълум қандайдир ушлаб бўямайдиган бир кучни, факторни таърифлаган бўлса, энди ген дейилганда якка полипептид занжирини кодирлайдиган ДНК нинг бир қисми тушунилади (структурал ген); қатъий қаралганда, бошқарувчи оқсиллар билан реакцияга киришиб, нуклеин кислоталар активлигини идора қиладиган регулятор генлар ҳам бор. Улар ҳам ДНК молекуласининг бир секциясидан иборат. Ҳужайранинг генетик материали асосан хромосомалардаги ДНК да ядрога, яна мембранада, митохондрияларда, хлоропластларда, бактерияларда, вирусларда ҳам мавжуд. Организмнинг, ҳужайранинг барча генлари йиғиндиси геном деб аталади, Турли организмларда ДНК нинг миқдори, бинобарин, ҳужайраларда генларнинг сони жиддий фарқ қилади, аммо бир организмнинг барча ҳужайраларидаги ДНК нинг миқдори бир хил бўлади.

**Вируслар, фаглар.** Молекуляр генетиканинг асосий концепциялари прокариотлар – бир ҳужайрали, мембрана билан ўралган ядроси йўқ организмлар (бакхериялар), вируслар бартериофагларда олинган. Вируслар, уларни ташқи таъсирлар, ферментлардан сақлаб турадиган пардага ўралган инфицирловчи (юқумли) нуклеин кислоталардир.

Қуйида баъзи вируслар геномининг тузилиши бошқа манбалардан олинган бир нечта ДНК билан таққосланган.

## ДНКнинг ўлчами ва конформацияси

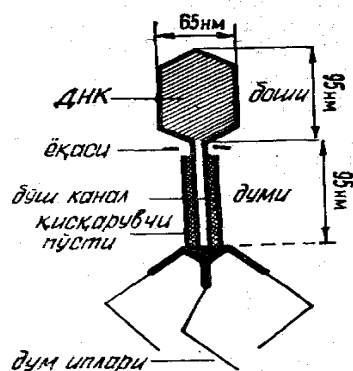
| Манба                                                                                                                                   | Молекуляр<br>массаси | Узунлиги | Қўш нуклеотид-<br>лар сони | Конформация                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|----------------------------|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>                                                                                                                 | $2,8 \cdot 10^9$     | 1,36     | $4 \cdot 10^6$             | Ҳалқали икки<br>занжирли     |
| <i>Haemophilus influenzae</i>                                                                                                           | $8 \cdot 10^8$       | 300 мкм  | $1,2 \cdot 10^6$           | Ҳалқали икки<br>занжирли     |
| Бактериофаг Т4                                                                                                                          | $1,3 \cdot 10^9$     | 50 мкм   | $2 \cdot 10^6$             | Бир чизикли<br>икки занжирли |
| Бактериофаг $\lambda$                                                                                                                   | $3,3 \cdot 10^7$     | 13 мкм   | $5 \cdot 10^4$             | Бир чизикли<br>занжирли      |
| Бактериофаг<br>$\Phi \times 174$                                                                                                        | $1,6 \cdot 10^6$     | 0,6 мкм  | 5386 қўш нук-<br>леотидлар | Ҳалқали бир<br>занжирли      |
| Митохондрия ДНК<br>си (сичқонники)                                                                                                      | $9,5 \cdot 10^6$     | 5 мкм    | $1,4 \cdot 10^4$           | Ҳалқали икки<br>занжирли     |
| <i>Drosophila melanogaster</i>                                                                                                          | $4,3 \cdot 10^{10}$  | 2 см     | $6,5 \cdot 10^7$           | Бир чизикли<br>икки занжирли |
| <p>Қўш асоснинг молекуляр массаси = 650<br/> ДНК нинг 1 мкм = 3000; қўш асосларнинг молекуляр массаси = <math>1,3 \cdot 10^6</math></p> |                      |          |                            |                              |

Вируслар, ҳужайранинг аксича, метаболик жараёнларда энергия ҳосил қилиш ва оксилларни синтезлаш хусусиятига эга эмас. Вирусларни ўрганиш молекуляр биологиянинг ривожланишига чуқур таъсир этди. Вирусларнинг кўпайиш механизми кўп йиллар давомида ҳужайра ривожланиши ва биологияда ҳўжайин – текинхўр муносабатининг модели ҳамда эволюцион жараён ҳақидаги тушунчалар молекуляр аспектининг манбаи бўлиб келмоқда.

Улар таркибида ДНК ёки РНК сақлаши, бир вақтда уларнинг икковини ҳам сақламаслиги билан ҳужайралардан фарқ қилади. Бактерияларда репликация қилинадиган вируслар бактериофаглар, фаглар (юнонча — бактерияларни емирувчилар демак) деб аталади. Вирусларнинг баъзилари бир занжирли, иккинчилари икки занжирли нуклеин кислоталар сақлайди. Тузилишининг мураккаблигига қараб, вируслар жуда кенг миқёсда фарқ қилади: фақат 4 та ген тутувчи РНК сақловчи  $\Phi \times 174$  — фагдан геноми 250 гendan иборат чечак вирусига. Уларнинг, шакли ва ўлчами ҳам фарқ қилади.

Вируснинг ҳужайрадан ташқаридаги тайёр маҳсулоти вирион (ёки вирус парчаси) деб аталади. Вирион таркибига кирган нуклеин кислоталар, уни ферментлар таъсирида парчаланихдан сақлаб турадиган, оксил қобик капсид билан ўралган. Худди шу капсид нуклеин кислотанинг ҳужайра ичига киришини таъминлайди.





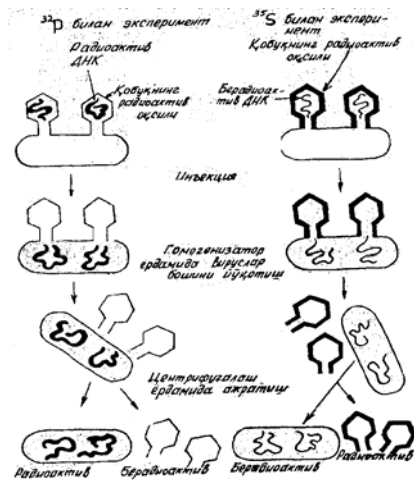
Вируснинг тузилиши.

Вируслар нуклеин кислоталарининг ўлчами бактериялар ДНКсиникига нисбатан кичик, улар вирус парчаларида учрайдиган оксилларни ва хўжайин хужайрада вируснинг репликацияси учун зарур баъзи ферментларни специфик кодирлайди. Қуйидаги жадвалда вирусларнинг энг машҳур баъзи вакиллари келтирилган:

Баъзи энг машҳур вируслар

| Вирус турлари                                                            | Вакиллари                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Бактериал вируслар<br>ДНК тутувчилар                                     | (бактериофаглар)<br>Φ × 174<br>λ (лямбда)<br>T2<br>T4                                                                                                                                                                                  |
| РНК тутувчилар                                                           | і2<br>MS2<br>R17                                                                                                                                                                                                                       |
| Юқорида келтирилган бактериофаг-<br>ларнинг хўжайини<br>Ҳайвон вируслари | E. coli дир<br>Маймун вируси 40<br>(SV 40)<br>Сичқон полиомаси вируси<br>Қуён полиомаси вируси<br>Содда герпес вируси (одамники)<br>Аденовирус одамники<br>Раус саркомаси вируси (паррандаларда)<br>Полиомиелит вируси<br>Грипп вируси |
| РНК тутувчилар                                                           |                                                                                                                                                                                                                                        |

Фаглар бактерияларни инфекциялаганда вируснинг думидаги толалари бактерия сатҳининг молекуляр структураси билан реакцияга киришади. Бинобарин, фаг билан бактерия орасида юксак спецификлик мавжуд. Фаг думидаги толалар билан бактерияга етишгач, асос пластинкасидаги лизозимлар (эритувчи ферментлар) бактерия хужайраси деворини бузади ва ДНК бактерия хужайраси ичига юборилади. Фаг ДНК (ёки РНК) си хўжайин хужайрасига киргач, фагларнинг янги авлодини ҳосил қиладиган уч фазада ўтадиган қатор жараёнларни бошлаб юборади: 1) илк фаг РНК си ва илк оксил синтези; хўжайиннинг барча нуклеин кислоталари ва оксиллари синтезини тўхтатиш; 2) кечки РНК ва кечки оксиллар синтези ва 3) янги фаглар морфогенези. Сўнгра тайёр фаглар хужайра деворини бузиб, ташқарига чиқади ва ҳосил бўлган бола вируслар ўз инфекциясининг янги циклини бошлайди. Вирус бактерияни инфицирлаганда хужайра ичига унинг ДНК молекуласи киритилиши ДНК ирсиятни ташувчи молекула эканлигини тасдиқлашда муҳим далил бўлган эди.



Фагнинг бактерия хужайрасида кўпайиши.

1952 йил Альфред Д. Херши ва Марта Чейз Е. соли ни Т2 бактериофаг билан инфекциялаб ўтказган тажрибаларида бактерия хужайрасига фагнинг оксиди эмас, балки ДНК си киритилишини нишондан фойдаланиб кўрсатдилар. 111-бетдаги расмда мана шу тажрибанинг умумий схемаси келтирилган.

Тажрибада бактериофагнинг икки хил нишонланган препаратлари қўлланган. Улардан бирида фагнинг ДНК си  $^{32}\text{P}$  билан, иккинчисида фагнинг оксиди  $^{35}\text{S}$  билан нишонланган. Препаратларнинг ҳар бири алоҳида радиоактив нишон тутмаган бактериялар суспензиясига қўшилиб чайқатилган. Фаглар бактериялардан ажратилгандан сўнг нишонланган ДНК билан ишланган бактерияларда радиоактив нишон топилган.  $^{35}\text{S}$  билан нишонланган фаг оксиди бактерияда топилмаган, лекин радиоактив нишон фагнинг «соясиди» (ДНК сидан ажралган қобиғида) топилган.

**Прокариот хужайралар геноми.** Прокариот хужайралар геноми икки занжирли ягона ДНК нинг ёпиқ ҳалқасидан иборат бўлиб, хужайранинг катталигига нисбатан у жуда улкан. Генетик экспериментлар ва бевосита микроскопик тадқиқотлар Е соли ДНК си жуда узун молекула эканлигини кўрсатди. Унинг узунлиги л,36 мм, тахминан  $4 \cdot 10^6$  жуфт асослар, 4600 кв (к — кило, b — base асос)га эга, қалинлиги 20 А мол, массаси  $2,8 \cdot 10^9$ . Тушунарлики, ДНК юксак даражада ўралган бўлиши керак. Бактерия ДНК сининг миллионлаб одатий асослари (А, Т, Г ва Ц) орасида қўшимча метил группалар тутадиган асослар ҳам учрайди. Бактериянинг ҳар бир тури учун метилланган асосларнинг ўзига хос кўриниши, характерли. Бир қатор муҳим текширишларда метилланган асосларнинг биологик аҳамияти аниқланди. Улар бактерияга ҳужум қилиб, унинг ДНК сини парчалайдиган вируслардан сақланиш қуроли экан. Бактерия — хўжайиннинг метилланган ДНКси ўзининг рестриктазаси томонидан парчаланмайди, ҳолбуки, вирус ДНК си эса бу ферментлар таъсирида йўқотилади.

Прокариотларда геном структура жихатдан ҳам анча содда тузилган, уларнинг геномида ДНК регулятор ва сигнал асослар қаторидан ташқари, трансляция қилинмайдиган жим-жит турадиган участкалар ҳам анча сийрак.

Бундан ташқари, баъзи бактерия хужайраларида плазмидий деб аталадиган ҳалқа шаклидаги бир нечта, майда цитот плазмада эркин яшайдиган ДНК молекулалари ҳам, мавжуд. Хромосомадан ташқари, эркин генетик элемент деб аталадиган бу структуралар хужайранинг жуда кўп бўлиниш циклларида ўзининг хусусий ритмларида яшайверади. Бинобарин, плазмидий ДНК нинг турли сегментларидан ташкил топган, турлича келиб чиққан репликонлардир. Улар ДНК дан жуда кичик, 5—100 миллион дальтон массага эга, осонлик билан ўз эгасининг геномига ва бошқа хужайралар ДНКсига ҳам уланиб олади. Уларнинг бундай хоссаси генетик инженерликда ёт хужайрага керакли генни жойлаштириб ишлатишга мажбур қилиш учун жуда қўл келди.

**Эукариот хужайра геномининг тузилиши.** Хар хил турларга мансуб эукариот хужайраларда битта хужайранинг ўзидаги ДНК нинг микдори турлича. Тирик организм канча мураккаб бўлса, унда генетик ахборот шунча куп бўлади. Ягона одам хужайрасидаги ДНКнинг умумий узунлиги 2 м га тенг хисобланади; бу тахминан  $5 \cdot 5 \cdot 10^9$  кушасосларга, бинобарин,  $4 \cdot 10^{12}$  молекуляр массага тўғри келади. Одам хужайраларида 46 та хромосома бўлиб, улар хар бирининг узунлиги 4 см га тенг. ДНК да 1 миллион «харф» (нуклеотидлар) 0,034 см узунликда жойлашади ва  $10^6$  нм<sup>3</sup> хажмни ишғол килади. Бошқача айтганда, одам организмнинг диаметри 20 мкм га тенг бўлган типик хужайрасида, битта гаплоид геномда ахборотнинг ярмини саклайдиган уруг хужайрасидаги  $3 \cdot 10^9$  нуклеотидларда жойлашган генетик ахборот цирралари  $1 \cdot 5 \cdot 10^{-4}$  см (1.5 мк) кубга сигади. Солиштириш учун айтиш мумкинки, бундай ахборот китобда  $3 \cdot 10^9$  харф, 1 млн бетни эгаллар эди.

Умуман битта хромосомада нечта ген жойлашган, деган савол ҳам олимларни кизиктириб келган. Бу саволга жавоб бериш учун ҳам молекуляр биологиянинг сеvimли объекти *E. coli* га мурожаат қилишга тўғри келди. Тез орада турли йўллар билан битта хромосомада жуда кўп генлар жойлашганлиги аниқланди.

