



**O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O'RTA MAXSUS
TA'LIM VAZIRLIGI**

GULISTON DAVLAT UNIVERSITETI

«BIOLOGIYA» KAFEDRASI

“AMALIY MOLEKULYAR ZOOLOGIYA”

**fani bo'yicha
O'QUV-USLUBIY MAJMU'A**

Bilim sohasi: 100000 - Gumanitar soha
Ta'lim sohasi: 110000 - Pedagogika
Mutaxassislik: 70510101 – Biologiya (1-k magistr)

GULISTON–2022

Ushbu o'quv-uslubiy majmua Guliston davlat universiteti Kengashi tomonidan 202_ yil --- avgustda №_ buyruq bilan tasdiqlangan fan dasturi asosida ishlab chiqildi.

O'quv-uslubiy majmuani tuzuvchi:

Z. Maxmudjonov

**Biologiya kafedrası katta o'qituvchisi,
biologiya fanlari bo'yicha
falsafa doktori (PhD)**

Taqrizchi:

A. Pazilov

**Biologiya kafedrası professori,
biologiya fanlari doktori**

Ushbu o'quv-uslubiy majmua Guliston davlat universiteti o'quv metodik Kengashining 202_ йил 29.08 1-sonli majlisida ko'rib chiqilgan va ishlatishga tavsiya etilgan (№1 bayonnoma).

MUNDARIJA

I	O'QUV MATERIALLARI	
I.1.	MA'RUZA MATERIALLARI	
	Ma'ruza 1 Amaliy molekulyar zoologiya faniga kirish.	
	Ma'ruza 2. Hayvonot olami xilma-xilligi o'rganishda molekulyar usullarni qo'llash.	
	Ma'ruza 3. Hayvonlar molekulyar sistematikasini o'rganishda dunyoda va O'zbekistonda bo'yicha olib borilayotgan tadqiqotlar.	
	Ma'ruza 4. Molekulyar-genetik tahlillar uchun zoologik namunalarni yig'ish talablari. Namunalarda morfologik va taksonomik tadqiqotlar.	
	Ma'ruza 5. Zoologik ob'ektlardan genom DNKsini ajratish.	
	Ma'ruza 6. Polimeraza zanjirli rektsiya (PZR) uslubining asosiy tushunchasi. PZR – amplifikatsiya.	
	Ma'ruza 7. Agaroz gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi. Ribosomal va mitoxondrial DNK tozalash	
	Ma'ruza 8. Molekulyar klonlash. Ligirlash reaksiyasi. Komponent xujayralarni tayyorlash va transformatsiya qilish.	
	Ma'ruza 9. Plazmida DNKsi ajratish. Restriksion tahlil.	
	Ma'ruza 10. Sekvenirlash – DNKning birlamchi nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash. Nukleotidlar ketma-ketligi asosida organizmlarni identifikatsiya qilish.	
	Ma'ruza 11. Filogenetik daraxtni tuzish. Nukleotidlar ketma-ketligini ni Genbank (NCBI) bazasiga joylashtirish. DNK – diagnostika (PTsR texnologiyasi).	
	Ma'ruza 12. Parazitlarni ekspress-tashxis qilish (PTsR texnologiyasi).	
I.2.	AMALIY MASHG'ULOTLAR MATERIALLARI	
	Amaliy mashg'ulot 1. Standart fenol-xloroform usuli yordamida umurtqasiz hayvonlar to'qimasi namunasidan genom DNKsini ajratish.	
	Amaliy mashg'ulot 2. Polimeraza zanjirli reaksiya (PZR) - amplifikatsiya o'tkazish.	
	Amaliy mashg'ulot 3. Agaroz gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o'tkazish. Agaroz gelidan DNK ajratish va tozalash.	
	Amaliy mashg'ulot 4. Ligirlash reaksiyasini o'tkazish.	
	Amaliy mashg'ulot 5. Plazmida DNKsi ajratish. Restriksion tahlil.	
	Amaliy mashg'ulot 6. Sekvenirlash reaksiyasi. PZR-amplifikatsiya reaksiyasidagi asimmetrik fragmentlarni tozalash.	
	Amaliy mashg'ulot 7 Turlar xilma-xilligi. Jumboqli turlar.	
	Amaliy mashg'ulot 8. Bioxilma-xilikni o'rganishda molekulyar-genetik usullarning qo'llanilishi. Molekulyar markerlar.	
	Amaliy mashg'ulot 9. Kommertsiyali reagent to'plamlari yordamida umurtqasizlar to'qimasi namunasidan genom DNKsini ajratish.	

	Amaliy mashg'ulot 10. <i>Escheria coli</i> komponent xujayralarini tayyorlash talablari.	
	Amaliy mashg'ulot 11. <i>E.coli</i> xujayrasini genetik transformatsiyasini o'tkazish.	
	Amaliy mashg'ulot 12. Blastn programmasi yordamida ko'plab tekislash ishlarini olib borish.	
	Amaliy mashg'ulot 13. Nukleotid ketma-ketliklarni tuzish. Turli kompyuter dasturlari yordamida nukleotidlar ketma-ketligini ko'p marotabali to'g'irlash.	
	Amaliy mashg'ulot 14. Filogenetik daraxtni tuzish. MEGA-8 dasturidan foydalanish.	
	Amaliy mashg'ulot 15. <i>Macrochlamus turanica</i> va <i>Zonitoides nitidus</i> turlarining tashqi va ichki tuzilishi	
II.	MUSTAQIL TA'LIM MASHG'ULOTLARI	
III.	GLOSSARIY	
IV.	ILOVALAR	
	Namunaviy fan dasturi	
	Ishchi fan dasturi	
	Tarqatma materiallar	
	Testlar	
	Baholash mezonlari	
	O'UM ning elektron varianti	

NAZARIY MASHG'ULOT MATERIALLARI

I.1. MA'RUZA MATERIALLARI

1-mavzu: AMALIY MOLEKULAR ZOLOGIYA FANIGA KIRISH

REJA:

“Amaliy molekular zoologiya” fanining predmeti, maqsadi, vazifalari. Amaliy molekular zoologiya fanining boshqa fanlar bilan aloqasi va ahamiyati. «Bioxilma-xillik» tushunchasi. Biologik turlar. Baxsli turlar. Turlar ichidagi polimorfizm. Bioxilma-xillikni saqlashda interaktiv kataloglar va ma'lumotlar bazasi.

Tayanch iboralari: *Bioxilma-xillik, populyatsiya, tur, jumboqli turlar, polimorfizm, DNK-shtrix kodlash, genosistematika, filogenetika, DNK, PTsR.*

1.1. “Amaliy molekular zoologiya” faniga kirish

Molekular genetikaning rivojlanishi biotexnologiyaning taraqqiyoti uchun katta turtki bo'lib xizmat qildi. Ushbu yo'nalishning negizida yangi mahsulotni yaratish yoki avvaldan ma'lum bo'lgan mahsulotni genetik materialni ko'chirib o'tkazish yo'li bilan olish masalasi yotadi. Hozirgi davrda biotexnologiya turli biologik faol moddalarni sanoat asosida ishlab chiqarilishida keng qo'llanilmoqda (Venter et al., 2001; Glik, Pasternak, 2002 va boshq.).

Molekular zoologiya - zoologiya fanining yangi yo'nalishi bo'lib, evolyutsiyaning o'rganishning katta imkoniyatlarini beradi. U bir butun revolyutsiyaga sabab bo'ldiki, oldin tadqiq etilgan turlar o'rtasidagi qarindoshlik aloqalarini qayta ko'rib chiqishni talab qilmoqda. DNK rasshifrovkasi qarindoshlik darajalarini bizga ko'rsatdi. Ta'kidlash joizki, molekular genetik organizmlarning evolyutsiyasi va irsiyat mexanizmlari to'g'risidagi tasavvurlarni chuqurlashtirib, pirovardida filogenetika va gen sistematikasiga asos soldi. Gen va genomlarni solishtirish natijasida hayvon, o'simlik va mikroorganizmlarning genetik qarindoshligi haqida xulosa qilinadi. Solishtirayotgan genlarning nukleotid ketma-ketligi qanchalik farq qilsa, shunchalik organizmlar genetik qarindoshligi jihatdan bir-biridan uzoq bo'ladi.

Gen sistematikasi hali sistematik statusi oxirigacha o'rnatilmagan taksonlar xususida bahsli savollarni echishda alohida ahamiyat kasb etdi. Tadqiqotchilar morfologik tahlilning an'anaviy usullaridan foydalanib, organizmning taksonomik holatini baholab beraolmaganlarida bu muammoga tez-tez to'qnash kelishmoqda. Barcha morfologik belgilar DNK ketma-ketligida belgilanganligini e'tiborga olgan holda sistematika uchun genetik materialdan foydalanish evolyutsiya jarayonlarini yanada chuqurroq tushunish imkonini beradi va uning asosida sistematik joylanish haqida xulosa qilinadi. Shuningdek, DNK orqali jinsiy voyaga etmagan organizmlar, lichinkalar, o'simtalar, gulsiz yoki mevasiz o'simliklar, ya'ni organizmni har qanday bosqichida identifikatsiya qilish mumkin.

Hozirgi vaqtda turli guruh organizmlarda molekulyar biologiya sohasiga (genomika) bag'ishlangan ilmiy tadqiqot ishlar soni adabiyotlarda tobora kengayib bormoqda.

Hayvonlar va o'simliklar turlarni aniqlashda morfologiya, fiziologiya, bioximiya, tsitologiya, etologiya, ekologiya, geografiya va genetika kriteriyalari mavjud. Bular ichida morfologiya kriteriyasi birinchi va uzoq vaqt yagona kriteriy sifatida e'tirof etilib kelingan. Morfologik kriteriy hozir ham o'simliklar va hayvonlar sistematikasida keng foydalanilmoqda. Lekin ba'zan bir biriga yaqin bo'lgan turlar yoki "polimorf"larni aniqlashda morfologik usul ham yordam bermayotir. Keyingi yillarda bioximik va genetik tadqiqotlarni yuksak darajada rivojlanishi va yangi tekshirish usullarni kirib kelishi, molekulyar taksonomiya yo'nalishini ochib berdi.

Bu sohadagi ishlarning ulkan yutuqlarga erishishi va kuchaytirilishiga qaramasdan, hozirgi vaqtda bioxilma-xillikni o'rganish holati darajasi qiyin ahvoldadir. Hozirgi davrda 1,9 mln yaqin tirik organizmlar mavjud bo'lib, keyingi 250 yil ichida ularning katta qismiga tavsif berilgan. Turli tadqiqotchilarning fikriga ko'ra, hozirgi paytda ko'pi yoki kami bilan faqatgina umurtqali hayvonlarning (90 % yaqin) va yuksak o'simliklarning (85% yaqini) turlariga tavsif berilgan. Bug'imoyoqlilarning 25 % yaqin turlari talqin qilingan (shu jumladan 10 % hasharotlar), 5 % qo'ziqorin va diatom suv o'tlari va b.q. (Shneer, 2007).

Inson xo'jalik faoliyati natijasida turlar xilma-xilligi tez va fojiali kamayishiga olib kelmoqda-ki, agarda biz turlarni faqatgina klassik morfologik usullar orqali tadqiqot ishlari olib boradigan bo'lsak, katta ehtimollik mavjudki-ki, biz ular ustida tadqiqot olib borish, xatto ko'p qismini aniqlash imkoniga ega bo'lmay qolamiz. Hozirgi davrda dunyoda 15000 yaqin taksonomist-morfolog tadqiqotchilar bor. Hozirda er yuzida ko'plab turlar mavjud bo'lib, qaysiki ularni aniqlash uchun dunyoda 1-2 mutaxasistlar to'g'ri keladi. Hisob-kitoblarga qaraganda, agarda yangi turlarni aniqlashni jadallashtirish sharoitini 30 marotabaga ko'paytirsak, mavjud bo'lgan bioxilma-xilikni tavsif etish uchun 25 yil kerak bo'lar ekan (Woodruff, 2001).

2000 yillar boshida taksonomik ma'lumotlarni keng va to'liq foydalanishni ta'minlash maqsadida interaktiv kataloglar (Catalog of Life) tuzish takliflarni paydo bo'la boshladi (Bisby, 2000; Godfray, 2002). Bu vaqtda bir guruh tadqiqotchilar, paydo bo'lgan muammolarni samarali echishda DNK-sistematika yordam beradi deyishdi (Tautz, 2002, 2003). Bunday taklifning paydo bo'lishiga sabab sekenirlash texnologiyasida revolyutsion (Senger-sekvenirlash texnologiyasi) o'zgarishlari bo'ldi. Alohida DNK fragmentlarni, o'rtacha uzunlikdagi 1000 j.n. sekvenirlash bemalol va etarlicha arzon usul bo'lib qoldi. Molekulyar-genetik usullardan foydalanib, bioxilma-xilik va sistematika muammolarni tavsif etish xaddan tashqari qiziqarli bo'lib qolmoqda. Biroq, shakshubhasiz, faqatgina molekulyar-genetik usullardan foydalanishda sistematiklar bilan hamkorlikda bo'lmasdan, mavjud turni aniq ba'holash mumkin, lekin ularni tavsiflash borasida yordam bera olmaydi. Hozirgi paytdagi bu mavjud nuqtai-nazar asosidagi bu holat shundan iboratki, bioxilma-xillikni o'rganish aniq

guruhlarning mutaxasistlariga tayangan holda hamda molekulyar-genetik usullar asosida amalga oshirish lozimdir (Shneer, 2007). Bunday qarashlarning afzalligi shubhasiz shundaki, alohida olingan ketma-ketliklarning DNK-markerlari u yoki bu turlar vakillarini mutaxasist tomondan mazkur turning dastlabki aniq identifikatsiyasi qilinmaganligi kam ma'lumotlidir (bunday usuldagi bioxilma-xillik keng tarqalgan), lekin faqatgina morfologik usullarni qo'llash ham, bioxilma-xilikni hali aniqlanmagan qismini ochib berolmaydi.

2003 yili “**DNK-shtrix kod**” usuli yoki molekulyar “**barkodlash**”ni taklif etishdi. Bu usulning zamirida shunday faraz mavjudki, qaysiki genom sohasining uncha katta bo'lmagan razmeri topildi (600-800 nukleotidlar), shunday qilib, bitta tur individlari yoki turli xil turlar ketma-ketligi uzunligi bir xil bo'ladi. Shunday sohani DNK-shtrixkod (barcode) deb atashdi. Ob'ekt DNKsining bu sohasi ketma-ketligi ma'lum bo'lgach, uni ma'lumotlar bazasi (IBOL) bilan solishtiriladi, qaysiki ob'ektning bu ketma-ketligi boshqa barcha turlar solishtiriladi va o'rganilayotgan tur tezda aniqlanadi. Agarda ketma-ketlik bazadagi mavjud biror bir to'g'ri kelmasa, demak bu yangi tur, ya'ni noma'lum tur topilganidan darak beradi. Hayvonlarning shunday sohasi o'rganish maqsadida mitoxondrial genning fragmentlari, ya'ni tsitoxromoksidazaning kodlovchi 1 subbirligi (SO1) tanlandi. Bu usul hozirgi vaqtda juda keng tarqaldi, ma'lumotlar bazasi (IBOL) doim yangi ketma-ketliklari bilan to'ldirilmoqda.

Biroq bu usulda ham bir necha kamchiliklar mavjud. Birinchidan, tabiiy, mitoxondrial genlar fragmentlari bo'yicha turlar mansubligini aniqlashga nisbatan e'tirofli. Bu holatda mitoxondrial *introgressiya* (introgression- introgressiya - turlar o'rtasidagi gibridlanish natijasida boshqa turni genni olishi) bilan to'qnashish kelishni mumkin, psevdogenlar mavjudligi va boshqalarni hisobga olish kerak. Bundan tashqari, faqat mitoxondrial DNK ketma-ketligi bilan yadro DNKsi polimorfizmini baholay olmasligi mumkin, bu hali aniqlanmagan bioxilma-xilikni baholashda juda muhimdir. Shunday bo'lsada, bu usul har doimgiday hozirda bioxilma-xilikni o'rganishda asosiy molekulyar-genetik usul bo'lib hizmat qilmoqda.

Sistematika va filogeniyada molekulyar-biologik belgilarning qo'llanilishi o'tgan asrning 70-yillarida tug'ildi. Bu vaqtda sistematik tuzilishlar uchun eukariotlarning nukleotidlar ketma-ketligining 18S, 5,8S yoki 28S rDNK genlari universal marker sifatida tanlanishi, yuqorida aytilgandek, sekvenirlash usulining takomillashuvi va materillarni qisqa muddatda olish va qayta ishlash imkonini berdi. Genomda ribosomal ketma-ketliklar ko'plab nusxalarda bor bo'lishi va bir necha qismlardan tuziladi, kaysiki ulardan biri, ribosoma funktsional subbirligiga tegishli (18S, 5,8S yoki 28S) bo'lib, asosan stabildir, ya'ni *evolyutsion konservativdir*, bu holda, ITS1 va ITS2 ichki spayser ketma-ketligi, qarama-qarshi o'laroq, evolyutsion o'zgaruvchandir (*labilniy*). Konservativ sohalar polimer zanjirli reaksiyalar birinchi bosqichda - praymerlarni tadqiq qilinayotgan DNK- matritsaga ulanishida, variabel sohalar esa, turlarni identifikatsiyalashda hizmat qiladi. Turga xos variabel sohalarning o'xshashlik darajasi turli xil turlarning evolyutsion qarindoshligini ifodalaydi. Ribosomal genning aynan bu muhim xususiyati ular qismlaridan turli darajadagi taksonomik

muammolarni echishda foylaniladi (Blaxter, 1998; Nadler et al., 2000; Nguyen et al., 2001). Birinchi bo'lib, molekulyar ma'lumotlar asosidagi klassifikatsiya tizimi Nematoda sinfida bo'lib, bundan 15 yil oldin paydo bo'ldi (Blaxter et al., 1998). Bu ma'lumotlar o'sha davrda SSU 18S rDNA sohasi bo'yicha olingan bo'lib, bu klassik sistemadan butunlay farq qiladi.

Sistematika va filogeniya o'zining tuzilishini «**ribosomal**» va «**oqilli**» daraxtlar tuzish uchun yangi ulkan usulga ega bo'ldi, sekvenirlash esa oddiygina laborant ishi bo'lib qolmoqda. (*Bu xali bizda emas*). Shuni aytish mumkin-ki, biologiyada yangi paradigma shakllandi – organik olamningda barcha shakllarida DNK turli-tuman ko'rinishlari bor.

Biroq, taklif etilgan molekulyar filogenetik daraxtlarda nomuvofiqliklar paydo bo'ldi. Gohida bu tuzilishning farqi nafaqat sikvensning texnik takomillashmaganligi emas, balki bitta laboratoriyada olingan ma'lumotlarda ham kuzatildi. Buning sabablari o'rganilmoqda va tahlil qilinmoqda. Hammasi ochiq oydin ma'lum bo'layaptiki, sistematika va filogenetikaning sermahsul rivoji, morfologik, fiziologik va molekulyar ma'lumotlari bilan birgalikda – organizmlarning sistematikasi va filogenetikasining sintetik tizimini ishlab chiqishdir. Shunday qarashlar yuz yillikning 90 yillardan boshlab aktiv ishlanmoqda (Patterson, 1994; Margulis i dr., 1996).

Filogenetik rekonstruktsiyalarni yuqori taksonomik darajada bajarish uchun boshqa genlar yoki yadro DNKsi sohalari, masalan, elongatsiya omili (elongation factor, Ef-la), oqsil issiqlik stresi genlari, miozinlar, gistonlar foydalaniladi. Shu bilan birga oqsillarning aminokislotalar ketma-ketligi va RNKning ikkilamchi tizimlari ham taqoslanadi. Oila va avlodlar darajasida esa mitoxondrial genlar tahlil qilinadi.

Shunday qilib, har qanday yirik taksonlarning taksonomik muammolarni echishda “molekulyar” usullarni to'laqonli qo'llashda shu guruhga ichiga kiruvchi turlar, avlodlar va x.k. masshtabli nukleotidlar farqini o'rganish hamda bu farqlarda aniqlangan tadqiqot omillari, shu jumladan o'rganilayotgan populyatsiyalar (“geografik” omil) o'zaro uzoqligini ta'sirini o'rganishni talab qiladi.

Ushbu majmuada eukariot organizmlarni 18S, 5,8S va 28S ribosoma DNK kodlovchi genlari bo'yicha identifikatsiya qilishda qo'llaniladigan qulay markerlarni ishlatish oddiy va tushunarli shaklda tavsiflagan. Hamma bosqichlar – material yig'ishga oid talablar, DNK ajratish va PTsR-amplifikatsiya hamda filogenetik daraxt tuzish aniq va ketma-ket bayon etilgan.

Bu qo'llanma “Amaliy molekulyar zoologiya”ni o'rganuvchilarga mo'ljallangan bo'lib, molekulyar-genetik ma'lumotlarni asosida hayvonlar sistematikasi, taksonomiyasi va filogeniyasini, morfologik va fiziologik ma'lumotlar bilan birga keng qo'llash imkonini berishga hizmat qiladi.

Bioxilma-xillik tushunchasini aniqlash

Bioxilma-xillikni o'rganish biologiyaning asosiy vazifalaridan biri hisoblanadi. Ammo, birinchi navbatda "Biologik xilma-xillik" tushunchasiga nimalar kirishini aniqlash zarur. Zamonaviy kontseptsiyaga ko'ra, organizmlar bioxilma-xilliligini barcha muhitlardagi tirik organizmlar, quruqlik, dengiz va

boshqa suv ekotizimlardagi ekologik komplekslar: tur ichida, turlar va ekotizimlar o'rtasida xilma-xillik tashkil qiladi. (*Rio-de-Janeyro, 3-14 iyun 1992 yil, Birlashgan Millatlar Tashkilotining atrof-muhit va rivojlanish konferentsiyasida qabul qilingan biologik xilma-xillik to'g'risidagi Konventsiya*).

Bunga ko'ra biologik xilma-xillik uch tipga bo'linadi:

- ekotizimlar va landshaftlar (yashash joyining xilma-xilligi);
- turlar xilma-xilligi;
- genofond (genetik xilma-xillik).

Genetik xilma-xillik yoki genetik polimorfizm – populyatsiyalarning belgilar yoki tabiatning genetik markerlari xilma-xilligi [Ramel, 1998]. Genetik xilma-xillik tur yoki populyatsiya guruhlari, populyatsiyalarning genetik xususiyatlari muhim tarkibiy qismi hisoblanadi. Genetik xilma-xillik genetik markerlarni tanlashga, bir qancha o'zgaruvchan parametrlarda ifodalanadi [Leffler, 2012]:

1. Virtual geterozigotali - π , ya'ni, populyatsiyada ikki tasodifiy tanlangan genotipli nofunktsional nukleotid sayt o'rtasidagi farq nisbati.

2. Lokusdagi allellar soni.

3. Genetik masofa (populyatsiyalar o'rtasidagi genetik xilma-xillikni baholash).

Biz bioxilma-xillikni faqat ikki turdagi ya'ni turlar xilma-xilligi va populyatsiyaning genetik polimorfizmini molekulyar-genetik metodlardan foydalanib o'rganamiz.

Turlar xilma-xilligi. Jumboqli turlar

Ko'p hollarda faqat morfologik mezonlar yordamida turlar tarkibini o'rganish qiyin yoki "baxsli, mujmal turlar"ni ajratish hatto imkonsiz [Bickford, 2006]. Bu holda albatta molekulyar genetik metodlarni qo'llash kerak.

Jumboqli (mujmal) deb nomlangan turlar, ikki yoki undan ortiq tur bir tur sifatida tasvirlangan (bir nomga ega) va eng kamida tashqi morfologik farqlar kuzatiladi [Bickford, 2007]. Birinchi, bu turlar molekulyar-genetik usullardan ancha avval Linney klasifikatsiyasi qabul qilingan paytda kashf etilgan.

Jumboqli turlar, shuningdek, o'xshash turlar yoki egizak turlar ham deyiladi. Birinchi marta "egizak-turlar" atamasini [Mayer, 1963] kiritgan. "Jumboqli turlari" termini keyinchalik paydo bo'ldi [Henry, 1985], ammo ko'proq to'g'riroq deb hisoblandi, ba'zi mualliflar "egizak-turlar" atamasini faqat qiz turlar uchun, qaysiki umumiy bir shoxdan rivojlangan turlarga xos deb hisoblashdi. Bir qancha, jumboqli turlar xaqiqatdan ham qiz turlarga mos keladi, bu xollarda sinonim hisoblash mumkin, ammo ko'p mualliflar hammasini "jumboqli turlar" deb atashmoqda [Knowlton, 1986]. Bundan tashqari, bir qancha mualliflar "jumboqli turlar" va "pseudomujmal turlar" tushunchalariga ajratgan. Aniqlangan morfologik belgilarga qarab ajratish bilan birga mujmal turlar molekulyar-genetik metodlar yordamida ajratiladi. Bu holda turlar "pseudokriptik" turlar deb ataladi [Saez, 2003].

Simpatrik jumboqli turlar. So'nggi uch o'n yilliklarda molekulyar genetik usullar yordamida pseudokriptik va jumboqli turlarning soni DNK-ketliklar tahlil asosida aniqlandi [Carr, 2010]. Bu usullar PZR (polimeraza zanjirli reaksiya) asosida amplifikatsiya metodlari va rivojlanishi hamda muhim ko'paytirish

usullariga asoslangan texnologiyalar asosida amalga oshiriladi. Biz tur asosi har doim morfologik o'zgarishlar bilan birga emas va bu holatda, turlarning haqiqiy soni ham muhim sanaladi, bu faqat morfologik kuzatishlar asosida izohlanadi. Biroq, ba'zan genetik usullardan foydalanish tasvirlangan turlarning sonini oshirish uchun emas balki kamaytirishi mumkin.

Bir qancha turlar muhim morfologik xilma-xillikka ega va ba'zi hollarda ko'p sonli sistematiklar morfologik, rang o'zgarishi [Knowlton, 1987]. Genetik tahlil bir necha turli taksonlar kenja turlar va turlar orasida asossiz genetik izolyatsiya yo'qligini ko'rsatadi, bu esa chalg'ituvchi bo'lishi mumkin [Nygren, 2011]. Ba'zi sut emizuvchilarni o'rganish tarixida bir qancha turlar alohida bir nechta turlarga ajratilgan va yana taftish qilish natijasida bir necha morfologik tiplar keyin bir tur ekanligi kuzatilgan [Linnaeus, 1746, 1758; Agassiz, 1862; Haeckel, 1879; Mayer, 1910; Kramp, 1961]. Bu jumboqli simpatrik turlar bioxilma-xillikni hisobini olishda muhim, populyatsiya tuzilishi va dinamikasini o'rganish, shuningdek, jamoalar ekologiyasini o'rganish uchun juda muhim ekanligini aytish lozim [De Leon, 2010]. Ko'plab populyatsiya dinamikasi (ayniqsa, dengiz) jamoalari hali yaxshi o'rganilmagan va buni sabablaridan biri mujmal turlari soni ko'pligidir [Eckert, 2003]. Biroq, turlarning morfologik ma'lumotlari va biologik ma'lumotlari bir qancha savollar tug'diradi, turlari orasidagi genetik masofalar va qaysiki tur ichidagi genetik polimorfizmga mos keladi. Turning biologik kontseptsiyasi alohida tur sifatida tanlash uchun asosiy mezon ko'ra bir tur doirasida organizmlar bir-biri bilan erkin va ko'payishda izolyatsiyalanmagan xolda ko'payishadi [Mayr, 1970]. Simpatrik jumboqli turlar orasida molekulyar-genetik xilma-xillik borligi ular o'rtasida chatishish yo'qligi murakkab turlarning mavjudligi isbotidir.

Allopatrik turlar va kosmopolit turlar. Geografik ajralgan turlar, geografik izolyatsiyalangan turlarni o'zaro chatishtirish imkoni yo'q, bu esa allopatrik turlarni izohlashga qat'iy dalil bo'la olmaydi. Ayrim mualliflar allopatrik guruhlar o'rtasida divergentsiyani nazorat qilishda 3-5% nukleotidlarning almashinishi mumkin deb hisoblaydi. Ko'pchilik mualliflarning fikriga ko'ra yadro genomining 5%gacha kam yoki ko'p farq qilishi ikki sinonim turlarning chatishishida kam xatolikni keltirib chiqaradi. Ayrim mualliflarning fikricha, bu savolga javob topishda turli takson qiz turlari orasida ko'payish bo'yicha izolyatsiyalangan turlarning divergentsiyasi natijasidir. Biroq, polimorfizm darajasi genom darajasida nafaqat yuqori taksonlar, balki yaqin turlar o'rtasida ham, shu takson darajasida ham o'zgaradi. Ko'payish bo'yicha izolyatsiyalanish va ma'lum genetik masofada joylashishi ishonchli bog'liqlik katta genetik masofa deb belgilangan (bu turlarning paydo bo'lish vaqti) bu esa ular o'rtasidagi ko'payish vaqtini belgilaydi [Coyne, Orr, 1989, 1997; Sasa, Chippindale, Johnson, 1998; Presgraves, 2002; Mendelson, 2003]. Hayvonlarda reproduktiv to'siq *Drosophila* avlodi vakillari orasidagi simpatrik turlar orasida divergentsiya darajasi kamroq allopatrik va ko'payishdan keyin ko'payishdan olingi alohidalanishga nisbatan tezroq sodir bo'ladi (pushtsiz yoki steril duragaylarda [Coyne, Orr, 1989, 1997; Howard, 1993; Butlin, 1995; Hostert, 1997] paydo bo'ladi. Bu bepustlik gibrid turlar o'rtasidagi zararli epistatik ta'sirlar izchil asta-sekin to'planishi natijasida

rivojlanadi, bu “turlar xilma-xilligi soati” deb ham ataladi [Coyne, Orr, 1989, 1997; Sasaet, 1998; Orr, Turelli, 2001].

Dengiz umurtqasizlaridan polixetlar sinfining geografik tarqalishi va turlar tarkibi yaxshi misol bo'ladi. Hozirgi vaqtda polixetlarning 10000 dan ortiq turi ma'lum bo'lib guruh xamma joyda tarqalgan va ular dengiz ekosistemasining muhim komponentlaridan hisoblanadi, ularning geografik tarqalishi deyarli o'rganilmagan. Polixetlarning kattagina qismi kosmopolit turlardir. An'anaviy sistematik yondashuvga asosan bir tur morfologik jihatdan farq qilmaydigan turlardan hosil bo'ladi. Hozirgi zamonda polixetlarning biogeografiyasiga doir ilmiy ishlar ko'payib bormoqda. Hozirgi kunda “keng tarqalgan” ko'ptukli chuvalchanglarning turlarini asoslashda klassik taksonomiya usulari kosmopolitizm xodisasini asoslashga etarli bo'lmay qoldi. Ko'p xollarda yuqorida aytilganidek, reproduktiv alohidalanishga qat'iy dalillar topilmadi, ammo, keng qamrovli tahlillar shuni ko'rsatmoqda-ki ham genetik, ham morfologik farqlar bilan birga turlarning ekologik farqlari mavjud. Masalan, *Owenia fusiformis* Delle Chiaje, 1844 (Oweniidae), *Sternaspis scutata* Ranzani, 1817 (Sternaspidae) va *Scoloplos armiger* (Muller, 1776) (Orbiniidae) turlari xamma okeanlarda, xar xil chuqurliklarda va amalda turli xil xaroratlarda uchrashi aniqlangan. Ammo, ohirgi ma'lumotlarga asosan *O. fusiformis* kompleks turlar deb topilmoqda. Hozirgi kundagi to'laqonli tadqiqotlardan RAPD usuli yordamida aniq nukleotidlar ketma-ketligi solishtirilmagan. Uning yordamida aniqlanishicha *Neopetitia (Petitia) amphophthalma* Siewing, 1956 (Syllidae) ular kosmopolit turlar emas balki *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) ning alohida amfianlantik tarqalgan kompleks turlar vakilidir. Keyinchalik yadro va mitoxondriya markerlardan foydalanib tadqiqotlar olib borish yo'lga qo'yildi. *S.armiger* (Orbiniidae) turi V. Bleydorn [Bleidorn, 2006] hammuallifligida o'rganilgan kosmopolit turdir. Yuqorida aytib o'tilganidek, bu turlarning vakillari hamma joylarda, ham litoral, ham suvning chuqur qismlarida uchraydi. Shimoliy muz okeani xududida bu tur polixetlarning keng tarqalgan turi hisoblanadi. Yadro va mitoxondriyali markerlar yordamida olib borilgan tadqiqotlardan ma'lumki *S.armiger* kosmopolit tur hisoblanmaydi, o'zi kompleks tur sanaladi. Tinch okeanida esa ikkita *S.armiger* turlari va ikki yoki uch turi Atlantika okeanida aniqlangan. Yana bir yorqin misol, Nigrenning molekulyar-genetik tadqiqotlari hisoblanadi. Tsirkumboreal va transarktika turlar va ularning morfologik farqlari katta qiziqish uyg'otadi. O'tgan asrning boshlanishi va o'rtalarida bir qancha ninaterililar turlari (dengiz yulduzlari va dengiz tipratikonlari) morfologik belgilariga asosan transarktika va tsirkumboral tarqalishi haqida ilmiy ishlar chop etilgan.