Ичак таёкчасида уларнинг сони 3000 дан ортиқ, балки 5000 атрофидадир. Турли генетик ёндашишлар орқали кўпгина генларнинг хромосомада жойланиш тартиби ҳам белгиланган. Бир ДНК молекуласидаги генларнинг сони, албатта, уларнинг ўлчамихакидаги саволни ҳам тугдиради. Генлар ўлчамининазарий хисоб билан ҳам белгилаб булади. Яна ўша молекуляр биологиянинг ишончли объекти *E. coli* га мурожаат қиламиз, Маълумки, ичак таёкчаси  $4 \cdot 10^6$  кушнуклеотидлардан иборат. қарбир аминокислотани изчил келадиган учта асос (триплет) кодирлаганидан ва генетик кодда уларни ажратиб турадиган вергуллар бўлмаганидан 350 та аминокислота ўолдигидан тузилган ўртача оўсилни кодирлаш учун 1050 та асос тўғрикелади. Бундай асосли хисобга *E. coli* да мавжуд бўлган 4 миллион қўшасослар 3800 та генни кодирлаш учун етарли бўлади ( $4 \cdot 10^6 : 1050 \approx 3800$ ). Ген структурасида регулятор каторлар

вагенлар орасида кодламайдиган участкалар спейсерлар борлиги хисобга олинганда генларнинг сони камроқ бўлиши керак.

Эукариот ДНК да генларнинг ташкил этилиши структура ва функция жиҳатидан ҳам анча мураккаб. Сичқон ва бошқакўп организмларда ўтказилган тажрибалар уларнинг хромосомаларида жуда кўп такрорланадиган каторлар мавжуд эканлигини, прокариотларда улар йўқлигини тасдиқлади. Бу такрорланишларнинг кичик (10 асосдан кам) катордан ташкил топганлари миллиондан ортиқ бўлишимумкин. Улар юксак такрорланишлар деб аталиб, сичқон ДНК сининг ~10% ни ташкил қилади. 10000 мартадан кам бўлмаган ўртача такрорланишлар яна 20% ни ташкил этади ва долган 70% ДНК нинг ягона қисмига тўғрикелади. Турли эукариотларда юксак ва ўртача такрорланадиган каторлар сони ҳар хил турларда фарқ қилади.

Гаплоид геномдаги ДНКнинг миедори организмларнинг эволюцион занжиридаги ўрнига боглик эмас. Бир қатор яқин турадиган турларда ҳам ДНК нинг миқдори орасида кескин фарқ кузатилиши мумкин. Бунинг моҳиятини шундан тушунилса бўлади, сут эмизувчиларда улар геномининг 1% дан камигина зарур оксилларни кодирлайдиган ДНК хисобига тўғрикелади. Бинобарин, сут эмизувчилар геноми деярли 3 млн оксилни кодирлаш учун етарли ўлчамга эга ( $3 \cdot 10^9$  нуклеотид) бўлса ҳам, ҳеч бир организм 30000 дан ортиқ алоҳида каторларни реал кодлашга қабул тузилмаларга молик эмас. Бу нуқтаи назардан инсон тахминан 5000 генга эга пашша — дрозифиладан фақат 6 мартагина мураккаб.

Маълумки, барча ДНК нинг фақат озгина қисмигина ҳақиқатан оксилларни кодирлайдиган ДНК дир. Хромосомадаги ДНК нинг кўп қисми оксилларни кодирламайди. ДНК нинг кўш занжири юзасида жуда кўп оксиллар сочилиб ётади. Улар нуклеотидларнинг специфик қаторини танийди (регулятор оксилар), масалан, оксил репрессор ДНК билан богланиб, лактоза метаболизмига жавобгар ва бутун генлар кластери оиласи синтезини тўла ингибирлайди. Бундай оксиллардан бир қанчаси маълум.

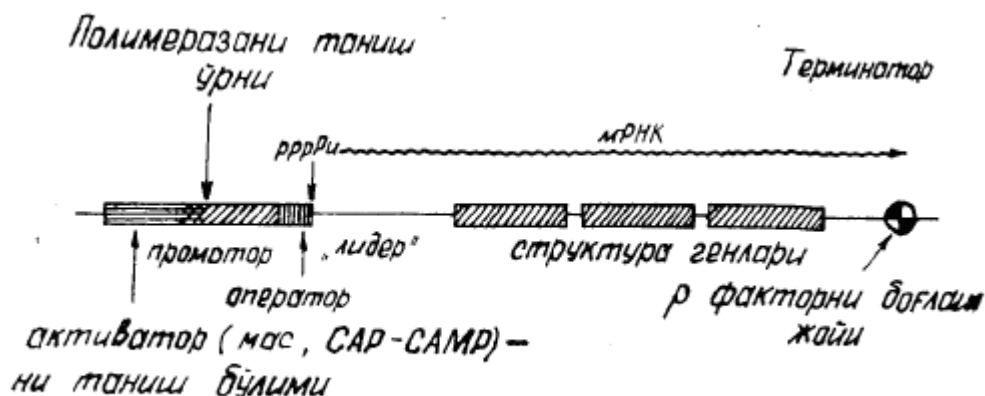
Одам, хайвонлар ва юксак ўсимликлар хужайраларида ДНК нинг миқдори бактерияларникига Караганда 10000 марта кўп, генлар миқдори эса фақат 1000, баъзан ундан кам кам марта кўпроқ. Хужайрадаги ДНК нинг миқдори миллион генга етади, лекин ҳар бир айлани дақиқада 100000 дан кам ишлайди, қолганлари тинч ҳолатда бўлади.

Баъзи эукариот генлар хужайрада жуда кўп нусхаларда учрайди. Бунга тўрт хил р-РНК ни кодирлайдиган генлар йигиндиси ёркин мисолдир. Гистонларни кодирлайдиган генлар ҳам 1000 гача нусхада учрайди. Лекин бундай воқеа унча кўп тарқалган эмас. Масалан, эукариотларнинг бир қанча тўималари ва хужайраларида жуда кўп миқдорда учрайдиган «оксиллар» масалан, зардоб альбуминў, гемоглобин, коллаген ва тухум альбумини генлари бир ёки бир нечта

нусхада бўлади.

**Ген активлигининг регуляцияси.** Геннинг охирги махсулоти оксил бўлганидан унинг регуляцияси бевосита оксил синтезини назорат қилиш механизмининг калитидир. Ичак таёқчаси-хромосомаси ДНК сининг катталиги, т-РНК ва р-РНК лар ҳисобга олинмаганда, тахминан 3000 та оксилни кодирлаш учун етарли. Аммо бир вақтнинг ўзи-да фақат 1000 тагина оксил синтезланади. Одамнинг 46 хромосомасида кодирланган оксиллар сони 10—100 марта ортиқ, лекин бу ерда ҳам бу оксиллар ҳаммаси доимо синтез қилинмайди. Шунинг билан бирга ҳамма генлар ҳам полипептид занжирини ҳосил қилиб экспрессияланмайди. Анчагина генлар оксилларни кодирловчи цистронларнинг бошланиши ва тугашини белгилайди, бошқалари бу генларни ишга солиш ва тўхтатиш сигналларини ташкил қилади. Булардан шундай хулосага келиш мумкинки, жонли хужайра оксиллар синтезини идора қилиш қобилятига эга, бинобарин, баъзи оксиллар фақат улар учун зарур шароит тугилгандагина синтезланади. Мана шундай назорат механизмини тушунтириш учун 1961 йили француз олимлари Ф. Жакоб ва Ж. Моно *генлар индукцияси ва репрессияси назариясини* таклиф қилдилар. Бу назария сўнгра яна такомиллаштирилиб, жуда кўптажрибаларда тўла тасдиқланди.

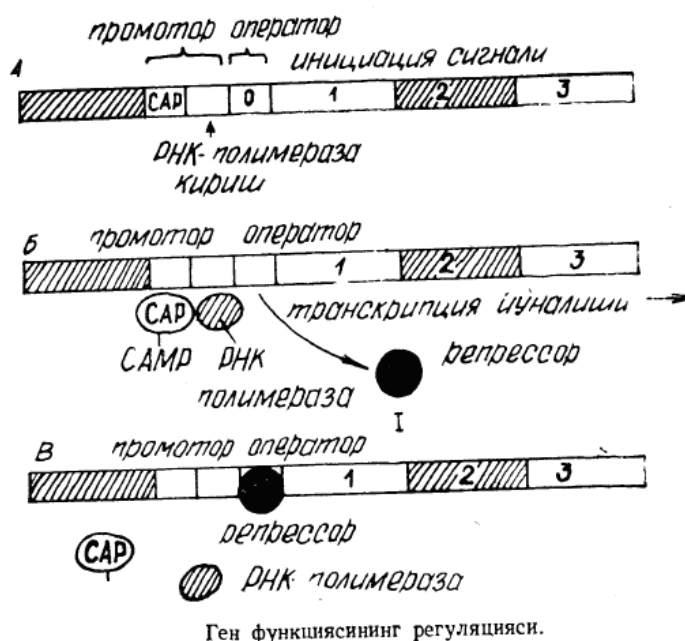
Индукция ва репрессия назариясига кўра, ген, яъни ДНК нинг маълум чегараланган сегментининг икки қисми: *регулятор ген* ва *структура гени* бор. Структура генлари (яъни хужайра структурасини ва унинг метаболизмини таъминлаб турадиган оксилларни кодирловчи генлар) регулятор ген экспрессияси туфайли назорат қилинади. Бу функцияни регулятор ген структура ген экспрессиясини бўриб турадиган махсус оксил — репрессорни синтез қилиш йўли билан таъминлайди. Демак, нормал ҳолатда структура генлари репрессирланган бўлади. Ген ишлаши учун репрессор активсизланиши лозим. Бундай функцияни *индуктор* (купинча ген таъсир этадиган субстрат) бажаради. Ҳақиқатан хужайрада субстрат бўлмаса геннинг ишлаши ҳам керак эмас. Мухитда индуктор пайдо бўлиши билан ген ишлайди ва шу субстратдан фойдаланиш учун лозим бўлган фермент синтезланади. У *индуцирланадиган фермент* дейилади.



Оперон структурасининг модели.

Репрессор оқсил табиатли модда бўлиб, ДНК нинг *оператор* номли сегменти билан реакцияга киришади. Репрессорнинг боғланадиган жойи промотор билан структура генлари орасида. ДНК га мухтож РНК-полимеразанинг боғланадиган жойи промоторнинг старт нуқтаси. Репрессорнинг оператор билан боғланиши туфайли РНК-полимераза промотор билан бирика олмайди. ДНК молекуласининг регулятор участкасидаги операторлар — регулятор оқсилларни танийдиган жой, *промоторлар* инициация (структура гени иш бошлаш) жойини танийди.

Баъзи вақтларда шу қисмга «ижобий» назорат қиладиган элементлар, масалан, комплекс циклик АМР—КФО (катаболик активловчи оқсил) ҳам киради. Мана шу участкаларнинг ҳаммаси структура генлари, битта промотор, ва битта оператордан иборат функционал бирлик *оперон*ни ҳосил қилади.



Энг яхши ўрганилган оперон — ичак таёкчасининг *лактаза оперони* — *Лас-оперон*дир. Лас-оперон 120 та қўшасослар цаторидан тузилган. Оператор билан структура генлари орасида 166 та қўшнуклеотиддан иборат *лидер қатор*ликжойлашган, унинг маълум қисми *аттенюатор* деб аталади. Одатда, аттенюаторда, агар қандайдир стимуляторлар тўсқинлик қилмаса, транскрипция тугайди.

Транскрипция қилинаётган ген (ёки генлар) тугагани хақида ДНК матрицада асосларнинг махсус терминирловчи *қатори* сигнал беради. Транскрипциянинг тугаши учун р харфи билан белгиланадиган специфик оқсил ҳам керак.

Структура генлари инициирловчи кодондан бошланиб, терминирловчи кодон билан тугайди. Промотор ДНК га мухтож РНК-полимеразани, оператор тартибга солувчи молекулаларни борлайди. Лактаза оперонининг барча промотор-операторли участкаси ажратиб олиниб, унинг нуклеотид цатори аниқланган. Умумий узунлиги 120 та қўш асослар бўлиб, оператор (яъни 1/3), про-мотор тахминан 80 ( $\frac{2}{3}$  цисмини) ташкил қилади. Оперонда назорат остида биттадан ген ҳам бўлишимумкин. Лактоза

оперонида бирин-кетин келган учта ген ( $\beta$ -галактозидаза, пермеаза, трансацетилаза) учта айрим старт ва терминал кодонлар ташувчи битта м-РНК сифатида

**Эукариот хужайрада генлар ифодаси.** Энди ДНК молекуласининг функционал жихатдан энг мухим қисми бўлган генлардаги ахборотнинг амалга ошишини ва бу жараённинг бошқарилишини кўриб чиқайлик. ДНК молекуласида тўртта нуклеотиднинг изчил қатъий тартибда жойла- шини белгилайдиган генетик ахборот хар бир тирик организм учун ягонадир. XX асрнинг дастлабки йилларида ген деб аталган унинг бирлиги доим биология фанининг марказида бўлиб, тобора аниқ; таърифланиб келди.

Ген классик биологик маънода организмнинг қандайдир бир фарқли белгиси, яъни фенотиби, организмнинг кузатиладиган хоссаси, ташқи кўриниши(масалан, кўзнинг ранги) ни белгилайдиган хромосоманинг қисмидир. Кейинроқ ген генетик материалнинг қандайдир бир ферментни аниқлайдиган ёки кодирлайдиган қисми (Бидл ва Татумнинг: *бир ген—бир фермент* гипотезаси) деган таъриф пайдо бўлди. Сўнгра бу таъриф кенгроқ маънода «*бир ген — бир оқсил*» шаклини олди. Лекин хозир генга яна ҳам аниқроқ; биохимиявий таъриф бериш мумкин. Маълумки, кўпгина оксиллар бир нечта полипептид занжирдан ташкил топган. Бу занжирлар бир хил бўлмаганидан (масалан, гемоглобинда  $\alpha$  ва  $\beta$  занжирлар) уларни алохида генлар кодирлайди: шунинг учун *бир ген—бир полипептид* ифодаси ген билан оқсил орасидаги муносабатни аниқроқтаърифлайди.

Шундай қилиб, геннинг ифодаси унда ёзилган информациянинг оқсил шаклида амалга ошишидир. Бу феномен ген *экспрессияси* деб аталади. Лекин ДНК нинг ўзибевосита оқсил синтезида қатнашмаганидан ДНК даги информацияни оқсил шаклида реализация қилинишигача ДНК нинг биринчи махсулоти матрица РНК си — *транскрипт*хосил булади. Сўнгра м-РНК геннинг охириги махсулоти— оқсилни яратади. Бирор оқсил (фермент) ни бор-йўқлигичам организмнинг ирсий белги- сидир. Айрим генлар ва улар тўпламларининг ташқи мухит билан боглиқхолдаги экспрессияси *фенотипни* белгилайди.

## 8-МАВЗУ

### ЎЗГАРУВЧАНЛИК ВА НАСЛ ТАШУВЧИ МОЛЕКУЛАЛАРНИНГ ЭВОЛЮЦИЯСИ.

Режа:

1. Ирсият ва ўзгарувчанлик
2. Мутация ва мутагенлар
3. Нуктали мутация

Табиатнинг хаммани қизиқтирадиган энг чуқур сирларидан бири организмнинг *ирсияти ва узгарувчанлигидир*. Бу муаммонинг ёритилишида Грегор Мендель томонидан 1865 йилда ирсият қонуниятларининг очилиши, 1900 йилда унинг бир вақтда икки олим Де Фриз ва Чермак томонидан янгидан алохида- алохида тасдиқланиши муҳим босқич бўлди. Лекин бу кашфиётларнинг ўзиҳали ирсиятнинг сақланиши нимага боқлиқ ва ирсий белгилар қандай йўл билан наслдан-наслга ўтади, деган фундаментал саволларга жавоб бермас эди. Асримизнинг бошида ирсият сирини молекулардан қидириш керак, деган ғоя туғилиб, уни тасдиқлайдиган бир қатор далиллар тўпланди. Бу йўналишда инглиз олими А.Гэррод биринчи қадам қўйди, десак бўлади. У сийдикнинг ҳавода қорайиб кетиши билан кузатиладиган *алкаптонурия* касаллигининг сабабини текшириб, бу касаллик ген таъсирининг етишмаслигига боғлиқ эканлигини, касаллик наслдан-наслга утишини аниқлади ва уз тадқиқотлари билан метаболизмнинг тугма патологияси концепциясини ишлаб чиқди. Кейинги йилларда генлар оксиллар структурасини белгилаши ва анчагина кенг тарқалган ирсий касалликлар айнан фермент камчилиги билан боғлиқ эканлиги аниқланди. Юқорида келтирилган алкоптонурия касаллиги ҳам ароматик аминокислота бўлган тирозин метаболизмининг нормал маҳсулоти – гомогентизат кислотанинг, организмдаги уни оксидлайдиган фермент утишмаслиги туфайли сийдик билан чиқарилишига боғлиқ.

1941 йилда бир ген – бир фермент гипотезанинг илгари сурилиши генетик билан биохимия орасида алоқалар ўрнатилишига сабаб бўлди. Бу қонидани ишлаб чиққан олимлар Джорж Бидл ва Эдуард Татум уз олдиларига биохимиявий белгиларни генлар бошқарадими, деган фундаментал саволга жавоб беришни мақсад қилиб қўёган эди. Улар уз тадқиқотлари учун жуда қулай объект – нон могори – нейроспорадан фойдаланиб, ультрабинафша ёки рентген нурлар таъсирадауларда мутациялар пайдо бўлишини кузатдилар. Ионлантирувчи нурлар, рентген, ядро (гамма нурлар), уттрабинафшанурлар асосий мутаген агентлардир. Бидл ва Татум нейроспора ионлаштирувчи нурлар таъсирида витаминлар ва аминкислоталар синтезлаш хусусиятини ёқотишини ва бу хусусият янги наслга утишини тасдиқладилар. Демак генлар ферментлар синтезини бошқарар экан, чунки нур таъсирида витамин ёки аминокислота синтезлаш хусусияти йўқолишига нейроспора хужайрасда тегишли фермент етишмаслиги сабаб бўлди. Бидл ва Татум бу муҳим кашфиётлари учун 1958



йилда бактерияларда жинсий жараёни кашф этган олим Джошума Ледерберг билан бирга Нобель мукофотиغا созовор булдилар.

Гэрроднинг кашфиётлари ирсий касалликлар ген таъсирига боғлиқ эканлигини кўрсатган бўлса ҳам фан хали геннинг ўзи нима, у қандай қилиб ирсий белгиларни саклайди ва наслдан-наслга ўтишини таъминлайди, деган саволларга жавоб бериш дан анча узок эди. Ирсият муоммоларини хал қилиш йулида хали чигал ва мураккаб саволлар турар эди. Уларни ечиш учун яна ярим аср талаб қилинади. Бу давр ичида хромосома структуралари синчиклаб урганилди, генларнинг бириккан группалари кашф этилди, хромосомаларнинг дастлабки хариталари тузилди, мутациялар ва мутаген омиллар исботланди ва хоказо.

Кўп йиллардан бери геномлар барқарор, тургун ҳисобланиб келинган. Аммо яқиндан бери ДНК нинг маълум қаторларида турли ўзгаришлар бўлиб туриши, геномдаги жойларининг алмашилиши, ДНК яқин қисмларининг қайта қурилиши тасдиқланди. Бундай ҳодисалар прокариот ва эукариот организмларнинг табиий ҳаёт жараёнида ҳам бўлиб туради.

Хромосомалар доимо турли ўзгаришларга, қайтадан тузилишга дучор бўлади. Организмларнинг табиий ҳаётида хромосомаларда қузатиладиган ўзгаришларнинг бир неча хили маълум. Ўзгарган хромосомалар пайдо бўлишига олиб келадиган генлар орасида нормал биологик алмашинув ёки турли манбалардаги генларнинг қўшилиши *генетик рекомбинация* деб аталади. Хосил бўлган хромосома репликация, транскрипция ва трансляция хусусиятини саклаб қолади. ДНК таъсирида бактериялар трансформацияси мисолида генетик рекомбинацияни Эвери, Мак-Леод ва Мак Картиларнинг классик экспериментида танишган эдик. Бу тажрибаларда пневмококкларнинг вирулент штаммидан ажратишиб олинган ДНК вирулентмас хужайраларга қирганда бу штаммни вирулентли шаклга айлантириши қузатилган. Демак, донор хужайрада бўлган вирулентлик гени реципиент геномига илинади.

Хромосомалар нормал физиологик функция бажаришида ҳам доимо ўзгаришлар, қайта тузилишлар бўлиб туради. Тухум хужайра сперматозоид билан қўшилганда генетик рекомбинация юз беради; генлар ёки уларнинг айрим қисмлари хромосоманинг бир жойидан иккинчи жойига кўчиши, хужайра вирус билан инфицирланганда ҳам генлар алмашинуви ва янги комбинациялар тузиши мумкин.

Геномнинг ўзгарувчан эканлиги ҳақида кўпдан бери маълум далиллар бўлса ҳам, ДНК молекуласида кўчиб юрадиган генларнинг кашф этилиши таажжубланадиган ҳодиса бўлиб чиқди. Чунки табиатдаги ҳамма қузатишлар ирсиятнинг катъий эканлигига далил, одамлар орасида ҳам бу феномен мияга каттиқўрнашиб қолган. Шунинг учун ҳам америкалик тадқиқотчи агроном Барбара Мак-Клинтон 1940 йилда ўзининг нозик тажрибаларида геномнинг айрим элементларини аниқлаб бериши ва хоссаларини ўрганишига қарамай,

унинг далилларини фан дунёси тан олмай келди. Факат 20 йил ўтгандан кейин геномнинг ҳаракатчан элементлари янгидан очилиб, у биохимиявий нуқтаи назардан ДНК нинг гендаги кичкина киритмалари сифатида қабул қилинади. Уларни текшириш кенгайиб, аввало геномнинг ҳаракатчан участкалари ёки *сакраб утувчи генлар* деб аталган кисмлари, кейинроқ олдиндан мавжуд, жойини ўзгартириш хусусиятига эга (*транспозиция, мобиль, диспергирланган—ёйилган*) элементлар деб аталади. Бу структураларнинг кашф этилиши ижобий ҳулосаларга сабаб бўлди. Фанда ген трансформациясига (ўзгаришига), онкогенлар (рак кўзгатувчигенлар) га, генларни ажратиб олиб уни бошқа организм геномига пайванд қилиш йўлибилан янги хайвонларни олиш (трансген хайвонлар) соҳаларига янгича қараш шаклланишига олиб келди. Умуман бу феноменнинг эволюцияга алоқаси ҳар томонлама кенг муҳокама қилиниб, бир қатор самарали гоялар майдонга чиқди.

ДНК молекуласида узилишлар, доимо алмашинувлар, уланишлар бўлиб турса ҳам уларнинг турга оид хоссалари ўзгармай сакланади. Бу ҳужайрада нуклеотидлар қаторини аслидай тиклаб турадиган махсус ферментлар мавжудлигига боғлиқ.

Хромосомалардаги бир қатор ўзгаришлар ташки муҳитнинг шикаст етказадиган омиллари ионлантирувчи нурлар, қатор химиявий моддалар ва бошқалар таъсиридан келиб чиқадиган, баъзилари репликация жараёнида узун ДНК молекуласининг узилишига боғлиқ тасодиқий ўзгаришлар бўлиб, аксари ҳолларда улар I ДНК-полимераза ва ДНК-лигазалар иштирокида тузатилади (репарация). Агар ДНК молекулаларида пайдо бўлган бу ўзгаришлар бартараф қилинмаса, янги синтезланадиган ДНК да ҳам шундай нуксон шаклида такрорланади, наслдан-наслга ўтади. Бу ҳодиса мутация, унга сабаб бўладиган омиллар *мутагенлар* деб аталади. Демак, мутациялар ДНК молекуласининг нуклеотид қаторида пайдо бўлган, наслдан-наслга ўтадиган ўзгаришлардир.

Мутациялар — айрим индивидлар ҳаётида жуда сийрак учрайдиган тасодиқий ҳодисадир. Битта жуфт асосда учрайдиган ўзгариш *нуктали мутация* ҳосил қилади. Анчагина мутагенлар одамларда рақ касаллигига сабаб бўлади. Мутациялар баъзан оксилнинг биологик функциясида жиддий ўзгаришларга, баъзан эса биологик функцияси жихатидан ўзининг асидан яхшироқ, сифатли оксил ҳосил бўлишига олиб келади



57- раем. Трансдукция.

## 9-МАВЗУ

### НАСЛ ТАШУВЧИ ЭЛЕМЕНТЛАРНИНГ АЛМАШИШИ ВА КЎЧИРИШ ЖАРАЁНЛАРНИНГ МЕХАНИЗМЛАРИ

#### Режа:

1. Лизогения
2. Трансдукция
3. Конъюгация
4. Геном касалликлари

Генетик рекомбинациянинг бошка бир хили *лизогения*. Бактерия хужайраси фагларнинг маълум турлари билан инфекцияланганида бу фагларнинг ДНК си хўжайин-хужайранинг халкали хромосомасига уланиб олиб, унинг билан бирга, ўзини янги фаг парчаси сифатида намойиш қилмай, кўпа влодлар давомида репликация қилиниши мумкин. Аммо маълум вақт ўтгач, қандай бўлмасин бир ходиса «ухлаб ётган» геннинг экспрессия механизмини ишга солиб юборади. Натижада фаг парчалари ҳосил бўлиб, хўжайин-хужайра лизисга учрайди (емирилади). Мана шундай фаглар *лизогенирловчи* ёки ҳолис, мўътадил деб аталади. Бундай фаглар орасида энг яхши ўрганилган *E. coli* хужайрасига қирадиган  $\lambda$  (лямбда) фагдир.

Генетик рекомбинацияларнинг муҳим бир тури *трансдукция* деб аталади. Агар бактерия хужайрасига ДНК тутувчи баъзи фаглар юккан бўлса, бактерия-хўжайин ДНК сининг кичик бир қисми унинг ДНК сига ковалент боғланиши, у билан бирга репликация қилиниши ва шуйўл билан бола фаг парчаларининг ДНК сига уланиши мумкин. Бундай парчалар бошка хўжайинга юкса, фаг ДНК си хужайрага биринчи хужайра хромосомасининг бир қисмини олиб қиради. Трансдукция («кўчириб ўтказиш») табиий жараён, у лаборатория шароитида бактериялар хромосомаси харитасини тузишда қўлланади.

Бактериялар *конъюгацияси* ҳам генетик рекомбинацияга мисол бўлади. Бу баъзан бактерияларда жинсий қушилиш (конъюгация) жараёнида кузатилади. Бу жараёнда донор хужайра хромосома занжирларидан бирининг бир қисми, баъзан тўла занжир — *пиль* деб аталадиган узун бириктирувчи найча орқали шу турга оид реципиент хужайрага ўтказилади. Жинсий конъюгация туфайли реципиент хужайрага бир нечта янги генлар қўшилиб, унинг хромосомаларига уланади.

**Геном касалликлари.** Генлардаги нуқсонлар кўпинча ирсий касалликларга сабаб бўлади. ҳозирги даврда юқумли касалликлар тобора камайиб, одамларда муҳитнинг зарарли факторлари таъсирида келиб чиқадиган касалликлар ва ирсий касалликлар асосий ўринни эгалламоқда. Бир гуруҳ касалликларнинг келиб чиқишида ирсиятнинг иштироки кўп авлодларда кузатилган ва ирсий асосга эга эканлиги ҳеч қандай шубҳа тугдирмайди (масалан, гемофилия, ўроксимон хужайрали камконлик, қатор

конкасалликлари ва бошқалар). Бу касалликларнинг сабаби ота ва онадан орттирилган ирсий нуқсонлар, кайсидир геннинг мутацияси.