Keyinchalik ayrim asosiy taksonlar qarindosh-turlar hisoblangan. Kompleks dengiz yulduzlarining *Leptasteria* avlodi arktika va subarktika turlar o'rganilishi natijasida o'ziga Arktika va Shimoliy Atlantikaning markaziy Kaliforniyadan to Alyaskagacha bo'lgan xududda tarqalgan 60 turni birlashtirishi ma'lum bo'ldi. Alyaska xududidagi kompleks turlar dastlabki urinishlarda dengiz yulduzlarining allazim variatsiyasi sifatida o'rganilgan, hozirgi vaqtda esa keng qamrovli tadqiqotlar, Arktika va Antartikaning ko'plab nuqtalaridan tekshirishlar uchun

to'plangan materiallar ko'p sonli genlar aniqlangan.

Molekulyar metodlar ushbu guruhlarni ajratish uchun asosiy manba bo'lib xizmat qildi. Shu kabi ishlar ko'plab olib borilmoqda. Jumboqli turlarning kompleksini tadqiq qilish juda qiyin. Ammo, bu kabi ishlar o'rganilmagan bioxilma-xillikni tadqiq qilishda katta ahamiyatga ega bioxilma-xillikni tadqiq qilishda mujmal turlar yoki tur ichidagi polimorfizmni o'rganish juda muhim sanaladi.

Jumboqli turlar paydo bo'lishi. Molekulyar-genetik ma'lumotlar jumboqli (mujmal) turlarni chuqur suvlardagi mollyuskalardan to chuchuk suv baliqlarigacha va tropik kapalaklardan to arktika o'simliklarigacha alohida turlarni guruhlarga ajratishda genetik differentsiatsiya qilishda morfologik va geografik ma'lumotlarni to'ldirishda, ekologik yoki xulqiy farqlarni to'ldirishda muhim sanalanadi. ISI Web of Science (<http://G'G'scientific.thomson.com/G'products/G'wos/G'>) va Zoological Record Plus (<http://G'G'www.csa.com/G'factsheets/G'zooclust-set-c.php>) bazalaridagi ma'lumotlarni o'rganish natijasida "jumboqli turlar" va "egizak turlar"ga doir oxirgi 50 yilda 3500 dan ortiq maqolalar mavjud. Bunday katta yashirin genetik xilma-xillik jumboqli turlar soni bilan yashash muhit o'rtasida bog'liqlik bor yo'qligi xaqida savol tug'ilishiga sabab bo'ladi. Jumboqli turlarga bag'ishlangan maqolalarni sanasak ko'pchilik tadqiqot ishlar u yoki bu guruh hayvonlar bilan bog'liq. Kam sonli maqolalar yuksak o'simliklar va mikroorganizmlarning jumboqli turlariga bag'ishlangan. Shundan kelib chiqqan xolda olimlarning u yoki bu guruhlarning jumboqli turlarini o'rganishi natijasida yakdil bir xulosaga kelishi qiyin. Ko'pchilik pashshalarning kosmopolit turlari turli xil kontinentlarda tarqalgan (jumboqli turlar soni nisbatan kamroq), ammo, ko'pchilik mollyuskalar bilan shug'ullanuvchi mutaxassislar (xavaskorlar chiroyli chig'anoqlarini terishadi) fikricha mollyuskalarning tarqalishi morfologik xilma xillikka bog'liq ("parchalangan" turlar). Tropik va o'lik xududlardan aniqlangan jumboqli turlarni soni sanashda bir qancha muammolarni keltirib chiqaradi. Ma'lumki ikki, uch yoritilgan turlar tropik mintaqalardan topilgan, ammo jumboqli turlarning yarmi o'lik xududlardan aniqlangan. Bu esa jumboqli turlarning paydo bo'lish qonuniyatini yoritishda o'lik xududlardani topilgan turlar ko'pchilik tadqiqotchilar tomonidan aniqlanganligi bilan izohlanadi [Carroll, 2004].

Jumboqli turlarning paydo bo'lishi birinchi navbatda organizmni aniqlashda morfologik belgilariga asoslanadi. Yuqorida ta'kidlanganidek turlar xilma-xilligi xar doim xam morfologik o'zgarishlar bilan birga bo'ladi [Templeton, 1981].

Tur ichidagi genetik polimorfizm

Tur ichidagi va populyatsiyalar ichidagi polimorfizm juda ko'p savollarni keltirib chiqaradi. Tabiiy populyatsiyalardagi genetik xilma-xillikni saqlanishining qanday mexanizmi mavjud? Populyatsiya ichidagi polimorfizmlik darajasi uning soni bilan bog'liq-mi? Genetik xilma-xillikni past darajasi qanchalik o'zgaruvchan sharoitda moslashishi imkoniyatini kamaytiradi? Bu savollar zamonaviy populyatsion genetikaning rivojlanishiga turtki bo'ldi va evolyutsion genetika va qiyosiy genomikaning molekulyar-evolyutsiia-nol-gipotezasining neytral

nazariyasini rivojlanishi imkonini berdi [Kimura, 1968; Kreitman, 1996; Fay, 2003]. Bu savolning tushunish uchun bundan 50 yil oldingi allozim tadqiqotlarida o'zgarishlar yuz berdi [Crow, 2008; Lewontin, 1974].

Hozirgi vaqtda sevenirlash texnologiyasining revolyutsiyasi natijasida bu kabi savollarga tegishli ma'lumotlarni sistemalash ishlari qilinmoqda. Shunday qilib, turli eukariot taksonlari vakillarning nukleotidlarining o'zgaruvchanligini uchta lokusini qiyoslash oraqali ish qilindi [Leffler, 2012]. Bunda taqqoslash uchun faqat o'zgargan sinonim saytlaridan foydalanildi. Shuni aytish kerak-ki, o'zgargan sinonim saytlar neytral bo'lmasligi ham mumkin, o'zgargan sinonimlar RNK stabiligiga va splaysingga ta'siri kabi ma'lumotlar mavjud [Chamary, 2006].

2003 yili Hebert [Hebert, 2003a,b] o'z maqolasini e'lon qildi, unda DNK-shtrixkodni asoslaydi va bu dasturni rivojlantirishni taklif etadi. Bungacha molekulyar-filogenetik tadqiqotlariga bag'ishlagan ko'pgina maqolalar e'lon qilingan va bitta va shu genetik markerdan foydalanib, hayvonlarni yaqin turlarini taqqoslash orqali yagona tizim yaratish edi.

Trioxstrongilid nematodalarining polimorfizm gipotezasi.

Trichostrongyloidea Cram, 1927 katta oilasi – Nematoda sinfining keng tarqalgan taksonlari biri hisoblanadi. Uning vakillari keng doiradagi xo'jayinlarda parazitlik qilib, dunyoning deyarli barcha mamlakatlarida qayd qilingan. Bu katta oilani yirik vakili Trichostrongylidae Leiper, 1912 oilasi bo'lib, ularning ichida turlar tarkibi va tarqalish kengligi bo'yicha birinchilardan biri Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 kenja avlodi hisoblanadi.

Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 kenja oilasiga mansub ba'zi bir turlarning erkak zotlari (ko'p holatlarda ikkita) morfologik shakllariga ko'ra o'zaro farqlanishga egaligi tahmin qilinadi (Drozd, 1995). Bu gipotezaga asos bo'lgan holat – ba'zi erkak zotlar boshqa turga mansub erkak zotlari bilan birga uchratishi kuzatildi. Juftlikdagi bu morfaldan (shakllar) biri dominant holatda bo'lib, individlari miqdoriga ko'ra dominant holatda bo'ladi (major), ikkinchisi esa kam, ya'ni minor deb ataladi. Major va minor morflardan iborat erkak individlarni an'anaviy tarzda tasniflashda ularning spikulasi va jinsiy konussimon sohasi bo'yicha farqlanishlarga ko'ra, turli xil avlodlarga kirishi aniqlanadi.

Dastlab, Ostertagiinae kenja oilasida *Ostertagia*, *Orloffia*, *Teladorsagia*, *Marshallagia* va *Spiculopteragia* avlodlarining morfalarini aniqlash orqali o'n to'rtta polimorf turlarga ajratilgan edi (Drozd, 1974). Ulardan beshta avlodi major formalarga (*Ostertagia*, *Orloffia*, *Marshallagia*, *Teladorsagia*, *Spiculopteragia*) va to'rtta avlodi esa minor turlarga (*Skjabinagia* Kassimov, 1942; *Grosspiculagia*; *Rinadia*; *Apteragia* Jansen, 1958) ajratildi. Keyinchalik bu ro'yhat o'n to'qqiztaga kengaytirildi (Drozd, 1995). Shunday qilib, quvushshoxlilar so'yilib ko'rilganda *Skjabinagia* "turlari" doim *Ostertagia* avlodi major turlari bilan birgalikda uchrashligi qayd etildi. O'z navbatida *Rinadia* va *Apteragia* avlodi "turlari" ham soni jihatdan ko'p uchrovchi *Spiculopteragia* avlodi turlari bilan, *Grosspiculagia* "turlari" esa *Marshallagia* avlodi turlari bilan uchradi. Bunda har kaysi juftlik ma'lum tur belgilari bilan o'xshaydi, lekin avlod belgilari bilan farq qiladi. Har bir populyatsiyada major va minor formalarning xissalari, odatdagicha, har qaysi juftlik uchun o'zgarmay qoladi. Yig'ilgan

ma'lumotlar asosida shunday **gipotezaga** kelish mumkin-ki, bu juftliklar bitta turning polimorf formalardir, qaysiki morfologik jihatdan farqlanadi va shuning uchun turli avlodlarga joylashtirilgan (Drozd, 1995).

Nazorat savollari:

1. Amaliy molekulyar zoologiya nimani o'rganadi?
2. Evolyutsiya nima?
3. Dezoksiribonuklein kislotasi (DNK) modeli kimlar tomonidan kashf etilgan?
4. Biologik xilma-xillik terminini aniqlang va tushuntiring?
5. Jumbog'li turlar deganda nimani tushunasiz?
6. Turlar ichidagi polimorfizm nima?
7. «Egizak-turlar» terminini fanga kim birinchi kiritgan?

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation // Trends Ecol. Evol. -2007. - V. 22. -No.3. -P. 148-155.
2. Банникова А.А. Молекулярная филогенетика и современная систематика млекопитающих// Журнал общей биологии. - 2004. - Т.65. - N4. - С.278-305.
3. De Ley P., Blaxter M. Systematic position and phylogeny // The biology of nematodes / Ed. by D.L.Lee. L.; N.Y.: Taylor and Francis, 2002. P. 1-30.
4. Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя. Обзор // Биохимия. – 2007. - Т. 72. - С. 1690-1699.

2-mavzu: HAYVONOT OLAMI XILMA-XILLIGI O'RGANISHDA MOLEKULAR USULLARNI QO'LLASH

REJA:

Genosistematika. Filogenetika. Hayvonot olamini o'rganishda molekulyar bioximiy va genetika usullarni qo'llash tarixi. Polimeraza zanjirli reaksiya. Sekvenirlash. Turlarini identifikatsiyalashda foydalaniladigan molekulyar markerlar. Mitoxondrial genlar (DNK-barkoding), yadro genlari.

Bioxilma-xilikni o'rganishda molekulyar bioximiy va genetika usullarni qo'llash tarixi

Bioxilma-xilik va sistematikani o'rganishda 1960-1970 yillarda Allozim texnologiyasi (izoferment) analizi ishonchli joyni egalladi. Bu izofermentlar polimorfizmni ochilishi bilan bog'liq. Fosfolipidlar tarkibi bo'yicha ham talay ishlar amalga oshirildi.

Parazit nematodalar turining populyatsion strukturasi aniqlash uchun birinchi navbatda turli fermentlar, oqsillar elektroforezi metodlarini qo'llashga asoslangan. Bunda kriptik turlarni aniqlashda elektroforez haraktida oqillar izoformalarni bo'linish usulidir.

Bu metodlar ko'p mehnat talab qiluvchi va aniqlanadigan fermentlarning etarli darajada turg'un (stabil) bo'lmasligi bois hamisha ham ishonchli emas edi. Shunga qaramasdan, muhim natijalar olingan. Muhim ishlar guruhiga italiyalik prof. L.Padjining tadqiqotlarini kiritish zarur. Uning rahbarligida dengiz hayvonlarining parazit askaridalar asosiy fermentlarining o'zgaruvchanlik spektrlari tadqiq qilindi. Jumladan, *Pseudoterranova decipiens* nematodasi populyatsion strukturasi o'rganish uchun 16 ta enzim lokusi, shu jumladan bir nechta malatdehidrogenaza, esterazalar va boshqa fermentlar ishlatildi (Paggi et al., 1991). Bu fermentlarning spektrlaridagi aniq farqlar ushbu nematodaning shimoliy atlantika populyatsiyasi uchta genetik mustaqil turlardan iboratligini ko'rsatdi (A, V, S). Faqat bir marta duragay individ – A va V shakllari chatishishining hosili aniqlandi. Padj va hammualliflarining ko'rsatishicha, har bir uchtalik shakl (forma)lar chegarasida genetik xilma-xillikning darajasi juda kam bo'lib, ushbu formalar o'rtasida esa ancha katta (har bir guruh ichidagi farqdan ikki darajada ko'p). Ushbu uch guruhining ajralish davri 2-4 million yilni tashkil etadi. Fermentlarni tadqiq etish natijasidagina ushbu uch guruh o'rtasidagi morfologik farqlar, shuning uchun ularning geografik tarqalish xususiyatlari aniqlandi. Shuni ham ta'kidlash zarurki, bu formalarning har biriga o'ziga xos xo'jayinlari mavjud.

Xuddi shunday ishlar Ostertagiinae kenja oilasi nematodlarining taksonomik holati bo'yicha ko'p izlanishlar olib borilgan. Jumladan, *Teladorsagia* (*qOstertagia*) avlodini uchta, *T. circumcincta*, *T. davtiani* va *T. trifurcata* turlari statusi borasida noaniqliklar mavjud edi. Keyinchalik, bu turlarni allozim analizi asosida ko'rib chiqib, ular bitta turning turli morfolarini degan xulosaga kelishgan

(Andrews & Beveridge, 1990).

Yangi uslublardan foydalanish, xususan PZR, polimorf turlar borasidagi muammolarni echishda va yangi ma'lumotlarni olishda imkon yaratdi. Bunday amalga oshirilgan tadqiqotlarda *Ostertagia gruehneri* Skrjabin, 1929 va *O. arctica* Mizkewitsch, 1929 turlarining ITS-1 ichki transkripsiyalanuvchi speyser) va ITS-2 sohalari bo'yicha nukleotidlar ketma-ketligi solishtirma tarzda o'rganilganda, yaqqol tarzda farqlanishlar qayd qilinmagan bo'lib, bu holat ularning bitta turga mansub ekanligidan dalolat beradi (Dallas et al., 2000). Bunday amalga oshirilgan tadqiqotlarda *Teladorsagia circumcincta* (Stadelman, 1894), *T. trifurcata* (Ransom, 1907) va *T. davtiani* (Andreeva et Satubaldin, 1954) turlarini ribosoma DNKsi tarkibida ITS-2 sohasi (ichki transkripsiyalanuvchi speyser) solishtirma tarzda o'rganilganda yaqqol tarzda farqlanishlar qayd qilinmagan bo'lib, bu holat ularning bitta turga mansub ekanligidan dalolat beradi (Stevenson et al., 1996, Amirov va boshq., 2014).

DNK-shtrixkodlash

Aslida nima taklif qilingan edi? Foydalaniladigan namunadan DNK ajratishda, birinchi navbatda taksonomik tarkibi shu sohadagi ekspert tomondan har tomonlama aniqlangan va vaucher namunaning saqlangan bo'lishi kerak. Agarda, namuna juda kichik bo'lsa va undan biror qismidan DNK ajratishni imkoni bo'lmasa, unda aniq fotografiyasi bo'lishi shart (e-vaucher). Genbank (GenBank) bazasidagi ma'lumotlarning aniq emasligi va muammolardagi xatolar alaqachon ilmiy adabiyotlarda muhokama qilinmoqda. So'z, sekvenirlash hatosida, namunadagi turlarni taksonomiyasini aniqlashda beparvolik (etiketlarni chalkashtirish, materialni etarlicha tekshirmaslik) yoki ob'ektiv sabablar ta'sirida, variabellik hollarda va yomon ajraluvchi turlar xususida boradi [Tautz, 2002; Harris, 2003; Vilgalys, 2003]. Masalan, ayrim guruh qo'ziqorinlarning noto'g'ri aniqlanishi, to 20 % tashkil qilishi mumkin [Bridge, 2003; Nilsson, 2006]. Namunalarning yig'ish tizimida aniq ma'lumotlar uchun alohida ahamiyat beriladi (yig'ish joyi, aniq koordinatalari, yig'uvchining familiyasi). Ilgari ma'lumotlar bazasida bunday fikrlar muhokama qilingan, lekin hozirda bunday ma'lumotlar albatta bo'lishi shart. Barcha organizmlar uchun xos bo'lgan marker tanlash ideyasi mavjud edi. Misol uchun, hasharotlar sistematikasiga bag'ishlangan obzorda [Caterino, 2000], mualliflar markerlarni standartizatsiya qilish muhimligini muhokama qilishdi, shunday qilib, turli tadqiqotchilar, turli markerlarni alohida guruhlari bo'yicha yaxshi samarasini hisobga oldilar (asosan quyi taksonomik darajadagi guruhlari uchun), natijada qiyoslash va umumlashtira olmadilar.

Tanlanadigan yagona **gen** quyidagi xossalarga ega bo'lishi kerak: u nisbatan qisqa fragmentli soha bo'lishi kerak, etarlicha variabel bo'lib, yaqin qarindoshlik turlarni ajratishi, buning uchun bu fragment o'zidan yon tomonlarda konservativ soha bo'lishi kerak (etarlicha konservativ bo'lishi, chunki keng o'ziga xos praymerlar bilan amplifikatsiya qilinishi kerak). Sekvenirlash engil va arzon bo'lishligi uchun nisbatan kichik razmerdagi fragmentlar (700-800 j.n atrofida) bo'lishligi kerak. Tekislashni oddiy bo'lishligi uchun unda bo'linish (indeley) tarkibi kam bo'lishi kerak. Standart gen sifatida 5' fragmenti, oqsil mitoxondriyasining tsitoxrom-oksidadaza kodlovchi 1 subbirligi (SO1 yoki cox1)

tanlandi, qaysi-ki ilgari turlar o'rtasidagi o'garuvchanlik darajasini yaxshi ko'rsatgan [Moore, 1995]. CO1 geni tadqiq qilingan mitoxondrial genomlarning hammasida ishtirok etadi, u 1540 nukleotidlarni o'z ichiga oladi, qiyosiy tadqiqotlar uchun odatda uning variabel qismi yaqin 650 j.n. foydalaniladi. Uning amplifikatsiyasi uchun standart paymerlari yaratildi [Folmer, 1994; Zhang, Hewitt, 1997].

Yadro genlariga nisbatan mitoxondrial genlar bilan ishlash anchagina qulay. Bu genlarni engilgina amplifikatsiya qilinadi (ayniqsa buzilgan materiallar), har bir xujayrada 100-10000 mitoxondriylar bor. Mitoxondrial genomning polimorfizm darajasi yadro genomiga nisbatan ancha yuqori (5-10 marta), intronlar saqlamaydi. 2000 yillardan boshlab mitoxondrial gen bilan turlarni aniqlash va ajratishni isbotlashga oid ko'pgina ishlar chop etildi. Asosiysi tadqiqotchilar uchun qulayligi, lekin markerning etarli darajada sifatligidir. Shuning uchun-ki SO1 genning fragmentlari faqatgina turlarni aniqlashda (hayvonlarda) foydalanish mumkin, bu borada ko'plab ishlar bajarildi.

Hayvonlarning turli guruhlariga mansub 13000 oshiq juftlikdagi turlarida CO1 geni fragmentlari bilan taqoslangan [Hebert, 2003a] bo'lib, turli xil tur organizmlari 2% kamroq farq qiladi, bitta tur organizm uchun esa 1% oshmaydi [Hebert, 2003b]. Tadqiq qilinayotgan hayvonlarning bu ketma-ketlikning ichki va turlar o'rtasidagi farqlanish (divergentsiya) darajasi 5-20 martaga farq qildi. Ko'pgina tadqiqot ishlarda CO1 genlari fragmentlari bilan to'g'ri identifikatsiya qilingan guruhlar 96-100% tashkil qildi.

Xebert va uning xammualiflari 2004 yilda CO1 geni fragmentlari asosida DNK-shtrixkodning samarasini isbot qilish bo'yicha 4ta ish chop etishdi. Ular turli guruh hayvonlarda bajarilgan, kapalaklarda [Hebert, 2004a], qushlarda [Hebert, 2004b], o'rgimchaklarda [Barrett, Hebert, 2004] va oyoqdumlilarda [Hogg, Hebert, 2004]. Mualliflar o'zlarining ma'lumotlari va hamda genbank bazasi ma'lumotlaridan foydalanishdi. Odatda, Kimuraning ikkiparametrli modulidagi masofalarni hisobga olgan holda ketma-ketlikning farqini topishdi [Ney, Kimura, 2004] va ichki va tur o'rtasidagi variabellikni taqqoslashdi. Ayrim holatlarda samarali taksonomik identifikatsiya qilinganlariga ba'ho berildi, buning uchun o'rganilgan bitta turning ketma-ketliklari olindi, daraxt qilindi (yaqin qo'shnilar usuli), keyin navbat bilan boshqa individlarning ketma-ketliklari qo'shildi va bu turlar klaster qilindi va tekshirildi.

2004 yili Shimoliy Amerikaning qushlari bo'yicha ish e'lon qilindi [Hebert, 2004b], bunda ilgari morfologik aniqlangan, o'rnatilgan DNK-shtrixkod yordamida turlar o'rtasidagi tegishlilik tekshirib ko'rildi. CO1-ketma-ketligi bo'yicha turlar o'rtasidagi farq, ichki turlarga qaraganda 19-24 marta ko'p (tegishli 7,05-7,93%, qarama-qarshi 0,27-0,43%) ekanligi aniqlandi va ma'lumotlarga ba'ho berildi.

Kanada Artikasidan oyoqdumlilarning (Sollembola turkumi) 13 avlodiga mansub 19 turi o'rganildi (har bir vakildan 1-3tadan). Bitta avlodga mansub bo'lgan turlar o'rtasidagi farqlar 8-19 % tashkil etdi-ki, bu holda bitta turning idividlari o'rtasidagi farqlar esa ko'pincha 1 % kam bo'ldi. Bu ishda uchratilgan ikkitasidagi farqlanish (divergentsiya) istisno tariqasida (5 i 13%), mualliflar bunga bir-biriga o'xshagan "egizak" turlarning hali aniqlanmagan dalili deb hisobladilar.

Natijada Xebertni “shtrixkodning otasi” deb atay boshladilar [Marshall, 2005] va uni hammualliflari shu xulosaga kelishdi, DNK-ShK hali tavsifi berilmagan turlar va yangi turlarni identifikatsiya qilish yaroqlidir, bu to’lig’icha isbot qilindi. Bunda CO1- fragmenti bo’yicha ichki va turlar o’rtasidagi farq 10 martagacha farq qilishi (10xSST - species-screening threshold) taklif etildi yoki turlar ketma-ketligi o’rtasidagi farq taxminan 2-3 %, turlarni aniqlash chegarasidir [Hebert, 2004b]. Ikkinchi kriteriy o’zaro (retsiproknoy) monofil bo’lish, jumladan ketma-ketlikni o’rni to’ldirib bo’lmaslikdir.

Nazorat savollari:

1. Genosistematika nimani o’rganadi?
2. Filogenetika nimani o’rganadi?
3. DNK-shtrixkodni tushuntirib bering?
4. Turlarini identifikatsiyalashda qanday molekulyar markerlar ishlatiladi?
5. Mitoxondrial genlar (DNK-barkoding) va yadro genlarini tushuntirib bering?

Фойдаланилган адабиётлар:

1. Hebert P. D. N., Gregory T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy// Syst. Biol. - 2005. -V. 54. -P. 852-859.
2. Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004. - V.101. -P. 14812-14817.
3. Kuchboev A.E., Krucken J., Ruziev B.H., von Samson-Himmelstjerna G. Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan// Parasitology Research 2015, 114 (4). - P 1355-1364.

3-mavzu: HAYVONLAR MOLEKULYAR SISTEMATIKASINI O’RGANISHDA DUNYOVA VA O’ZBEKISTONDA BO’YICHA OLIB BORILAYOTGAN TADQIQOTLAR

REJA:

Ko’p xujayrali umurtqasiz hayvonlarning zamonaviy sistematikasi va filogenetikasi. Umurtqasiz hayvonlar molekulyar taksonomiyasi bo’yicha O’zbekistonda olib borilayotgan tadqiqotlar.

Umurtqasiz hayvonlar molekulyar sistematikasi va taksonomiyasi bo’yicha olib borilayotgan tadqiqotlar

Strongilidlar (Nematoda) parazit nematoda guruhlari orasida evolyutsion holati jihatdan yaxshi samarali hisoblanadi. Ularning keng ko’lamdagi xilma-xilligi XX asrda tadqiqotchilarning bu nematodalarni Strongylida Railliet et Henry,

1913 otryadiga ajratishga olib keldi. Ularning erkin yashovchi nematodalar – rabditidalar bilan ko’p jihatlarining morfologik o’xshashligi anchadan beri ma’lum edi. Nematodalar sistematikasida molekulyar metodlarning keng qo’llanishi strongilidlarning statusi masalasini tikladi, chunki ribosomal ketma-ketlikning tahlili natijalariga ko’ra strongilidlar rabditidlarning bir yo’nalishi ekanligini ko’rsatadi. Strongilidlarning tuproqdagi Heterorhabditidae (Poinar, 1975) oilasi entomopatogen nematodalar bilan muayyan filogenetik bog’liqligi aniqlangan.

Strongilidlarning qarindoshlik aloqalari to’g’risidagi tasavvurlar Blaxter M.L. va De Ley (2002) taklif qilgan nematodalar sinfi sistemasida o’z aksini topgan (rasmlar). Bu sistemada strongilid (darajasi) (Rhabditida Chitwood, 1933 otryadi tarkibidagi Strongyloidea Weinland, 1858) katta oila darajasiga tushiriladi. Strongilid tarkibidagi katta oilalar oila darajasiga tushirildi: Strongylidae Baird, 1853; Trichostrongylidae Leiper, 1912; Metastrongylidae Leiper, 1908 va Ancylostomatidae Looss, 1905. Shu bilan birga bu katta oilaga Heterorhabditidae Poinar, 1975 oilasi mualliflar tomonidan kiritilgan. Strongilidlar darajasining bunday o’zgarishlari kladistik va an’anaviy yondoshuvlar o’rtasidagi o’zaro kelishilib, ular Trichostrongylidae oilasining “ichki” taksonomik strukturasi o’zgartirmagan.

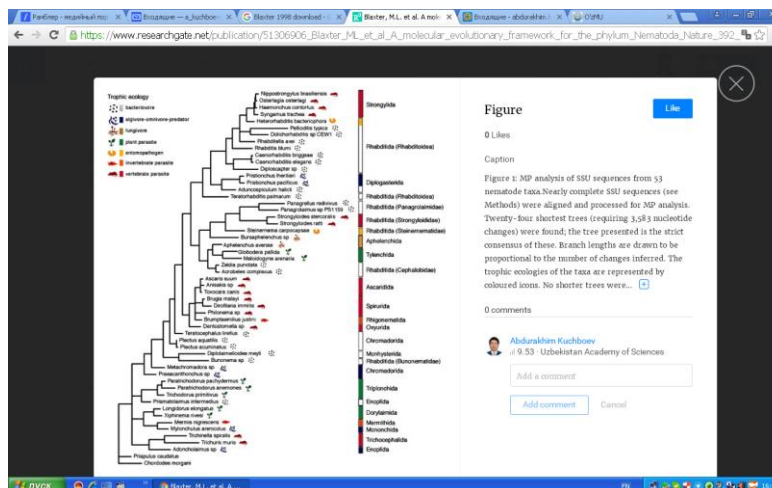
Klassifikatsiya evolyutsiyaning tizimi

Геккель (1894) Три царства	Уиттекер (1969) Пять царств	Вёзе (1977) Шесть царств	Вёзе (1990) Три домена	Кавалье-Смит (1998) Два домена и семь царств	
Животные	Животные	Животные	Эукариоты	Эукариоты	Животные
Растения	Грибы	Грибы			Грибы
	Растения	Растения			Растения
Протисты	Протисты	Протисты			Хромисты
	Монеры	Археи	Археи	Простейшие	
		Бактерии	Бактерии	Прокариоты	Археи
					Бактерии

Molekulyar sistematikani o’rganishda dunyoda va O’zbekistonda olib borilayotgan tadqiqotlar

Strongilidlar parazit nematoda guruhlari orasida evolyutsion holati jihatdan yaxshi samarali hisoblanadi. Ularning keng ko’lamdagi xilma-xilligi XX asrda tadqiqotchilarning bu nematodalarni Strongylida Railliet et Henry, 1913 otryadiga

ajratishga olib keldi. Ularning erkin yashovchi nematodalar – rabditidalar bilan ko'p jihatlarining morfologik o'xshashligi anchadan beri ma'lum edi. Nematodalar sistematikasida molekulyar metodlarning keng qo'llanishi strongilidlarning statusi masalasini tikladi, chunki ribosomal ketma-ketlikning tahlili natijalariga ko'ra strongilidlar rabditidlarning bir yo'nalishi ekanligini ko'rsatadi (Aleshin et al., 1998; Blaxter et al., 1998; Sudhaus, Fitch, 2001). Strongilidlarning tuproqdagi Heterorhabditidae (Poinar, 1975) oilasi entomopatogen nematodalar bilan muayyan filogenetik bog'liqligi aniqlangan.



Расм. Нуклеотидларнинг SSU асосидаги Нематода синфининг филогенетия гипотезаси.

Strongilidlarning qarindoshlik aloqalari to'g'risidagi tasavvurlar P.De Ley va M.Blaxter (Blaxter, De Ley, 2002) taklif qilgan nematodalar sinfi sistemasida o'z aksini topgan. Bu sistemada strongilid (darajasi) (Rhabditida Chitwood, 1933 otryadi tarkibidagi Strongyloidea Weinland, 1858) katta oila darajasiga tushiriladi. Strongilid tarkibidagi katta oilalar oila darajasiga tushirildi: Strongylidae Baird, 1853; Trichostrongylidae Leiper, 1912; Metastrongylidae Leiper, 1908 va Ancylostomatidae Looss, 1905. Shu bilan birga bu katta oilaga Heterorhabditidae Poinar, 1975 oilasi mualliflar tomonidan kiritilgan. Strongilidlar darajasining bunday o'zgarishlari kladistik va an'anaviy yondoshuvlar o'rtasidagi o'zaro kelishilib, ular Trichostrongylidae oilasining "ichki" taksonomik strukturasi o'zgartirmagan.

Parazitlar molekulyar sistematikasi bo'yicha O'zbekistonda olib borilayotgan tadqiqotlar. O'zR FA Zoologiya instituti Molekulyar biologiya va biotexnologiya laboratoriyasida turli guruh hayvonlar parazit gelmintlar va quruqlik mollyuskalari tur tarkibi, molekulyar taksonomiyasi, filogeniyasi va sistematikasini o'rganish muammolari bilan shug'ullanadi. Shu jumladan, tuyoqli hayvonlar nematodalarining morfologiyasi, molekulyar diagnostikasi va ularning sonini nazorat qilish bo'yicha ilmiy tadqiqot ishlari o'tkazilmoqda. Hozirda *Metastrongylus*, *Dictyocaulus*, *Protostrongylus*, *Spiculocaulus* va *Cystocaulus* avlodlarining 9 turi va *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Marshallagia*, *Teladorsagia* va *Setaria* avlodlarining 18 turi bo'yicha 50 ortiq ribosomal DNKsi ITS va 28S cohasining nukleotidlar ketma-ketligi tahlil qilindi. Aniqlangan nematodalar ichidan 15ta turi halqaro Genbank (NCBI) bazasiga joylashtirildi va u uchun yangi

hisoblandi (Abramatov et al., 2013; Kuchboev et al., 2015; Amirov i dr., 2014, Amirov va boshq., 2015).