Булар каторига хромосомалар бузилиши туфайли пайдо бўладиган касалликлар ҳам киради. Умуман, ирсий касалликларнинг хиллари уч мингдан ортик, лекин улардан фақат 10% нинг генетик механизми аниқланган. Айрим генлар нуқсони ва уларнинг етишмаслиги натижасида келиб чиқадиган бир канча касалликлар (улар *молекуляр касалликлар* ҳам дейилади) билан китобчанинг айрим саҳифаларида танишган эдик. Улар қаторига ферментлар етишмаслигидан келиб чиқадиган алкаптонурия,  $\beta$ -галактоземия, фенпируозум кислотали олигофрения (ақли заифлик) ва бошқалар, гемоглобин молекуласининг  $\beta$ -занжирида битта аминокислотанинг бошқаси билан алмашинуvidан келиб чиқадиган ўроксимон хужайрали камконлик киради. Бу гуруҳ касалликлардан ташқари, келиб чиқиши бевосита бир ген нуқсонига боғлиқ бўлмаса ҳам, лекин ирсий мойиллик билан боғлиқ ташқи муҳит омиллари таъсирида бошланадиган ва ривожланадиган касалликлар гуруҳи ҳам бор. Улар қаторига кенг тарқалган юрактомир касалликлари (атеросклероз, гипертония, инсульт), бир қатор нерв ва рухий касалликлар, эндокрин касалликлар (қандли диабет, Базедов касаллиги), кўпгинакон касалликлари, шунингдек рак, моддалар алмашинуvinинг бузилиши киради. Лекин бу касалликларга мойиллик кўпгенлар иштироки билан боғлиқ ва ҳозирча уларнинг генетик механизми тўла ўрганилган эмас. Бу масалалар билан шугулланадиган генетиклар, биохимиклар ва медиклар ҳамкорлигида пайдо бўлган *медицина генетикаси* фани энди биринчи қадамларини қўймоқда.

Кейинги йилларда молекуляр биологияда кўп одамларнинг ўлимига сабаб бўлиб келаётган энг хавфли касаллик (хавфли ўсма) — раkning келиб чиқишини аниқлаш ва уни даволаш усулини ишлаб чиқишга жуда катта эътибор берилмоқда. Бу муаммога яқиндан ёндашилган сари унинг ечилиши молекуляр биология ва генетика инженерлигисиз ҳал бўлмаслигигаён бўлмоқда. Кўп йиллар давомида ўтказилган тадқиқотларда рак Хужайралари нормал хужайралардан фарққилиши аниқланди. Биринчидан, хавфли ўсма хужайралари чексиз ўсиш хусусиятига эга. Улар организмнинг тўқималарини емириш хисобига ўсади. Бундан ташқари, рак хужайралари метастаз беради, яъни асосий ўчоғдан узилиб кон ва лимфа орқали бошқа жойларга тарқалади ва кўплаб янги ўчоклар ҳосил қилади. Маълум бўлдики, кўпайиш хусусиятига эга барча хужайралар хавфли айниш хусусиятига ҳам эга экан. Кейинги йиллардаги тадқиқотлар асосида бундай айниш генлар ишининг регуляцияси бузилиши оқибати, деган фикр тугилди. Ракнинг келиб чиқиши ҳақида бир канча назариялар бор. Улардан бири рак ҳар хил — ташқи ва ички омиллар таъсирида пайдо бўлишимумкин, лекин рап омилда эмас, балки бўлинаётган хужайранинг табиатига боғлиқ, деб даъват қилади. Бошқа бир назарияга кўра, ракни канцероген (*канцер*

— рак тугдирувчи) моддалар кўзгатади. Бу назарияни тасдиқлайдиган анча далиллар бор, лекин у раkning ҳамма хилларига тааллуқли эмас.

Кейинги йилларда раkning келиб чиқишида вирусларнинг ролига асосий эътибор қаратилган. Бу фикр илгаридан бор бўлса ҳам ўсма кўзгатадиган вируслар бор эканлигига узоқ вақтгача ишонилмас эди. Лекин 1970 йили Г. Темин ва Д. Балтимор РНК тутувчи вирусларда ДНК синтезлайдиган *тескари транскриптаза* ферментини кашф этдилар. Бундай вируслар ревертазалар деб аталди. Фермент РНК матрицасида геномга уланиши мумкин бўлган ДНК ни синтезлайди. Бу тадқиқот ҳам 1975 йили Нобель мукофоти билан нишонланган.

РНК шаклидаги вирус кўпвақтлар давомида хужайрада ўзгаришсиз кўпайишимумкин. Аммо у ДНК тутувчи шаклга ўтар экан, геномга улана олади ва хужайрани ўзгартиради. ДНК ли вируслар ревертаза ферментига мухтож бўлмаса ҳам, рак кўзгатиш хусусиятига эга. Бундай вируслар тўдаси *онкогенлар* деб аталиб, таркибидаги РНК (ёки мувофиқ равишда ДНК) занжирларида нормал хужайрани айнитиб ёмон сифат ли қилиш хусусиятига эга *онкооксилни* кодирлайдиган нуклеотидлар каторига эга. Бунобарин, раkning келиб чиқиши мана шу онкогенларга боғлиқ. Шуниси қизикки, онкогенлар барча хайвон ва одам хужайраларида ҳам топилган. Улар *протоонкогенлар*, яъни раkning бирламчи генлари номини олди. Нормал хужайрада улар тинч ётади ва фақат хужайра ривожланишининг маълум босқичида активлашиб, битта хужайрада 20—30 та РНК молекулалари ҳосил қилади. Уларнинг хужайра активлигидаги роли унча аниқ эмас, лекин баъзи онкооксиллар структураси хужайраларнинг ўсиш омиллари деб аталадиган баъзи бирикмаларга ўхшаш эканлиги эътиборга лойиқ.

Қайси шароитда протоонкоген активлашиб, рак кўзгатадиган онкогенга айланади? Бу фундаментал саволга ҳали тўлажаваб йўқ. Протоонкогенни кузгатадиган бир қатор ҳам ички, ҳам ташқи омиллар топилган. Уларнинг рак пайдо бўлишидаги иштироки ген инженерлигининг нозик усуллари ва қудратли асбоблари ёрдамида жадаллик билан ўрганилмоқда.

# 10-МАВЗУ

## ХРОМОСОМА ТАРКИБИГА КИРМАЙДИГАН ГЕНЕТИК ЭЛЕМЕНТЛАР

Режа:

1. Транспозонлар
2. Ас элементлар
3. Плазмидалар

Транспозонларнинг кашф этилиши генетик мухандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлди. Кўчиб юрувчи генетик элементлар-транспозонларни ўсимлик организмида АҚШ олимаси Барбара Мак Клинтон, микроорганизмларда АҚШ олими Ахмад Бухорий ва хашаротларда Россия олими Георгий Георгиев кашф этган. Кўчиб юрувчи генетик элементлар айна вақтда транспозицион элементлар ёки транспозонлар деб ҳам аталади. Транспозонлар хилма-хил структурага эга бўлсалар-да, барча транспозон молекулаларининг икки четида 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 бўлакларини боғловчи фермент лигаза таъсирида ўзаро боғланади. Транспозонларнинг хужайра 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 юрувчи генетик элементлар иштирокида ген мухандислигига асосланган кўпгина биотехнологик жараёнлар яратилган. Ас (Activator) – 1940 йилларнинг ўрталарида маккажўхори геноми махсус участкаларида хромосомада узилиш ва геномнинг махсус участкаларида ксиниллик ҳолатини чақириш хусусиятига кўра, биринчи марта генетик усуллар ёрдамида Барбара Мак Клинтон томонидан идентификация қилинган. Ас- элемент геном бўйлаб фаол транспозиция бўлиш хусусиятига эга кўчиб юрувчи генетик элементлар гуруҳига киритилади.

Транспозонларнинг бу оиласига бирламчи структураси жиҳатидан Ас-элементига қардош бўлган, бироқ ички районларидаги делециялари туфайли геномга мустақил жойлаша олмайдиган Ds – элементлари гетероген гуруҳи ҳам киритилади, бунда транспозициялар эҳтимоли фақат Ас – элемент махсус оқсили транспозаза иштирокида амалга ошади.

Аниқланишича, Ас-элементи маккажўхори ўсимлигидан ташқари бошқа хил ўсимликлар: арабидопсис, сабзи, картошка, помидор, шоли ва ҳ.к. геномларида ҳам фаол бўлиши мумкин экан. Арабидопсис ўсимлиги геномида Ас-элементи транспозицияси қонуниятларини тадқиқ қилиш бўйича тажриба натижаларининг кўрсатишича, Ас- кўчиб юрувчи элемент

асосидаги конструкциялардан *нишонланган транспозициялар тизимини* олишда фойдаланиш мумкин, шунингдек, *қопқон (enhances trap lines)* номли *генлар линияларини* яратиш янги генлар, жумладан тўқимага хос экспрессия, яъни, маълум бир тўқималарда транскрипция ва трансляцияга учрайдиган генлар гуруҳини идентификация қилиш имконини беради. Шундай қилиб, муайян тўқималарга хос бўлган, масалан, илдиз, муртак халтаси ва ҳ.к. тўқималарига хос генлар ва оксилларни идентификация қилиш (ва келгусида амалиётда қўллаш) мумкин. Бундай векторларда репортер генларни қўллаш транспозонли конструкциялардаги интеграциянинг янги сайтларни белгилаш ва инсерция жойларини аниқлаш имконини беради. Улар функционал генларнинг кетма-кетлиги атрофи ёки бевосита ўзига ўтиб олиб, унинг кейинги клонланиши ва секвенс қилинишига шароит яратади, шунинг учун бундай типдаги плазида- векторларни - ген тутгич (қопқон) деб аталади.

**Плазмидалар** Бактерия ва тубан эукариот организмлар хужайраларида асосий хромосомадан ташқари, кичик ўлчамга эга бўлган халқасимон ёки чизиксимон структурага эга бўлган қўшимча хромасомалар мавжуддир бу мини-хромасомалар 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, ачитки 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 нихоятда оширади. Плазмидалар ўз хусусиятига кўра иккига бўлинади.

Биринчиси транспозон ёки бактериофаг ирсий молекуласи каби хужайра 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. Хужайра 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 хужайралар орасида тасодиқий равишда тақсимланади. Шу билан бирга автоном плазмид бир хужайрадан иккинчисига хужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидан ўта олади.

## 11-МАВЗУ

### ГЕН ИНЖЕНЕРИЯ ИШЛАРИНИ РЕЖАЛАШТИРИШ СХЕМАСИ ВА ПРИНЦИПЛАРИ

Режа:

1. Ген инженерлиги хақида маълумот
2. Рекомбинант ДНКлар технологияси
3. Клонлаш

Вируслар билан прокариот хужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини урганиш, плазмидлар ва мўътадил фагларнинг хужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имконини беради. Олимлар қўлида ДНК нинг керакли бир қисмини бактерия хужайрасига кўчириб ўтказадиган система — плазмидлар ҳам бор. Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халкали молекулалар — плазмидлар ва мўътадил вируслар *вектор* деб аталади. Улар табиатнинг ўзи биологларга такдим қилган совга бўлди. Шундай экан, энди бактерияларни културада (улар ўсадиган мухитда) инсонлар учун керакли оксилларни, фермент-ларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан?

Бу ғояларнинг амалда юзага чиқиши *ген инженерлиги* ёки *генетик инженерлик* деб аталган ва катта истиқболга эга бўлган янги сохани дунёга келтирди. Ген инженерлиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисмларига эга бўлиш, керакли жойидан кесиш, керакмас қисмини олиб ташлаб керак бўлган қисмларини бошқа генлардан ёки синтез йўли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган *дурагай* ёки *рекомбинат* генини мувофиқ организмга киритиб (масалан, одамнинг инсулин генини микроб хужайрага ёки сичқоннинг ўсиш гормони генини каламушга), зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва хоказо ғоялар ва технологиянинг йнгиндисидир. Унинг қисқадавр ичида босган ҳар бир кадамининг ўзи улуг кашфиёт.

Ген инженерлигининг пойдевори — *рекомбинат ДНКлар технологияси* — генетик структураларни бирга кўшиш техникаси — молекуляр биологиянинг энг муҳим ютуқларидандир. Бу технологиядан фойдаланиб, зарур маҳсулот (оксил) ни кодирлайдиган ДНК молекуласининг кичик бир қисми — генни кесиб олиш, унинг ёт ген билан комбинациясини яратиш, сўнгра бу янги геномни муносиб хужайраларга киритиб хўжайин-хужай ра ДНК сининг синтез механизми ёрдамида кўп марта лаб кў- пайтириш мумкин.

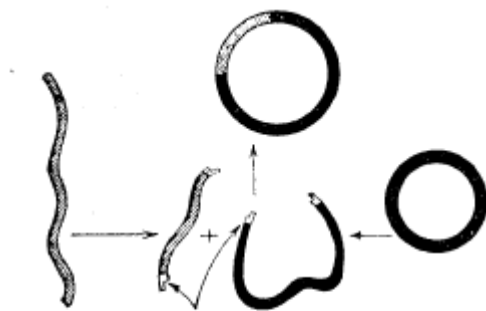
Ген инженерлигининг пайдо бўлиши ДНК структураси, унинг репликацияси, регуляцияси, молекуланинг айрим қисмлари, хатто, алоҳида нуклеотидларни таниш механизми, айрим нуклеин кислота, оксиллари минимал миқдорда ажратиб олиб, унинг миллионлаб



нусхасини тайёрлаш техникаси ишлаб чиқилишига боғлиқ эди. Рекомбинат молекулалар олиш техникасини такомиллаштириш натижасида янги вируслар, микроблар, ўсимликлар, ҳайвонлар турларини яратиш, ирсий касалликларни даволаш, бузилган генларни тузатиш, инсоният учун зарур генотипик конструкциялар тузиш имконияти тугилди. Бу соҳанинг тўла истикболи, жамият ривожланишига таъсири қандай бўлишини олдиндан айтиш қийин. Лекин инсон қўлига шундай қудратли қурол теккани аниқ.

Айрим ДНК молекулалари генлар бир турининг кўп нусхасини ҳосил қилиш учун илгаридан хужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатиладиган *клонирлаш* техникасининг молекулаларга мослаштирилган варианты қўлланади. Хужайра линияларининг бир хиллигини клонирлаш усули билан кучайтириш мумкин. *Клон* деб бирдан-бир олд хужайрадан келиб чиққан хужайралар популяциясига айтилади. Клонирлаш асосан мутант хужайралар олиш учун ишлатилади. Молекуляр клонирлаш ДНК нинг аниқ бир намунасини тоза ҳолда кўпайтиришдан иборат.

Кейинги йилларда соматик хужайраларнинг кўшилишига (дурагайланишига) ҳам эришиш мумкин бўлди. Бунда аввало иккита ядроли, битта комбинирланган хужайра— *гетерокарион* келиб чиқади.



59- расм. Рекомбинат ДНК ни олиш схемаси:

Юқорида — рекомбинат ДНК; ўртада — ёпишқоқ учлар; ёнда — плазмид, ўртада (пастда) — рестриктаза билан кесиш; чапда — хромосома ДНК си.

Вақт ўтиши билан гетерокарион митотик бўлиниб, бир ядроли *дурагай* (гибрид) хужайра беради. Уни клонирлаш мумкин.