Bioinformatik tahlil qilingan ITS sohasining nukleotidlar ketma-ketligi asosida o'pka nematodalarini tezkor aniqlash maqsadida turlarga xos bo'lgan alel praymerlar yaratildi. Bu ixtiro uchun O'zR intellektual mulk agentligiga patentlash uchun talabnoma berildi. Bu kelajakda veterinariya amaliyotida parazit nematodalarning molekulyar diagnostikasi uchun PZR tizimida foydalanish mumkin bo'ladi.

Undan tashqari qo'y va qora mollarda parazitlik qiluvchi va shu vaqtgacha olimlar o'rtasida keskin munozaraga baxsga sababchi bo'lgan gemonx nematodasining ikkita turi ustida molekulyar- genetik tadqiqot o'tkazildi. Bu usul yordamida gemonx turlarni risbosomal DNKsining ITS-2 o'rganildi va tahlil qilindi. Natijada bu turlarning alohida- alohida tur ekanligini tasdiqlash imkonini berdi (Kuchboev i dr., 2012, Abramatov et al., 2013). Olingan nukleotidlar ketma-ketligi Genbank bazasiga joylashtirildi (NCBI).

Protostrongilid nematodasi turlari uchun turga xos bo'lgan praymerlar yaratildi va ixtiroga Patent olingan (2017).

Laboratoriyada fan doktori, fan nomzodi, uchta kichik ilmiy xodimlar faoliyat yuritadi va uchta amaliyot xonalari: molekulyar biologiya, laminar boks, avtoklaf va tsentrifuga xonalari hamda ilmiy xodimlar uchun mo'ljallangan ikkita xonada ilmiy-tadqiqot ishlari olib boriladi.

Laboratoriya ilmiy-tadqiqot ishlari olib borish uchun kerak bo'lgan barcha zamonaviy asbob-uskunalar va jihozlar bilan ta'minlangan.

Nazorat savollari:

1. Qaysi hayvonot olami guruhlari uchun molekulyar sistematika yaratilgan?
2. O'zbekistonda hayvonlar molekulyar diagnostikasi va sistematikasi bo'yicha qanday ishlar amalga oshirilmoqda?

Asosiy adabiyotlar:

3. Aleshin V.V., Kidrova O.S., Milyutina I.A. et al. Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: Molecular evidence for monophyly of Chromadorian and Secernentean nematodes // Russ. J. Nematol. 1998a. Vol. 6, N 2. P. 175-184.
4. Blaxter M. *Caenorhabditis elegans* is a nematode // Science. 1998. Vol. 282. P. 2041-2046.
5. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda // Nature. 1998. - Vol. 392. - P. 71-75.
6. Kuchboev A.E., Krucken J., Ruziev B.H., von Samson-Himmelstjerna G. Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan// Parasitology Research 2015, 114 (4). - P 1355-1364.

**4-mavzu: MOLEKULYaR-GENETIK TAHLILLAR UChUN ZOOLOGIK
NAMUNALARNI YIG'ISH TALABLARI. NAMUNALARDA MORFOLOGIK
VA TAKSONOMIK TADQIQOTLAR
(4 soat)**

REJA:

Zoologik ob'ektlardan invaziv va neinvaziv genetik namunalarini yig'ish. Namunalarni dala va laboratoriya sharoitida saqlash talablari. Namunalarni molekulyar tadqiqotlar uchun yaroqliligi. Yig'ilgan namunalarda morfologik va taksonomik tadqiqotlar o'tkazish.

**4.1. Molekulyar-genetik tahlillarda zoologik namunalarni
yig'ish talablari**

Zoologiya kuzatuv ob'ekti – ko'p hujayrali (Animalia) va bir hujayrali organizmlar (protistlar hisoblanadi. Molekulyar- genetik tahlil uchun namuna sifatida kuzatilayotgan umurtqasiz hayvon hajmiga qarab butun organizmlar (o'lchami kamida 1 sm), tana qismlari, to'qima va ichki organlar bo'laklari xizmat qilishi mumkin. Maqbul namuna o'lchami - 5 mm x 2-3 mm, og'irligi 0.1 dan 5 g gacha. Molekulyar- genetik tahlil uchun zarur bo'lgan materiallarni to'plash jarayonida kerakli namuna DNK molekulasini destruktiv o'zgarishini oldini olish maqsadida 70°S li chuqur muzlatuv holatiga tushirilishi yoki, 70% li etanol eritmasida (S₂N₅ON) belgilab qo'yilmog'i zarur. Tutish jarayonidan keyin organizm nobud bo'lsa, namunani qayd qilish, 20-30 daqiqa mobaynida amalga oshirilishi zarur. Tekshirilayotgan hayvon namunalarni formaldegid eritmasi bilan qayd qilinishi, yaroqsiz hisoblanadi, chunki quyidagi bu modda DNKga jiddiy tasir ko'rsatadi, tanazulni olib keladi va taxlil natijalarini qisman yoki to'liq buzilishiga sabab bo'ladi. 70% li etanol eritmasida qayd qilingan namunalarni muzlatgichda saqlanishi maqsadga muvofiq bo'ladi, agar bunday sharoit bo'lmasa, xona haroritida quyosh nuri tushmaydigan joyda saqlanishi tavsiya qilinadi. Saqlash uchun 1-2 ml probirkalardan (ependorflar) foydalaniladi.

4.2. Неинвазивный генетический забор проб

- Введен в 1992 г. как метод получения генетических образцов от бурых медведей в Европе
- 3 лучших цели использования: идентификация вида, половая идентификация и идентификация отдельных особей
- Низкие показатели успешности, проблемы контаминации (загрязнения проб) и высокий уровень ошибок микросателлитного генотипирования - это проблемы, которые следует учитывать
- Интеграция в область исследований дикой природы становится все более осуществимой

- Количественная оценка генетических паттернов = понимание популяционных процессов
- Наличие множества объектов и маркеров
- Меньшие усилия при более низких затратах, чем при отлове животных
- Большое количество получаемых образцов по сравнению с инвазивными методами
- Хороший подход для изучения редких и скрытных видов
- Может сгенерировать больше данных, чем метод использования фото-ловушек
 - Идентификация отдельных особей
 - Идентификация пола
 - Мигранты, социальная структура
 - Более точные оценки численности
- Дополняет другие методы
 - Увеличивает возможности по изучению местообитаний, перемещений
 - Используется для изучения редких животных

Преимущества

- Увеличивает кол-во определенных животных
- Предоставляет данные для многочисленных проектов
- Множественные схемы забора проб
- Доступность

Недостатки:

- Контроль количества и качества ДНК
- Риск экстраполяции результатов
- Может не дать данные для будущего анализа
- Требуется полевое и лабораторное обучение

- Обнаружение редких видов
 - Образцы шерсти или фекалий
 - Случайно собранные данные
 - Помогает зафиксировать наличие вида
- Помогает различать виды
- Примеры:
- По образцу шерсти обнаружили медведя гризли (против 1 особи на более, чем 5304 ловушке-ночей!)
- Манул и кабан, идентифицированные по экскрементам, но не замеченные на фото-ловушках в горах Тянь-Шаня в Кыргызстане

Методология обнаружения экскрементов

Цель: получить достаточное количество образцов для оценки размера популяции

1. Определите площадь исследования для оценки времени обследования
2. Разбейте территорию на блоки обследования по частям / всему ареалу
3. Проведите трансектные обследования - длина зависит от качества среды обитания, рельефа местности, количества присутствующих экскрементов
4. Соберите экскременты, запишите географические координаты, отправьте в лабораторию

Правила обработки образца

- Малое количество и низкое качество ДНК, которая извлекается из образцов фекалий, чрезвычайно сложно использовать в генетическом анализе.
 - * Избегайте контаминации при заборе!
 - * Используйте хороший лабораторный метод
 - * Проверка на соответствие и гарантия качества
- Используйте перчатки и стерильные инструменты
- Избегайте смешения образцов, которые могут быть от 2х особей
- Ищите свежие образцы, но старые тоже можно использовать

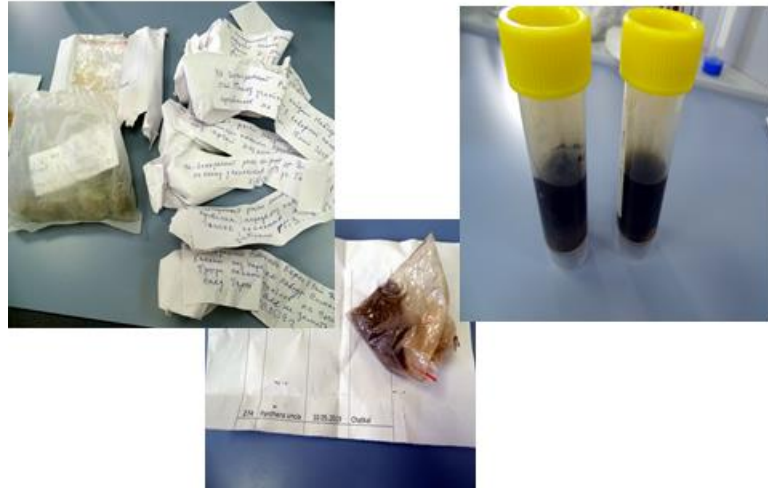
Правила отбора проб в поле

- Подготовьте новую пробирку для забора пробы
- Определите GPS локацию
- Заполните форму с данными
- Наденьте новые перчатки
- Отломите (срежьте) кусочек с внешней части фекалий и положите в пробирку с силикагелем
 - Не сжимайте фекалии
 - Простерилизуйте приборы
 - Утилизируйте перчатки
 - Храните пробирки в темном, сухом месте



Расм. Намуналар йиғиш қоидалари

Неправильный забор материала!



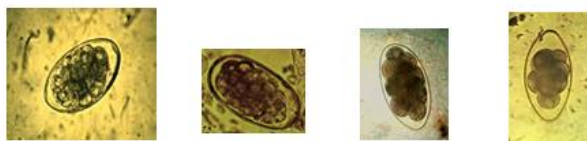
Правила в лаборатории

- Необходимо иметь специально выделенные места для работ до- и после- выделения ДНК для предотвращения контаминации
- Очистка рабочего места после взятия образца на всех этапах
- График лабораторных работ для предотвращения порчи продуктов

Намуналарда морфологик ва таксономик тадқиқотлар

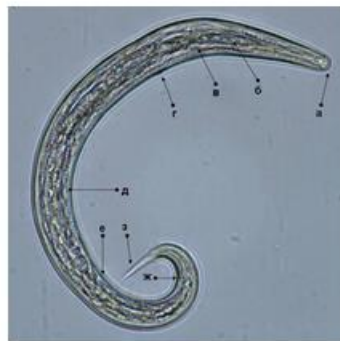
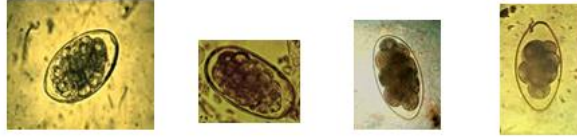
Морфологик аниқлаш

Трихостронгилидларнинг бир-бирига ўхшаш турли хил тухумлари

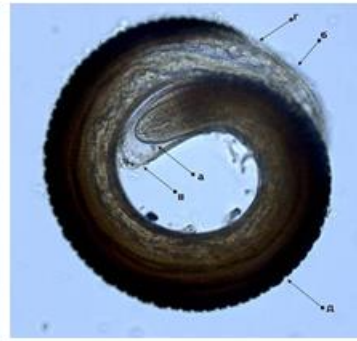


Морфологик аниқлаш

Трихостронгилидларнинг бир-бирига ўхшаш турли хил тухумлари



Лининки первой стадии *Protostrongylus* sp. (400×):
 а – головной конец, б – пищеводно-кишечный переход, в – нервное кольцо, г – экскреторное отверстие, д – кишечник, е – половой зачаток, ж – анус, з – хвост



Лининки третьей стадии *Protostrongylidae* sp., ивлеченные из ноги моллюска (400×):
 а - головной конец, б- хвостовой конец, в-г- хитинизированные бороздки на головной и хвостовой частях лининки, д - панцирь.

Nazorat savollari:

1. Molekulr-genetik tahlillari uchun zoologik materillar yig'ishga nimalarga e'tibor qaratiladi?
2. Namunalarda olishda genetik neinvaziv usuli deganda nimani tushunasiz?
3. Dala sharoitida fekaliylardan namunalar olish.

5 - mavzu. ZOOLOGIK OB'EKTLARDAN GENOM DNKSINI AJRATISH

REJA:

Zoologik namunasidan genom DNKsini ajratish Standart fenol-xloroform va kommertsiyali reagent to'plamlari yordamida. Fenol – xloroformli uslubi, Diatom DNA Prep (Rossiya) reagentlari to'plami yordamida DNK ajratish uslubi va Dneasy Tissue Kit (Germaniya) reagentlar to'plami yordamida DNK ajratish uslubining usunlik va kamchiliklari.

Tayanch iboralar: *nematodalar, eppendorf probirkalari, kontaminatsiya, gel-elektroforez, UF-nuri, TAE, agaroz, bromli etidiy, DNK tozalash to'plami, DNK-markeri.*

Standart fenol-xloroform va kommertsiyali reagent to'plamlari yordamida umurtqasizlar namunasidan genom DNKsini ajratish

DNK va RNK ajratishni ta'minlashda bir qator prioritet talablarni ajratish mumkin:

– biologik materialni lizisi (Lízis - rastvorenie kletok i ix sistem, v tom chisle mikroorganizmov, pod vliyaniem razlichno'x agentov, naprimer fermentov, bakteriolizinov, bakteriofagov, antibiotikov);

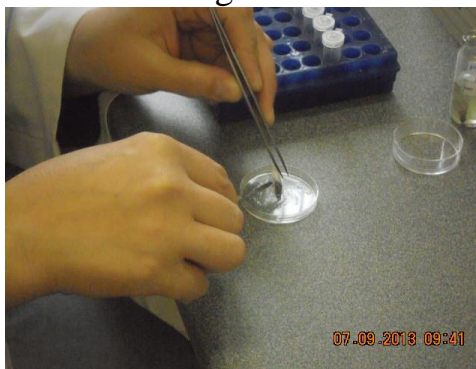
– selektiv ekstraksiya (sorbtsiya) (Sorbtsiya (ot lat. sorbeo – poglohayu (shimmok))- poglohenie tvordo'm telom libo jidkostyu razlichno'x vehestv iz okrujayuhey sredy) ili (posledovatelnoe udalenie primesey iz ekstratsii);

- katta xajmda to'plash;
- PZR susaytiruvchi komponentlardan ajratish;
- DNK va RNK ajratish;
- yuqori foizda chiqishi;
- kalibrovka mumkinligi va ijobiy nazorat;
- kontaminatsiyaning yo'qligi;
- kam vaqt sarflanishi;
- avtomatizatsiyaning mumkinligi.

Eukariot organizmlardan nuklein kislotalarni ajratish va fraktsiyalashda traditsion va kommersion tayyor reagent-to'plam usullari (naborda ishning bajarilishi keltirilgan) foydalaniladi.

Masalan, genom DNKsi hayvonlarning o'pka va oshqozon-ichak tizimida endoparazitlik qilib yashovchi nematodalar to'qimalaridan ajratiladi. Oldindan 96%li etil spirtga solingan nematodalar soat oynasida distillangan suv bilan yaxshilab yuviladi va har birini alohida 100 mkl lizis bufferi solingan eppendorf

probirkasiga solinadi. Yirik nematodalardan (diktiokaullar, gemonxlar, parabronemalar) DNKsini ajratishda, ularning bosh qismi ishlatilgani ma'qul (tanani bosh qismidan qizilo'ngach tugagan joyigacha) va bu binokulyar lupasi ostida, ko'z skalpeli yoki britvani lezviyasi yordamida kesib olinadi (erkak nematodalarning dum tomoni esa morfologik taxlili uchun qoldiriladi) (1-rasm).



1- rasm. DNK ajratish uchun nematod tanasidan preparat tayorlash.

2.2.1. Fenol – xloroformli uslubi (FX- uslub).

Bu – nuklein kislotalarni ajratishning klassik uslubidir. Bu uslub proteinaza K ishtirokida detergentlar (yuvuvchi vosita) tomonidan biologik materiallarning parchalanishi hamda fenol va xloroform yordamida nuklein kislotalarni ajratib olishni o'z ichiga oladi (2-rasm). Buning afzalligi shundaki, Diatom DNA Prep (Rossiya) va Dneasy Tissue Kit (Germaniya) reagentlar to'plamiga qaraganda bu uslub bilan anchagina ko'p miqdorda DNK ajratib olinadi. Uslubning kamchiliklariga esa uning davomiyligi, mashaqqatliligi, agressiv organik erituvchilarning ishlatilishi va DNKni oqsildan ham, RNKdan ham etarli darajada tozalamasligini kiritish mumkin.



2-rasm. DNK ekstratsiyasi uchun Fenol-Xloroform reagenti.

Nematoda to'qimalaridan nuklein kislotalarni FX – ekstraksiya qilish usuli quyidagi bosqichlardan iborat:

1. Nematoda tanasidan 0,05 g og'irlikdagi to'qimani bo'lakchasi olinadi.
2. Nematodalarning to'qimalari, tarkibida 40 mM tris – HCl (pH q8,0), 0,5 mM EDTA, 1^xSSC bo'lgan bufer eritmasida (to'qima va buferning 100 mkg; 500 mkg nisbatida) gomogenizatsiya qilinadi.

3. 0,5% gacha SDS va proteinaza K ni oxirgi konsentratsiyasi 1 mgG/ml bo'lguncha qo'shiladi, aralashtiriladi va 37°S haroratda 2-3 soat davomida inkubatsiya qilinadi yoki 18 soatga qoldiriladi.

4. Probirkaga 5 M natriy atsetat oxirgi konsentratsiyasi 0,1 M bo'lgunga qadar qo'shiladi va aralashtiriladi. So'ngra 1:1 nisbatda fenol, to'yingan HCl trisi (pHq8,0) qo'shib, 10-15 daqiqa davomida aralashtiriladi.

5. Xloroformni 1:1 nisbatdagi hajmda qo'shib, yana 5-10 daqiqa mobaynida aralashtiriladi.

6. Olingan aralashmani 4°S haroratda 20 daqiqa tsentrifuga qilinadi (bir daqiqa davomida 4000 aylanma tezlikda).

7. Yuqoridagi fraksiyani erigan DNK bilan (supernatant) pipetka yordamida tortib olinadi.

8. FXli oqsildan ajratish jarayoni (deproteinatsiya) undan butunlay xolos bo'lgunga qadar takrorlanadi.

9. Ajratib olingan supernatantga 2:1 nisbatdagi xajmda xloroform qo'shib, 10-15 daqiqa aralashtiriladi, so'ngra 15 daqiqa tsentrifuga qilinib (bir daqiqa davomida 4000 aylanma tezlikda) yuqorgi fazasi olinadi.

10. 1 ml li erigan DNKga 5 M natriy atsetat oxirgi konsentratsiyasi 0,2 M bo'lguncha qo'shib, aralashtiriladi.

11. Ikki hajmdagi 96% li etanol eritmasi qo'shib, DNK cho'kmaga tushgunga qadar bir maromda aralashtiriladi.

12. -20°S xaroratda bir sutka davomida sovutiladi, so'ngra 15 daqiqa davomida 15000 aylanma tezlikda tsentrifuga qilinadi (0°S gacha sovuguncha).

13. Supernatant olib tashlanadi, DNK cho'kmasi 70% li etanol eritmasida yuviladi.

14. Etanol eritmasi to'kib tashlanadi, DNK havoda etanol eritmasi uchib ketgun qadar quritiladi va ionsizlantirilgan suvda eritiladi.

Olingan DNK preparatlarini konsentratsiyasi spektrofotometrda aniqlanadi. Ajratilgan DNK konsentratsiyasi 2,0 – 2,3 mkgG/mkl tashkil qiladi.

2.2.2. Diatom DNA Prep (Rossiya) reagentlari to'plami yordamida DNK ajratish uslubi

Bu uslub reagentlar yoki kitlar yordamida nukleotidlarni ekstraktsiya qilish uslublaridan biri hisoblanadi. Bu to'plam DNKni turli tabiiy materiallardan ajratish, shuningdek klinik namunalardan DNKni tez tozalab olish imkonini beradi. Bu usul FX – uslubdan jadalligi (1 ta namunaga 30 min. – 1,5 vaqt sarflanadi), toksik (zaharli) reagentlarning ishlatilmasligi bilan ajralib turadi. Ta'sir qilish maxanzimi guanidintionsionatli (Trizol) lizis qiluvchi reagentning ishlatilishiga asoslangan bo'lib, u hujayrani lizisiga, hujayra solyubilizatsiyasiga, shuningdek hujayra nukleazali denaturatsiyaga olib keladi. Lizis qiluvchi (parchalovchi) – reagent ishtirokida DNK NucleosTM – sorbent to'plamida faol so'riladi, so'ngra spirtli eritmada oqsil va tuzlardan oson yuviladi. Sorbentdan ajratilgan DNKni PZR da ishlatish mumkin.

To'plamni tarkibi: parchalovchi reagent, tuzli bufer Nucleos sorbentining suspenziyasi, "Ekstra Gen" ion almashinuvchi aralashma suspenziyasi (3-rasm).

3 rasm. *Diatom DNA Prep 200 to'plami.*

Diatom DNA Prep 200 reagentlar to'plami yordamida nematodalarning to'qimalaridan DNKni ajratib olish uslubi quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi.

buferni ishchi
2. 1,5 ml
tanasidan 0,05 g
bo'lakchasi
(nematodaning
chunki dum
jihattan
muhim



1. Qo'llanmaga binoan eritmasi tayyorlanadi.

probirkaga nematoda og'irlikdagi to'qima kesilib solinadi bosh qismi olingani ma'qul, qismi turlarni morfologik identifikatsiya qilishda ahamiyatga ega) va 800 mkl

parchalovchi reagent bilan maydalaniladi va qo'l yordamida 5-10 marta aralashtiriladi.

3. Aralashma 5-7 daqiqa 65° S haroratli termostatga qo'yiladi.

4. Probirkadagi aralashma minutiga 5000 aylG'min tezligida 10 sekund davomida tsentrifuga qilinadi.

5. Supernatant toza probirkaga olinadi, unga oldindan gomogenizatsiyalangan Nucleos suspenziyasi 20-40 mkl miqdorda qo'shiladi.

6. Probirkani rotator yordamida 10–20 aylG'min yoki qo'l yordamida aralashtirish kerak, so'ng 5000 aylG'min tezligida 10 sek. tsentrifuga qilinadi va supernatant olib tashlanadi.

7. Cho'kmaga 400 mkl parchalovchi reagent solinib, vorteks bilan gomogen holatga kelgunga qadar jadal aralashtiriladi.

8. Aralashmaga tuzli buferning 1 ml ishchi eritmasi qo'shilib, 5-10 marta aralashtiriladi, 5000 aylG'min. tezligida 10 sek tsentrifuga qilinadi, so'ngra supernatant olib tashlanadi.

9. 7 – bosqich qayta takrorlanadi.

10. Cho'kma 65°S haroratda 4-5 daqiqa davomida quritiladi.

11. Shu probirkaning o'ziga "Ekstra Gen" suspenziyasi 50-100 mkl miqdorda quyiladi va gomogen xolatga kelguncha aralashtiriladi, so'ngra 65°S haroratdada 5 daqiqa davomida termostatga qo'yiladi va yana aralashtiriladi.

12. So'ngra 1 min mobaynida 10000 aylG'min. tezligida tsentrifugalanadi.

13. Supernatant toza probirkaga olinadi, -20°S haroratda saqlanadi.

Ajratib olingan DNK konsentratsiyasi 0,12-0,17 mkgG'mkl ni tashkil qiladi.

"Tez" FX – uslubidan ajratib olingan DNK ni ko'p holatlarda oqsil va

uglevod qoldiqlaridan tozalash kerak. Buni esa Diatom reagentlar to'plamidagi Nucleos suspenziyasi yordamida, uslubning 5 - bosqichidan boshlab tozalash mumkin.

2.2.3. Dneasy Tissue Kit (Germaniya) reagentlar to'plami yordamida DNK ajratish uslubi

Dneasy Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) reagentlar to'plami afzalligi jinsiy voyaga etgan nematodalarning 10 mg to'qimasidan tashqari, juda kichik o'lchamdagi nematodalarning lichinkasi yoki tuxumidan genom DNKsini ajratish olish mumkin (4-rasm). Bunda nematoda to'qimasining kichik bo'lagi ajratib olinadi yoki pipetka bilan 1-2 dona lichinka yoki tuxumi olinadi va 1,5 ml li "Ependorf" probirkasiga solinadi. Namunalar og'irligi 10 mg dan oshmasligi kerak.

1. Biologik materialga 180 mkl ATL buferi solinadi.

2. 20 mkl proteinaza K qo'shiladi va vorteksda 15 sek davomida aralashtiriladi. Probirkalar termostatda 55°S haroratda biologik materialning to'liq parchalanishiga qadar inkubatsiya qilinadi. Namunalarni 1-3 soatga yoki kechasiga 18 soatga qoldirish mumkin.

3. 15 sek davomida vorteks qilinadi, keyin 200 AL buferi qo'shib, 15 sek vorteksda aralashtiriladi, 70°S haroratda 10 minut inkubatsiya qilinadi.

4. So'ngra 200 mkl etanol (96-100% li) qo'shib, vorteksda gomogen eritma hosil bo'lguncha aralashtiriladi.

5. Har bir gomogen ehtiyotkorlik bilan (Dneasy Mini spin column) filtrli epindorf probirkalarga solinib, qopqoqlari berkitilib 1 minut davomida 8000 aylG'min tezlikda tsentrafuga qilinadi.

6. Epindorfga o'tgan toza suyuqlikni 2 ml li probirkalarga o'tkazilib, ustiga 500 mkl AW1 solinib 1 minut davomida 8000 aylG'min tezlikda tsentrifuga qilinadi.

7. Toza suyuqlikni 2 ml li filtrli probirkalarga o'tkazilib, ustiga 500 mkl AW2 bufer solinib filtrdan suyuqlik to'liq ajralguncha 14 000 aylG'min tezlikda 3 minut davomida tsentrifuga qilinadi.

8. Filtrli epindorfni boshqa 1,5 ml li yoki 2 ml li probirkalarga o'tkaziladi va ustiga 50-100 mkl AE bufer yoki distillangan suv solinadi, so'ngra xona xaroratida 2 minut inkubatsiya qilinadi va 8000 aylG'min tezlikda 1 minut tsentrifuga qilinadi. Buferda erigan DNK -20°S haroratda saqlanadi.

9. Elyuat olish jarayonini 8 - bosqichga ko'ra takrorlash mumkin.

1.2.4. HiPurA™ Insect DNA Purification DNK ajratish uslubi

Bu to'plam xasharotlar, bo'g'imoyoqlilar, yumaloq va yassi chuvalchanglar va x.k. tsentrifugallash orqali genom DNK ajratishda qo'l keladi. Hasharotlar odatda suyuq azot bilan maydalandi va proteinaza K bilan lizis qilinadi. Lizisdan so'ng bog'langan DNK HiElute Miniprep (Capped) slikagelli spin kolonka orqali toza holda olinadi. Ikki marta tuz va oqsil qoldiqlari yuviladi va DNK elyutsiya qilinadi. Odatda 50 mg to'qimadan 5-15 mkg DNK olinadi.

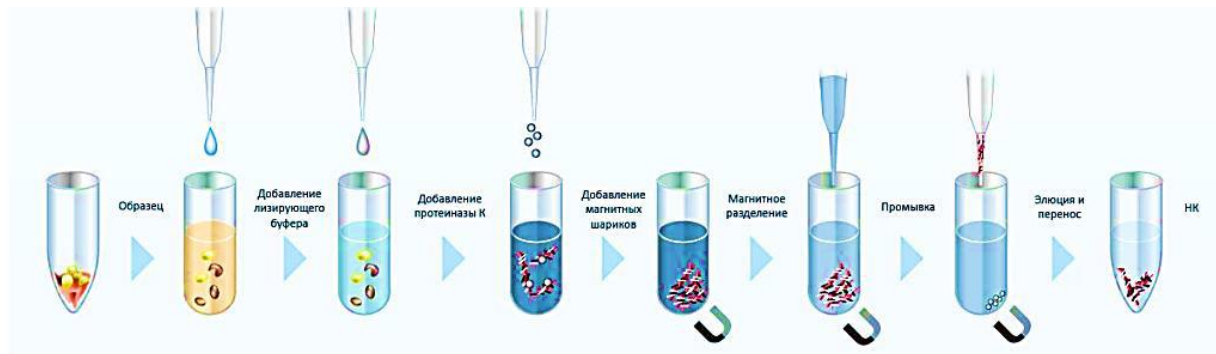
1. **To'qimani eritish:** Eppendorfdagi namunaga 180 mkl Lysis Solution (AL) va 20 mkl protenaza K (20mgG/ml) solinadi. Yaxshilab vorteksda aralashtirib 55⁰S da inkubatsiya qilinadi. To'qima yaxshilab eriguncha 1-3 soatga yoki kechasiga qoldirish mumkin. Eslatma: Agar DNK qoldig'i ahamiyatsiz bo'lsa, keyingi etapga o'tish mumkin.
2. **Lysis reaksiyasi:** Namuna ustiga solamiz 200 mkl lysis bufferini (S1, Lysis Solution) 15 sekund yaxshilab vorteks qilinadi. Keyin 70⁰S da 15 minut inkubatsiya qilinadi (suvli vannada).
3. **Lizisni HiShredderTM o'tkazish:** Lizisni HiShredderTM (DSCA01 – qizil rangli) spin kolonkaga o'tkazib (2 ml probirkaga) va 2 min. 14.000 ob. min. tsentrifuga qilinadi.
4. 3chi bosqichdagi sizib o'tgan fraktsiyani yangi 2 ml li probirkaga o'tkaziladi (devordagi musorlarga tegib ketmasdan).
5. Lizisga 200mkl etanol (96-100%) qo'shiladi va qo'lda 5-10 sekund yaxshilab aralashtiriladi.
6. **Lizisni HiElute Miniprep kolonkaga o'tkazish:** Lizisni HiElute Miniprep spin kolonkaga (DSCA02 - ko'k rangli) o'tkaziladi va 10 000 obg'min 1 minutga tsentrifuga qilinadi, 1 min laboratoriya xaroratida ushlanadi. Pastki qismi to'kib tashlanadi va spin kolonkani 2 ml li probirkaga ko'chiriladi.
7. **Yuvish:** Probirkaga (spin kolonkali) 500 mkl yuvuvchi buffer (Wash solution) qo'shiladi va 10 000 obg'min 1 minutga tsentrifuga qilinadi. Pastki qismi to'kiladi va spin kolonka boshqa probirkaga ko'chiriladi.
8. Unga yana 500 mkl yuvish suyuqligi (Wash sotution) qo'shiladi va 13 000 obg'min 3 minutga tsentrifuga qilinadi. Pastga oqib o'tgan qismi to'kib tashlandi.
9. **DNK Elyutsiya:** Spin kolonkaga 100 (50) mkl Elyutsiya buferi (ET) (DS0040) solinadi va 10 000 obg'min tsentrifuga qilinadi, xona xaroratida 1min turadi.
10. Elyutatni (DNK) kissqa (2-8⁰ S) yoki uzoq (-20⁰ S) muddat saqlashga xolodilnikga qo'yiladi.

MagPurix 12s yordamida nuklein kislotalarni ajratib olish

Bundan tashqari, hozirgi vaqtda nuklein kislotalarni avtomatik ravishda ajratib olish uchun bir necha priborlar ishlab chiqarilgan. **MagPurix 12s** – bu Zinexts (Tayvan) kompaniyasida ishlab chiqarilgan bo'lib, nuklein kislotalar (NK) avtomatik ravishda ajratadigan ish stoli kompakt robot tizimi (4-rasm).(<http://www.skygen.com/zinexts>).

MagPurix 12s yordamida NK ajratib olish uchun 3ta qadam kifoya:

1. Namunalar solinadi, reagentlar solingan kartrij va usukunaga ishlatiladigan materiallar.
2. Shtirix kod skaneri yordamida protokol qilindi va «Start» knopkasi bosiladi. Tizim avtomatik ravishda NK ajrata boshlaydi.
3. Avtomatik ravishda yig'ilgan pribirkadagi NK uskunadan olish.



4-рasm. MagPurix 12s tizimi yordamida NK avtomatik ravishda ajratib olish bosqichlari. NK ajratib olishda moddalarni ajratishda magnit shariklari yordamiga asoslangan.

Nazorat savollari:

4. DNK va RNK ajratishni ta'minlashda qanday asosiy talablar qo'yiladi?
5. DNK ekstratsiya uchun qanday detergentlardan foydalaniladi va uning yo'riqnomasi?
6. "Fenol i xloroform" uslubi afzaligi va kamchiligini tushuntiring?
7. Diatom DNA Prep reagentlari to'plamining afzaligi va kamchiligini ayting?
8. Sorbtsiya usulidan foydalanishda nuklein kislotalarning ajratish va tozalashdagi asosiy bosqichlari qanday?
9. Qaysi maqsadlarda tuzli bufer ishlatiladi?
10. MagPurix 12s yordamida nuklein kislotalarni ajratib olish qanday amalga oshiriladi?
11. Ajratilgan genom DNKsining konsentratsiyasi kaysi asbobda o'lchalanadi?

Асосий адабиёт

1. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Қўшимча адабиёт

1. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун ҳайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент,

6-Mavzu: POLIMERAZA ZANJIRLI REKTSIYA (PZR) USLUBINING ASOSIY TUSHUNCHASI. PZR – AMPLIFIKATSIYA

REJA

Polimeraza zanjirli rektsiya (PZR) uslubini asosiy tushunchasi. PZR uchun kerakli yadro va mitoxondrial markerlarini tanlash. PZR-amplifikatsiya o'tqazish. PZR rejimi.

Tayanch iboralar: *nematodalar, Eppendorf probirkleri, kontaminatsiya, Gel-elektroforez, UF-nuri, TAE, agaroz, bromli etidiy, DNK tozalash to'plami, DNK-markeri.*

PZR-amplifikatsiya uslubining asosiy tushunchasi

Polimeraza zanjir reaksiya (PZR) - *in vitro* amplifikatsiya metodi bo'lib, uning yordamida qisqa vaqt mobaynida muayyan sondagi DNK ketma-ketligini odatdagidan 1000 marotaba ko'proq tanlash yoki ko'paytirish mumkin (Mullis, Faloona, 1987; Sambrook, 2001). Metod mohiyati – probirkada muayyan DNK qismlarini qaytalanuvchi temperatura tsikllarida ko'p marotabali ko'chirish (amplifikatsiya). Amplifikatsiyaning har bir tsiklida yuqorida sintezlangan fragmentlar yana DNK-polimeraza fermenti yordamida ko'chiriladi va DNK fragmentlari o'ziga xos ko'p marotaba kattalashadi (Boldo'reva, 2005).

PZR qo'llanilish sohasi: genom ketma-ketligini yuqori darajali klonlash (Scharf et al., 1986), mitoxondriya va genom DNK larini to'g'ri sekvenerlash (Wong et al., 1987), nukleotid ketma-ketligi o'zgaruvchanligini tahlilash va kasallik qo'zg'atuvchilarni aniqlash (Kwok et al., 1987).

Polimera zanjir reaksiyasini o'tkazish uchun reaksion aralashmada turli xil tarkiblar bo'lishi zarur (Saiki i dr., 1990):

Ikta praymer – su'niy yo'l bilan sintezlangan.

Praymerning nukleotidlar ketma-ketligiga bo'lgan talablar:

1. Ichki ikkilamchi tuzilishning bo'lmasligi;
2. Nukleotidlar tarkibining muvozanatlangan bo'lishi GG'Ts, AG'T va hamma ketma-ketlik bo'yicha to'g'ri taqsimlanganligi;
3. Dimer praymerlar bo'lmasligi uchun, 3'chi oxiri orasida komplementarlikni bo'lmasligi.

Praymerlarning optimal konsentratsiyasi 0.1-0.5 mkM. Praymerlarning yuqori kontsetratsiyasi o'ziga xos bo'lmagan qizdirishga yoki o'ziga xos bo'lmagan PZR-amplifikatsiya mahsulotlari yig'ilishiga olib kelishi mumkin.

DNK-polimeraza termostabilligi (Taq-polimeraza). DNK- polimerazaning umumiy xususiyati shundaki, 5'x3' yo'nalishida nuklein kislotalarning matritsiyalangan sintezini olib borishi. Ko'pchilik DNK-polimerazalar xatolik orqali qo'shilgan nukteotidlarni olib tashlash uchun mo'ljallangan 3'x5' ekzonukleazali faollikga ega bo'ladi. Odatda reaksiya o'tkazish uchun 0.5-0.25 birlikda termostabil polimerazaning *Thermus aquaticus* o'zi kifoya.

2'-dezoksinukleozid-5'-trifosfat aralashmasi (dNGF - dATF, dGTF, dTsTF i dTTF) - Taq-polimeraza yordamida ikkinchi DNK zanjiri sintezi uchun foydalaniladi. Nostabillingan dOTF aralashma DNK polimeraza ishi aniqligini kamaytiradi. dNGF baland konsentratsiyasi Mg^{2+} , ionlari konsentratsiyasini kamaytiradi va DNK polimeraza faolligini pasaytiradi.

Bufer – ma'lum konsentratsiyadagi kation va anionlar aralashmasi bo'lib, reaksiya uchun optimal sharoit yaratadi: stabil rN va eritmaning ion kuchi.

Tahlil qilinayotgan namuna – reaksiya aralashmasiga kiritish uchun tayyorlangan preparat bo'lib, PZR-amplifikatsiyasi uchun nishon hisoblangan DNKni o'zida saqlaydi.

Mg^{2+} ioni - Taq-polimeraza ishi uchun kerakli. Ishchi konsentratsiyalar diapazoni: 0,5-5,0 mM (10 mM - DNK-polimerazani 40-50% ga susaytiradi Mg^{2+} konsentratsiyasining oshishi polimera zanjir reaksiyasining o'ziga xosligiga va samaradorligiga kuchli tasir ko'rsatadi: PZR- maxsulotlar chiqishini ko'paytiradi, lekin praymerlar gibridlanishi xosligi susayadi. Mg^{2+} optimal konsentratsiyasi DNK- matritsasi va praymerlari nukleotid ketma-ketligiga bog'liq. Mg^{2+} dNTF bilan kompleks hosil qiladi, aynan shu komplekslar Taq-polimeraza uchun substrat xisoblanadi. Mg^{2+} konsentratsiyasi ko'tarilishi DNK erish temperaturasini ko'tarilishiga va praymerlar gibridlanishi aniqligini pasayishiga olib keladi.

Tsiklik temperatura rejimi - PZR- amplifikatsiyasida tahlil qilinayotgan DNKdagi qator hodisalar bo'lib muayan temperatura parametrlari taminlanadi. Har bir amplifikatsiya tsikli 3ta bosqichdan iborat (Ro'bchin, 2002):

1. *Denaturatsiya*. Reaktsion aralashmani 95°S gacha qizdiriladi, buning natijasida ikki zanjirli DNK molekulasi echilib ketadi (ajralib) va ikkita bir zanjirli molekula hosil qiladi.

2. *Yumshatish (praymerlarning qo'shilishi, gibridlanishi)*. Praymerlar bir zanjirli DNKga qo'shiladi. Ko'zlangan spetsifik soha chegarasidagi qarama-qarshi DNK zanjirlariga mos keladigan ketma-ketlikka to'g'ri va qarama-qarshi praymerlar komplementar bo'lib qo'shiladi. Har bir juft praymer uchun o'zining yumshatish temperaturasi mavjud bo'lib, u 50-65°S oraliqda bo'ladi. Yumshatish vaqti 20-60 sek.

3. *Elongatsiya (DNK sintezi)*. DNK zanjirining qarama-qarshi yo'nalishda 5'chi oxirdan 3'chi oxirga komplementar qurib bitirilishi. DNKning yangi zanjirlari sintezi uchun 2'- dezoksinukleozid-5'-trifosfat eritmasi material bo'lib xizmat qiladi. Bu bosqichda reaktsion aralashmadagi temperaturani optimum darajasiga olib chiqiladi (72° S). Elogatsiya davom etish vaqti apmlifikatsiya qilinayotgan DNK fragmentining uchunligi yoki DNK-polimeraza fermentining ishlash tezligi bilan belgilanadi. Elongatsiya vaqti odatda quyidagi formula yordamida aniqlanadi: T (elongatsiya) q 1 daqiqa x N (m.j.n. DNK).

Apmlifikatsiyaning temperatura tsikli ko'p marotaba qaytariladi (25 va undan ko'p). Har bir tsiklda sintezlanayotgan DNK fragmentlari ikki marotaba ko'payadi. Tsiklik jarayon natijasi DNK fragmentlarining o'ziga xos eksponentsial ko'payishidir.

Tugallanayotgan qurilish. Odatda PZR- amplifikatsiyasi oxirgi tsiklidan

so'ng qisman sintezlangan PZR mahsulotlarini tugallash uchun reaksiyon aralashmani qo'shimcha ravishda 5-15 daqiqa mobaynida 72°S da inkubatsiya qilinadi (Saiki i dr., 1990).

"Issiq start" ("hot-start") – PZR amplifikatsiyasi reaksiyasidagi nospetsefik mahsulotlarni hosil bo'lishini oldini olish uchun yondashuv hisoblanadi. Uning mohiyati shundan iboratki, probirkada praymerlarni spetsifik yumshatish uchun kerakli sharoit bo'lmagunga qadar reaksiyani boshlanmasligi (Helkunov, 2004).

GTs tarkibi va o'lchamiga qarab, praymerlar muayyan erish temperaturasiga egadirlar. Agar sistema temperaturasi erish temperaturasidan baland bo'lsa, praymer DNK zanjirida saqlanib qolish xususiyatini yo'qotadi va denaturatsiyaga uchraydi. Optimal sharoit ushlanib turilsa, ya'ni erish temperaturasi yumshatish temperaturasiga yaqin bo'lsa, praymer ikki zanjirli molekula hosil qiladi. "Issiq startni" amalga oshirish yo'llaridan biri birlamchi denaturatsiya vaqtida termotsikler chuqurchasiga (lunka) probirkani kiritish (Saiki i dr., 1990).

Bu holatda, agar nospetsefik yumshatish temperatura tsikllanishiga qadar bo'lgan bo'lsa elongatsiya sodir bo'lmaydi, agar komplekslar qizdirilsa DNK-praymer denaturatsiyaga uchraydi, shuning uchun nospetsifik mahsulotlar hosil bo'lmaydi. Keyinchalik, probirkadagi temperatura erish temperaturasiga nisbatan pasayadi va bu spetsefik amplifikatsiya mahsulotlari hosil bo'lishiga olib keladi (Helkunov, 2004).

Ijobiy nazorat- reaksiyon aralashma tarkibiga kiruvchi hamma komponentlar reaksiyani normal o'tishini ta'minlanishiga ishonch hosil qilishga yordam beradi. Buning uchun yumshatish uchun praymerlardan iborat DNK preparatlaridan foydalaniladi: masalan, kerakli organizm DNK si yoki genomning spetsefik klonlangan qismi.

Kontaminatsiya – reaksiyon aralashmaga tashqaridan amplifikatsiya reaksiyalari uchun nishon bo'lib xizmat qiladigan va sohta ijobiy, salbiy natijalarni beradigan DNK molekulasini tushib qolishi.

Salbiy nazorat tajribaning xar bir seriyasida kontaminatsiyani yo'qligiga ishonch hosil qilish uchun foydalaniladi. Salbiy nazorat sifatida bidistillirlangan suvdan foydalanish tavsiya qilinadi.

Reaksiyon aralashmadagi begona DNKni yo'qotish uchun reaksiyon aralashmali (DNK matritsasi yo'q) probirkani ultrabinafsha nurlanishga 10 daqiqa mobaynida duchor qilinadi.

Reaksiyon aralashmadagi begona matritsalarining manbai sifatida bo'lishi mumkin:

- Laboratoriya uskunalari va pipetkalarda qolgan DNK qoldiqlari orqali;
- Namunalar orasidagi qarama-qarshi kontaminatsiya;
- Oldingi PZR maxsulotlari.

Kontaminatsiyani oldini olish va soxta salbiy natijalarni oldini olish uchun quyidagi qoidalarga rioya qilmoq zarur:

•PZR uchun tayyorlanayotgan matritsa, PZRni to'g'ridan-to'g'ri o'tkazayotgan va PZR ni tahlil qilayotgan ish o'rinlarini taqsimlang.

•PZR uchun aralashmani ultrabinafsha lampali laminarlangan shkafda yoki izolyatsiyalangan boksa aralashiring. PZR uchun ishlatiladigan

mikrotsentrifugani, qo'lqoplarni va boshqa uskunalarni ham shu erda saqlang.

- Faqat PZR uchun ishlatiladigan pipetkalarini maxsus g'ovakli filtri bor qopqoqchalarni ishlating.

- PZR ni o'tkazayotganda faqat steril materiallar va yangi perchatkalardan foydalaning.

PZR uchun kerakli yadro va mitoxondrial markerlarini tanlash

Yuqorida aytilgan fikrlardan kelib chiqqan holda ma'lum bo'ldiki, tadqiqotchilarning hamma talablarga javob beradigan yagona marker tanlash mumkin emas. Turlarni to'g'ri aniqlash va ajratish, tur ichidagi va populyatsiyalar ichidagi polimorfizm darajasini aniqlash hamda filogenetik daraxtlar tuzish uchun bir necha markerlardan foydalangan holda amalga oshirildi. Misol uchun simpatirik turlarni ajratish uchun, ya'ni turlar o'rtasida chatishish bor yo'qligini isbotlash uchun yadro va mitoxondrial markerlar foydalanish orqali amalga oshiriladi. Biroq, ideal marker talabini tuzish mumkin [Cruickshank, 2002].

1. U genomda bitta nuxsada bo'lishi kerak. Agarda ko'pnuksali genlardan foydalanilganda, nusxalar nukleotidlar ketma-ketligidan farq qilishi mumkin, hammasidan yomoni, bo'linish va qo'shimchalarni bo'lishi (rRNK kodlovchi ichki transkrib bo'lmagan speyzer genlari), PZR mahsulotlarini vektorda "klonirovanie" ishlarini qilish va keyinchalik bir necha bakterial klonlardan qo'yilgan plazmidalarni sekvenirlash, bu eskirgan keng tahlillarni qilib bo'lmasligiga yoki ko'p xarajatlilikga olib keladi [Patwardhan, 2014].

2. Shunday qilib, keyingi tahlillar uchun qabul qilingan markerlar sifatidagi gen ketma-ketligi, boshqa organizmlarning shu genini ketma-ketligi bilan tekislash protsedurasidan o'tish kerak, tekislash oson amalga oshirilishi kerak. Bu shuni bildiradiki, tahlil qilinadigan ketma-ketlik uzunligi bo'yicha katta farq qilmasligi, qo'shish va bo'linishlar ko'p bo'lmasligi lozim. Biroq, ayrim hollarda ko'rilayotgan sohani tekislash qiyin bo'lishi yoki ikkilamchi tizimdagini qiyoslash (tRNK), bunday ketma-ketliklarni ishlatish mumkin bo'ladi [Kjer, 1995].

3. Ahamiyatga ega bo'lgan ma'lumotni olish uchun almashtirish soni optimal bo'lish kerak. Agar genni evolyutsiyalanishi tez bo'lsa, bu gomoplaziyaga olib keladi, bu olinadigan ma'lumotlarni ishonchliligini pasaytiradi. Boshqa tomondan, konservativ sohaning (masalan, rRNK kodlovchi) yaqin ketma-ketligini taqqoslashda (yoki yaqinda ajralgan turlar) bu genetik tahlil bilan ularning ajratib bo'lmaydi [Patwardhan, 2014].

4. Fragmentlarni amplifikatsiya qilishda ishlatiladigan praymerlar genning konservativ sohasiga mos bo'lishi, chunki o'rganilayotgan sistematik jihatdan uzoq bo'lgan organizmlarni fragmentlarini amplifikatsiya qilish mumkin bo'ladi. Biroq, ular nihoyatda "universal" bo'lmasligi kerak, teskari holatda genomning boshqa sohasini o'ziga xos bo'lmagan amplifikatsiyaga olib keladi [Yli-Mattila, 2000].

Quyida keng tarqalgan yadro va mitoxondrial markerlar ko'rib chiqiladi.

Ribosomal RNK (rRNK) kodlovchi yadro genlari

Ribosomal genlar o'zining universalligi va yuqori konservativ va variabel domenlarini bo'lishi bilan markerlar ichida eng yaxshilari hisoblanib, nisbatan uzoq guruhlarni ham filogenetik aloqalarini o'rganishda foylaniladi [Patwardhan, 2014]. Hamma organizmlarda ribosomalar asosan ikki subbirliklarda, kichik (18S – eukariotlarda va 16S – qolgan hammasida) va katta. Bakteriyalar va arxeobakteriyalarda katta subbirlikning ikki variantda: 5S, 5,8S va 23S rRNKning ichki tizimi katta va kichik subbirliklari, tegishli 10 va 8 variabel sohalarni hosil qiladi. rRNK oqsilkodlovchi genlarga nisbatan kamroq evolyutsiyalaydi [Schmidt, 2007].

16S rRNK – foydalanilgan markerlar ichida birinchilaridan biridir. Birinchi bo'lib, PZR va sekvenirlash davridan oldin, 1960 yillarda Dubnau va hammualiflari 16SRNK ketma-ketligi tahlili uchun *Bacillus* Cohn, 1872 avlodi turlarida qo'llashdi [Dubnau, 1965]. Biroq, Vozaning [Woese, 1987] klassik ishlaridan keyin, bu gen bakteriyalar taksonomiyasida qo'llanila boshladi. Bu genning ketma-ketligi uzunligi 1550 j.n. iborat bo'lib, turli guruh bakteriyalar uchun oligonukleotid “imzolari” xususiyatga ega bo'lib, ham variabel va ham konservativ sohalarni tashkil etadi [Clarridge, 2004]. Hozirgi vaqtda sekvenirlashni yangi avlodlari qo'llagan holda metagenom tadqiqotlardan foydalanilmoqda (odatda 4-5-4 sekvenirlash, bunda o'qish katta uzunlikda bo'ladi).

5S rRNK – 120ta nukleotidli ko'pgina organizmlarning ribosomalarida qantashuvchi yuqori konservativ ketma-ketlik bo'lib, ayrim qo'ziqorinlar, ayrim hayvonlar va ko'pchilik protistlardan tashqari, o'simliklarning filogeniyasini tuzishda foydalaniladi [Szymanski et al., 2002]. Biroq, qisqa razmerda bo'lganligi uchun, ishonchlilik va aniqligi tegishli ishlarda ancha past.

23S rRNK – uzunligi 1000 nukleotiddan oshiq. Uning ketma-ketligi ko'pgina ko'pxujayrali hayvonlarda aniqlangan. Uning ikkilamchi tuzilishini taqqoslash va shu taqqoslash asosida filogeniyasini qurish – filogenetik tahlillar uchun asosiy instrumentdir. Ayrim hollarda bu genning to'liq razmeri emas, uni fragmentlari foydalaniladi (400 nukleotidga yaqin S2-S3 sohalari) [Schmidt, 2007].

18S rRNK – bu genning to'liq razmeri 1800 nukleotidga yaqin bo'lib, filogenetik daraxtlarda keng qo'llaniladi, ayrim hollada esa turni identifikatsiya va ajratishda ishlatiladi. Qolaversa, variabel sohasining bo'lishi bilan u gen yaqin turlarni ajrata olmasligi mumkin, umuman olganda ketma-ketlik etarlicha konservativ. Keyingi vaqtlarda filogenetik analizlar uchun 18S, hamda 23S rRNK genlari ishlatilmoqda. rRNK 18S geni ko'pincha infuzoriylar va boshqa sodda hayvonlar turlarini aniqlash maqsadida metagenom tahlilida qo'llanilmoqda.

Shunga qaramasdan, ribosomal genlar shak shubhasiz ko'pkopiyali, qoidadan holi sifatida ulardan faqat birkopiyali genlar markerlari sifatida ko'rsatishadi. Ularning foydalanishi mumkin uning yuqori konservativ tufaylidir, genning hamma nusxalari bir xil. Xromosomada, genlar, rRNK kodlovchi genlar oralig'ini takil qiluvchi ichki transkrib speyseri deyiladi (Internal transcribed spacer, ITS).

ITS – kodlanmaydigan ketma-ketlik, shuning uchun ularda ribosomal va oqsilkodlovchi genlarga nisbatan polimorfizm nihoyatda yuqori. Ularning praymerlari universal va har qanday taksonomik guruhlar tegishli fragmentlarini amplifikatsiya qilishda foydalanish mumkin [Persson, 2000], masalan, suv o'tlari, yuqori o'simliklar va umurtqasiz hayvonlar, undan tashqari, qo'ziqorinlar uchun ham ishlab chiqilgan, qaysiki molekulyar shtrixkod sifatida qo'llanilmoqda.

Shu o'xshash universal praymerlar bog'liqligi, ularning ketma-ketligi rRNK kodlovchi tegishli 28, 18 ili 5,8 konservativ ketma-ketliklari genlariga mos keladi. Bu markerlarni kamchiligi, birinchi navbatda, bir necha ketma-ketliklarni tekislashni qiyinligi, chunki, ularning uzunligi turli turlarda sezilarli darajada farq qiladi, yo'qotilish va qo'yilishlar bo'lishi mumkin. Shu sababli har doim ham ulardan foydalanila olmaslik mumkin, masalan turarni ajratishda, chunki ITS va rRNK kodlovchi genlari ko'pnushali, lekin ribosomal genlardan farqi, bitta organizm bir necha nushada ITS bo'lishi, uzunligi va yo'qotilish va qo'yilishga ega bo'lishi bilan farqlanadi [Jousson, 2001]. Biroq, bu hamma organizmlarda ham odir bo'lmasligi mumkin, ko'p hollarda bu markerdan yaqin turlarni ajratishda foydalanish mumkin bo'ladi.

Mitoxondrial genlar

Standart gen sifatida 5' fragmenti, oqsil mitoxondriyasining tsitoxrom-oksida kodlovchi 1 subbirligi (SO1 yoki cox1) tanlandi, qaysi-ki ilgari turlar o'rtasidagi o'garuvchanlik darajasini yaxshi ko'rsatgan [Moore, 1995]. CO1 geni tadqiq qilingan mitoxondrial genomlarning hammasida ishtirok etadi, u 1540 nukleotidlarni o'z ichiga oladi, qiyosiy tadqiqotlar uchun odatda uning variabel qismi yaqin 650 j.n. foydalaniladi. Uning amplifikatsiyasi uchun standart paymerlari yaratildi [Folmer, 1994; Zhang, Hewitt, 1997].

Yadro genlariga nisbatan mitoxondrial genlar bilan ishlash anchagina qulay. Bu genlarni engilgina amplifikatsiya qilinadi (ayniqsa buzilgan materiallar), har bir xujayrada 100-10000 mitoxondriylar bor. Mitoxondrial genomning polimorfizm darajasi yadro genomiga nisbatan ancha yuqori (5-10 marta), intronlar saqlamaydi. 2000 yillardan boshlab mitoxondrial gen bilan turlarning aniqlash va ajratishni isbotlashga oid ko'pgina ishlar chop etildi. Asosiysi tadqiqotchilar uchun qulayligi, lekin markerning etarli darajada sifatligidir. Shuning uchun-ki SO1 genning fragmentlari faqatgina turlarni aniqlashda (hayvonlarda) foydalanish mumkin, bu borada ko'plab ishlar bajarildi.

Bunda CO1- fragmenti bo'yicha ichki va turlar o'rtasidagi farq 10 martagacha farq qilishi (10xSST - species-screening threshold) taklif etildi yoki turlar ketma-ketligi o'rtasidagi farq taxminan 2-3 %, turlarni aniqlash chegarasidir [Hebert, 2004b]. Ikkinchi kriteriy o'zaro (retsiproknoy) monofil bo'lish, jumladan ketma-ketlikni o'rni to'ldirib bo'lmaslikdir.

PZR-amplifikatsiyasini o'tkazish

Misol uchun, ishda 18S rDNK geni fragmenti amplifikatsiyasi eukariot praymerlari (James et al., 2006) standart usul yordamida o'tkaziladi (jadval 6.1).

1. Ishni boshlashdan avval reatsiyaning DNK- polimerazadan tashqari xamma komponentlarini eritib oling va bir qancha vaqtga muzga joylashtirib

turing. 0,2 ml probirkani muzga joylashtiring, 34,8 mkl bidistillirlangan suv, 5 mkl 10X Taq-bufer, 5 mkl 2,5 mM MgCl₂, 1 mkl 2 mK 2'-dezoksinukleozid-5'-trifosfat, 1 mkl dan to'g'ri va teskari praymerlar, 2 mkl DNK matritsasi, 0,2 mkl Taq-polimerazasi qo'shing, yakuniy xajm 50 mkl ni tashkil etadi (jadval 6.2).

2. 0,2 ml probirkadagi reaksiya aralashmasini vorteksdan aralashiring va mikrotsentrifugada 15 sek mobaynida tomchilarni cho'kindi xolatiga keltiring.

3. Termotsikler dasturini o'rnatish (jadval 6.3).

4. Termotsikler lunkasiga probirkadagi reaksiya aralashmasini joylashtiring va termotsikler qopqog'ini mahkam yoping.

5. PZR-amplifikatsiyasi tugallangandan so'ng namunalarni agarozda geldagi elektroforez metodi yordamida tahlil qilish mumkin. Amplifikatsiyalangan namunani -20°C saqlash zarur.

Jadval 6.1.

18S rDNK geni fragmenti amplifikatsiyasi uchun spetsifik praymerlar

Praymer nomlanishi	Nukleotid ketma-ketligi 5'→3'
Universal eukariot to'g'ri praymeri 18S-SR1R(1F)	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT
Universal eukariot teskari praymeri 18S- SR1(578R)	ATTACCGCGGCTGCT

Jadval 6.2

PZR uchun mo'ljallangan reaksiya aralashmasi tarkibi

Reaksiya komponentlari	Xajm, mkl
10X Taq-bufer	5
2,5 mM MgCl ₂	5
0,2 mK 2'-dezoksinukleozid-5'-trifosfat	1
20 mK to'g'ri praymer *	1
20 mK teskari praymer *	1
DNK matritsasi	2
Taq-polimeraza 5 edG' mkl	0,2
Bidistillirlangan H ₂ O	34,8
Reaksiyaning yakuniy xajmi	50

3.2. PTsR rejimi

18S rDNK geni fragmenti amplifikatsiyasi ish rejimi uchun quyidagi tartibda amalga oshiriladi (jadval 3).

18S rRNK geni fragmenti amplifikatsiyasi rejimi

Temperatura	Vaqt	Bosqichlar tasnifi
95° S	5 min	Dastlabki qizdirish
95° S	30 sek	denaturatsiya
60° S	30 sek	yumshatish
72° S	1,5 min	sintez
72° S	2 min	Yakuniy sintez
10° S		Saqlash

} 35 tsikl

Nazorat savollari:

1. Polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) nima?
2. PZR asosiy printsiplari qanday?
3. PZR tsikli qaysi etaplardan iborat?
4. Reaksiya aralashmasi qaysi komponentlardan iborat bo'ladi?
5. PZR qo'yishda nima maqsadda nazorat qo'yiladi?
6. PZR qo'yishda qaysi yadro markerlari ishlatiladi?
7. PZR- laboratoriyasi qanday tuziladi?
8. PZR usulini qanday amaliy ahamiyati bor?

Asosiy adabiyotlar

2. McPherson M.J., Moller S.G. PCR. The Basics 2nd edition: Taylor & Francis Group, 2006. - 305 p.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar

2. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction / K.B. Mullis, F A. Faloona // Meth. Enzymol. - 1987. - V.155. - P.335-350.
3. Scharf, S.J. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences / S.J. Scharf, G.T. Horn, H.A. Erlich // Science. - 1986. - V.233, №4768. - P.1076-1078.
4. Wong, C. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA / C. Wong, C.E. Dowling, R.K. Saiki et al. // Nature. - 1987. - V.330, №6146. - P.384-386.
5. Kwok, S. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection / S. Kwok, D.H. Mack, K.B. Mullis et al. // Virol. - 1987. - V.61, №5. - P.1690-1694.
6. Болдырева, М.Н. Генодиагностика заболеваний: качественный и

7 mavzu: Agarozaga gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi. Ribosomal va mitoxondrial DNK tozalash

REJA:

Agarozaga gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi. Agarozaga gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o'tqazish. DNK kontsentratsiyasini o'lchash. DNK- tozalash to'plamlari yordamida PZR mahsulotini tozalash va ajratish

Tayanch iboralari: *Gel-elektroforez, UF-nuri, TAE, agarozaga, bromli etidiy, DNK tozalash to'plami, DNK-marker.*

Agarozaga gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi

DNK elektroforezi - analitik metod bo'lib, ajratish, tenglashtirish va DNK qismlarini tozalash uchun foydalaniladi. DNK elektroforezi gorizontal yo'nalishda amalga oshiriladi (Sambrook, 2001, Osterman, 1996).

DNK molekulasini shakarfosfat qoldig'i manfiy zaryadlangan, shuning uchun DNK zanjiridagi manfiy zaryadlangan katoddan elektor maydon kuchi ostida musbat zaryadlangan anod tomonga harakatlanadi, Uzunroq bo'lgan molekullar sekinroq ko'chadi, chunki gelda ushlanib qoladi, qisqaroq molekullar tezroq harakat qiladi (Sambrook, 2001).

Natijalarni vizuallashtirish maqsadida erigan agarozaga bromli etidiy kiritiladi (Dretzen et. al., 1991).

Olingan DNK qismlari o'lchamlari tahlili uchun chiziqli DNK markeridan foydalaniladi.

Elektor maydon kuchlanishi katta ahamiyatga ega, shu sababli taqsimlanish samaradorligi pasayishi kuzatiladi. DNK qismlarini ajratishda eng maksimal samaradorlikka erishish maqsadida, kuchlanish 1 santimetr gelda 5 voltdan oshmasligi zarur (Girvitz et.al., 1990).

Gelning tarkibiga quyidagilar kiradi: 1X TAE (rN 8,1), agarozaga, bromli etidiy. Gelning foiz ulushiga qarab har xil tarkibiy qismlar qo'shiladi. Gelning foiz ulushi DNK qismlari tarqalish uzunligi orqali tanlanadi (7.1 jadval). 18S rRNK gen tahlili uchun (uzunligi taxminan 600 j.n.) 2% li agarozaga geli optimal hisoblanadi.

7.1 jadval

Gelda agarozaga kontsentratsiyasining nisbati va tahlil qilinayotgan DNK fragmentining optimal razmeri

Geldagi agarozaning miqdori (%)	DNK qismlari o'lchami (ming j.n, Kb)
0,3	50-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Agaroza gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o'tkazish

1. Gelni elektroforez vannachasiga quyishdan avval namunalarni kiritish uchun orgoynadan taroqchalarni o'rnatib chuqurchalar (lunka) yasab oling. Tarqchalarning pastki tishchalari umumiy hajmi 50 ml bo'lgan gelning asosidan 2 mm oralig'ida joylashsin (umumiy hajmi 150 ml bo'lgan gelning asosidan 1 mm oralig'ida joylashsin) (7.5-7.6 rasmlar).

2. 50ml 2%li agaroza gelini tayyorlash uchun 50 ml 1X TAE va 1 g agaroza qo'shiladi. 1X TAE boshlang'ich konsentratsiyasi 50X TAE eritmasidan tayyorlanadi. (Tris, 0,5M EDTA pH 8,0, muzlatilgan uksus kislotasi).

3. Agaroza tutqichini 1X TAE eritmasi yordamida qaynash darajasida shunday qizdiringki, eritma gomogen holatiga kelsin, yani agarozaning erimagan zarralarini bo'lmasin.

4. Bu jarayondan so'ng 50°S darajasida sovuting va 0,5 mkl bromli etidiy qo'shing.

5. Hamma gel hajmini elektroforez vannachasiga quying. Gel sovugandan so'ng (30-45 daqiqa xona haroratida), astalik bilan taroqchalarni olib tashlang va elektroforez vannachasiga 1X TAE buferini gel to'liq qoplanmagunga qadar quying.

6. Namunalarni 6X Loading Dye buferi (tarkibi: 4% li to'q sariq G, 0.03% li bromfenol, 0.03% ksilen- tsianol FF, 15% Fikolla 400, 10 mM tris-HCl pH 7,5 i 50 mM EDTA pH 8,0) bilan shunday aralastirinki, namunadagi yakuniy konsentratsiya 1X bo'lsin va mikropipetka yordamida geldagi chuqurchalarga (lunka) quying.

7. Olingan DNK qismlari hajmini tahlil qilish uchun chuqurchalarning (lunka) biriga 2,5 mkl li DNK-markerini *DirectLoa^{drM} Wide Range DNA Marker* qo'shing.