Бир турдан ажратиб олинган ДНК ни иккинчи тур хужайрасига бевосита киритиб, унинг экспрессиясига эришиб бўлмайди, чунки реципиент (қабул қилувчи) тур ўзининг ДНК сини сақлайдиган қуролга эга. Улар модификация қиладиган метилазалар ва рестрикцияловчи

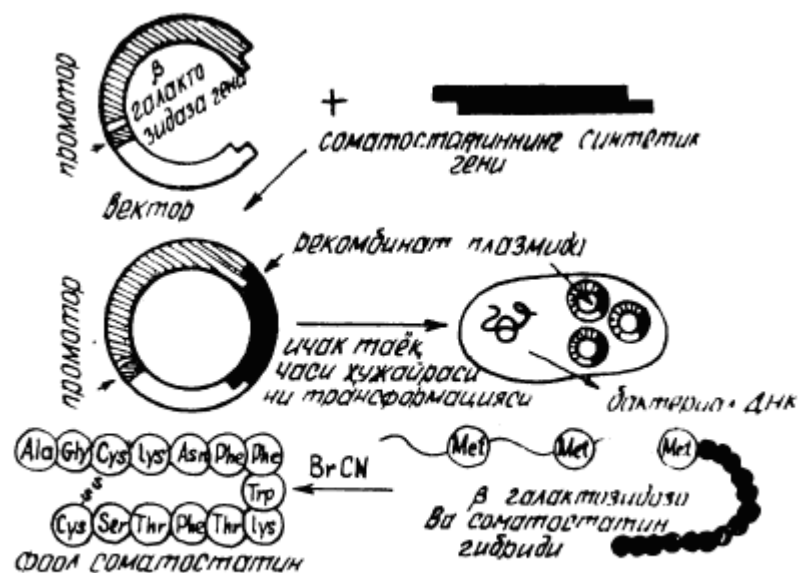
эндонуклеазалардир.

ДНК ни фрагментларга кесиш ва уни бактерияга киритиш вазифасини олий даражада беҳато бажарадиган асбоб табиатнинг ўзйда тайёр, улар бактериялар — эндонуклеазаларнинг бир гуруҳи бўлиб чиқди. Албатта, бактерия хужайрасида ДНК молекуласини керакли жойидан кесадиган фермент инсонлар максоди учун тайёрланган эмас, бу асбобни бактериялар ўз душмани — вирусларга қарши курашиш учун яратган. Лекин табиатнинг донолиги туфайли қачонлардир пайдо бўлган вируслар ДНК сини чегаралайдиган (рестрикция) фермент бугунги кунда инсонлар максоди учун хизмат қилмоқда. Рекомбинант молекуладар конструкция қилиш учун реструкцион эндонуклеазалардан фойдаланишни биринчи бўлиб 1972 йили Америка олимлари Стенли Коэн ва Герберт Бойер кашф этдилар. Бу олимлар у

вақтгача ўзларининг плазмидлар устидаги тадқиқотлари билан машхур эдилар.

Коэн ва Бойер гоёсига мувофиқ, плазмидани рестриктазаларнинг бири ёрдамида кесиб ДНК фрагментларида бир занжирли учлар ҳосил қилинади. ДНК нинг бу эркин учлари *ёпишқоқ учлар* дейилади, чунки бу учларда тўлатилмаган бир қизикли нуклеотидлар қатори бор. Шу рестриктазанинг ўзи билан донор ДНК фрагментларга бўлинади. Уларнинг бирида бизни қизиқтирадиган генини сақлайдиган участка ҳам бўлади. Энди мана шу фрагментларни кесилган плазмидалар билан аралаштирилса, ДНК молекуласининг бир занжири учидан рестриктазалар ёрдамида ҳосил бўлган нуклеотидлар қатори, плазмидаларнинг ёпишқоқ учларига комплементар бўлганидан улар билан тегишли лигазалар иштирокида ковалент бог орқали уланади. Угай ДНК ҳўжайин ДНК сига уланиб ўқилиб кетмайди. Бунинг учун воситачи — вектор иштирок этиши зарур. Шундай векторлар сифатида плазмидийлар қулай қурол эканлиги юқорида таъкидланган.

Рекомбинат молекулаларни яратиш учун аввало зарур генининг ҳўжайра ДНК сидаги ўрнини аниқлаб, уни кесиб олиш керак. Энди кесиб олинган ДНК фрагментини клонирлаш ва векторга боғлаш керак. ДНК ни клонирлаш турли манбалардан ажратиб олинган ДНК фрагментларини плазмидий ёки вирус (бактерияфаг) га киритиб сўнграбу генетикэлементларни бактерия ёки ачитки ҳўжайраларида қўпайтиришусулидир. Шу усул билан ДНК нинг фрагменти векторга боғланади. Векторнинг асосий хоссаси шундан иборатки, у тегишли ҳўжайинда автоном реплицирланиш хусусиятига эга. Мана шу усулда олинган рекомбинирланган молекула клонирлаш учун жуда қулайдир, у реципиент ҳўжайрада бемалол экспрессия қилинади. Навбатдаги босқичда плазмидий ёки вирус геномига уланган ДНК молекуласи (рекомбинат молекула) бактерия ёки ачитки ҳўжайрасига киритилади. Бундайсинтетик геномда бизни қизитирган ген вектор ДНК синингаҳамиятикам маълум участкасини алмаштирган бўлади. Бактерияҳўжайраси тез бўлиниб қўпайганидан, рекомбинат ДНК ҳамшу қадар қўпаяди ва тегишли оқсил синтезини қўп марталаб тезлатади ва



Ген инженерлиги йўли билан ўсиш гормони олинди.

уни саноат миқёсида олиш имконини беради. Ген инженерлиги йули билан бир қанча зарур гормонлар, имуп тамалар (инсулин, ўсиш гармони, интерферон), иммуноглобулиплар, турли дорилар муваффақият билан олинмокда.

Молекуляр биология ва ген инженерлигининг турли тармоклари нихоятда жадаллик билан ривожланмокда. Лекин хали хал килинмаган фундаментал илмий муаммолар, амалиёт учун жуда мухим вазифалар кўп. Улар орасида биринчи даражали ахамиятга эга масала — инсоннинг жисмоний ва рухий холати, функцияси, имконияти бошқарилишининг молекуляр асосини тушунишдир. Энди шубха йўкки, бу сирларнинг калити унинг геномида. Мана шунинг учун хам АКШда ва ривожланган бошка мамлакатларда, бизиинг мамлакатимизда хам инсон геномининг тўла нуклеотид қаторини ўрганишни мақсад қилиб қўйган инсон геноми номли узок муддатга мўлжалланган, жуда қиммат турадиган, фавқуллодда буюк лойиҳани ишлашга киришилди. Лекин бу улкан вазифани бажариб бўлармикин?

Маълумки, инсон геноми бутун бир дунё, унинг моддий асосини 3 млрд нуклеотид қолдигидан иборат ва мингдан ортиқ ген ташкил қилади. Лекин шундай бўлса хам, молекуляр биология ва ген инженерлигининг бугунги кундаги гоёлари, методик юксаклиги ва тажрибаси бу вазифани хал қилишга қурби етади, деб ишонса бўлади. Кейинги йилларда бутун хромосомалар ва уларнинг жуда катта фрагментларини генлардаги электрофорез усулида ажратиш олиш ва катта ДНК молекулаларининг структурасини тез аниқлаш усуллари ишлаб чиқилди, миллионлаб асосга эга бўлган гигант ДНКларни. эукариотлар хужайрасида клонирлашга эришилди. Шунини айтиб ўтиш хам ўринли тарих шунини кўрсатадики, инсоният ўз олдига доимо хал қилиниши мумкин бўлган вазифани қўйиб келган. Шубха йўкки «одам геноми» дек мислсиз лойиҳани ўз олдига қўйган молекуляр биология

ва ген инженерлиги хужайрадаги ҳар бир геннинг тузилиши, функциясини, хромосомада аниқ жойлашган ўрнини тайинлаш, уларга боғлиқ белгилар, хоссалар, бузгунликларни аниқлаш асосида ирсий касалликлар (геном касалликлари)нинг олдини олиш ва даволаш, турли оксиллар, ферментлар, гормонлар, вакцина ва антителоларни ишлаб чиқариш, микроорганизмларнинг янги турларини яратиш, ўсимлик ва ҳайвон геномига одамлар учун фойдали хусусият берадиган генларни киритиш ва бошқа муаммоларни муваффақиятли ҳал қилади.

## **12-МАВЗУ**

### **ВЕКТОРЛАР ТУРЛАРИ ВА УЛАРНИНГ ИШЛАТИЛИШ ҚОИДАЛАРИ . ГЕН ИНЖЕНЕРИЯСИНИНГ АСБОБ УСКУНАЛАРИ**

Режа:

1. Вектор молекулаларнинг функцияси
2. Векторлар турлари
3. Векторларга қўйиладиган асосий талаблар
4. Ген муҳандислиги ферментлари

Бегона ДНКнинг репликацияси, экспрессияси ва трансформациясини (бошқа организмга қўчишини) таъминловчи ДНК молекуласи *вектор* деб аталади. Вектор хужайрага қўшимча ирсий ахборот киритилишини амалга оширади. Вектор сифатида плазмидалар, бактериофаглар, мобил элементлар ва ҳайвонларнинг вирусларидан фойдаланиш мумкин. Ҳозирги вақтда жуда кўп векторлар яратилган бўлиб, уларни бир нечта типга бўлиш мумкин:

1. Клонлаш учун векторлар. Бундай векторларга бириктирилган ДНК фрагментларни репликациялаш орқали сонинини (амплификацияси) кўпайтириш учун фойдаланилади. Бундай мақсадлар учун бактерия плазмидалари ва фаглар қўлланилади. Геномнинг катта ўлчамдаги фрагментларини клонлаш учун эса бактерия ва ачитқи хромосомалари асосида яратилган (ВАС ва ЯС) сунъий векторларидан фойдаланилади.
2. Экспрессион векторлар. Улардан генларнинг муайян кетма-кетлиги аниқлаш ва уларнинг оксил маҳсулотларини таҳлил қилиш, муайян оксилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Кўп сонли экспрессион тизимлар, айниқса прокариот организмлар учун мавжуд. Шунингдек сут эмизувчилар, ўсимликлар ва ачитқилар хужайраларида генлар экспрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган.
3. Трансформация учун векторлар. Реципиент геномига бегона ДНК фрагментларини киритиш учун фойдаланилади. Бундай векторлар одатда геномга интеграцияланишига ёрдам берувчи махсус изчилликлар тутати. Замонавий вектор тизимлар полифункционал бўлиб, бир нечта функцияни битта векторга жамлайди. Биринчи табиий векторлар бактериялардан ажратилган бўлиб, кўпчилиги тажриба мақсадидан келиб чиққан ҳолда (экспрессион векторлар, клонлаш учун векторлар,

трансформация учун векторлар) ген мухандислиги усуллари ёрдамида қайта яратилган.

Вектор молекулаларнинг таркибида маркер ген бўлиши, бу ген хужайрада вектор иштирок этаётгани хақида маълум қилувчи фенотип бериши яъни вектор селектив ирсий белгига эга бўлиши керак. Кўпинча селектив белги сифатида табиатда кенг тарқалган антибиотикка чидамлилик генидан фойдаланилади.

**Е.солі хужайраларига вектор конструкциялар трансформацияси** Таркибида бегона ДНК фрагментлари тутувчи вектор конструкциялар Е.солінинг махсус штамлари хужайраларига трансформация қилиш учун фойдаланилади. Вектор плазмидаларнинг бактерияларга трансформацияси хужайраларнинг ДНК молекулаларини қабул қилиш қобилятига асосланган (компитентлигига). Е.солі хужайраларига трансформациялаш асосан кальций шоки ёки электропорация усулларида бирини қўллаш орқали амалга оширилади. Иккала ҳолатда ҳам бактерия мембранасининг ДНК молекулалари учун ўтказувчанлиги ошади.

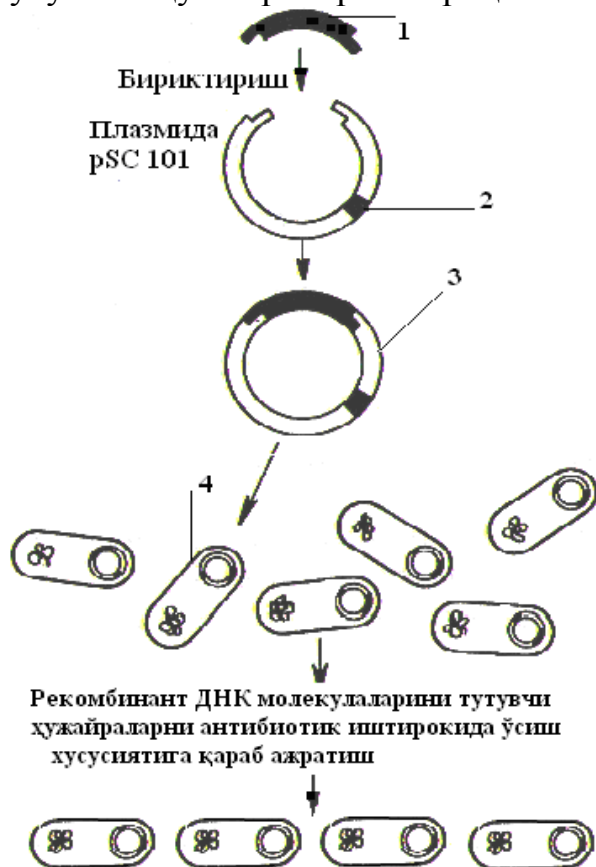
Вектор молекуласи учун қуйидаги асосий талаблар қўйилади:

- 1) вектор бегона ДНК фрагментларини ўзига бириктириши учун бир нечта рестриктазалар учун ягона рестрикция сайтлари тутиши зарур.
- 2) вектор репликация бошланиш нуқтаси изчиллигини тутиши ҳисобига муайян хужайраларда репликацияланиши шарт.
- 3) вектор маркер ген изчиллигини тутиши зарур. Бу генлар вектор конструкцияни тутувчи хужайралар селекциясини енгиллаштиради.