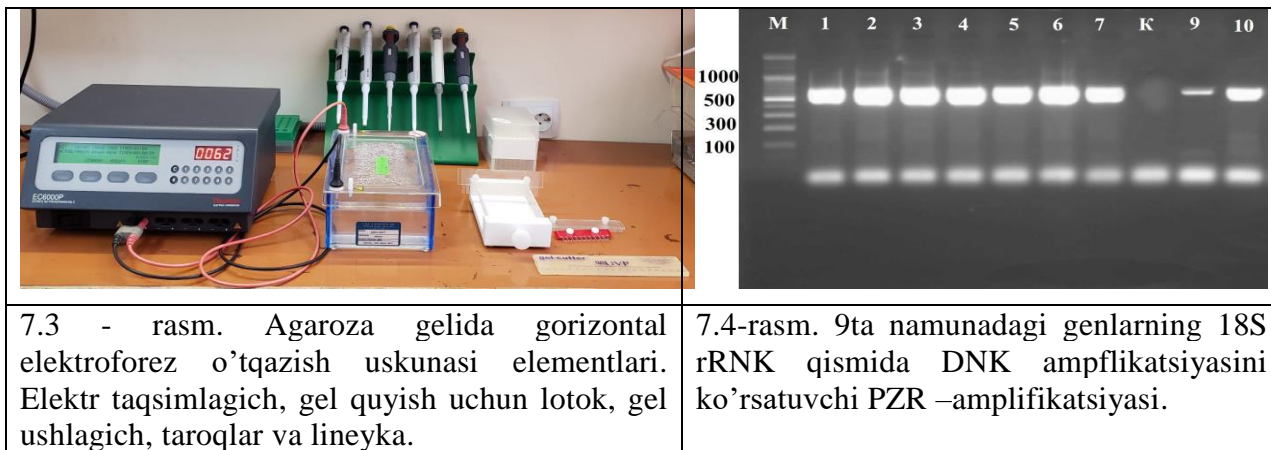
8. DNK ajratishni uchun kuchlanish 1 santimetr gelda 5 voltdan oshmasligi zarur.

9. Elektroforez yakunlangandan so'ng gelni ultrabinafsha va transilyuminator nurlarida ko'ring va rasmga oling, natijalarni qayd qiling.

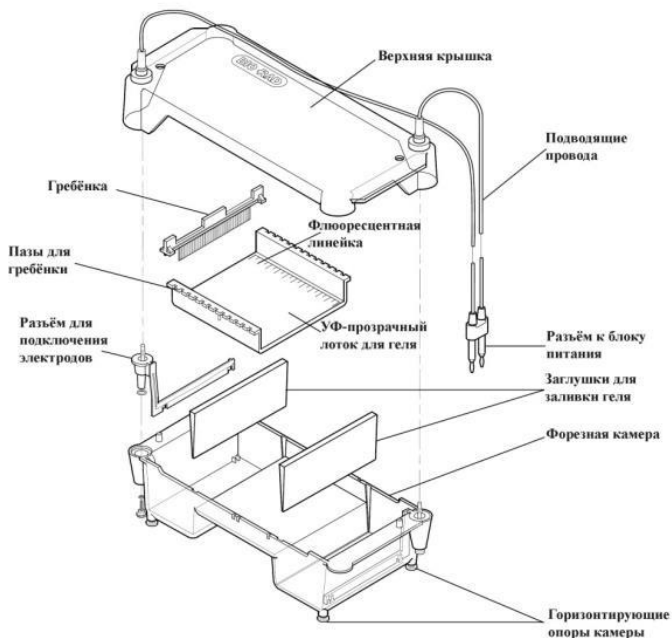
Diqqat! Qo'z to'r pardasining ultrafiolet nurlari shikastlamasligi uchun DNK zonasini tekshirishda transilyuminatorning komplekt shishalari orqali

yoki maxsus himoya ochkilari yordamida amalga oshiriladi.

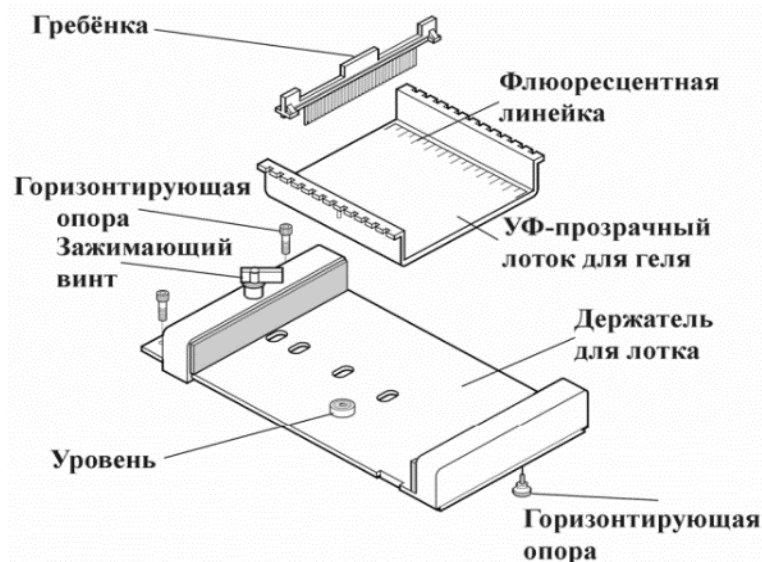
10. 7.3 -rasmда hamma namunadagi genlarning 18S rRNK qismida DNK ampflikasiyasini kursatuvchi PZR mahsulotdagi tahlili misol tariqasida keltirilgan. Genning 18S rRNK qismi ampflikasiyalangan nukleotidlar ketma-ketligi uzunligi taxminan 500 p.ni tashkil qiladi.



11. 7.4-rasmда hamma namunadagi genlarning 18S rRNK qismida DNK ampflikasiyasini kursatuvchi PZR mahsulotdagi tahlili misol tariqasida keltirilgan. Genning 18S rRNK qismi ampflikasiyalangan nukleotidlar ketma-ketligi uzunligi taxminan 500 p.n tashkil qiladi.



7.5 - rasm. Agaroz gelida gorizontaal elektroforez o'tqazish uskunalarini elementlari



7.6 - rasm. Gel quyish uchun lotok va taglik.

12. Kerakli PZR fragmentini skalpel yordamida geldan kesib oling, 1.5 ml li tsentrifugalangan probirkaga joylashtiring va tarozida o'lchab oling. PZR fragmentlarini ishlab chiqaruvchi tomonidan tavsiya qilingan turli xil metodikalar yordamida ajratib olish mumkin.

13. 7.5-jadvalda PZR- amplifikatsiyasi tahlili jarayonida kelib chiqishi mumkin bo'lgan muammolar va ularning echimi ko'rsatilgan.

Jadval 7.5

Kelib chiqishi mumkin bo'lgan muammolar va ularning echimi

Muammo	Ehtimoli bor sabab	Mumkin bo'lgan muammo echimi
DNK gelda bo'yalgan yo'lchadek ko'rinadi.	Mahsulot degradatsiya qilinadi.	Nukleazalar yordamida ifloslanish markazini toping, material uzoq vaqt saqlanmaganligiga ishonch hosil qiling, PZR ni qayta qiling
	Amplifikatsiyani o'ziga xos bo'lmagani.	O'ziga xos bo'lgan praymerlar tanlab oling yoki yanada optimal reaksiya sharoitini tanlang
	DNK matritsasi ortiqchasi	Kamroq miqdorda DNK matritsasini oling.
Geldagi o'ziga xos bo'lmagan chiziqchalar	Amplifikatsiyani o'ziga xos bo'lmagani	O'ziga xos bo'lgan praymerlar tanlab oling yoki yanada optimal reaksiya sharoitini tanlang

	DNK matritsasi ortiqchasi	Kamroq miqdorda DNK matritsasini oling
PZR- amplifikatsiyasi mahsulotdagi chiziqchalar, ozgina yoki yo'qligi bo'lishi	Xira bo'yalgan gel	Agarozaga ko'proq miqdorda bromli etidiy qo'shing
	DNK matritsasini namunada yo'qligi	DNK matritsasini qo'shing
	Praymerlar inqirozga uchragan praymero'	Yangi praymerlar sintez qiling
	Praymerlar DNK matritsada yumshamasligi	O'ziga xos bo'lgan praymerlar tanlab oling
	PZR o'tkazish uchun noto'g'ri sharoit	Yanada optimal reaksiya sharoitini tanlang
	Amplifikator buzulganligi	PZR ni boshqa amplifikatorda o'tqizing

DNK-tozalash to'plamlari yordamida PZR maxsulotini tozalash va ajratish

Agaroza gelidan DNK ajratish uchun ishlatiladigan DNK tozalash to'plami (Tsitokin). PZR natijasidan olingan DNK larni tozalash uchun 0,8 % 100 ml li agarozaga gel tayyorlanadi. Elektroforezdan qolgan 21 mkl PZR mahsulotlarini 4 mkl kraska bilan aralashtirib, xar bir na'muna aralashmalarini gel katakchalariga solinib, 100 Vt kuchlanish bilan 1–1,5 soat elektroforez kamerasida yurgiziladi.

Elektroforez kamerasidan gelni olib, transillyuminatorida himoya ko'zoynagini taqqan holda, geldagi DNK nuqtalarini (pik) bir martalik lezviya yordamida kesib olinadi. Kesilgan gel bo'laklarini 1,5 ml-li eppendorf idishlariga solinadi. Shuni aloxida e'tiborga olish kerakki eppendorf idishlarini tarozida tortish va xar bir eppendorfnii tartib bo'yicha raqamlash kerak.

PZR maxsulotlarini geldan tozalashda "Tsitokin" firmasida ishlab chiqarilgan to'plamlardan foydalanildi.

1. Eppendorfdagi gelni eritish uchun gel og'irligiga teng 10 mg bo'lsa 10 mkl bog'lovchi aralashma solindi.

2. Termostatga 65 °S ga 15 daqiqa gel eriguncha saqlandi.

3. Termostatdan eppendorfnii olib xona xaroratida 1 daqiqa saqlanadi va vorteks qilinadi va 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

4. Tsentrifugadan eppendorflarni olib yangi filtrli eppendorflarga probirka ichidagi aralashma solinadi va yuvuvchi aralashmadan 700 mkl solinadi, 1 daqiqa 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

5. Eppendorf ichidagi aralashma olib tashlanadi va 500 mkl yuvuvchi aralashma solinib, 5 daqiqa 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

6. Eppendorfdagi filtrli kalonka boshqa yangi 1,5 ml-li eppendorfga o'tkaziladi va 50 mkl elyuat aralashmasi yoki tozalangan suv solindi, 1 daqiqa xona xaroratida saqlandi, so'ng 1 daqiqa 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

7. Eppendorflardan filtrli kalonkalarni olib tashlanadi, eppendorfnii ostki qismiga tushgan geldan tozalangan maxsulotni -20°S sovutgichga olib qo'yiladi.

Geldan tozalangan PZR maxsulotlarini sikvenirlash uchun nukleotidlarini

o'qitish uchun TsKP «Genom» («Genotex») firmasiga berildi.

PZR maxsulotlarini sikvenirlashga berishda PZR maxsulotlarini kontsentratsiyasi aniqlanadi va shu kontsentratsiyaga qarab DNK 1 ml eppendoflarga solinib, ustiga PZRda ishlatilgan praymerlardan beriladi.

Nazorat savollari:

1. Elektroforez usuli asosida qanaqa printsip yotadi?
2. 100 ml 2.0 %-li agarozaga geli tayyorlash uchun qancha og'irlikdagi agarozaga kerak bo'ladi?
3. DNK fragmenti razmeri 350 va 150 j.n ajratish uchun qanday kontsentratsiyali agarozaga kerak bo'ladi?
4. Elektroforez o'tqazilganda DNK molekulalari nimaga va qaysi tomonga haraktlanadi?
5. Elektroforez jarayonida agarozaga gelida DNK molekulalari tezligi qanday omillarga bog'liq?
6. Nima uchun gelda hosil bo'lgan pufakchalardan qochish kerak?
7. Geldagi DNK ko'rinishi (vizualizatsiya) nimani hisobidan amalga oshadi?
8. Elektroforez jarayonida geldagi DNK molekulalari xarakatini qanday qilib nazorat qilish mumkin?
9. Elektroforezning qaysi bosqichida perchatka bilan ishlash kerak va nega?

Asosiy adabiyotlar

Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.

Қўшимча адабиётлар

1. Dretzen, G. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels / G. Dretzen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // Anal. Biochem. - 1991. - V.112. - P.295-298.
2. Girvitz, S.C. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels / S.C. Girvitz, S. Bacchetti, A.J. Rainbow, F.L. Graham // Anal. Biochem. - 1990. - V.106. - P.492-496.
3. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.

8-mavzu: MOLEKULYaR KLONLASH. LIGIRLASH REAKTsIYaSI. KOMPONENT XUJAYRALARNI TAYYoRLASH VA TRANSFORMATsIYa QILISH

REJA

Ligirlash reaksiyasi va uni o'tkazish uchun kerakli komponentlar. *Escherichia coli* xujayrasini o'stirish. *E. coli* komponent xujayralarni tayyorlash.

E. coli xujayrasini genetik transformatsiyasini o'tkazish. Bakterial koloniyalarni PTsR-skrining qilish.

DNK klonlash (genlarni klonlash) – berilgan ketma-ketlikdagi DNKni ajratish jarayoni bo'lib, *in vitro* da uning ko'pchilik nusxalarini olish uchun ishlatiladi. DNK ni klonlash ko'pincha genlarni saqlovchi bo'laklarni amplifikatsiyalash uchun qo'llaniladi.

LIGIRLASH REAKTSIYASI

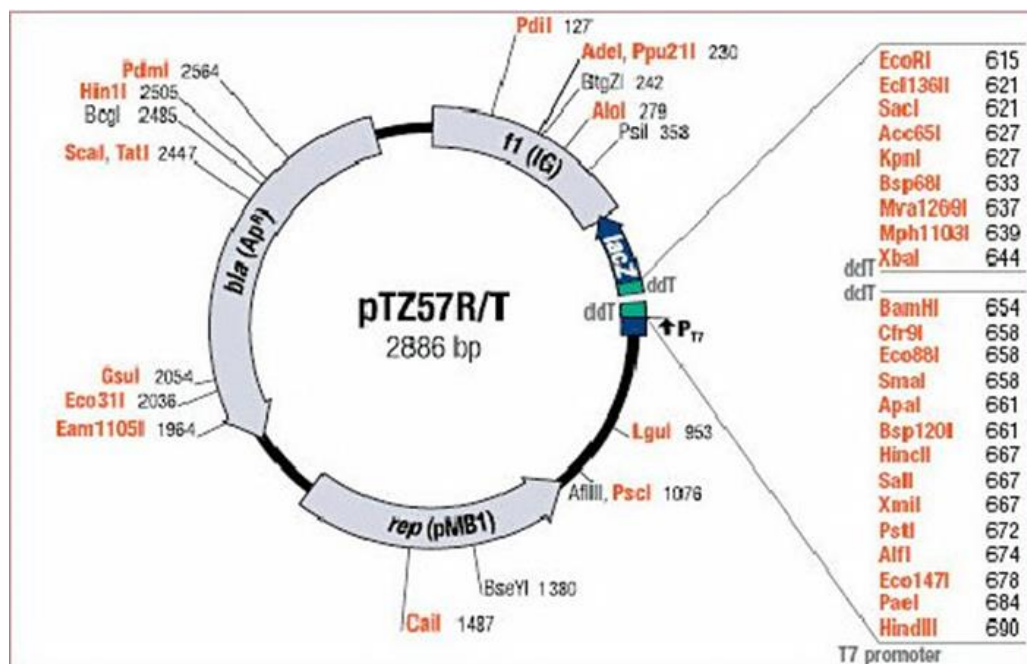
Ligirlash reaksiyasi - bu DNKning ikki molekulasini kovalent birikmasidir. Ushbu reaksiya uchun quyidagi tarkibiy qismlar talab qilinadi: T4 DNK- ligaza fermenti, 10X T4 DNK Ligaza buferi, plazmid (vektor) *pTZ57RG'T* va geldan ajratilgan PZR- DNK fragmenti.

T4 ligaza - DNK fermenti - bu molekulyar og'irligi 55,3 kDa bo'lgan monomerik polipeptid. Ferment DNKning 5'-fosfat va 3'-gidroksil terminal guruhlari o'rtasidagi fosfodiefir aloqasini shakllanishini katalizlaydi. Yopishqoq uchlarni bog'lashdan tashqari, u ikki qanotli DNK parchalarini uchlari bilan birlashtirish reaksiyasini katalizatsiyalashga qodir. T4 fagadan rekombinant klonlangan DNK ligaza genini olib yuruvchi *Escherichia coli* shtammidan ajratilgan. Optimal ta'sir harorati 16°S . Saqlash harorati -20°S

Bufer 10X T4 DNK - Ligaza ligirlash reaksiyasi uchun maqbul sharoitlarni ta'minlaydi. U quyidagilardan iborat: 400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT (ditiotreitol), 5 mM ATF. Buferni (-20°S) ATF parchalanishining oldini olish uchun, tamponni mayda alikotlar ichida, qayta-qayta erimasdan saqlash kerak.

Plazmid (vektor) pTZ57RG'T (8.1-rasm) PZR parchasini TG'A klonlash va keyinchalik *E. coli* bakterial hujayralariga aylantirish uchun ishlatiladi. *pTZ57RG'T* vektorining afzalliklari:

- Bu chiziqli ikki qatorli DNK molekulasi;
- Ikki zanjirning 3'-uchida dideoksitimidin (ddT) mavjud bo'lib, bu ligirlash paytida vektorning qayta ishlanishiga to'sqinlik qiladi va klonlash mahsulotlarining yuqori mahsuldorligini va yot mahsulotlarning past darajasini ta'minlaydi;
- Klonlash samaradorligini baholash uchun ko'k-oq testdan foydalanishga imkon beradi;
- Ko'p cheklangan endonukleazlarni tanib olish joylari mavjud, bu esa klonlangan parcha bilan keyingi manipulyatsiyalarni amalga oshirishga imkon beradi;
- M13G'pUC praymerini to'ldiruvchi nukleotidlar ketma-ketligini o'z ichiga oladi, bu DNK parchasini sektsiya qilish yoki PZR tahlilini o'tkazish imkonini beradi;
- T7 promotorlikka ega, u kiritilgan DNK parchasini *in vitro* da transkripsiya qilishga imkon beradi.



8.1-rasm. PTZ57RG'T vektorli xaritasi (www.helikon.ru)

Vazifa 5. Ligirlash reaksiyasining bayoni.

1. Ishga kirishishdan oldin, reaksiyaning barcha tarkibiy qismlarini eritib oling (8.1-jadval), T4 DNK ligazasidan tashqari, ularni muzlatgichga 4 ° S haroratda vaqtincha saqlash uchun qo'ying.
2. 1,5 ml naychani muz ustiga qo'ying, 3,7 mkl agarozadan tozalangan PZR bo'lagi, 0,5 mkl 10X T4 DNK ligaza buferini, 0,5 mkl PTZ57RG'T plazmidni va 0,3 mkl T4 DNK qo'shing. ligazalar, oxirgi hajmi 5 mkl.
3. Reaksiya aralashmasini 1,5 ml naychada xona haroratida 1 soat davomida inkubatsiya qiling.

8.1-jadval

Ligirlash reaksiyasi uchun reaksiya aralashmasining tarkibi

Reaksiya tarkibiy qismlari	Hajm, mkl
Plazmid (vektor) PTZ57RG'T	0,5
DNK-ligaza buferi T4 10X	0,5
PZR-DNK fragmenti	3,7
DNK-ligaza T4	0,3
Yakuniy reaksiya hajmi	5

ESCHERICHIA COLI HUJAYRASINI O'STIRISH

E. coli shtampi XL1-Blue hujayralarini o'stirish uchun 1 turdagi oziqlantirish vositasidan foydalanish mumkin: LB (Luria-Bertani muxiti) va LB - agarlangan

(mos ravishda 8.2-8.3-jadvallar).

8.2-jadval

LB (pH 7.5) tarkibi

Komponent nomi	Miqdor
Tripton	10 gG'l
Hamirturush ekstrakti, tuz saqlamagan, tip D	5 gG'l
NaCl 5M	10 gG'l
Deionlangan suv	1 l

8.3. jadval

Agarlangan LB muhiti tarkibi

Komponent nomi	Miqdor
Tripton	10 gG'l
Hamirturush ekstrakti, tuz saqlamagan, tip D	5 gG'l
NaCl 5M	10 gG'l
Agar	5 gG'l
Deionlangan suv	1 l

***E. COLI* KOMPETENT XUJAYRASINI TAYYOURLASH VA TRANSFORMATSIYA QILISH**

Transformatsiya - ularga yot DNKlarning kirib borishi natijasida hujayralarning irsiy xususiyatlarining o'zgarishi. DNKni o'zlashtira oladigan hujayralar holati kompetentsiya holati deyiladi. Odatda, kompetentli hujayralarning maksimal soni logaritmik o'sish fazasi (eksponentsional faza) oxirida kuzatiladi. Ushbu faza hujayra bo'linishining doimiy maksimal darajasi bilan ajralib turadi, hujayralar hajmi va ko'plab bakteriyalar tarkibidagi protein miqdori ham doimiy bo'lib qoladi.

Kompetentlik holatida bakteriyalar avtolizin, endonukleaza 1 va DNKni bog'laydigan oqsil sintezini faollashtiradigan maxsus past molekulyar og'irlikdagi proteinni (vakolat omili) ishlab chiqaradi. Avtolizin hujayra devorini qisman yo'q qiladi, bu DNKning u orqali o'tishiga imkon beradi, shuningdek bakteriyalarning osmotik zarbaga chidamliligini kamaytiradi (Grant, 1980). Kompetentlik holatida metabolizmning umumiy darajasi ham pasayadi. Bakterial konvertsiya uchun DNK ikki qatorli bo'lishi kerak, uning uzunligi 450 juft nukleotidlardan kam emas. Jarayon uchun maqbul pH miqdori 7 ga teng.

***E. coli* XL-Blue shtammining tavsifi:** Genotip: recA1, gyrA96, thi- 1, hsdR17, supLE44, relA1, lac [F, proAB, lacI^rZAM15, Tn10(Tet^R)]. Idish: Tetratsiklin bilan suyultirilgan agarlangan LB (konsentratsiyasi 12,5 mgG'ml). Suyuq muhit: LB.

Shtamm ko'k va oq sinovlarni o'tkazishga imkon beradi. Restriksiya tizimi qisman ishlaydi. Plazmid va fagemidlarni etishtirish. F^r epizomiga tetratsiklin

qarshilik geni belgilanadi. Shu bilan birga, plazmidni ajratish uchun suyuqlik tarkibiga tetratsiklin qo'shilmaligi kerak, bu bakterial hujayralar devori bilan bog'liq muammolarni keltirib chiqaradi va tsentrifuga orqali cho'ktirishda ular birlashadi.

Vazifa 1. CaCl₂ usuli yordamida kompetentli *E. coli* hujayralarini tayyorlash (Cohen et al., 1972).

1. Kompetentli hujayralarni tayyorlash uchun, 37° C haroratda 16-20 soat davomida Petri idishlarida o'stirilgan, diametri 2-3 mm bo'lgan *E. coli* shtampli XL-Blue bakterial koloniyasini tanlang va uni LB vositasi bilan flakonga o'tkazing.
2. 37° C da 3 soat davomida termostatda inkubatsiya qiling, shundan keyin 25 ml kolba idishdan 2ta sterillangan sovutilgan polipropilen probirkalarga o'tkazing va muz ustida 10 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.
3. Keyinchalik, probirkadagini 10 minut davomida 4°C da, 6 ming aylanmada tsentrifuga qiling, so'ngra suyuqlikni cho'kgan ostki qismini ehtiyotkorlik bilan chiqindi stakanga to'kib tashlang va uni ag'darmasdan filtr qog'oziga probirkani qoldiq suyuqlikni yo'qotish uchun tepadan pastga qaratib joylashtiring.
4. Har bir probirkada tarkibida 10 mM MgCh va 5 mM CaCl₂ ni o'z ichiga olgan tayyorlangan va sovutilgan 15 ml eritma bilan resuspenziya qiling.
5. Olingan aralashmani 10 minut davomida 4°C da, 6000 aylanada tsentrifuga qiling, so'ng suyuqlikni ostki qismini olib tashlang, har bir probirkadagi qoldiqni miqdorini oldindan tayyorlangan va sovutilgan 0,1 M CaCh eritmasidan 2 ml solib resuspenziya qiling.

Vazifa 2. *E. coli* hujayralarining genetik transformatsiyasini o'tkazish

1. Har bir 1,5 ml tsentrifuga probirkalariga 5 daqiqa davomida oldindan sovutilgan probirkalardan 200 mkl kompetentli hujayra eritmasidan qo'shiladi hamda oldingi bosqichlarda olingan 2 mkl ligatsion aralashmani qo'shiladi.
2. Ligirlash reaksiyasi mahsulotlari bilan aralashirilgan kompetentli hujayralar eritmasini 30 daqiqa davomida muzda saqlanadi, keyin suv hammomida 42°C haroratda 90 sekundgacha qizdiriladi, so'ng probirkadagi transformatsiya qilingan hujayralarni tezda muzga qayta o'tkaziladi.
3. Keyin 800 mkl LB muhitini qo'shiladi va 37°S 1 soat davomida shaykerda inkubatsiya qilinadi.
4. Inkubatsiyadan so'ng bakteriyalarni tarkibida ampitsillin (100 mgG/ml konsentratsiyada), tetratsiklinni (12,5 mgG/ml konsentratsiyasida), 40 mkl 100 mM IPTG va 40 mkl 1 mM X-GAL bo'lgan selektiv muhitga eking.
5. Idishlarni 37° C haroratda 14-16 soat davomida inkubatsiya qiling.

BAKTERIAL KOLONIYALARIDA PZR-SKRININGI O'TKAZISH

O'sib chiqqan oq koloniyalarda biz uchun qiziqarli bo'lgan genom - plazmida qo'shimchasi borligi tekshirish kerak. Buning uchun koloniyalarda PZR-tekshiruvini o'tkaziladi. 8.4-jadvalda PZR-skriningi uchun ishlatiladigan reagentlar keltirilgan. Reaksiyani o'rnatish tartibi PZR amplifikatsiyasi bilan bir xil, namunadagi DNK o'rniga faqat bakterial koloniya qo'shiladi (Sambrook et al., 2001).

Vazifa 3. Koloniyalarni PZR-skriningi va agaroz gel elektroforezi yordamida PZR-amplifikatsiyasi mahsulotlarini tahlil qilish

1. Koloniyaning bir qismini steril tish tozalagich yoki mikropipetka uchligi yordamida PZR reaksiya aralashmasi bo'lgan probirkaga o'tkazing.
2. Keyin, uchlikni (yoki tish tozalagich) reaksiya aralashmasi bo'lgan probirkaga tushiring va koloniyalarni ampitsillin va tetratsiklin bilan birga yangi idishga eking.
3. Idishni 14-16 soat davomida 37° C haroratda inkubatorga qo'yingg.
4. PZR-amplifikatsiyasi rejimi, 4-jadvalga qarang.

Jadval 8.4

PZR-skriningi uchun reaksiya aralashmasini tarkibi

Reaksiya komponentlari	Xajm, mkl
10X <i>Taq</i> -buferi	2
2,5 mM MgCl ₂	1
0,2 mkM 2'-dezoksinukleozid-5'-trifosfatlari	0,2
20 mkM to'g'ri praymer*	0,2
20 mkM teskari praymer*	0,2
Taq-polimeraza 5 edG'mkl	0,05
Bidistillangan H ₂ O	6,35
Yakuniy reaksiya hajmi	10

* praymerlarning nomi va ketma-ketligi 8.5-jadvalda keltirilgan.

8.5-jadval

pTZ57R|T plazmid tarkibidagi fragmentni PZR-amplifikatsiyasi uchun ishlatiladigan praymerlar (astarlar)

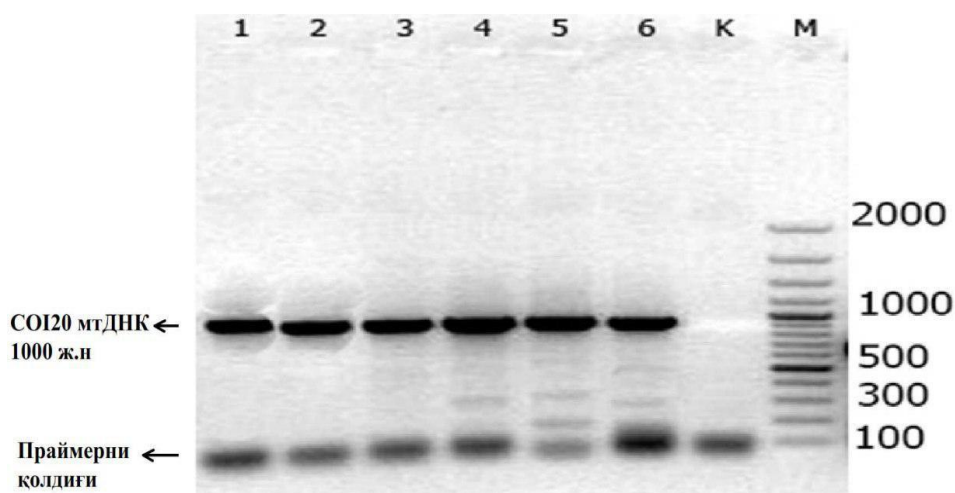
Praymerlar nomi	Nukleotidlar ketma-ketligi 5' [^] 3'
pUCG'M13 Forward	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
pUCG'M13 Reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

PZR-amplifikatsiyasi tugagandan so'ng, namunalarni 2% agaroz gelida elektroforez yordamida tahlil qiling.

Misol sifatida 8.1-rasmda bitta namunadagi koloniyalarning PZR- skriningi ko'rsatilgan.

Keyingi ishlar bizda qiziqish uyg'otadigan rekombinant plazmidlarni o'z ichiga olgan PZRni musbat koloniyalari bilan olib boriladi.

Bakteriyalarni 15 ml probirkaga tarkibida ampitsillin (100 mgG/ml konsentratsiyada) bo'lgan 5 ml muhitda kiritiladi va inkubatorida 14-16 soat davomida 37 ° C da kuchli aralashtirish bilan inkubatsiya qilinadi.



8.1 - rasm. *E. coli* koloniyalarini PZR-skrining natijalarini 2% agarozaga geli elektroforez yordamida tahlil qilish.

1 - ijobiy nazorat (pTZ57R|T plazmidiga kiritilgan COI mtDNK genining bir bo'lagi), 2-6 - tahlil qilingan koloniyalar, K – PZR-amplifikatsiyasi mahsuloti vektorlari qo'shmasdan, M - DNK markeri (DNA Lader Mix).

Bakterial shtammlarni uzoq muddatli saqlash:

E. coli hujayralarini ikki haftadan ko'proq vaqt davomida 4° C haroratda saqlash tavsiya etilmaydi, koloniyalarni tez-tez qayta ekish tavsiya etilmaydi, chunki bu rekombinant plazmidlarning genetik beqarorligiga olib keladi va o'z-o'zidan paydo bo'lgan mutatsiyalar ehtimolini oshiradi. Past haroratlarda (-12° C dan -80° C gacha) uzoq muddatli saqlash uchun hujayralarga krioprotektor (glitserin) qo'shiladi, bu hujayra ichida muz kristallarining paydo bo'lishiga imkon bermaydi.

E. coli bakterial kulturasini uzoq muddatli saqlash uchun tayyorlash:

Namunani kriokonservatsiya qilish uchun ("drenajlash" ni tayyorlash) toza probirkaga (hajmi 1,5 ml), 0,5 ml steril 80% glitserinni 0,5 ml bakteriyalar kulturasiga qo'shing. Vorteksdan aralashtiring. Muzlating va - 80 ° C haroratda saqlang.

9- MAVZU: PLAZMIDA DNKSI AJRATISH. RESTRIKTSION TAHLIL

REJA

Plazmida DNKsini Fermentas Gene to'plamlari yordamida ajratish. Restriksiya reaksiyasini o'tkazish printsiplari.

PLAZMIDA DNKNI AJRATISH

Inkubatsiyadan keyin plazmida DNKsini bakterial hujayralardan ajratish kerak. Ishlab chiqaruvchi tomonidan tavsiya etilgan tartibda turli xil to'plamlar yordamida bakterial hujayralardagi plazmida DNKsini ajratib olish mumkin.

Vazifa 1. Fermentas Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit # K050 to'plamida plazmida DNKsini ajratish

1. 1,5 ml bakteriya kulturasini 1,5 ml tsentrifuga probirkasiga o'tkazing, 30 sekundda maksimal tezlikda (13,0 ming aylanish tezligi) tsentrifuga qiling, mikropipetka yordamida supernatantni olib tashlang.
2. Cho'kmaga 250 mkl Buffer P1 qo'shing (- 4°C da saqlanadi), cho'kma erimaguncha vorteksda aralashiring.
3. 250 mkl Buffer P2 lizis buferini qo'shing (tarkibida SDS va NaOH ionlarini mavjud detergent; qo'shilganda hujayra membranasi yo'q qilinadi), 1,5 ml probirkani 6 marta ag'darilgan holda aylantiring. Vorteksda aralashmang!
4. 350 mkl neytrallovchi bufer Buffer P3 (tarkibida natriy yoki kaliy atsetati mavjud) qo'shing, 1,5 ml probirkani 6 marta ag'darilgan holda aylantiring.
5. Maksimal tezlikda 5 daqiqa davomida tsentrifuga qiling.
6. Ehtiyotkorlik bilan supernatantni sorbentli kolonkaga o'tkazing. Kolonkani 2 ml tsentrifuga probirkasiga joylashtiring.
7. Kolonkani 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsentrifuga qiling. 2 ml probirkadagi tsentrifugatni (cho'kmani) to'kib tashlang.
8. Kolonkaga 500 mkl yuvish bufferi Buffer PB (tarkibida C₂H₅OH) qo'shing.
9. Kolonkani 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsentrifuga qiling. 2 ml probirkadagi tsentrifugatni to'kib tashlang.
10. Kolonkaga 750 mkl yuvish buferini Buffer PE qo'shing.
11. Kolonkani 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsentrifuga qiling. 2 ml probirkadagi tsentrifugatni to'kib tashlang.
12. Yuvish bufferini to'liq olib tashlash uchun kolonkani yana 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal tezlikda tsentrifuga qiling.
13. Kolonkani yangi 1,5 ml tsentrifuga probirkasiga o'tkazing, kolonkaga 50 mkl elyutsiya buferini Elution Buffer qo'shing. Xona haroratida 1 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.

14. Kolonkani 1,5 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsentrifuga qiling. Plazmada DNKsi 1,5 ml probirkada qoladi, kolonkani tashlab yuboring.
15. To'plam bilan ajratilgan plazmid DNKsini $Q\ 2^{\circ}C$ dan $Q\ 4^{\circ}C$ gacha haroratda yoki $-15^{\circ}C$ dan $-25^{\circ}C$ gacha haroratda saqlash kerak.

RESTRIKTSION TAHLIL

Restriktaza (cheklov) fermentlari - bu ikki zanjirli DNKdagi ma'lum bir ketma-ketlikni tan oladigan va sayt ichidagi yoki yonidagi DNKni gidroliz qiladigan endonukleazlar. Kamida 1 ming restriktaza fermentlari ma'lum. Restriktaza fermentlarining 3 tipga ajratiladi:

I tip va III tip - zanjirida ikkita faoliyatni amalga oshiruvchi oqsil molekulasi, restriktaza va modifikator. Restriktaza ATF energiyasini talab qiladi.

II tip - 2 turdagi proteinlar: restriktaz va modifikatsiyalovchi fermentlar. Restriktaza ATF talab qilinmaydi.

Vazifa 2. Restriktaza reaksiyasi tahlili

1. Ishga kirishishdan oldin reaksiya tarkibiy qismlarini eritib oling (9-1 jadval), restriktaza fermentlaridan tashqari (9-2-jadval) va vaqtincha saqlash uchun $4^{\circ} S$ ga muzga qo'ying.
2. 1,5 ml probirkani muz ustiga qo'ying, 8 mkl plazmada DNK (pTZ57R|T 18S rDNK geni qo'shilishi bilan), 0,5 mkl EcoRI fermenti, 0,5 mkl BamHI fermenti va 1 mkl 10x React Buffer 0 buferini qo'shing. Reaksiya aralashmasining yakuniy hajmi - 10 mkl.
3. Barcha tarkibiy qismlarni qo'shgandan so'ng, reaksiya aralashmasi 1,5 ml probirkada, 37 soat davomida 1 soat davomida inkubatsiya qiling.
4. DNK namunalari restriktaz tahlilidan keyin 0,8% agarozga geliga qo'ying (3-topshiriqqa qarang), qo'llash uchun maxsus buffer qo'shing – 6X Loading Dye, shunda qo'llash uchun namunadagi oxirgi konsentratsiyasi 1X bo'lishi kerak.

Masalan, 4-rasmda 0,8% agarozga gelidagi elektroforez yordamida plazmada DNKni restriktaz bo'linish natijalari tahlili ko'rsatilgan.

9-1-jadval.

Ligirlash reaksiyasi uchun reaksiya aralashmasining tarkibi

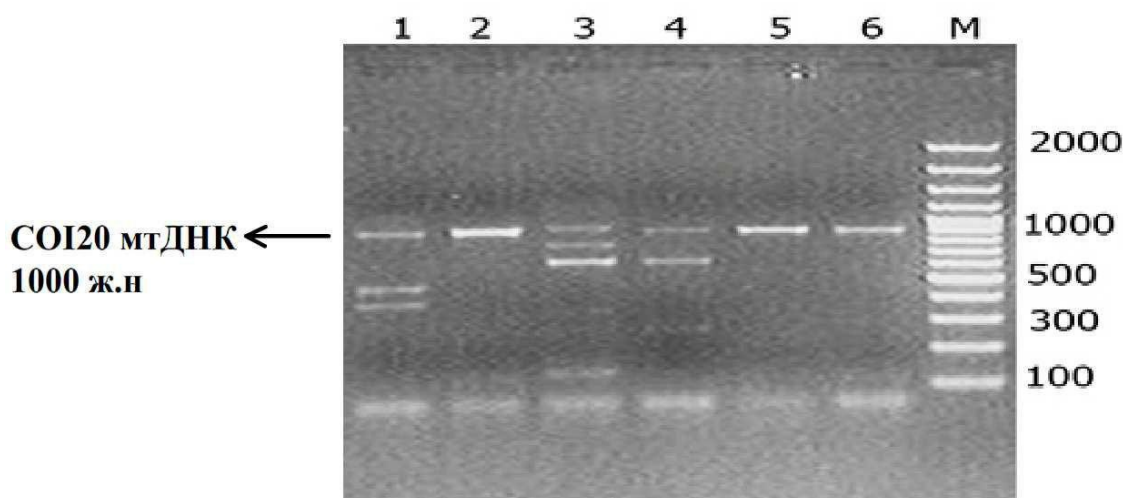
Reaksiya tarkibiy qismlari	Xajm, mkl
EcoRI	0,5
BamHI	0,5

10x React Buffer 0	1
Plazmida DNKsi	8
Yakuniy reaksiya hajmi	10

9-2-jadval.

Ishda ishlatiladigan restriktaza fermentlari

Restriktaza	Saytni tanish	Manba	Buf er eritmasi
EcoR1	G [^] AATTC CTTAA [^] G	<i>E. coli</i> shtammi, klonlangan genini tutuvchi <i>ecoRIR</i> - <i>E. coli</i> RY13	Buffer EcoR1 yoki Buffer Tango
BamH1	G [^] GATCC CCTAG [^] C	<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> H shtammi	Buffer BamH1 yoki Buffer Tango
Alu I	AG [^] CT	<i>Arthrobacter luteus</i> bakteriya shtammi	Blue 10 ^x Buffer yoki Buffer Tango
HAE III	GG [^] CC	<u><i>Haemophilus aegyptius</i></u> shtammi	Buffer R yoki Buffer Tango



6-rasm. 0,8% agarozaga gelida plazmida DNKsini elektroforez orqali restriktaz bo'linish natijalarini tahlil qilish. 1-6 - tahlil qilingan namunalar, M - DNK-marker.

10-MAVZU. SEKVENIRLASH – DNKNING BIRLAMCHI NUKLEOTIDLAR KETMA-KETLIGINI ANIQLASH. NUKLEOTIDLAR KETMA-KETLIGI ASOSIDA ORGANIZMLARNI IDENTIFIKATSIYA QILISH

REJA:

PZR-amplifikatsiyaning asimmetrik reaksiyasini fluorestsent nishonli

nukleotidlar yordamida tashkil etish (sekvenirlash reaksiyasi)

PZR-amplifikatsiya reaksiyasidagi asimmetrik fragmentlarni tozalash

Blastn programmasi yordamida ko'plab tekislash ishlarini olib borish.

Tayanch iboralar: *Sekvenirlash, NCBI, Blast, BioEdit, ClustalW2, Clustal Omega* programmalari.

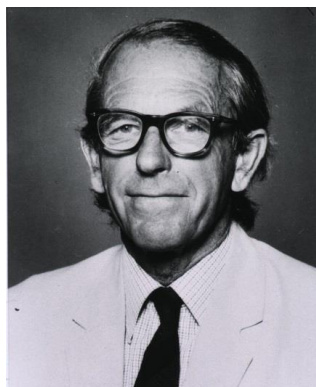
PZR-amplifikatsiyaning asimmetrik reaksiyasini fluorestsent nishonli nukleotidlar yordamida tashkil etish (sekvenirlash reaksiyasi)

Molekulyar genetikaning rivojlanishi biotexnologiyaning taraqqiyoti uchun katta turtki bo'lib xizmat qildi. Ushbu yo'nalishning negizida yangi mahsulotni yaratish yoki avvaldan ma'lum bo'lgan mahsulotni genetik materialni ko'chirib o'tkazish yo'li bilan olish masalasi yotadi. Hozirgi davrda biotexnologiya turli biologik faol moddalarni sanoat asosida ishlab chiqarilishida keng qo'llanilmoqda (Venter et al., 2001; Glick, Pasternak, 2002).

Mahalliy adabiyotlarda nuklein kislotalarni ketma-ketligini rasshifrovka qilish sekvenirlash deb ataladi (ingl. Sequencing – ketma-ketlikni aniqlash). Hozirgi vaqtda sekvenirlash (avtomatik sekvenator) Sendjer usulida bo'lib, keng tarqalgan, bu uchun ko'pgina kommersiyali naborlar ishlab chiqarilmoqda.

Avtomatik DNK sekvenirlash printsipi aniq vaqt tartibida fluoretsentlangan mahsulotlarni elektroforetik ajratish, o'ziga xos terminatsiya sekvenirlash reaksiyalari va ularning detektsiyasini o'z ichiga oladi (Inoue et al., 1998). Detektsiya gelning pastki qismida, DNK qismlarining lazer nuri yordamida bo'yoq molekulari qo'zg'alishi natijasida amalga oshiriladi. Ajratish maxsus moslama, avtomatik DNK sekvenatori yordamida amalga oshiriladi. Birinchi avtomatik DNK sekvenatori 1987 yil Applied Biosystems firmasi tomonidan ishlab chiqilgan.

Mazkur sekvenirlash usuli 1977 yili F. Sendjer tomondan taklif etilgan (8-rasm).



8-rasm. Frederik Sendjer – inglialik bioximik, ikki marta ximiya bo'yicha Nobel mukofoti laureati: Insulinda aminokislotalar ketma-ketligini aniqlagani uchun (1955 y.) va DNKni sekvenirlash usulin ishlab chiqargani uchun (1980 y.)

Avtomatik DNK sekvenatori maxsus kompyuter dasturlari yordamida boshqariladi. Masalan, Applied Biosystems firmasi moslamasi yig'ish dasturi va malumot tahlili bilan birga qo'shiladi. Elektroforetik bo'linish tugallangandan so'ng, Data Collection dasturi yordamida oldindan yig'ilgan malumotlar o'ziga xos dastur yordamida tahlilga yuboriladi. Bunda u yoki bu nukleotidlar asosidagi

terminantlangan DNKning tegishli fragmentlarining nisbiy balandik cho'qqisi aniqlanadi va buzilganlari olib tashlanadi (Alphey, 1997).

Avtomatik DNK sekvenirlashidagi fluotsentlangan mahsulotlarni ajratish terminantlangan sekvenirlash reaksiyalarida, elektroforezdan tashqari kapillyar-gel elektroforezi keng qo'llaniladi (Sambrook et. al., 2001). Unga yuqori sezuvchanlik, kapillyarning juda kichkina ichki diametri natijasi hisoblanagan yuqori bo'linuv tezligi, kabi xususiyatlari mos keladi. Dastlabki ishlarda kapillyar elektroforezini amalga oshirish uchun oddiy poliakrilamid geli xizmat qilgan (Lario et al., 1997). Biroq uning o'zgaruvchanligi, havo pufakchalarining hosil bo'lishi kabi kamchiliklari metodning unumdorligini ko'rinar darajada pasaytirardi. Chiziqli poliakrilamid usulidan foydalanish quyidagi muammolarning echimi bo'ldi va bu metodning samaradorligini oshirishga xizmat qildi. (Inoue et al., 1998).

Fluotsentlangan terminantlangan nukleotidlar yordamida PZR amplifikatsiyasi assimetrik reaksiyalarini tashkil qilish (sekvenirlash reaksiyasi) (2 mavzuga qarang).

Sekvenirlash reaksiyasidagi PZR bosqichlari uchun mo'ljallangan reaksiyalar aralashmasi komponentlari 6-jadvalda ko'rsatilgan. Sekvenirlash reaksiyasidagi PZR bosqichlari uchun mo'ljallangan termotsikler tartibi 14-jadvalda ko'rsatilgan. DNK sekvenirlash M13G'pUC(-20) kabi standart praymerlar yordamida yoki ABI Prism 310 Genetic Analyzer avtomat sekvenatori yordamida o'tqiziladi. Praymerlarni Sintol (Rossiya) korxonasi sintezlagan.

Jadval 6

Sekvenirlash reaksiyasidagi PZR bosqichlari uchun mo'ljallangan reaksiyalar aralashmasi tarkibi.

Reaksiya komponentlari	Hajmi, mkl
2,5X Ready Reaction Premix	0,5
TMS Buffer 5X	3,75
3,3 mkM Praymer	1
DNK	1
Bidistillirlangan suv	13,75
Reaksiyaning yakuniy hajmi	20

Jadval 7

Sekvenirlash reaksiyasini o'tkazishda temperaturalar davri tartibi.

Temperatura	Vaqt	Bosqichlar tasnifi
96° S	1 min	dastlabki qizdirish
96° S	10 sek	denaturatsiya
55° S	50 sek	yumshatish

} 35 давр

60° S	4 min	sintez
10° S		saqlash

DNK- Sekvenirlashda praymerlarning nukleotid ketma-ketligini

Praymerning nomlanishi	nukleotid ketma-ketligini 5'→3'
Sekvenirlash uchun praymerning T7 promotor qismi	TAATACGACTCACTATAGGG
Sekvenirlash uchun to'g'ri praymer M13G'pUC (-20)	GTAAAACGACGGCCAGTG

PZR amplifikatsiyasi assimetrik reaksiyalari fragmentlarini tozalash.

1. PZR-fragmentlari saqlangan probirkaga 2 mkl 125 mM EDTA, 2 mkl 3M natriy atsetat va 70 mkl 95% etanol qo'shing.

2. Aralashmani xona sharoitida 15 daqiqa mobaynida inkubatsiya qiling so'ngra aralashmani vorteksda aralashtiring.

3. Aralashmani 30 daqiqa mobaynida 20°S da inkubatsiya qiling.

4. 20 daqiqa mobaynida 13.3 ming daqG'ay tsentrifugalang.

5. Keraksiz suyuqlikli mikropipetka yordamida astalik bilan olib tashlang.

6. Cho'kindiga 100 mkl 70 % li etanol va 5 daqiqa mobaynida 13.3 ming daqG'ay tsentrifugalang.

7. Keraksiz suyuqlikli olib tashlang va probirkalarni 37°S termostatda ochiq holda quriting.

8. Keraksiz suyuqlik bug'langandan so'ng 20 mkl Hi- Di formamida qo'shing.

9. Aralashmani 20 sek davomida vorteksda aralashtiring.

10. Probirkadagi aralashmani termotseklarga joylashtiring.

- 2 daqiqa mobaynida 95° S gacha qizdiring;

- Saqlash uchun 4° S gacha sovuting.

11. Probalar joylashgan probirkalarni termotsiklerden chiqargandan so'ng, qisqa vaqt mobaynida (20 sek) tsentrifugalab, tomchilarni yo'qotib oling va probani mahsus sekvenirlash uchun mo'ljallangan probirkaga joylashtiring.

12. Sekvenirlash natijalariga BioEdit dasturlash paketi yordamida ishlov beriladi. Sekvenlangan xromotogramma tahlili uchun Chromas dasturidan foydalaniladi. Misol tariqasida 6-rasmda BioEdit dasturlash paketi erdamida sekvenlangan xromotogramma tahlili kursatilgan. 18S rRNK geni qismidagi birlamchi nukleotidlar ketma-ketligini (uzunligi 417 p.n.):

>7a

```
CGAGTGGCGTTTAGCCACACCAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATG
CCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGCGCGCTACTGAAGGAATCAGCG
TGGATGCCTCCCTGGCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTT
CGTGCTAGGGATTGGGGCTTGTAATTCTTCCCCATGAACGAGGAATTCC
```

CAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGT
 ACACACCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTTCAGTGAGGGCCTCG
 GATTGGTCTCGGTCTGGTGC GCAAGTGCCGGCACCGCTGGCCGAGAAG
 AAGCTCGAACTCGATCGCTTGGAGAAAGTAAAAGTCGTAATAAGGTTT
 CCGTAGGTGAATCTGCGGAAGGATCATTA



6 rasm. BioEdit dasturi yordamida sekvens xromotogrammasi namunası.

Birlamchi nukleotidlar ketma-ketligi tahlili asosida organizmni identifikatsiyalash

Organizmlarning identifikatsiyalash odatda nukleotidlar ketma-ketligi tahlili asosida, BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ko'p marotabalik to'g'rilash dasturi yordamida malumotlar bazasida GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) <http://www.embl.org> yoki DNA Data Bank of Japan (DDBJ) <http://www.ddbj.nig.ac.jp> o'tkaziladi.

BLAST (ingl. *Basic Local Alignment Search Tool*) - *birlamchi nukleotidlar va oqsillar ketma-ketligini solishtirishga yordam beruvchi algoritm*. BLAST algoritmi asosidagi kompyuter dasturlari birlamchi strukturasi (ketma-ketligi) yoki malumotlar bazasidagi fragmenti malum bo'lgan oqsil yoki nuklein kislotalar gomologlarini izlab topishga imkoniyat yaratadi (Altschul et

al., 1990; 1997).

BLAST seriyasidagi dasturlar. Biologik ketma-ketlikni tahlil qilish uchun 3 ta asosiy yondashuv mavjuddir:

Nukleotidlar ketma-ketligi tahlili. DNK yoki RNK nukleotidlari ketma-ketligi bilan ishlashga yordam beruvchi algoritmlar to'plami. Blastn («Nucleotide BLAST») dasturi turli xil malumotlar bazasiga ega bo'lgan nukleotidlar ketma-ketligini solishtirish va gomologik ketma-ketlikni izlab topishga yordam beradi. Blastn yordamida tahlil boshqa algoritmlarga nisbatan ko'p vaqtni oladi, lekin past gomologli ketma-ketliklarni solishtirish imkonini beradi. Megablast 95% gacha yaqin qarindosh nukleotidlar ketma-ketligini solishtirishga mo'ljallangan. Dastur ko'p nukleotid ketma-ketliklarni yagona ketma-ketlikka yig'adi va BLAST baza malumotlarini qidira boshlaydi. Keyin megablast individual ketma-ketlikni solishtirish va statistik ishlov berish uchun olingan malumotlarga ishlov bera boshlaydi. Discontiguous megablast dasturi nukleotidlar ketma-ketligini bazi bir mos kelmaslikka etiborga va olmaslikka yo'l qo'yadi, u farqlanuvchi lekin ketma-ketlikni taqqoslash uchun mo'ljallangan.

Oqsil ketma-ketligi tahlili. Aminokislotalar ketma-ketligi bilan ishlashga yordam beruvchi algoritmlar to'plami. Standart Blastp («Protein BLAST») dasturi turli xil malumotlar bazasiga ega bo'lgan aminokislotalar ketma-ketligini solishtirish va gomologik ketma-ketlikni izlab topishga yordam beradi. Boshqa dasturlar singari Blastp dasturi mahalliy gomologik qismlarni topadi. Quyidagi algoritm yordamida dasturi turli xil malumotlar bazasiga ega bo'lgan aminokislotalar ketma-ketligini solishtirish va gomologik ketma-ketlikni izlab topish mumkin. psi-blast («Position-Specific Iterated BLAST») algoritmi oqsillar ketma-ketligi tahlilida yanada sezgir algoritm bo'lib, uni oqsillarning uzoq qarindoshlari yoki oqsillarning yangi oila azolarini topish uchun foydasi bo'ladi. Quyidagi algoritmdan Blastp standart algoritmi ketma-ketlikni topa olmaganda yoki gipotetik oqsillarga aloqa yuborganda, muayyan ketma-ketlik bilan o'xshashlik topilganda foydalaniladi. Phi-blast («Pattern-Hit Initiated BLAST») foydalanuvchi bergan shablonni o'zida saqlashi va bir vaqtda foydalanuvchi bergan so'rov bilan gomolgik o'xshash bo'lgan oqsillar ketma-ketligini qidirish uchun mo'ljallangan. Sdart («Protein homology by domain architecture») algoritmi oqsillar tarkibini o'rganadi. U xamma oqsillar tarkibini theprotein nr malumotlar bazasida tahlil qiladi va qidiruv olib boradi.

Translyatsiya qilingan ketma-ketliklarni taxlil qilish. Maxsus dastur bo'lib, nukleotid ketma-ketlikni aminokislota ketma-ketligiga translyatsiya qilishga imkon beradi. Blastx («Translated query vs protein database») oldin nukleotid ketma-ketlikni aminokislota ketma-ketligiga translyatsiya qiladi, keyin oqsillar

gomologik ketma-ketlikni malumotlar bazasida izlab topishga yordam beradi. Blastx o'qish uchun nukleotid ketma-ketliklarni xamma 6ta xoshiyasini translyatsiya va tahlil qiladi. Shunday qilib, algoritm de novo sekvenirlangan nukleotid ketma-ketlikni va EST- ketma-ketlikni («Expressed Sequence Tags») tahlil qiladi. Bu algoritm boshqa nukleotid Blast ga nisbatan yanada sezgir algoritm hisoblanadi, chunki solishtiruv oqsil ketma-ketligi darajasida olib boriladi. Boshqa tarafdin, tblastn («Protein query vs translated database») algoritmi aksincha oqsillar ketma-ketligini izoxli bo'lmagan nukleotidlar ketma-ketligida qidirishga yordam beradi. Va nixoyat, tblastx («Translated query vs translated database») algoritmi, yangi genlarni nukleotid ketma-ketlikda identifikatsiya qilishga foydali hisoblanadi.

BLAST algoritmlari yordamida, nukleotid ketma-ketligi turli xil organizmlar genomi malumotlari bazasida tahlil o'tkazish mumkin: umurtqalilar (odam, sichqon, makaka va boshqalar), umurtqasizlar (drozofila, *Caenorhabditis elegans* va boshqalar), o'simliklar (arabidopsis, makkajo'xori va boshqalar), zamburug'lar (aspargill) va viruslarda.

BLAST ishlash printsipt. BLAST seriyasidagi dasturlar ma'lum qismlardagi ketma-ketlikni solishtirish uchun mahalliy to'g'irlash olib boradi. Nukleotid yoki aminokislotalar keima-ketligi BLAST serveriga kelgandan so'ng, BLAST xamma qismlar (oqsillar uchun bu 3 aminokislotalardan iborat ketma-ketlik qismi, nuklein kislotalar 11 nukleotidlardan iborat) va o'xshash qismlar jadvalini tuzadi. Keyin malumotlar bazasida qidiruv amalga oshiriladi va gomologlar topilganda ularning o'lcham qismlari uzaytiriladi (4 va undan ortiq aminokislota, 12 va undan ortiq nukleotidlar) avval oraliqsiz, keyin orliqlardan foydalanilgan xolda. Xamma mumkin bo'lgan o'lcham qismlari uzaytirilgandan so'ng, malumotlar bazasidagi yanada gomologik ketma- ketlik juft to'g'irlanadi va olingan malumot SeqAlign strukturasiida qayd qilinadi.

O'rganilayotgan ketma-ketlik va BLAST malumotlar bazasidagi ketma-ketlik o'xshashligi darajasi va axamiyatini aniqlash maqsadida Max ident (maksimal o'xshashlik), Query coverage (so'rov qamrovi maydoni) va E qiymat (expected value, E-value) (kutilgan qiymat) dan foydalaniladi.

Blastn dasturi yordamida ko'p marotabalik to'g'irlashni o'tkazish

1. BLAST dasturi saxifasiga kiring:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BLAST asosiy sahifasi ochilishida tepa qismda 4 ta ilovali asosiy menyu bor:

- Home – uy sahifasigi qaytish uchun ilova.
- Recent Results – 36 soat ichida qilingan qidiruv natijalarini ochish uchun ilova.
- Saved Strategies – sizning shaxsiy saxifangizda «My NCBI» qidiruv natijasidan so'ng saqlangan ilova.
- Help - BLAST dasturida xujjatlar bilan ishlash uchun katalogga o'tish ilovasi.

2. Asosiy menyuda Basic Blast grafasidagi «nucleotide Blast» dasturini tanglang.

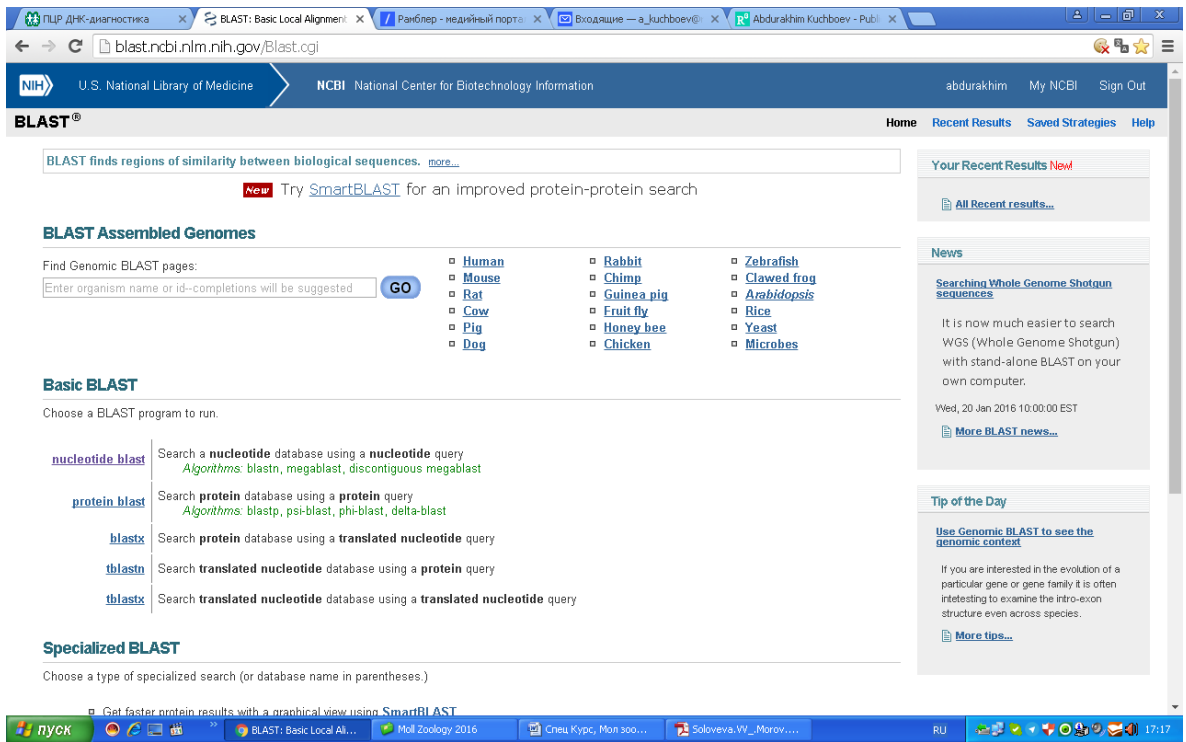
3. Ketma-ketlikni kiritish oynasiga FASTA formatida Enter Query Sequence kiriting. Namuna natijasida 18S rRNK qismi nukleotid ketma-ketligini tanlaymiz.

4. Choose Search Set → Others → Nucleotide collection (nrG'nt) parametrini tanglang.

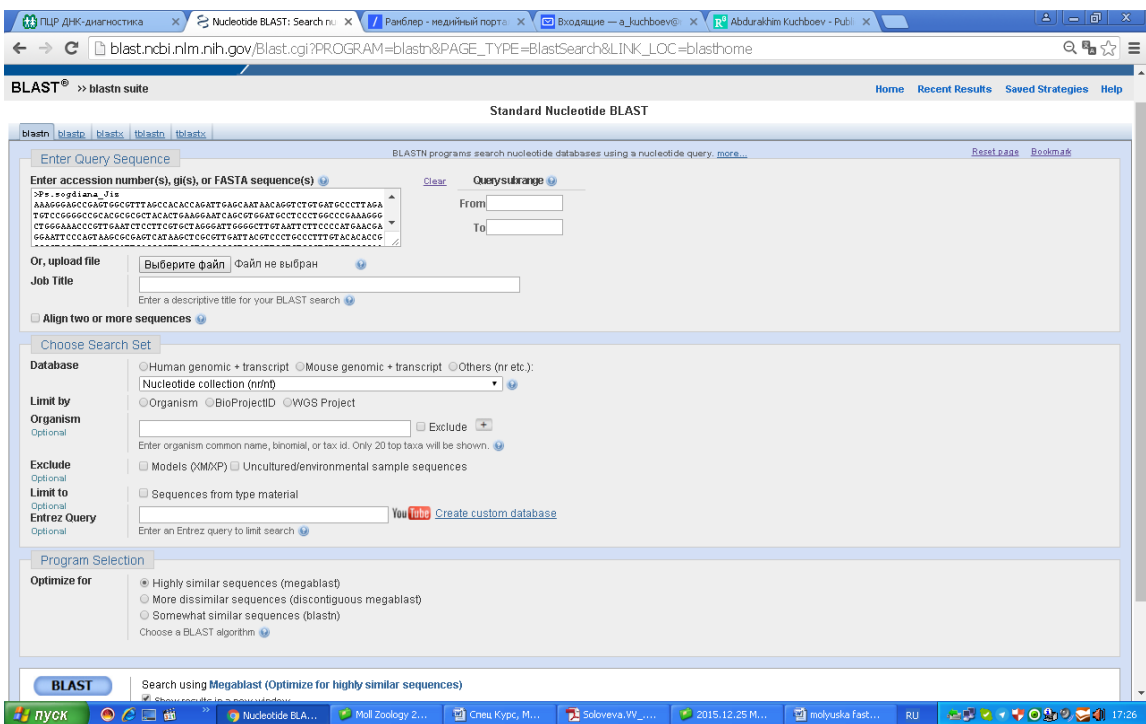
5. Program Selection grafasida somewhat similar sequences izlash algoritmini tanlang.

6. BLAST tugmasini bosing.

O'tkazilgan tahlilga binoan, foydalanilayotgan 18S rRNK geni ketma-ketligi asosidagi tahlil natijalariga ko'ra bu *Pseudonapaesus sogdiana* (gen 18S rRNK, KU760758) deb identifikatsiya qilish mumkin, lekin 98 % o'xshashlik asosida (maksimal idientifikatsiya -98 %, so'rovni amalga oshirish oblasti – 90%, E value - 0.0)

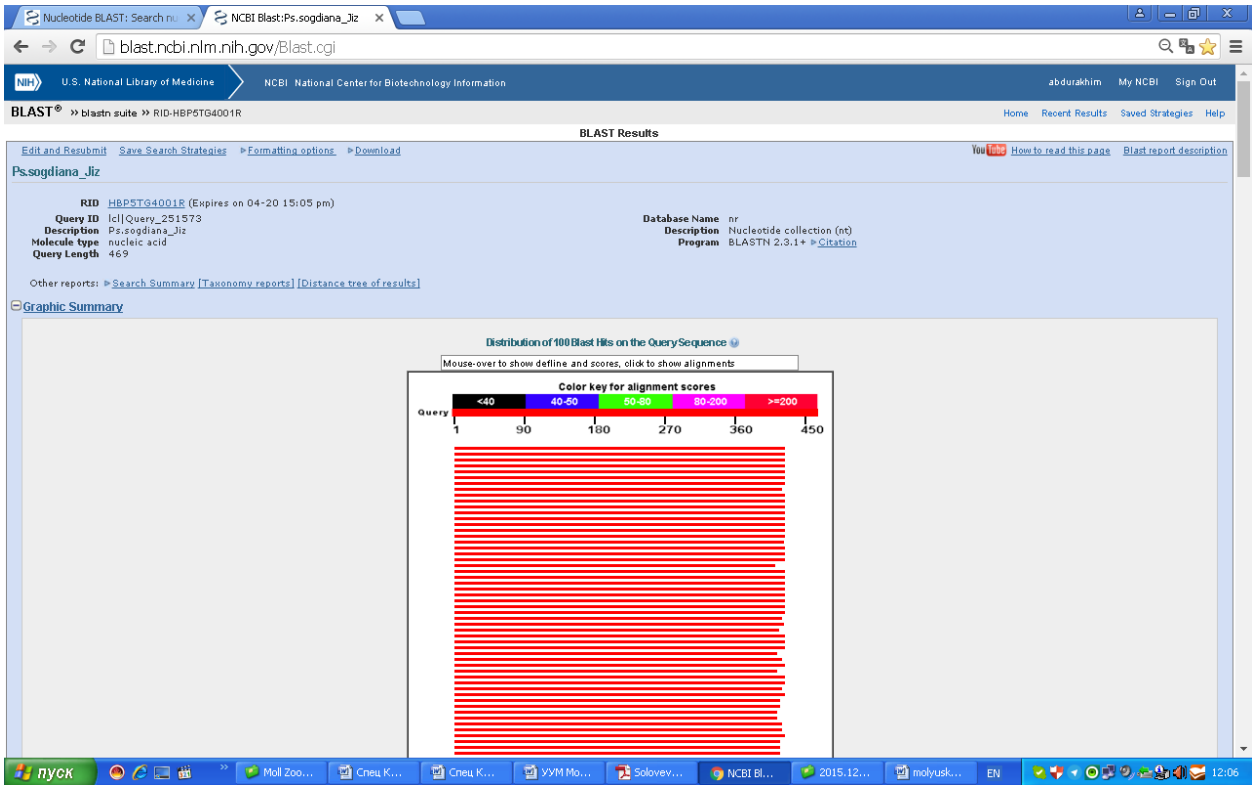


BLAST asosiy oynasi.