**Бактерия плазмидаларидан клонлашда фойдаланиш.** Бактерия хужайрасида хромосома ДНКсидан ташқари, кўп нусхада халқасимон ДНК молекулалари ҳам мавжуд. (1-25 м.н.ж.). Бундай халқасимон молекулалар *плазмидалар* деб аталади. Баъзи плазмидалар таркибида антибиотикга чидамлилик генларини тутади.

Плазмидалардан вектор сифатида биринчи марта 1973 йилда П.Берг лабораториясида фойдаланилган. Тажрибалар унча катта бўлмаган (~9 м.н.ж.), тетрациклинга чидамлилик гени тутувчи Е.солі плазмидаси рSC 101 да олиб борилган. Плазида таркибида фақат бир дона EcoPI рестриктаза ферменти таниб кесадиган сайт (махсус нуклеотидлар изчиллиги) бўлганлиги сабабли, фермент плазмиданинг халқасимон қўш занжирини фақат бир жойидан кесиб «ёпишқоқ» учли очик халқа ҳолатига ўтказади. Плазида рSC 101нинг ДНКси ичак таёқчаси учун бегона ДНКнинг EcoPI–фрагментлари билан аралаштирилади. ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида бегона ДНК фрагментлари ва рSC 101 плазида ягона рекомбинант молекулага бирлаштирилади. Сўнгра бу рекомбинант плазмидани Е.солінинг компитент хужайраларига қўшилганда у бактерия хужайрасига киради. Рекомбинант плазмидани

тутувчи хужайралар тетрациклинли селектив муҳитда ажратилади.

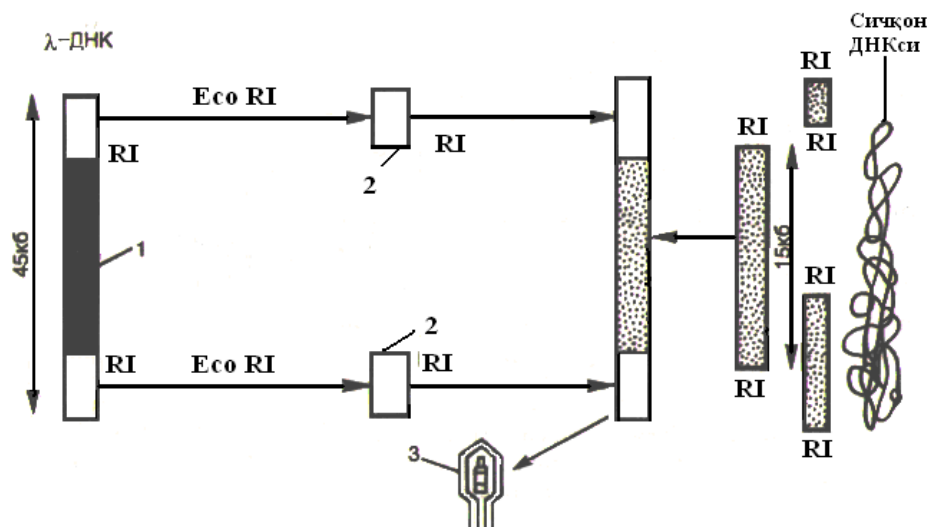


ДНК фрагмент-ларини плазмидалар ёрдамида клонлаш бўйича тажриба схемаси.

1-Бириктирилаётган гетеро-логик ДНК; 2-антибиотикка чидамлилик бўйича маркер; 3-ДНКнинг рекомбинант молекуласи; 4-Рекомбинант ДНКни бактерия хужайрасига киритиш.

**Фаглар асосидаги векторлар.** Космидлар. Вас- ва Ҳас- векторлар. Бактерия плазмидаларида ўртача 7-8 м.ж.н. узунликдаги фрагментларни клонлаш мумкин, эукариот генлари изчиллиги эса (~10-25 м.ж.н.) узунроқ бўлади. Бундан ташқари генларнинг кодирловчи қисми атрофида жойлашган регулятор изчилликларни ўрганиш учун геномни кенгрок клонлаш зарур. Бундай катта фрагментларни клонлаш учун  $\lambda$  бактериофаги асосида таркибига 22 м.ж.н. узунликдаги бегона ДНК фрагментларини тутувчи вектор конструкция яратилган.  $\lambda$  бактериофаг асосида клонлаш учун бундай векторларни яратишда фаг ДНК молекуласининг марказий қисми фагнинг Е.солі да кўпайиши учун зарур эмаслиги эътиборга олинган ҳолда рестриктазалар ёрдамида фаг геномидан кесиб олинганда репликация учун зарур бўлган фагнинг ўнг ва чап елкаси ўзгармасдан қолиши керак. Фаг елкалари бошқа фрагментлардан алоҳида ажратилиб, клонлаш учун вектор сифатида қўлланилади. Кесилган фаг ДНКси ўрнига ўлчами 9-21 м.ж.н. бўлган бегона ДНК уланади. Бактерияларда фақат фагнинг иккала елкаси ва

бегона ДНК тутувчи фаглар кўпаяди. Бунда олинган фаг рекомбинант ДНКси 30 м.ж.н. дан кам бўлмаслиги керак.



Бактериофаг л асосидаги векторда ДНКни клонлаш.

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

**Ген муҳандислиги ферментлари.** Ген муҳандислиги ферментлари ДНК молекулалари билан турли хил муолажаларни ўтказишга ёрдам бериб, уларни тегишли жойидан қирқиш, турли хил бўлакларини улаш, табиатда мавжуд бўлмаган янги хилдаги кетма-кетликларни синтез қилишда қўлланилади. қуйида ген муҳандислигида фойдаланиладиган асосий ферментларни кўриб чиқамиз.

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

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

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

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

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

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

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

Генлар устида бевосита муолажалар ўтказиш усуллариининг такомиллаштирилиши рестрикцион эндонуклеазалар (рестриктазалар)нинг очилиши билан боғлиқдир. 1953 йилдаёқ Е.солінинг алоҳида штамми ДНК си бошқа штамми ҳужайраси (масалан, В штамми ДНКси С штамми ҳужайраси) га киритилганда, одатда, генетик фаоллик кўрсата олмайди. Чунки у махсус ферментлар-рестриктазалар билан тезда бўлақларга бўлиб юборилади. Ҳозирги вақтда турли хил микроорганизмлардан мингдан ортиқ ҳар хил рестриктазалар ажратиб олинган. Ген муҳандислигида 200дан ортиқ тури кенг қўлланилмоқда.

Рестриктазалар эндонуклеазаларнинг ДНКни муайян махсус кетма-кетликлари *рестрикция сайтлари* (нуқталари)ни ҳосил қилиб гидролиз қиладиган гуруҳи ҳисобланади. Ҳар бир рестриктаза ўзининг рестрикция сайтини танийди ва ДНКни рестрикция сайти изчилликлари ичидан ёки унинг атрофидан бошлаб қирқади (1.1-жадвал). Шундай қилиб, муайян бир рестриктаза таъсирида битта ва айнан ўша ДНК кетма-кетлиги ҳар доим ҳам



бир хилдаги бўлақлар йиғиндисини ҳосил қилади. Рестриктазаларни номлашда фермент ажратиб олинган бактерия турининг лотинча номини бош ҳарфлари ва қўшимча белгиларидан фойдаланилади. Чунки бир турдаги бактериялардан бир неча хил рестриктазалар ажратиб олинган бўлиши мумкин. *Escherichia coli*-EcoP I, EcoP V, *Haemophilus influenzae* –Hinf I, *Streptomyces albus* – Sal I, *Thermus aquaticus* – Taq I.

#### Баъзи рестриктазалар ва улар таниб кесадиган изчилликлар

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

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

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

II-типдаги рестриктазалар муайян нуклеотид кетма-кетликларни ДНК дан таниб олади ва уни рестрикция сайти изчиллиги ичидан бошлаб гидролизлайди. II-типидаги рестриктазаларнинг рестрикция сайтлари 180<sup>0</sup> айланишдаги симметрик кетма-кетликлар - палиндромлардан иборат.

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5' EcoP I рестриктазаси рестрикция сайти.

5' TAGA 3'

3' ATCT 5' Taq I рестриктазаси рестрикция сайти

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

- 1) майда бўлакка бўлувчилар – рестрикция сайтлари тўртта нуклеотид жуфтликлардан иборат;
- 2) ўрта бўлакка бўлувчилар – 6-8 н.ж. рестрикция сайтлари;
- 3) йирик бўлакка бўлувчилар - 10-14 н.ж. рестрикция сайтлари

II-типтаги рестриктазаларни ДНК кетма-кетликларини бўлакларга бўлишига қараб икки гуруҳга киритиш мумкин, чунки улар. Бири танилган кетма-кетликнинг симметрия ўқи бўйлаб, бошқаси эса силжиб, «поғоналар» ҳосил қилади. Биринчи ҳолатда «тўмтоқ» учлар ҳосил бўлса, иккинчисида «ёпишқоқ» учлар ҳосил бўлади; яъни бўлаклар ўз учларида бир занжирли ўзаро комплементар қисмларга эга бўлади.

Рестриктазалар билан қирқилган «ёпишқоқ» учли бўлакларнинг ҳосил бўлиши:

5' G ↓AATTC 3'    5' C↓CGG 3'

*EcoP I* 3' CTTAA↑G 5'    *Hpa II* 3' GGGC ↑C 5'

Рестриктазалар билан қирқилганда «тўмтоқ» учли бўлакларнинг ҳосил бўлиши:

*Ta*↓ GA 3'    5' GTT↓ AAC 3'

*Taq* 3' AT↑CT    5' *HincI* 3' CAA ↑TTG 5'

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

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

### 13- МАВЗУ

#### КЕРАКЛИ АКТИВ ГЕНЛАР АЖРАТИБ ОЛИШ УСУЛЛАРИ СХЕМАСИ.

Режа:

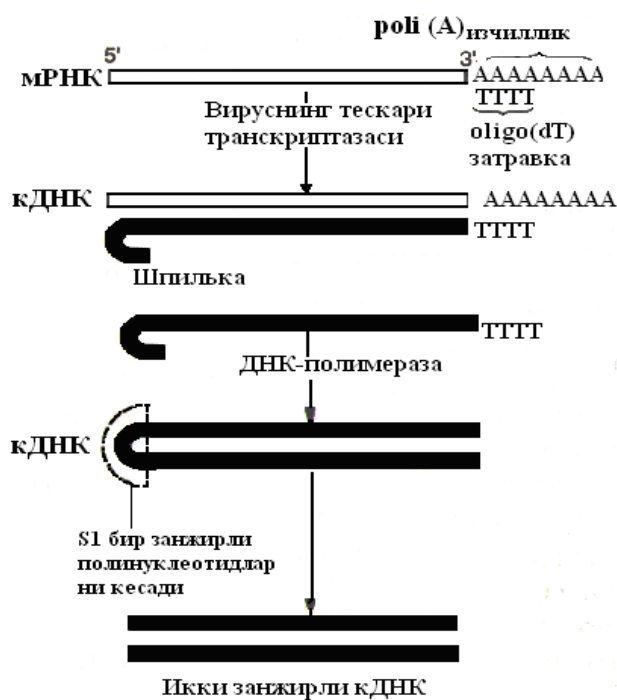
1. Генлар изчиллигини идентификация қилиш ва ажратиш
2. Генни киритиш ва унинг реципиент ўсимлик геномидаги экспрессияси.
3. кДНК библиотекасини яратиш
4. Клонотекадан зарур генни идентификация қилиш
5. Библиотекалар скрининги
6. ДНК таҳлилининг блот-дурагайлаш усули

Генларни ажратиш ген мухандислигининг асосий босқичларидан биридир. Рекомбинант ДНК олишнинг бу босқичидаги муваффақияти авваломбор бу геннинг қанчалик даражада ўрганилгани ва унинг донор геномидаги жойлашиш ҳолатига, мазкур ген мРНКсини ажратиш усуллари ва шу ген маҳсулотларининг функционал фаоллигини аниқлаш усуллариининг яратилиши; мазкур ген кўп миқдорда мавжуд бўлган (амплификацияланган) ёки фаол бўлган объектларнинг мавжудлиги, кейинчалик тескари транскрипция йўли шу геннинг ДНКсини олишда фойдаланиб, унинг мРНКсини етарли миқдорда ажратишга боғлиқ.

Генларни ажратишнинг иккита асосий усули мавжуд: ген сунъий равишда синтезланади ёки клонотекадан зарур генни тутувчи клон танлаб олинади.

Комплементар ДНК синтези (кДНК). *Тескари транскриптаза ёки ревертаза* ферменти аниқланганидан сўнг, генни сунъий равишда синтезлаш орқали генларни ажратиш имконияти пайдо бўлди. Бу фермент РНК тутувчи онкоген вируслардан ажратиб олинган. Фермент специфик ДНК-полимеразани акс эттиради ва РНК бошқарувчи ДНК синтезини РНКдан матрица сифатида фойдаланиб амалга оширади. Натижада комплементар ДНК занжири синтезланади. Фермент ген экспрессиясининг биринчи босқичига—транскрипцияга тескари реакцияни катализлайди, унинг номи ҳам шундан олинган.

ДНКнинг синтез реакцияси бошланиши учун ДНК ревертазага бошқа барча ДНК-полимеразалардаги каби унча узун бўлмаган икки занжирли затравка керак бўлади. Агар реакцияга 18-20та тимин қолдиқларидан иборат (поли дТ) бир занжирли қисқа олигонуклеотидлар қўшилса, улар мРНКнинг поли(А)-изчиллиги билан бирлашади (комплементарлик принципи асосида ДНК- РНК фрагментлар ҳосил қилади) ва бундай дуплекс ферментатив реакциянинг бошланиши учун затравка бўлиб хизмат қилади. Натижада дурагай РНК-ДНК молекула ҳосил бўлади, унинг учиди фермент икки занжирли ДНКнинг қисқа бўлаги-шпилкани синтез қилади. Шпилка ДНКнинг иккинчи комплементар занжири синтези учун затравка бўлиб хизмат қиладию Буни ДНК полимераза I амалга оширади. мРНК занжири РНК-аза ферменти томонидан гидролизланади. ДНКнинг бир занжирли участкаларини гидролизловчи  $S_1$  эндонуклеаза ёрдамида шпилкани кесиб ташлаш мумкин. Натижада занжирларидан бири мРНК га комплементар бўлган икки занжирли ДНК молекуласи ҳосил бўлади. Бундай ДНК *кДНК* деб аталади ва у мРНКнинг дастлабки молекуласи транскрибцияланган структура генига мос келади



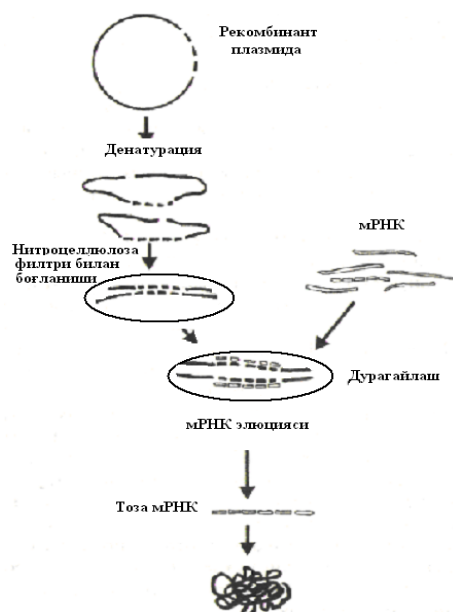
мРНКда кДНК синтези схемаси.