7 rasm. Nukleotidlar ketma-ketligi tahlili BLAST oynasi.

Quyida 8, 9 i 10 rasmlarda natijalar tahlili keltirilgan.



8 rasm. BLAST dasturi ishi grafik natijalari

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Auriculinea bidentata isolate PR0650 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	737	737	90%	0.0	98%	KM280971.1
Auriculastra subula isolate PR1651 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	737	737	90%	0.0	98%	KM280970.1
Arion silvaticus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	737	737	90%	0.0	98%	AY145385.1
Acusta despecta sieboldiana 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	737	737	90%	0.0	98%	AF190453.1
B.biplicata 18S rRNA gene	737	737	90%	0.0	98%	X94278.1
Deroceras reticulatum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	732	732	90%	0.0	98%	AY145373.1
Cylindrotris quadrasii isolate PR2223 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	90%	0.0	98%	KM280974.1
Zospeum suarezi isolate PR1842 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	89%	0.0	98%	KM280967.1
Laemodonta bella isolate PR0652 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	726	726	90%	0.0	98%	KM280996.1
Microtralia occidentalis isolate PR1760 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	726	726	90%	0.0	98%	KM280984.1
Myosotella myosotis isolate PR1759 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	723	723	90%	0.0	97%	KM281001.1
Pythia scarabaeus isolate PR0626 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	721	721	90%	0.0	97%	KM281004.1
Laemodonta cubensis isolate PR1750 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	721	721	90%	0.0	97%	KM280997.1
A.sirius small subunit ribosomal RNA gene	721	721	90%	0.0	97%	X98828.1
Cepaea nemoralis 18S rRNA gene	719	719	90%	0.0	97%	AJ224921.1
Cassidula auristelis isolate PR1927 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	717	717	90%	0.0	97%	KM280991.1
Allochroa pteifferi isolate PR1394 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	717	717	89%	0.0	97%	KM280989.1
Discus rotundatus voucher EED-Phy-607 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	717	717	90%	0.0	97%	FJ917212.1
Oxyloma sp. 18S rRNA gene	717	717	90%	0.0	97%	X94276.1
Onchidella borealis isolate PR0737 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	90%	0.0	97%	KM281006.1
Auriculinea bidentata isolate PR2057 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	87%	0.0	98%	KM280978.1
Ellobium chinense isolate PR2221 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	90%	0.0	97%	KM280975.1
Rituxaria quadrasii isolate PR2225 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	90%	0.0	96%	KM280973.1

Ris. 9. BLAST dasturi matn shaklidagi natijalari

The screenshot shows a BLAST search result page with two alignment sections. The first section is for 'Auriculicella bidentata isolate PR0650 18S ribosomal RNA gene, partial sequence' with sequence ID gb|KM280971.1. The second section is for 'Auriculastra subula isolate PR1651 18S ribosomal RNA gene, partial sequence' with sequence ID gb|KM280970.1. Both sections display a table of alignments with columns for Query, Subject (Sbjct), Score, Expect, Identities, Gaps, and Strand. The alignments show high sequence similarity between the query and subject sequences.

10 rasm. O'rganilayotgan nukleotidlar ketma ketligi va malumotlar bazasidagi ketma-ketlikning juft to'g'irlanishi.

Taqoslanayotgan ketma-ketlikning to'liqsiz gomologiyasi ham natija bo'lishi mumkin: 1) GeneBank deponirovat qilingan ketma-ketliklar xato bo'lishi mumkin (Sbjct); 2) tur ichidagi o'zgaruvchanlik.

Nazorat savollari:

1. Senjer usuli asosidagi sekvenirlashda qanday printsip yotadi?
2. Sekvenirlash o'tkazishda zanjirning uzishda qanday komponentlar kerak?
3. PZR-amplifikatsiyasi assimetrik reaksiyasida fragmentlarni tozalashni tushuntiring?
4. Blastn programmasi yordamida ko'plab to'g'rilashlar qanday o'tkaziladi?
5. BLAST yordamida birlamchi nukleotidlar ketma-ketligini qanday tahlil qilinadi?
6. BLAST bilash ishlashni printsiplarini ko'rsating?

Асосий адабиётлар

Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Кўшимча адабиётлар

1. Altschul S.F. Basic Local Alignment Search Tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // *J Mol Biol.* - 1990. - V.215. - P.403-410.
2. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // *Nucleic Acids Res.* - 1997. - V.25. - 3389-3402.
3. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics / L. Alphey. - Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. - 224 p.
4. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // *Chromotogr.* - 1998. - V.802. - P.179-184.
5. Lario, A. Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing / A. Lario, A. Gonzplez, G. Dorado // *Anal. Biochem.* - 1997. - V.247. - P.30-33.
6. Watts, D. Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer / D. Watts, J.R. MacBeath // *Methods Mol. Biol.* - 2001. - V.167. - P.153-170.

11- mavzu. FILOGENETIK DARAXTNI TUZISH. NUKLEOTIDLAR KETMA-KETLIGINI GENBANK (NCBI) BAZASIGA JOYLASHTIRISH. DNK – DIAGNOSTIKA (PTsR USULI)

REJA:

Tahlil uchun olingan ketma-ketliklarni tuzish. Clustal Omega dasturi yordamida nukleotidlar ketma- ketligini ko'p marotabali to'g'irlash. Filogenetik daraxtni tuzish MEGA dasturidan foydalanish (Ko'proq haqiqatga o'xshashlik usuli (maximal likelihood), maksimal iqtisod (maximal parsimony), chamalab ko'rilgan o'rtacha juftlik (UPGMA) va yaqin qo'shnilar (Neighbor-joining)dasturlari orqali tekshirish). Olingan nukleotidlar ketma-ketligini halqaro Genbank (NCBI) joylashtirish. Hayvonlar parazitlarni ekspress-tashxis usuli (PTsR texnologiyasi)

Tayanch iboralar: Molekulyar filogenetika, filogenetik daraxt, fasta format, MEGA-7, Genbank.

Kladistika (qadimgi yunonchada kládos - tarmoq) – filogenetik sistematikaning yo'nalishidir. Kladistik amaliyotning o'ziga xos jihati kladistik tahlil (taksonlar o'rtasidagi qarindoshlik aloqalarni rekonstruktsiya qilishda argumentatsiyaning qat'iy sxemasi), monofiliyani tushunish va loyihalashtirilgan filogeniya bilan ierarxik klassifikatsiya o'rtasidagi bir xil o'xshashlikni talab qilish hisoblanadi.

Kladistik taxlil esa hozirgi paytda qabul qilingan biologik klassifikatsiyaning asosi bo'lib, tirik organizmlar o'rtasidagi munosabatlarni hisobga oladi.

Kladogramma esa (inglizcha cladogram) – zamonaviy biologik sistematikadaga asosiy tushuncha – daraxtsimon graf bo'lib, taksonlar o'rtasidagi singillik munosabatlarini aks ettiradi.

Filogenetik daraxtni tuzish uchun oldin tahlil uchun kerakli ketma- ketlikni aniqlab olish so'ngra, ularni ko'p marotabali to'g'irlash zarur. Keyin, maxsus dastur yordamida daraxt tuziladi va natijalar grafik ko'rinishida ko'rsatiladi (Philippe et al., 2011).

Filogenetik daraxtni tuzish uchun FASTA formatida nukleotidlar ketma-ketligi tuziladi.

Ketma- ketlikni tanlashda kerak bo'ladi:

- 1) Unchalik katta bo'lmagan tanlamada to'xtash (< 50 ketma-ketlik)
- 2) Fragmentlarga, ksenologlarga, rekombinant ketma-ketlik, tandem qaytalanishlarga (ketma-ketliklarni qo'plab qaytalanishi) yo'l qo'ymaslik kerak.

Tahlil uchun olingan ketma-ketliklarni tuzish

1. Alohida matnli faylga (Microsoft Word) filogenetik daraxt tuzish uchun xizmat qiluvchi organizmlarning (FASTA formatida), ketma-ketligini kiriting.

2. Ketma-ketlikni raqamlang. Boshqa matnli faylga organizm nomlariga mos keluvchi raqamlar ketma-ketligini yozib chiqing (11-12rasm).

№	Namunaning birlamchi nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash
№1	gb KF811493.1 Protostrongylus rufescens isolate AK17 L3 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№2	gb KF811491.1 Protostrongylus hobmaieri isolate AK8 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№3	gb KF811488.1 Spiculocaulus leuckarti isolate AK14a 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№4	dbj AB478249.1 Protostrongylus shiozawai genes for ITS2, 28S rRNA, partial sequence
№5	gb EU018481.1 Cystocaulus ocreatus isolate 161 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

11-rasm. Microsoft Word matnli faylida organizmlar nomlanishi.

>1_Pf

TCGCGACTATTTGTCAAACGGTACTCGTCGTCAGTCTAAAGACGTGATT
 CCCGTTTTAGTGTAGAATAATGTGATAGCAACATGTAATGATACTTATG
 TATTATTACGCCAATTCAATATGCTGGAATATGTCCACATGCATGCTA
 GTGTTATCATTACTACCATCGTCGATGGATTTTCAACGAGTATCGCTGG
 AAATCATATAATGTTGAAGATTCGCCGATGGACGTCGTGTGCTGTTTCA
 TAATGATAGCTGTTAACTAGACATGAAGCGAGCTGGGTGGACATAG
 TTTGCATATTGTTCTTGCTTATTGTAACATGCAACCTGAACTCAGATGTG
 ATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>2_Ph

CGCGTTTGAATGCGAGTATTTGTGCGAACGGTACTCGTCGTCGTCAGCCT
 AGTGACGTGATTCCCGTTTTAGTGTAGAATAAATATGATAGCAACATGT
 AATGATACTTACGTATTATTACGCCAAACACAATATGCTATGTGTCCCC
 ATGCTAGTGTTATCATTACTACCATCGTCGATGTTGATTTCCAATGGGT
 ATCGCTGGAAATCATATAATGTTAAGGAATCGCCGATGGATGACGTGT
 GCTGCTCAGTAATGATAGCTATTAACACTAGACATGAAGTGAGCTGGG
 TGGACATAGACTGCATAATGTGCTTGCTTATTGTAACATGCAACCTGAA
 CTCAGATGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>3_Sl

GGTTGCATATATGAACGCGACTATTTGTGCGAACGGTACTTGTGTCGTCGTC
 AGTCTATTGACGGACGTGGTTCCCGTTCAAGTGCAGAAGTATGTGATAG
 CAACATGTAATGATACTTATGTATTATTACACCAAATACAATATGCTAT
 ATTGTGTTCCCTATGCTAGTGTTATCATTACTACCATCGCCGATGTTGATT
 TTCAATGGGTATCGTTGGAAATCATATAATGTTGAAGATTCGTGATGG
 ACGACGTGTGCTGTTTCAAGTAATGATTGCTATTGACACAAGACATGAAG
 CAAATTGGGCATAGATTGCAGCATAATGTGTTTATGTATTGTAACATGC
 AACCTGAACTCAGACGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>4_Psh

AGTTGCATATATGAATGCGACTATTTGTCAAACGGTACTCGTCGTCAGC
 TTAGTGACGTGATTCCCGTTTCAAGTGCAGAAGTATGTGATAGCAACATG
 TAATAATACTTATGTATTATTACGCCAAGTACAATATGCTATACGATGC

CCCTATGCTGGTGTTCATTACTACCATCGACGATGTTGATTTTCAATG
GGTATCGTTGGGAATCATATAATGTTGAAGATTTCGTCGATGGACGACSG
TGTGCTGTTTCAGTAATGATGTCATGTTGACACTAGACATAAAGCGAGTT
GGGCATAACAATGCGTAATGTGTTTGTCTTGTAAACATGCAACCTGAAC
TCAGACGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>5_Co

TTGTCGCATATATACATACTATTCATATGTATGTATTGTAAGGACGTGA
ATGCGGCTGTCTGTCAAACGGTACTCGTCGTCGCCGTTGCGAAACGTGCG
ACGTGATTCCCGTTTCAGTAAAGAATGAAGTGATAGCAACATGTAATC
GTTGCACCGAATGCAATATGGAATCGTGTGACTGTATGCTAGTGATCAT
TACTTACCATCGTCGATTTTGTATTCTCAATGGGTATCATTGATGAAATC
GCCCCGACATGAAATAGTCGTCGATGGATGACGTGTGTTGCTCAGTAAT
GATGACTATGAACACTAGCATAGTCCCAAATAGATTACATATTTGTATT
TAAAATTGTACGATGCAACCTGAACTCAGACGTGATTACCCGCTGAACT
TAAGCATATCAT

12 rasm. Microsoft Word matnli faylida raqamli ketma-ketlik.

***Clustal Omega* dasturi yordamida nukleotidlar ketma- ketligini aniqlab olish so'ngra ularni ko'p marotabali to'g'irlash**

Clustal Omega dasturi yordamida nukleotid kislotalar va oqsillar ketma-ketligini anaqlab olish, so'ngra ularni ko'p marotabali to'g'irlashga mo'ljallangan.

Clustal Omega guruhli satr yoki on-layn tarzda ishlaydi.

1. Ko'p marotabali to'g'irlash uchun *Clustal Omega* sahifasiga kiring: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.
2. *Clustal Omega* bosh sahifasida to'rt ilovalni menyu bor (13 rasm):

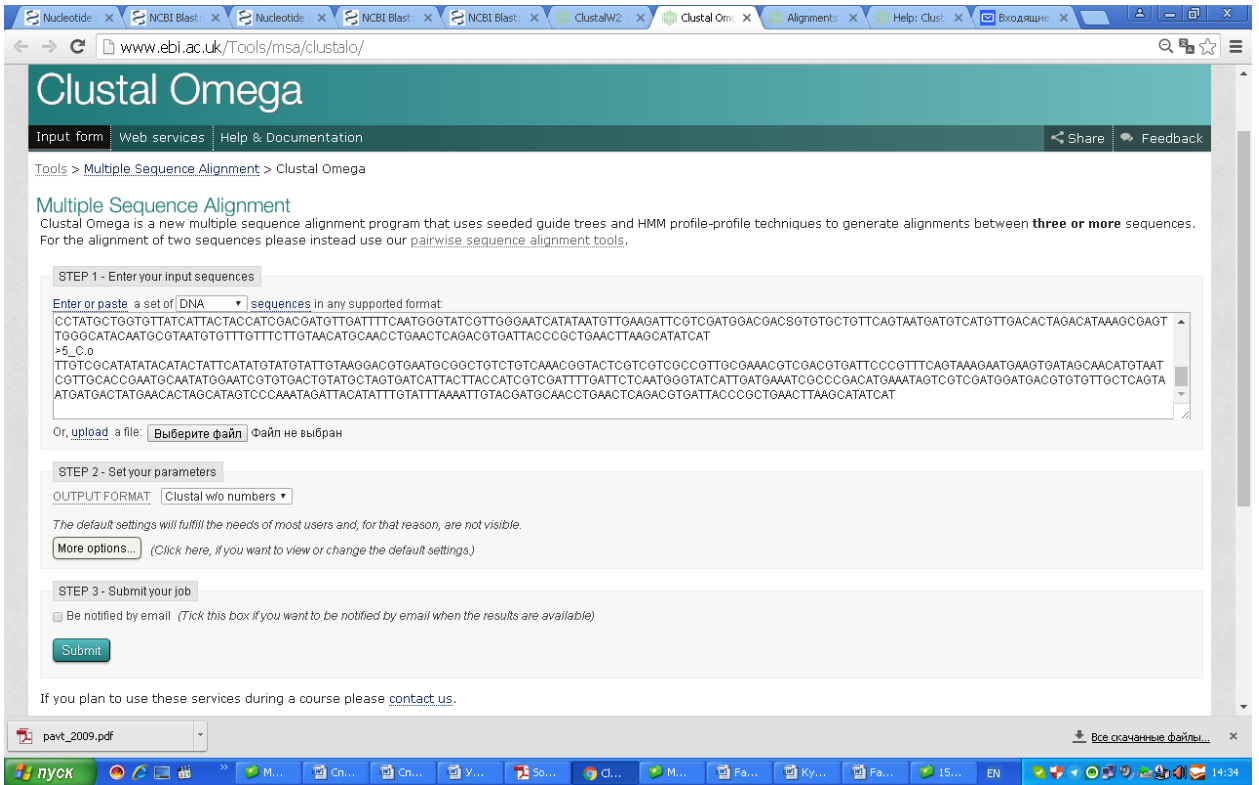
- Step 1 (Qadam 1) – ilova ketma-ketlikda FASTA formatida Microsoft Word dokumentiga taxlil qilinayotgan nukleotidlar ketma-ketligini kirituvchi oynani o'zida saqlaydi. Grafada Enter or paste da DNA tanlaymiz.

- Step 2 (Qadam 2) – ilova (Pairwise Alignment Options) juft to'g'irlash variantlarini o'zida saqlaydi: sekinroq (Slow) yoki tezroq (Fast). Parametrlarni o'zgartirmaymiz (Slow);

- Step 3 (Qadam 3) - ilova ko'plab to'g'irlash variantlarini o'zida saqlaydi (Multiple Sequence Alignment Options): kiritish formatini aniqlaymiz PHYLIP;

- Step 4 (Qadam 4) – natijalarni elektron manzil orqali yuborish uchun oyna (o'zingizning elektron manzilngizni grafada EMAIL ko'rsating).

3. To'g'irilashni ishga solish uchun SUBMIT tugmasini bosning. To'g'irlash natijalarini bir necha daqiqadan so'ng elektron manzilga yuboriladi (14-rasm).



13 rasm. Nukleotidlar ketma-ketligi tahlili uchun to'g'irlash parametrlari Clustal Omega oynasi.

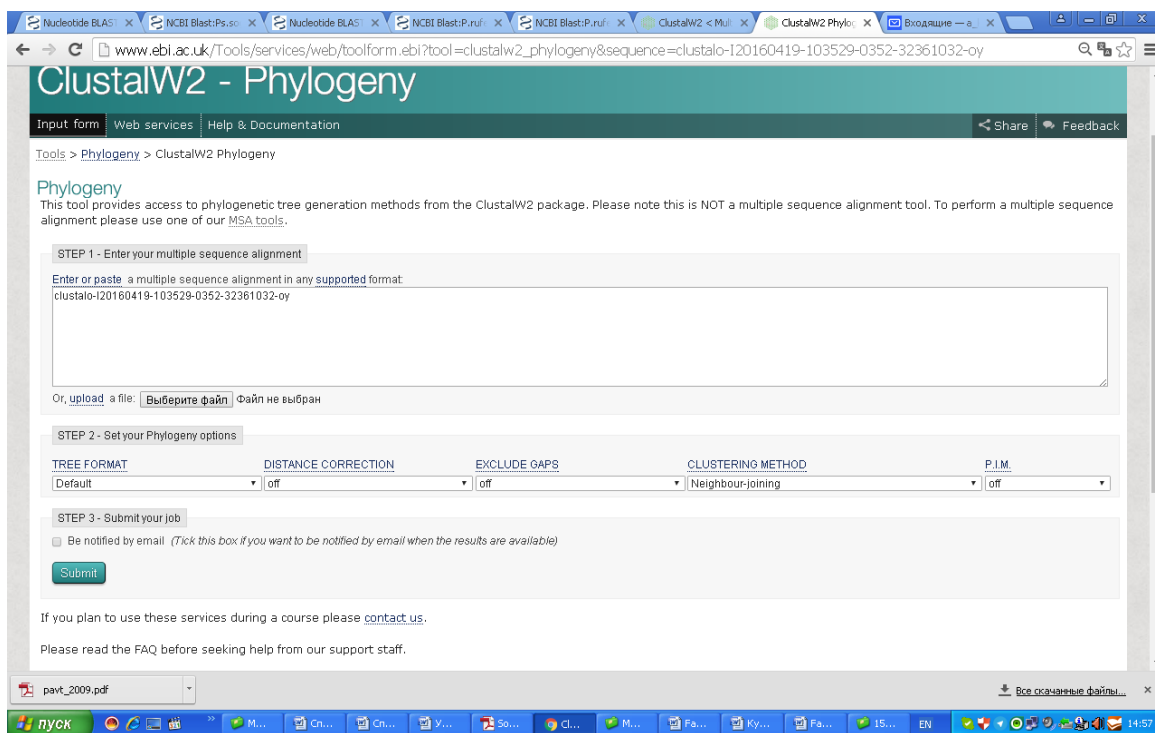


14 rasm. Clustal Omega dasturi yordamida to'g'irlanish natijasi.

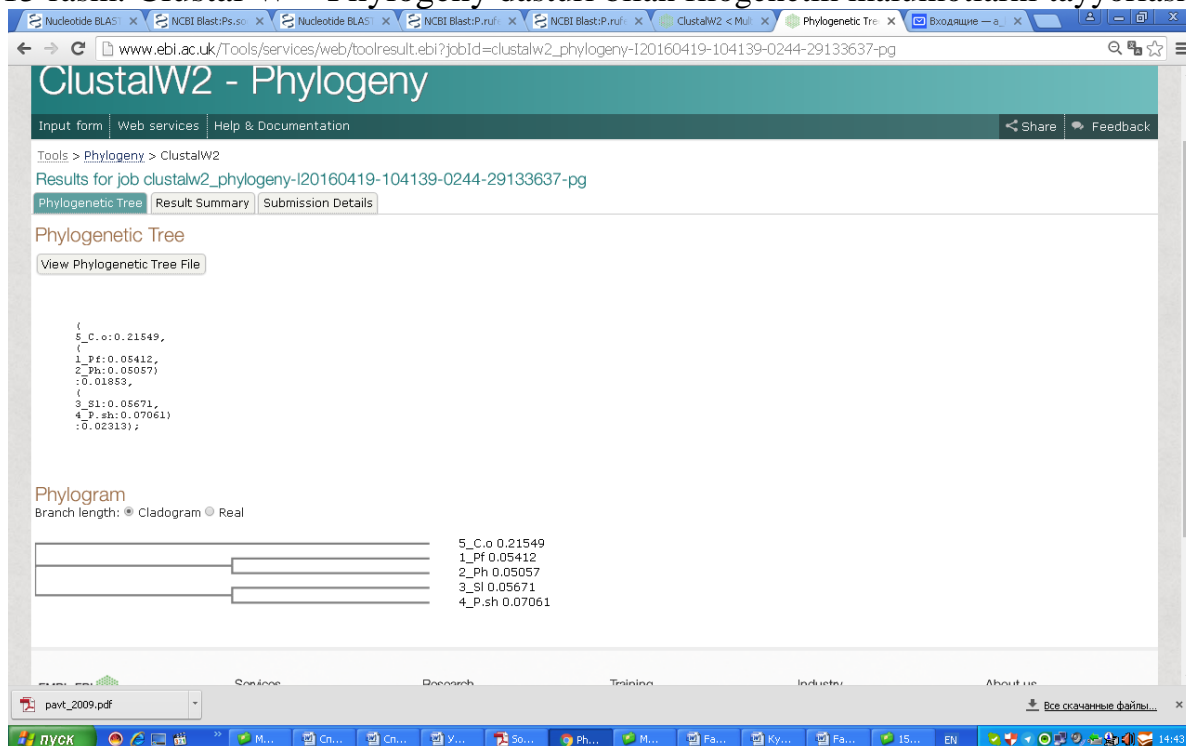
Clustaw2_phylogeny dasturi yordamida filogenetik daraxtni tuzish

Step 5 (Qadam 5) – Alignments oynasining o'ng tarafida filogeniya tuzish uchun ilova saqlanadi. (Send to ClustaW2_Phylogeny)

4. Send to ClustaW2_Phylogeny tugmasini bosing, boshqa oynada filogeniya tuzish uchun ketma- ketlik ochiladi (15-rasm).
5. Boshqa oynada Submit tugmasini bosing, bir necha daqiqa mobaynida fayllar va filogrammlar birdan filogenetik daraxt ochiladi (16-rasm).



15 rasm. Clustal W – Phylogeny dasturi bilan filogenetik malumotlarni tayyorlash.



16 rasm. Clustal W – Phylogeny yordamida filogeniya tuzish

Filogenetik daraxtni tuzish MEGA dasturidan foydalanish

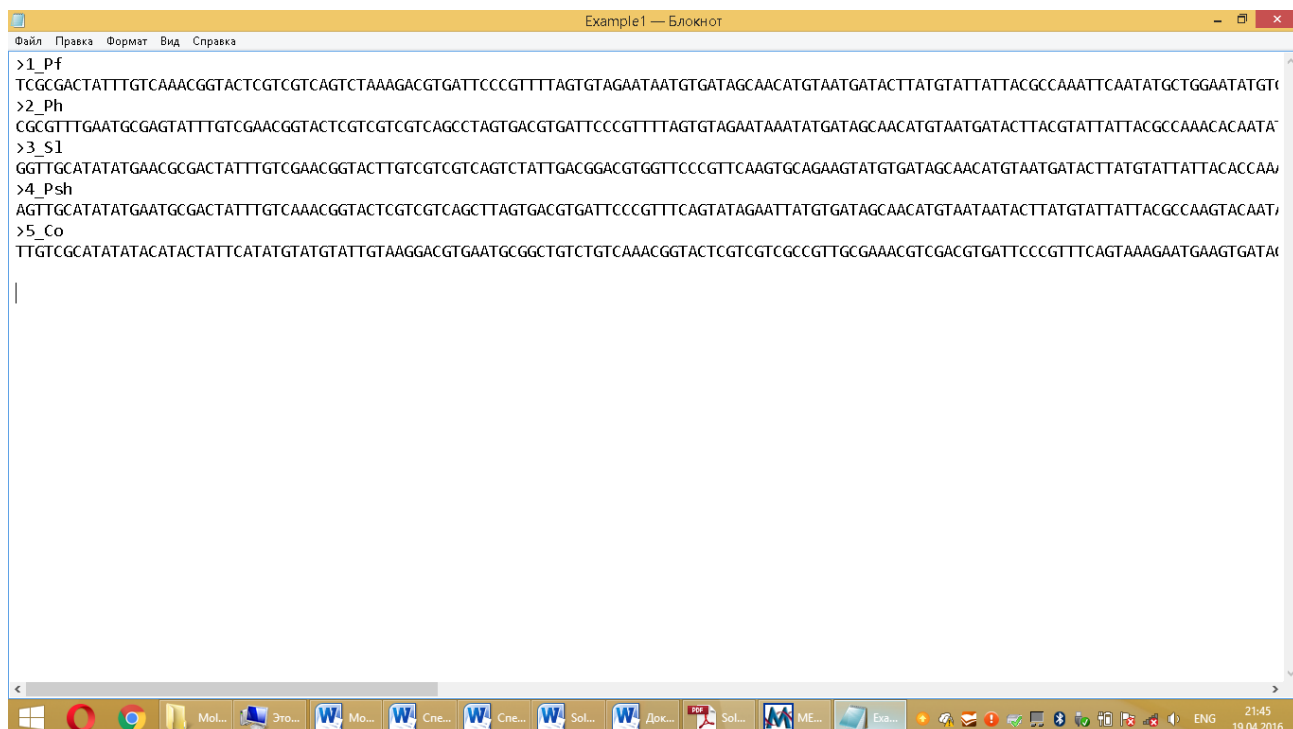
Filogenetik daraxtni tuzish uchun MEGA 5 dasturidan foydalanamiz. Dasturni ishlab chiqaruvchi korxonaning sahifasidan bepul ko'chirib olishimiz mumkin. Dastur tuzilayotgan daraxtning statistik ahamiyatini baholaydi va butstrep-tahlil imkoniyatini beradi. Maksimal tejamlash metodi yordamida minimal sondagi mutatsiyalangan daraxt tanlanadi.

1. Matnli fayl tuzamiz va unga ko'p marotabali to'g'irlangan 5ta ketma-ketlik ma'lumotlarni ko'chiramiz (17-rasm). Faylni nomlaymiz, masalan Example1.txt.

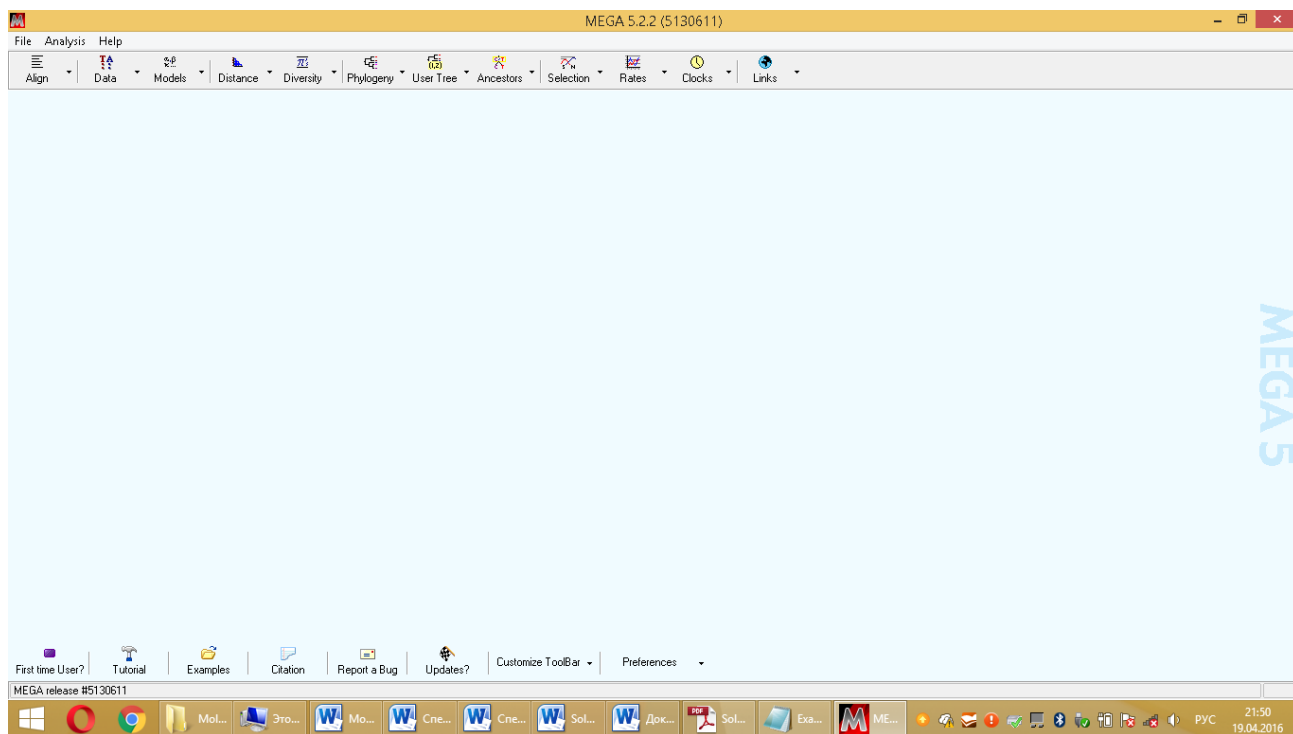
2. **MEGA 5.2** dasturini ishga tushiramiz. Dasturning kirish parametrlari paydo bo'ladi (17 –rasm): Align → Enter → Edit Built Alignment → Gearteve a new alignment OK → DNA → Aligin Explorer → Edit → Paste → Alignment by ClustarW → Data → Export Alignment → Mega format → faylga nom beramiz.