Олинган кДНКга «ёпишқоқ» учлар бирлаштирилади ва плазмидага, масалан, рУС 19 плазмидасига уланади. кДНК фрагментларини кўпайтириш учун рекомбинант ДНК Е.соліга киритилади. Шу каби схемалар ишлаб чиқарилиши саноат асосига қўйилган. Инсулин, ўсиш гормони, интерферрон, альбумин, иммуноглобулинлар, қатор бошқа оқсиллар генларини олишда фойдаланилади.

Мазкур оқсилни кодирловчи айнан шу ген олингани хақида ишонч хосил қилишнинг бир нечта усуллари мавжуд. Агар ген томонидан кодирланган оқсилнинг аминокислоталар тартиби маълум бўлса, унда клонланган ДНКнинг нуклеотид изчиллигини аниқлаб, унинг айнан шу оқсилни кодирлашига ишонч хосил қилиш мумкин.

Баъзи ҳолларда ДНК-РНК дурагайлаш усули ҳам қўлланилади.

Агар кДНК вектор молекула таркибида экспрессияланишга кодир бўлса, унда мРНК синтези амалга ошади, сўнгра мРНКдан оқсил синтез бўлади, генни унинг маҳсулоти бўйича оқсилни аниқлаш иммунокимёвий усул ёрдамида идентификация қилиш мумкин. Шундай тарзда бу усулларнинг бирини қўллаб айнан зарур ген олинганини исботлаш мумкин.



Филтрларда ДНК-РНК дурагайлаш ёрдамида кДНКни тутувчи плазмидалар идентификацияси

**кДНК библиотекасини яратиш.** Хар бири ўзининг таркибида кДНК тутувчи вектор плазмидалар йиғиндиси *кДНК библиотекаси* деб аталади. Демак, кДНК библиотекаси геном библиотекасидан фаркли, геномнинг бутун изчилликлари ва генларини ўзида тутмайди, фақат бу организмда экспрессияланувчи қисминигина намоён қилади. Бундай ҳолларда кДНК геннинг промотор ва интрон қисмларисиз фақат структура қисмини акс эттиради.

Фақат баргдан ёки илдиздан мРНК ажратиб, илдиз ёки барг тўқимасининг муайян тўқималарда баргда ёки илдизда экспрессияланувчи генларга хос бўлган специфик кДНКсини олиш мумкин. Шу йўл билан ўсимлик ёки ҳайвонлар кДНК библиотекаси билан бирга алоҳида органлар ва тўқималар кДНК библиотекаси (орган ёки тўқимага хос кДНК библиотекаси) ёки онтогенезнинг турли жараёнларига характерли кДНК библиотекасини яратиш мумкин.

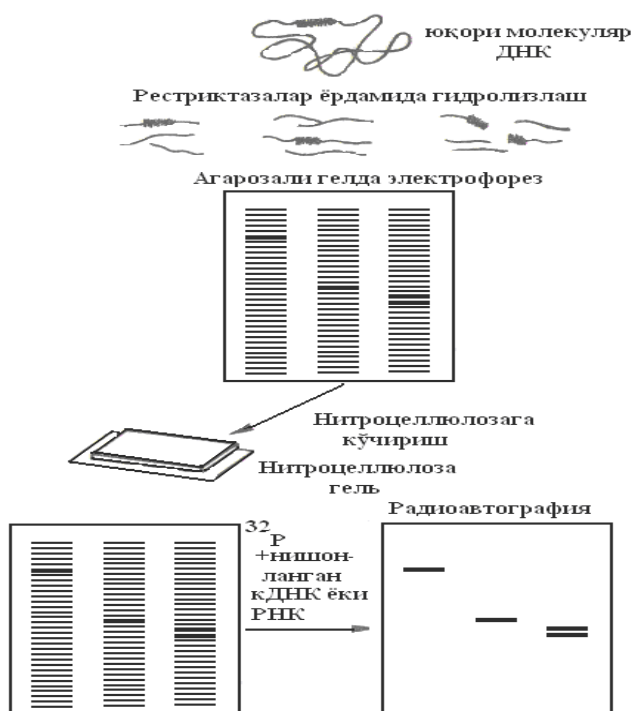
**Клонотекадан зарур генни идентификация қилиш.** Бундай ҳолларда тадқиқотчиларнинг олдида минглаб клонлар орасидан уни қизиқтирувчи генни тутувчи ДНК фрагменти мавжуд бўлган клонни излаб топиш вазифаси туради. Ҳозирги вақтда бундай муаммони ҳал қилиш учун молекуляр зондлардан фойдаланилади. Зонд- геннинг изчиллигига гомологик бўлган нуклеин кислотанинг нишонланган молекуласини ўзида акс эттиради. қидирилаётган генни тутувчи бактерия колониясини аниқлаш учун радиоактив нишонланган индивидуал мРНК яхши зонд бўлиб хизмат қилади. Аммо индивидуал мРНКни хар доим ҳам ажратишга муваффақ бўлиш қийин. Баъзида хужайрада қидирилаётган ген маҳсулоти (демак мРНКси ҳам) жуда кам миқдорда бўлади, ёки мРНК жуда тез деградацияланади, шунинг учун мРНКни ажратиш мумкин эмас. Барқарор оксил иштирокида унинг баъзи қисмининг унча кўп бўлмаган миқдорини ажратиш ва амнокислоталар тартибини аниқлаш мумкин (бунинг учун узунлиги 5-10 аминокислота қолдиғидан иборат оксил қисмини билиш етарли).

**Библиотекалар скрининги.** Радиоактив нишонланган зонд олинганидан сўнг, зондга комплементар ва таҳлил қилинаётган оксилга мос изчилликга эга плазмид

тутувчи бактерия колонияларини идентификация қилиш учун, геном библиотекаси ёки кДНК библиотекаси кўриб чиқилади.

Бактерия колониялари ўсаётган Петри ликовчаси устига махсус нейлон филтр ёпилади; ҳар бир колония хужайраларининг бир қисми филтрга ўтади, қолган қисми ликовчада қолади. Натижада реплика ҳосил бўлади: ликовчада ва филтрда колониялар бир хил тақсимланади. Нейлон филтрга ДНК мустаҳкам ўрнашади. Нейлон филтрдаги бактерияларни лизис қилиш ва клонларнинг ДНКсини денатурациялаш учун ишқор билан ишлов берилади. Сўнг филтр нишонланган зонд (кДНК ёки мРНК ёки сунъий олигонуклеотид) солинган эритмага жойлаштирилади. Дурагайланишда зонд нишонланган зондга комплементар изчилликлар тутувчи колониялар билан боғланади; филтр зонд молекулалари билан боғланмаган хужайралардан ювиш орқали тозаланади ва радиоактив нишон тутувчи колонияларни аниқлаш учун радиоавтография қилинади. Бу колониялар Петри ликовчасида идентификацияланганидан сўнг, алоҳида олиб кўпайтирилади. Шундай қилиб, геном библиотекаси ёки кДНКнинг кўп сонли клонлари орасидан таҳлил қилинаётган ген изчиллигини тутувчи клон аниқланади ва кейинги ишлар бутун геном билан эмас, фақат битта ген (ДНК фрагменти) билан олиб борилади.

**ДНК таҳлилининг блот-дурагайлаш усули** нафақат кДНК ва геном библиотекалари скринингида, шунингдек геном ДНКсини таҳлил қилишда ҳам фойдаланилади. Шу усул ёрдамида геномда муайян ДНК изчиллиги иштирокини аниқлаш мумкин (масалан, трансген ўсимликлар геномида бегона ген иштироки, ген нусхаларининг кўпайиши, геннинг нуклеотид изчиллигидаги ўзгаришларни таҳлил қилиш мумкин). Блот-дурагайлаш усули билан ДНКни таҳлил қилиш муайян ДНК фрагментларининг уларни специфик нишонланган зондлар билан дурагайлаш йўли орқали аниқлашга асосланган. У кўйидаги босқичлардан иборат: 1) ДНК рестрикцияси; 2) рестрикцияланган ДНК фрагментларини гелдан нейлон филтрга кўчириш ва уларни иммобилизациялаш; 3) нишонланган зонд билан дурагайлаш. Юқори молекуляр хромосома ДНКси битта ёки бир нечта рестриктазалар билан кесилади. Ҳосил бўлган фрагментлар агарозали гелда электрофорез қилиш орқали ажратилади ва олдиндан денатурацияланган (0,4 М NaOH) гелнинг устига нейлон филтр, унинг устидан филтр қоғозлар кўйилади. Капилляр кучлар таъсирида ДНК фрагментлари перпендикуляр равишда филтрга ўтиб, у билан боғланади (иммобилизацияланади). Бундай кўчириш блоттинг (blot – сўриш) деб аталади. Бунда филтрда гелнинг репликаси ҳосил бўлади. Сўнг филтр радиоактив нишонланган бир занжирли зонд солинган эритмага жойлаштирилганда филтрга бириккан хромосома ДНКси фрагментлари билан қўшилиб дурагайланади. Зонд фақат ўзига гомологик ДНК изчиллиги тутувчи фрагментлар билан дурагайланади. Нишон билан боғланган фрагментлар радиоавтография орқали аниқланади. Саузерн (Southern blotting) бўйича блот-дурагайлашнинг схемаси берилган.



Саузерн б'уйича блот-дурагайлаш усули принципи.

Радиоавтографияда хосил бўлган чизикчалар орқали геномда таҳлил қилинаётган фрагментлар мавжудлигини, бу изчилликлардаги ўзгаришларни (делеция, инсерция), чизикчаларнинг оч ёки тўқ ранги орқали геннинг геномдаги нусхалари сонини аниқлаш мумкин. Демак, бу усул бутун геном ва алоҳида генларни таҳлил қилиш учун ҳам қўлланилади.

## 14-МАЗУ

### ЎСИМЛИКЛАР ВА МИКРООРГАНИЗМЛАР ГЕН ИНЖЕНЕРИЯСИ

Режа:

1. Трансген ўсимликлар олиш босқичлари
2. Генни танлаш ва уни клонлаш.
3. Генни киритиш ва унинг реципиент ўсимлик геномидаги экспрессияси.
4. Трансформант ҳужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.
5. Агробактериялар асосида ўсимликлар трансформацияси
6. Ўсимликлар ген муҳандислиги векторлари
7. Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш Ўсимлик ҳужайралари трансформацияси усуллари

Жинсий гибридизация ва танлашга асосланган анъанавий селекция усуллари ўсимликларнинг янги генотипларини олиш имкониятини беради. Улар йирик ҳажмдаги кишлоқ ҳўжалик экинларининг гибрид ва навлари, шунингдек, селекциянинг нодир нусхаларини олишни таъминлайди.

Рекомбинант ДНК лар технологияси прокариот, шунингдек эукариот келиб чиқишга эга генларни ажратиш, бу ген (ёки бир неча генлар) реципиент ўсимлик хромосомасига кўчириб ўтказиш ва унинг экспрессиясини таъминлашга шароит яратади. Бу

технологияни қўллаш изланишни бирмунча аниқ мақсадли қилади ва генетик аппарат билан манипуляция қилиш имкониятларини кенгайтиради.

Ўсимликларнинг битта хужайрасидан яхлит ўсимлик олиш мумкинлиги, яъни тотипотентлик хусусияти хайвонлар хужайраларига нисбатан уларнинг энг муҳим афзаллиги ҳисобланади. Ўсимликлар ген муҳандислигидаги натижалар ўсимлик тўқималари култураси усуллари, айниқса, турли хил ўсимликларни регенерация қилиш услубларини ишлаб чиқишга боғлиқ бўлади.

Ген муҳандислиги технологияси трансген ўсимлик олишнинг қуйидаги босқичларини ўз ичига олади: 1) генни танлаш ва уни клонлаш; 2) реципиент - ўсимлик генотипини танлаш; 3) генни киритиш ва унинг реципиент – ўсимлик геномига экспрессияси; 4) трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.

**Генни танлаш ва уни клонлаш.** Генни танлаш, ўсимликка ҳўжалик аҳамияти кимматли маълум бир белгини ўтказиш заруриятидан келиб чиқади. Ҳозирги вақтда, асосан, ўсимликлар трансформацияси учун моноген белгилар, яъни, пестицидларга чидамлилиқ, ёки бошқа хил стресс омилларга чидамлилиқни белгиловчи генлар кенг қўлланилади. Бу белгиларга жавобгар генларнинг кўпчилиги бактерия геномларидан ажратиб олинган. Кейинги вақтларда чидамлилиқ белгиларига жавобгар донор сифатида ёввойи ўсимлик турлари геномлари танланмоқда. Турли хил тур, авлод ва ҳатто оилаларга мансуб ўсимликларнинг биологик жиҳатдан бир-бирига мос келмаслиги сабабли бундай генларни реципиент ўсимликлар геномига жинсий гибридизация усули орқалигина киритиш мумкин эмас.

**Реципиент ўсимлик генотипини танлаш.** Реципиент сифатида ишлаб чиқариш амалиёти талабларига ҳосилдорлиги, уруғ - меваси сифати, биотик ва абиотик стрессларга чидамлилиги билан жавоб бера оладиган, лекин фақат биргина салбий белги, масалан, зараркунанда ҳашаротга чидамсиз нав ёки линиялар танлаб олинади. Бундай ўсимликлар геномига ҳашаротларни нобуд қилувчи прототоксин оксили экспрессиясини таъминловчи в *bt2* бактерия генини киритиш танлаб олинган навда ҳосилдорликни сезиларли ошишига сабаб бўлади. Шунингдек, реципиент ўсимлик генотипини танлашда хужайраларнинг яхлит (фертил) етук ўсимликка қадар регенерация қилиш хусусияти ҳам инобатга олинади, чунки бу белги генотипга ҳам бир қадар боғлиқдир.

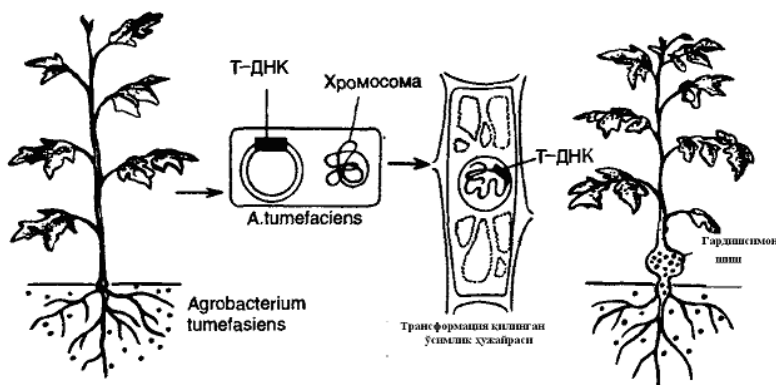
**Генни киритиш ва унинг реципиент ўсимлик геномидаги экспрессияси.** Ўсимликлар геномига бегона генларни кўчириб ўтказиш муаммоси бегона генларни икки паллали ва баъзи бир паллали ўсимликлар геномига кўчириб ўтказиш имконини берувчи тупроқ агробактериялари *Agrobacterium tumefaciens* таркибидаги *Ti* – плазмидларининг аниқланиши билан бирмунча енгиллашди. Сўнгги вақтларда ўсимлик хужайралари трансформациясида биобаллистик трансформация усули, айниқса, бир паллали ўсимликлар учун кенг қўлланилмоқда.

**Трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.** Трансформант хужайралардан етук ўсимликни регенерация бўлиши хужайралар тотипотентлигига боғлиқ, аммо бу ҳар доим ҳам амалга ошавермайди. Тотипотентлик белгиси икки паллали ўсимликлар: тамаки, картошка, лавлаги, соя, рапс, беда, помидор, сабзи, карам ва баъзи мевали дарахтларда яққол ифодаланган. Бир паллалилар, айниқса, бошоқдошларда бу белги кучсиз ифодаланган бўлиб, уларда хужайрадан етук ўсимликни регенерацияси жараёни жуда қийинчиликлар билан кечади. Ҳозирги вақтда ғалла



экинларига мансуб баъзи ўсимликлар маккажўхори, шоли, буғдой, сули кабиларни регенерация қилиш усуллари ишлаб чиқилган.

**Агробактериялар асосида ўсимликлар трансформацияси.** Баъзи тупрок бактериялари турлари (*Agrobacteria*)нинг икки паллали ўсимликларни зарарлаши ва бунда ўзига хос шиш – гардишсимон бўртма ҳосил қилиши олдиндан маълум эди. Бу шишлар зарарланган жойда мунтазам равишда бўлиниб ўсадиган дедифференциаллашган хужайралардан ташкил топган. *In vitro* шароитида ўстирилганда шиш хужайралари нормал ўсимлик хужайралари ўсиши учун зарур гормонлар учрамайдиган муҳитда ҳам ўса оладилар. Агар зарарлантирилгандан сўнг барча агробактерияларни антибиотиклар қўшиб инактивация қилинса ҳам шиш хужайралари тартибсиз (назорат қилинмайдиган) бўлиниш хусусиятини сақлаб қоладилар. Шиш ҳосил қилувчи кучли индукторлардан бири *Agrobacterium tumefaciens* мисолида шиш чакирувчи восита *Ti* – плазмида деб номланган (инглиз тилидан *Tumor inducing* – шиш чакирувчи) махсус плазмида бўлиб, унинг бир қисми ўсимлик хужайраси хромосомасига ўрнашиб олиши аниқланган



*Ti*-ДНК нинг ўсимлик хромосомасига интеграцияси ва (гардишсимон) шиш ҳосил бўлиши.

*Ti* – плазмида узунлиги 200 м.н.ж (минг нуклеотид жуфт) дан иборат ҳалқасимон ДНК дан ташкил топган. У бактерия хужайраларида автоном репликация бўла олиш хусусиятига эга. *Ti* – плазмидаларни улар синтезлайдиган опинлар типига кўра 4 та гуруҳга бўлиши мумкин. Кўпинча нопалин ёки октопин аминокислоталарини кодирлайдиган *Ti* – плазмидалар учрайди. Агробактерия хужайраси плазмидаларнинг фақат бири октопин ёки нопалин кодирлайдиган типини сақлаши мумкин.

*Агробактериялар ёрдамида ўсимликлар трансформацияси амалга оширилиши учун учта шарт бажарилиши лозим:*

1. Бактерия хужайраси юзасида бактериянинг ўсимлик хужайраси билан бирикиши учун зарур махсус полисахаридлар синтезини амалга оширувчи тўртта генни агробактериялар хромосомасидаги фаоллашуви;

2. *Ti* – плазмиданинг *vir* –ҳудуди, яъни ДНК нинг ўсимлик хужайраси ядросига кўчириб ўтказилиши инициацияси учун зарур қисмининг фаоллашуви;

3. *T*-ДНК нинг мавжуд бўлиши.

**Коинтегратив векторлар.** Керакли генни клонлаш учун ёрдамчи (оралик) вектор сифатида *E. coli* асосидаги плазмидалардан фойдаланилади. Уларга *T*-ДНК нинг чегараланган *T*-ДНК кетма-кетликлари фрагменти ва селектив (одатда, антибиотиклар канамицин, гиромоцин ёки гербицидга) чидамлилик белгисини кодирлайдиган гени

жойлаштирилади, бу эса келгусида трансген ўсимликларни танлашни амалга ошириш имконини беради. Бундай вектор кичик ҳажмга эга, ундан Т-ДНК худудига керакли ген кетма – кетлигини улаб, клонлаш мақсадида фойдаланилади.

Конъюгация йўли билан бундай оралиқ векторни ўсимлик геномига Т-ДНК қисмининг интеграцияси учун зарур бўлган генларни сақлайдиган бошқа векторга эга махсус *Agrobacterium tumefaciens* штамми хужайраларига кўчириб ўтказилади. Бу вектор муайян ўлчамга эга ва у  $Ti$  – плазмиданинг *vir*-худуди, Т-ДНК нинг чегараланган кетма-кетликларига эга ва оралиқ векторларга аналогик рВР322 плазмидаси фрагментларидан ташкил топган. Конъюгациядан сўнг иккала векторнинг гомологик қисмлари ўртасида рекомбинация амалга ошади, бунинг натижасида оралиқ векторнинг керакли ген ва селектив маркер тутувчи қисми *vir*- худуди ва Т-ДНК нинг чегаланган кетма-кетликлари билан бирга иккинчи векторга кўчириб ўтказилади. Шундай қилиб, иккита плазмида ўртасидаги рекомбинация натижасида коинтегратив вектор олинади. Бундай коинтегратив векторга эга агробактерия хужайралари селектив озиқа муҳитларида танлаб олинади ва келгусида ўсимликлар трансформацияси учун қўлланилади.

**ДНК сақловчи вируслар асосидаги ўсимлик векторлари.** Ўсимликларни зарарловчи вирусларнинг фақат 1-2 % игина ДНК сақловчи бўлади. Айнан улар рекомбинант ДНК олиш технологиясида қўллаш учун жуда қулай ва ўсимликларга генларни кўчириб ўтказувчи векторлар учун асосий воситалар ҳисобланади. Бу борада карамгулдошлар оиласига мансуб ўсимликларни зарарлайдиган гулкарамнинг CaMV (cauliflower mosaic virus) мозаика вируси энг истиқболли бўлиб ҳисобланади. Бу вирус қисмлари диаметри 50 нм атрофида бўлиб, 8000 ж.н. узунликдаги ҳалқасимон ДНК тутати. CaMV геномининг катта бўлмаган ҳажми билан худди бактерия плазмидаси сингари вирус ДНК си билан *in vitro* шароитида ишлаш имкони мавжуд ва уни ўсимлик баргига ишқалаш орқали киритиш мумкин.

**Кўчиб юрувчи генетик элементлар (транспозонлар) асосидаги векторлар.** 1990-йилларда ўсимлик хужайралари трансформацияси учун ўзига хос тузилишига эга ва геном бўйлаб транспозиция бўла оладиган ДНК кетма-кетликлардан иборат кўчиб юрувчи генетик элементлар асосидаги векторлардан фойдаланила бошланди. Мазкур усулнинг моҳияти шундаки, кўчиб юрувчи генетик элементлар ўсимлик хромосомасига бирламчи интеграциясидан сўнг қирқиш ва кетма-кет жойланиш йўли билан геном бўйлаб ўрнашиб олади. Ўсимликлар учун Ac/Ds векторлар тизими кенг қўлланилади.

**Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари қуйидагилар:**

Ўсимликларга генларни тўғридан - тўғри кўчириб ўтказиш.

ДНК микроинъекцияси.

Электропорация.

Липосомаларга жойлаштириш.

Биобаллистик трансформациялар усули.

**Ўсимликлар трансформациясининг далиллари.** Ўсимликлар трансформацияси векторлари таркибига функционал гендан ташқари селектив нишон генлари киради. Бу ген одатда антибиотиклар канамицин (*nptII* -гени) ёки гигромицин (*nptII*- гени) га чидамлилик генларини кодирлайди, шунинг учун трансген ўсимликларни дастлабки танлов ишларини тегишли антибиотиклар сақловчи озиқа муҳитларида олиб борилади. Бундай муҳитда геноми таркибида селектив нишон гени бўлган ўсимликларгина

регенерация қила олади. Бироқ селектив муҳитда ўса олиш хусусиятининг ўзи ўсимликнинг трансген табиатини исботловчи ягона далил бўла олмайди.

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

**Ўсимлик геномига бегона генларнинг экспрессияси** Бегона генларнинг ўсимлик геномига экспрессияси натижасида бир қатор муаммолар келиб чиқади. Биринчи марта ўсимликлар трансформацияси учун фойдаланиладиган генлар бактериялардан ажратиб олинган бўлиб, уларни ўсимлик хужайралари трансформацияси учун тўғридан –тўғри ишлатиб бўлмасди.

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

**Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш** Ўтган асрнинг 1970 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) муҳандислик яратилди. Бу усулнинг асосида ужайрадан таш арида рекомбинант ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оибатида генларни соф олда ажратиш, уларни модификация илиш, бирини иккинчисига улаш, “генлар мажмуаси” яратиш, оибатида бутунлай янги хусусиятига эга бўлган о сил синтез илиш имконияти яратилди ва уни о силлар му андислиги деб аталади

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

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

Агар клонлаш ма садида амма генлар са ловчи одам ДНК си ишлатилса, одамнинг ген кутубхонаси (клонотека) осил бўлади.

Бу усулда бактерияларга клонлаштирилган инсон, айвон ёки ўсимликлар генлари тў ридан-тў ри бактерияда фаолият кўрсата олмайди.

Ишлаш учун эса, уларни бактериядан ажратиш, бактерия генини бош арувчиси (регулятори) билан жи озлаш ва айтадан бактерияга киритиш зарур.

Бугунги кунда ар хил генлар са ловчи ва керакли махсулот синтез илувчи бир атор трансген бактериялар яратилган ва муваффа ият билан ишлатилиб келинмо да.

Шу сабабли ам табиий штаммлар ёрдамида олинадиган махсулотлар (биринчи авлод махсулотлари) билан бир аторда трансген штаммлар ёрдамида рекомбинант о силлар (иккинчи авлод махсулотлари)ни саноат ми ёсида ишлаб чи ариш йўлга ўйилган. Биологик махсулотларни учунчи авлоди – табиий о силларнинг вазифаларини тўли бажара оладиган, аммо табиий бўлмаган махсулотларни синтез илиш натижасида пайдо бўлади.

Ген–мухандислиги усуллари (рекомбинант ДНК технологияси) тиббиёт учун зарур бўлган, имматба о о сил моддалари ишлаб чи ариш ёки кўп тонналик о сил моддалари ишлаб чи ариш жараёнларида кенг ўлланиб келинмо да. Энг аввало инсон организмида синтез бўладиган ва доривор модда сифатида ишлатиладиган о сил ва пептидларни синтез илишни йўлга ўйиш катта а амият касб этади.

Ген мухандислиги муаммолари билан шу иланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ам шундай бирикмаларни етарлича синтез ила оладиган бактериялар штаммларини яратишга ба ишланган. Бу жараёни асосий ийинчиликлари, штамм яратиш билан бо ли эмас, балки, яратилган штаммда синтез илинган о сил моддаларини керакли меъёрда ушлаб туриш, уларни модификацияга учраб, микроорганизм ужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ам узвий бо ли дир.

## ТАВСИЯ КИЛИНАДИГАН АХБОРОТ МАНБАЛАРИ

1. Я. Х. Туракулов. Молекуляр биология. Тошкент. 1999, 156.
2. Я.Х.Туракулов. Биокимие. Тошкент. 1989, 256.
3. Уотсон Дж., Курц А., Туз Р. «Рекомбинантные ДНК». Москва. «Мир», 1986, 259.
4. Картель Н.А. «Биоинженерия : методы и возможности». «Ураджай», Минск, 1989, 141.
5. Рис Э., Стернберг М. «Введение в молекулярную биологию. От клеток к атомам» Мир, 2002, 142.
6. Ашмарин И.П. «Молекулярная биология». Изд. ЛГУ, 1977, 343.
7. Глазер В.М., В.В Зинченко, С.В. Каменева, Шестаков С.В. «Большой практикум по генетике микроорганизмов». Изд. Московского университета, 1985, 94.
8. Шербаков В.Г. «Биохимия растительного сырья». Москва «Колос» 1999 г.
9. Глик Б., Пастернак Дж. «Молекулярная биотехнология. Принципы и применение». Мир., 2002, 589.
10. Альбертс Б., Д.Брей, Д.Льюис, М.Рэфф, К. Робертс, Д.Уотсон. «Молекулярная биология клетки». Изд, Мир., 1986, 224.
11. [www.molbio.py](http://www.molbio.py)
12. [www.biotech.py](http://www.biotech.py)