3. Maksimal tejash metodi bilan ishlovchi Mega 5 dasturini ishga tushiramiz.

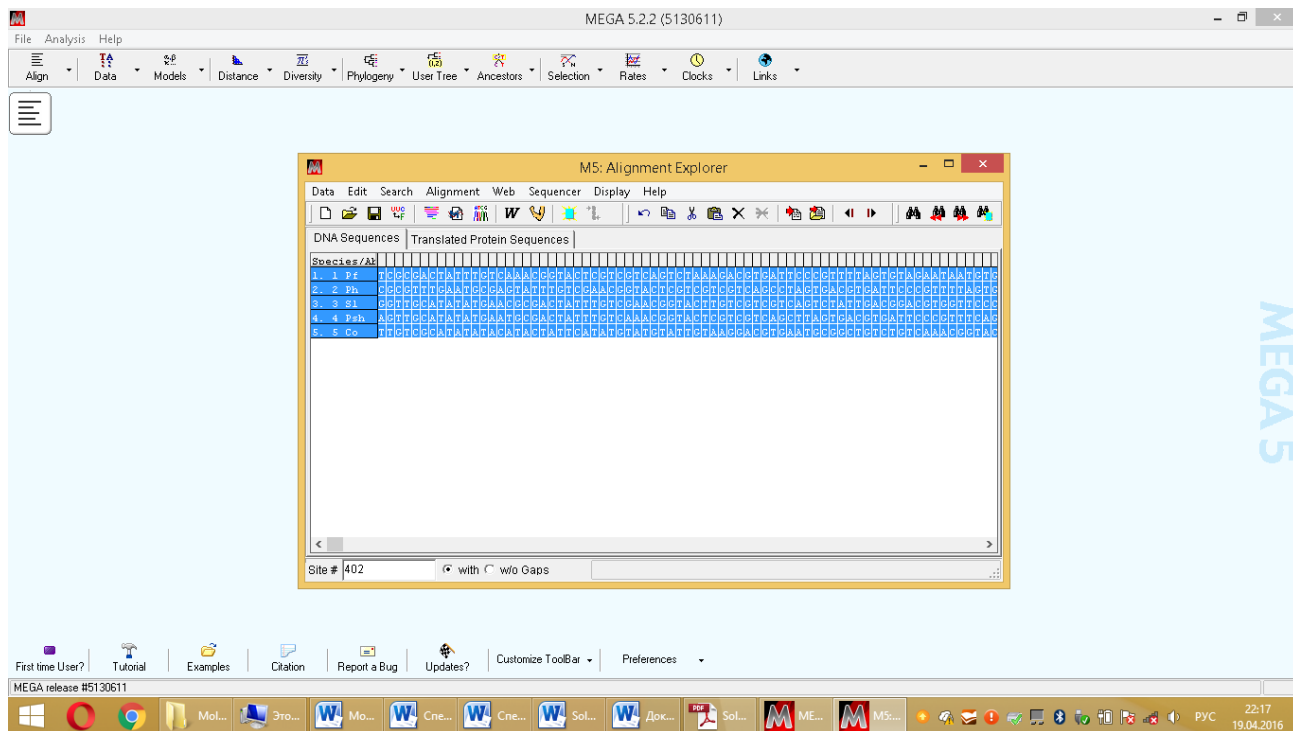
4. Faylga Example2 nomini beramiz va Enter ni bosamiz (18 rasm).



17-rasm. Ketma-ketliklarni ko'p marotabali tekislashdagi tekst fayl (txt)



18 rasm. MEGA 5 programmasini tahlili chiqish parametrlari



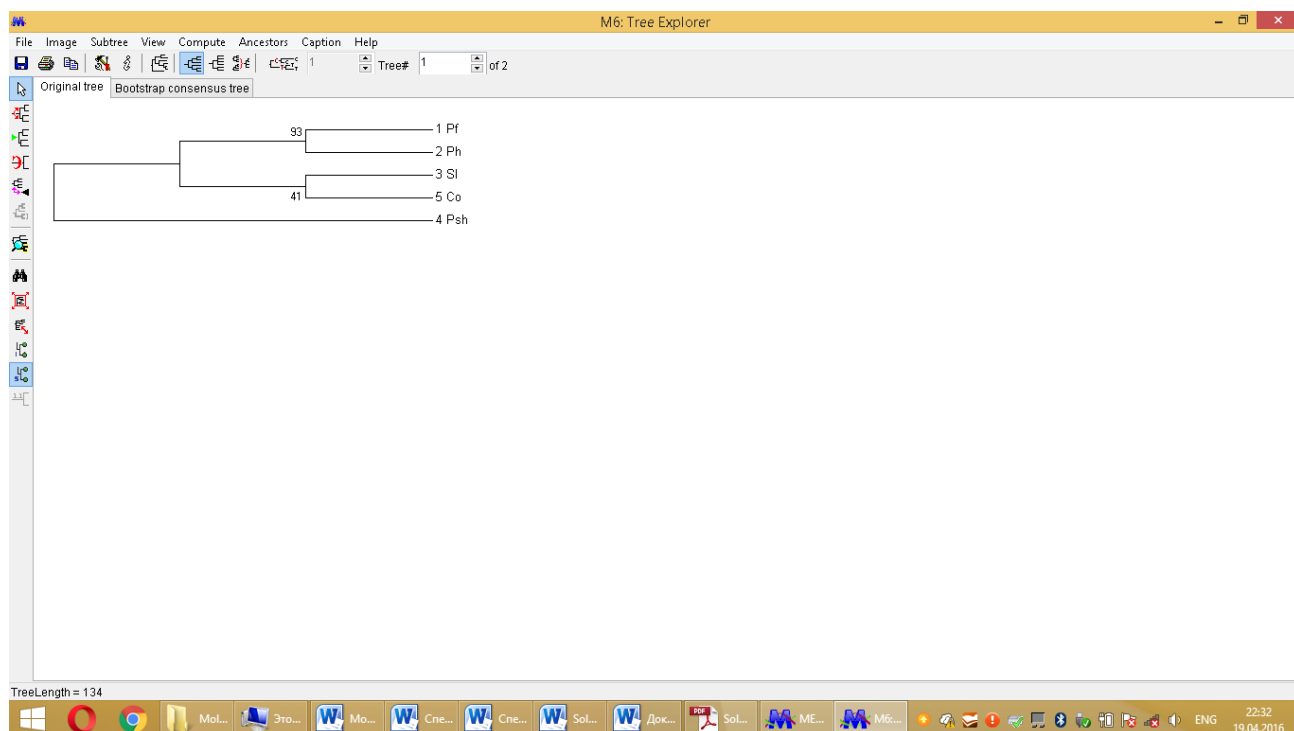
19-rasm. Mega formatda ma'lumotlarni tekislash va o'zgartirish

Natijada ma'dumotlar mega format faylida saqlanadi va uni masalan Example2 deb nomlash mumkin.

5. Example2 fayli yordamida maksimal tejamlash usuli bilan daraxt qilish

uchun Mega 5 programmasini ishga tushiramiz.

6. Example2 faylini kiritamiz va Enter bosamiz. Tahlilni chiqish parametrlari paydo bo'ladi (20-rasm).



Ris. 20. Dastur tahlilini chiqish parametri.

Har bir daraxtni tugunida butstrep-madad qiymatlari yoziladi, masalan 93 javob (replik). Bu son daraxtlarda qancha tugunlar (avlod) mavjudligini xarakterlaydi. Qiymat 93ga qancha yaqin bo'lsa, shoxlanishni ishonchligi shuncha yuqori bo'ladi.

Nazorat savollari:

1. Filogenetik daraxt degani nima o'zi?
2. Filogenetik daraxt nima uchun kerak?
3. Qanday filogenetik daraxtlar bo'ladi?
4. Daraxt uchun ketma-ketlik qanday qilib tanlab olinadi?
5. Ob'ektlar o'rtasidagi masofani qanday tushunsa bo'ladi?
6. Daraxtlarni qaysi on-line programmalarda tuzish mumkin?
7. Olingan daraxtlarni qanday qilib chiroyli taqdim etish mumkin?

Asosiy adabiyotlar

Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>

12 mavzu: PARAZITAR KASALLIKLARNI PTsR-DIAGNOSTIKASI

Biomaterial yig'ish. Turga xos praymerlar tayyorlash. Tirik hayvonlar parazitolarini ekspress-tashxis qilish usuli (PTsR texnologiyasi).

I.2. AMALIY MASHG'ULOTLAR MATERIALLARI

Shartli qisqartmalar va belgilar

DNK - dezoksiribonuklein kislotasi

Genbank - genetik bank

PZR - polimer zanjirli reaksiya

UF - ultrabinafsha nuri

EDTA - etilendiamintetrauksus kislotasi

SDS - dodetsilsulfat natriy

mtDNK - mitoxondrial DNK

rDNK - risobosomal DNK (RNK)

NCBI - Biotexnologiya Ma'lumotlari Milliy Markazi (AQSh)

18S - rDNK geni kichik subbirligi

28S - rDNK geni katta subbirligi

ITS - rDNK geni ichki transkrib speyseri

SOI - tsitoxrom oksidaza geni

j.n. - juft nukleotid

TAE - Tris-atsetat buferi

Taq polimeraza - DNK termostabil polimerazasi

bufferlar - eritmalardagi moddalar aralashmasi

mol - moddalar sonini ifodalovchi birlik

pH - eritmalardagi vodorod ionining konsentratsiyasi

n - namunalar soni

in vitro - organizmdan tashqarida tadqiqot o'tkazish

μ l – mikrolitr

1-amaliy mashg'ulot: Standart fenol-xloroform usuli yordamida umurtqasiz hayvonlar to'qimasi namunasidan genom DNKsini ajratish.

Ishning maqsadi: Klassik fenol-xloroform usuli yordamida umurtqasizlar namunasidan genom DNKsini ajratishni o'rganish.

Kerakli asboblari va jihozlari: Mikrotsentrifuga, indikatorli termostat, sterilizator, muzlatgich, suv vannasi, fenol-xloroform reagenti, proteinaza K, zoologik namunalar, turli o'lchamdagi FinnPipete, SealPette pipetkalar va eppendorf probirkalari, qisqich, skalpel.

Ishning nazariy asoslari:

1. Standart fenol - xloroformli usuli va uni asosiy xususiyatlari;
2. Laboratoriya jihozlarini tozalash va ish holatiga keltirish;
3. Ish uchun kerakli eritma va buferlar;
4. DNK va RNK ajratishni ta'minlashda bir qator ustunlik talablar:
 - biologik materialni lizisi;
 - selektiv ekstraktsiya (sorbtsiya);
 - katta hajmda to'plash;
 - PTsR susaytiruvchi komponentlardan ajratish;
 - DNK va RNK ajratish;
 - yuqori foizda chiqishi;
 - kalibrovka mumkinligi va ijobiy nazorat;
 - kontaminatsiyaning yo'qligi;
 - kam vaqt sarflanishi;
 - avtomatizatsiyaning mumkinligi.

Qisqacha nazariy qism: Fenol va xloroform usuli (FX) - nuklein kislotalarni ajratishning klassik uslubidir. Bu uslub proteinaza K ishtirokida detergentlar tomonidan biologik materiallarning parchalanishi hamda FX yordamida nuklein kislotalarni ajratib olishni o'z ichiga oladi (1-rasm, a). Buning afzalligi shundaki, kommertsiyali reagentlar to'plamiga qaraganda bu uslub bilan anchagina ko'p miqdorda DNK ajratib olinadi. Uslubning kamchiliklariga esa uning davomiyligi, mashaqqatliligi, agressiv organik erituvchilarning ishlatilishi va DNKni oqsildan ham, RNKdan ham etarli darajada tozalamasligini kiritish mumkin. Laboratoriyada foydalaniladigan jihozlari toza (ayrimlari sterillangan) bo'lishi kerak. Buning uchun avvalo jihozlari suvda yuviladi va distillangan suvda chayiladi. Ish uchun kerakli ayrim instrumentlar (skalpel, qisqich, ignalar) 96% li etanolda yuvilib olinadi. Sterilizatsiya qilinishi mumkin bo'lgan jihozlari sterilizatorida (ko'rsatilgan tartibda) sterilizatsiya qilinadi. Eukariot organizmlardan nuklein kislotalarni ajratish va fraktsiyalashda klassik va kommertsiyali tayyor reagent-to'plam usullaridan foydalaniladi (Kuchboev va boshq., 2015).

Ish uchun kerakli eritma va buferlar tayyorlash bo'yicha tavsiyalar qo'llanmaning 3-ilovasida berilgan.

Laboratoriya ishini bajarish tartibi:

Nematoda to'qimalaridan nuklein kislotalarni FX – ekstraktsiya qilish usuli quyidagi bosqichlardan iborat:

15. Nematoda tanasidan 0,05 g og'irlidagi to'qimani bo'lakchasi olinadi.

16. Nematodalarning to'qimalari, tarkibida 40 mM tris – HCl (pH q8,0), 0,5 mM EDTA, 1^xSSC bo'lgan bufer eritmasida (to'qima va buferning 100 mkg; 500 mkg nisbatida) gomogenizatsiya qilinadi.

17. 0,5% gacha SDS va proteinaza K ni oxirgi konsentratsiyasi 1 mgG/ml bo'lguncha qo'shiladi, aralashtiriladi va 37°S haroratda 2-3 soat davomida inkubatsiya qilinadi yoki 18 soatga qoldiriladi.

18. Probirkaga 5 M natriy atsetat oxirgi konsentratsiyasi 0,1 M bo'lgunga qadar qo'shiladi va aralashtiriladi. So'ngra 1:1 nisbatda fenol, to'yingan HCl trisi (pHq8,0) qo'shib, 10-15 daqiqa davomida aralashtiriladi.

19. Xloroformni 1:1 nisbatdagi hajmda qo'shib, yana 5-10 daqiqa mobaynida aralashtiriladi.

20. Olingan aralashmani 4°S haroratda 20 daqiqa tsentrifuga qilinadi (bir daqiqa davomida 4000 aylanma tezlikda).

21. Yuqoridagi fraktsiyani erigan DNK bilan (supernatant) pipetka yordamida tortib olinadi.

22. FXli oqsildan ajratish jarayoni (deproteinazatsiya) undan butunlay xolos bo'lgunga qadar takrorlanadi.

23. Ajratib olingan supernatantga 2:1 nisbatdagi hajmda xloroform qo'shib, 10-15 daqiqa aralashtiriladi, so'ngra 15 daqiqa tsentrifuga qilinib (bir daqiqa davomida 4000 aylanma tezlikda) yuqoridagi fazasi olinadi.

24. 1 ml li erigan DNKga 5 M natriy atsetat oxirgi konsentratsiyasi 0,2 M bo'lguncha qo'shib, aralashtiriladi.

25. Ikki hajmdagi 96% li etanol eritmasi qo'shib, DNK cho'kmaga tushgunga qadar bir maromda aralashtiriladi.

26. -20°S haroratda bir sutka davomida sovutiladi, so'ngra 15 daqiqa davomida 15000 aylanma tezlikda tsentrifuga qilinadi (0°S gacha sovuguncha).

27. Supernatant olib tashlanadi, DNK cho'kmasi 70% li etanol eritmasida yuviladi.

28. Etanol eritmasi to'kib tashlanadi, DNK havoda etanol eritmasi uchib ketgunga qadar quritiladi va ionsizlantirilgan suvda eritiladi.

Olingan DNK preparatlarini konsentratsiyasi spektrofotometrda aniqlanadi. Ajratilgan DNK konsentratsiyasi 2,0 – 2,3 mkgG/mkl tashkil qiladi.



a.



b.

1-rasm. a) DNK ekstraksiyasi uchun fenol-xloroform reagenti; b) Diatom DNA Prep 200 to'plami.

2-amaliy mashg'ulot: Polimeraza zanjirli reaksiya (PZR) - amplifikatsiya o'tkazish.

Ishning maqsadi: Polimeraza zanjirli reaksiyasi uchun kerakli buferlardan master-aralashma tayyorlash va amplifikatorga kerakli dasturlarni kiritishni o'rganish

Kerakli asboblari va jihozlari: Amplifikator, PZR boks, PZR laboratoriya muzlatgichlari, PZRda qo'llaniladigan reaktivlar va buferlar, praymerlar, turli o'lchamdagi FinnPipete, SealPette pipetkalari va eppendorf probirkalari.

Ishning nazariy asoslari:

1. PZR uslubini asosiy tushunchasi;
2. PZR uchun kerakli praymerlar tanlash;
3. PZR-amplifikatsiya o'tqazish;
4. PZR rejimi.

Qisqacha nazariy qism: Polimeraza zanjir reaksiya (PZR) - *in vitro* amplifikatsiya metodi bo'lib, uning yordamida qisqa vaqt mobaynida muayyan sondagi DNK ketma-ketligini odatdagidan 1000 marotaba ko'proq tanlash yoki ko'paytirish mumkin (Mullis, Faloona, 1987; Sambrook, 2001). Usul mohiyati – probirkada muayyan DNK qismlarini qaytalanuvchi temperatura tsikllarida ko'p marotabali ko'chirish (amplifikatsiya)dir. Amplifikatsiyaning har bir tsiklida yuqorida sintezlangan fragmentlar yana DNK-polimeraza fermenti yordamida nushalanadi va DNK fragmentlari o'ziga xos ko'p marotaba ko'payadi.

PZR qo'llanilish sohasi: genom ketma-ketligini yuqori darajali klonlash (Scharf et al., 1986), mitoxondriya va genom DNK larini to'g'ri sekvenirlash (Wong et al., 1987), nukleotid ketma-ketligi o'zgaruvchanligini tahlillash va kasallik qo'zg'atuvchilarni aniqlash (Kwok et al., 1987).

Polimer zanjir reaksiyasini o'tkazish uchun reaksiyon aralashmada turli xil tarkiblar bo'lishi zarur (Saiki i dr., 1990):

- Ikkita praymer
- DNK-polimeraza termostabilligi (Taq-polimeraza)
- 2'-dezoksinukleozid-5'-trifosfat aralashmasi (dNTP - dATP, dGTP, dTTP)

va dTTF)

- *Bufer*

- Mg^{2+} ioni

- *Tahlil qilinayotgan namuna.*

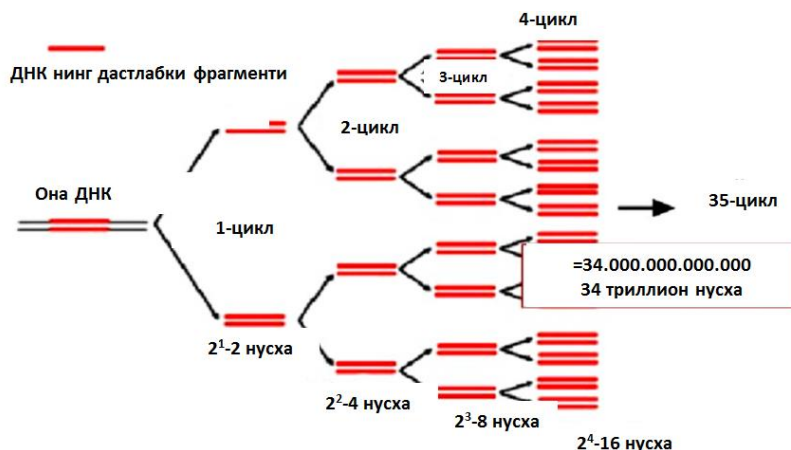
Tsiklik temperatura rejimi - PZR-amplifikatsiyasida tahlil qilinayotgan DNKdagi qator hodisalar bo'lib muayyan temperatura parametrlari ta'minlanadi. Har bir amplifikatsiya tsikli 3ta bosqichdan iborat bo'ladi:

4. *Denaturatsiya..*

5. *Yumshatish (prayermlarning qo'shilishi, gibridlanishi).*

6. *Elongatsiya (DNK sintezi).*

Amplifikatsiyaning temperatura tsikli ko'p marotaba qaytariladi (30 va undan ko'p). Har bir tsiklda sintezlanayotgan DNK fragmentlari ikki marotaba ko'payadi. Tsiklik jarayonlar natijasida DNK fragmentlari o'ziga xos geometrik tarzda ko'payib boradi (2-rasm).



2-rasm. PZR ning umumiy sxemasi

Dastlab eritmada, faqat 1 ta, ikki zanjirli DNK molekulasini (masalan, nematodani DNKsi) bo'lgan bo'lsa, 30-40 tsikldan keyin (3-5 soat ichida) eritmada kerakli darajada ko'p nusxa shakllangan bo'ladi. Bu esa, ularni oddiy laboratoriya usullari yordamida o'rganish imkonini beradi.

Ish uchun kerakli eritma va buferlar tayyorlash bo'yicha tavsiyalar qo'llanmaning 3-ilovasida berilgan.

Amaliy ishini bajarish tartibi:

Laboratoriya ishi ITS2 rDNK geni fragmenti amplifikatsiyasi eukariot primerlari (Gasser et al., 1993) (jadval 1) va standart usul yordamida o'tkaziladi (Sambrook, 2001).

6. Ishni boshlashdan avval reaksiyaning DNK- polimerazadan tashqari hamma komponentlarini eritib oling va bir necha vaqtga muzga joylashtirib turing. 0,2 ml probirkani muzga joylashtiring, 34,8 mkl bidistillirlangan suv, 5 mkl 10X Taq-bufer, 5 mkl 2,5 mM $MgCl_2$, 1 mkl 2 mK 2'-dezoksinkleozid-5'-

trifosfat, 1 mkldan to'g'ri va teskari praymerlar, 2 mkl DNK matritsasi, 0,2 mkl Taq-polimerazasi qo'shing, yakuniy hajm 50 mkm ni tashkil etadi (jadval 2).

7. 0,2 ml probirkadagi reaksiya aralashmasini vorteksdan aralashiring va mikrotsentrifugada 15 sek mobaynida tomchilarni cho'kindi holatiga keltiring.

8. Termotsikler dasturini o'rnatish (jadval 3).

9. Termotsikler lunkasiga probirkadagi reaksiya aralashmasini joylashtiring va termotsikler qopqog'ini mahkam yoping.

10. PZR-amplifikatsiyasi tugallangandan so'ng namunalarni agarozga geldagi elektroforez usuli yordamida tahlil qilish mumkin. Amplifikatsiyalangan namunani -20°S saqlash zarur.

Jadval 1

ITS2 rDNK geni fragmenti amplifikatsiyasi uchun spetsifik praymerlar

Praymer nomlanishi	Nukleotid ketma-ketligi 5'→3'
Eukariot to'g'ri praymeri ITS2 -NC1(F)	ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT
Eukariot teskari praymeri ITS2 -NC2(R)	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT

Jadval 2

PZR uchun mo'ljallangan reaksiya aralashmasi tarkibi

Reaksiya komponentlari	Hajm, mkl
10X Taq-bufer	5
2,5 mM MgCl ₂	5
0,2 mkM 2'-dezoksinukleozid-5'-trifosfat	1
20 mkM to'g'ri praymer *	1
20 mkM teskari praymer *	1
DNK matritsasi	2
Taq-polimeraza 5 edG'mkl	0,2
Bidistillirlangan H ₂ O	34,8
Reaksiyaning yakuniy hajmi	50

PZR rejimi

ITS2 rDNK geni fragmenti amplifikatsiyasi ish rejimi uchun quyidagi tartibda amalga oshiriladi (jadval 3).

Jadval 3

ITS2 rDNK geni fragmenti

Temperatura	Vaqt	Tsikl	Bosqichlar
92° S	3 min	1	Dastlabki qizdirish
92° S	15 sek	35	denaturatsiya
55° S	30 sek	35	yumshatish
72° S	30 sek	35	sintez

72° S	10 min	1	yakuniy sintez
10° S	-	-	saqlash

3-amaliy mashg'ulot: Agarozaga gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o'tkazish. Agarozaga gelidan DNK ajratish va tozalash.

1-qism: Agarozaga gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o'tkazish.

Ishning maqsadi: Agarozaga gelini tayyorlash, tayyorlangan gelga PZR mahsulotlarini kiritish va elektroforez o'tkazishni o'rganish.

Kerakli asboblari va jihozlari: Elektroforez tok manbai, gorizontaal gelelektroforez to'plami, elektron tarozi, ultrabinafsha-translyuminator, pipetkalar, agarozaga, TAE buferi, etilen bromid, himoyalangan ko'zoynaklar.

Ishning nazariy asoslari:

1. Agarozaga gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi;
2. Agarozaga gelini tayyorlash;
3. PZR mahsulotlarida elektroforez o'tqazish;
4. DNK miqdorini aniqlash.

Qisqacha nazariy qism: DNK elektroforezi - analitik usul bo'lib, ajratish, tenglashtirish va DNK qismlarini tozalash uchun foydalaniladi. DNK elektroforezi gorizontaal yoki vertikal yo'nalishda amalga oshiriladi (Osterman, 1996; Sambrook, 2001).

DNK molekulasini shakarfosfat qoldig'i manfiy zaryadlangan, shuning uchun DNK zanjiridagi manfiy zaryadlangan katoddan elektor maydon kuchi ostida musbat zaryadlangan anod tomonga harakatlanadi. Uzunroq bo'lgan molekullar sekinroq ko'chadi, chunki gelda ushlanib qoladi, qisqaroq molekullar tezroq harakat qiladi (Sambrook, 2001).

Natijalarni vizuallashtirish maqsadida erigan agarozaga bromli etidiy kiritiladi (Dretzen et al., 1991).

Olingan DNK qismlari o'lchamlari tahlili uchun chiziqli DNK markeridan foydalaniladi.

Elektor maydon kuchlanishi katta ahamiyatga ega, shu sababli taqsimlanish samaradorligi pasayishi kuzatiladi. DNK qismlarini ajratishda eng maksimal samaradorlikka erishish maqsadida, kuchlanish 1 santimetr gelda 5 volda oshmasligi zarur (Girvitz et.al., 1990).

Gelning tarkibiga quyidagilar kiradi: 1X TAE (rN 8,1), agarozaga, bromli etidiy. Gelning foiz ulushiga qarab har xil tarkibiy qismlar qo'shiladi. Gelning foiz ulushi DNK qismlari tarqalish uzunligi orqali tanlanadi (4 jadval). Masalan, 18S rDNK gen tahlili uchun (uzunligi taxminan 600 j.n.) 2% li agarozaga geli optimal hisoblanadi.

Gelda agarozaning konsentratsiyasining nisbati va tahlil qilinayotgan DNK fragmentining optimal razmeri

Geldagi agarozaning miqdori (%)	DNK qismlari o'lchami (ming j.n, Kb)
0,3	50-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Agarozaning gelini tayyorlash va elektroforez o'tkazishga doir tavsiyalar qo'llanmaning 3-ilovasida berilgan.

Amaliy ishni bajarish tartibi:

Gelni elektroforez vannachasiga qo'yishdan avval namunalarni kiritish uchun orgoynali vannaga taroqchalarni o'rnatib, katakchalar (cho'qircha) yasab oling. Tarqoqchalarning pastki tishchalari umumiy hajmi 50 ml bo'lgan gelning asosida 2 mm oralig'ida joylashsin (umumiy hajmi 150 ml bo'lgan gelning asosidan 1mm oralig'ida joylashsin) (3 rasm).

14. 50 ml 2%li agarozaning gelini tayyorlash uchun 50 ml 1X TAE va 1 g agarozaning qo'shiladi. 1X TAE boshlang'ich konsentratsiyasi 50X TAE eritmasidan tayyorlanadi. (Tris, 0,5M EDTA pH 8,0, muzlatilgan uksus kislotasi).

15. Agarozaning tutqichini 1X TAE eritmasi yordamida qaynash darajasida shunday qizdiringki, eritma gomogen holatiga kelsin, ya'ni agarozaning erimagan zarralari bo'lmasin.

16. Bu jarayondan so'ng 50°S darajasida sovutib va 0,5 ml bromli etidiy qo'shing.

17. Hamma gel hajmini elektroforez vannachasiga quyib. Gel sovugandan so'ng (30-45 daqiqa xona haroratida), astalik bilan taroqchalarni olib tashlang va elektroforez vannachasiga 1X TAE buferini gel to'liq qoplangunga qadar quyib.

18. Namunalarni 6X Loading Dye buferi (tarkibi: 4% li to'q sariq G, 0.03% li bromfenol, 0.03% ksilen- tsianol FF, 15% Fikolla 400, 10 mM tris-HCl pH 7,5 i 50 mM EDTA pH 8,0) bilan shunday aralashtirinki, namunadagi yakuniy konsentratsiya 1X bo'lsin va mikropipetka yordamida geldagi chuqurchalarga (katakcha) quyib.

19. Olingan DNK qismlari hajmini tahlil qilish uchun chuqurchalarning biriga 2,5 ml DNK-markerini *DirectLoa^{drM} Wide Range DNA Marker* qo'shing.

20. DNK ajratishni uchun kuchlanish 1 santimetr gelda 5 voltdan oshmasligi zarur.

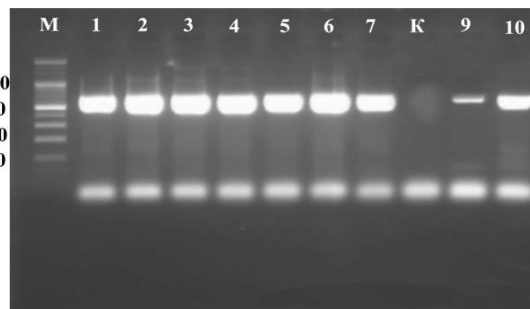
21. Elektroforez yakunlangandan so'ng gelni ultrabinafsha-transilluminator nurlarida ko'ring va rasmga oling, natijalarni qayd qiling.

Diqqat! Qo'z to'r pardasining ultrabinafsha nurlari shikastlamasligi uchun DNK qismini tekshirishda transillyuminatorning komplekt shishalari orqali yoki maxsus himoya ochkilari yordamida amalga oshiriladi.

22. 4-rasmda hamma namunadagi genlarning 18S rDNK qismida DNK-ampflikatsiyasini ko'rsatuvchi PZR mahsulotdagi tahlili misol tariqasida keltirilgan. Genning 18S rDNK qismi ampflikatsiyalangan nukleotidlar ketma-ketligi uzunligi taxminan 500 p.ni tashkil qiladi.



3 - rasm. Agarozada gelida gorizontaal elektroforez o'tqazish uskunasi elementlari: Elektr tok manbai, gel quyish uchun lotok, gel ushlagich, taroqlar va lineyka.



4-rasm. Elektroforez yordamida 1.5% agarozada 9 ta namunadagi rDNK 18S geni fragmentining PZR mahsulotining ko'rinishi.

2-qism: Agarozada gelidan DNK ajratish va tozalash

Ishning maqsadi: Agarozada gelidan DNK ajratish va tozalash usullarini o'rganish.

Kerakli asboblari va jihozlari: Turli o'lchamdagi pipetkalar va probirkalar, tsentrifuga, elektron tarozi, elektroforez tok manbai, elektroforez to'plami, transillyuminator, DNK tozalash uchun "Tsitokin" firmasida ishlab chiqarilgan to'plamlar, agarozada geli, skalpel, himoya ko'zoynagi.

Ishning nazariy asoslari:

1. PZR-ampflikatsiyasi mahsulotlarini tozalash to'plamlari;
2. PZR-ampflikatsiyasi mahsulotidagi DNKni tozalash va ajratish;
3. Tozalangan PZR mahsulotida preperatli elektroforez o'tqazish.

Qisqacha nazariy qism: Geldagi PZR-ampflikatsiyasi mahsulotlarida kelib chiqishi mumkin bo'lgan muammolardan biri o'ziga xos bo'lmagan chiziqchalar bo'lishi yoki bo'yalgan yo'lakchadek ko'rinadi. Bunday xolatlarda PZR fragmentini geldan ajratib olish kerak bo'ladi. **Kerakli PZR fragmentini skalpel yordamida geldan kesib olinadi, 1.5 ml li tsentrifugalangan probirkaga joylashtiriladi va tarozida o'lchab olinadi. PZR fragmentlarini ishlab chiqaruvchi tomonidan tavsiya qilingan turli xil usullar yordamida ajratib olish mumkin.**

Agarozada gelidan PZR mahsulotidan kerakli genning DNKsini ajratish uchun ishlatiladigan maxsus DNK tozalash to'plamlaridan foydalaniladi.

Tozalangan PZR mahsulotlari natijasi ko'rish uchun 0.9 % li agarozada gelida elektroforez o'tkaziladi.

Laboratoriya ishini bajarish tartibi:

Kerakli PZR fragmentini skalpel yordamida geldan kesib oling, 1.5 ml li tsentrifugalangan probirkaga joylashtiring va tarozida o'lchab oling. Elektroforez kamerasidan gelni olib, transillyuminatorida himoya ko'zoynagini taqqan holda, geldagi DNK nuqtasini bir martalik skalpel yordamida kesib olinadi. Kesilgan gel bo'laklarini 1,5 ml-li eppendorf idishlariga solinadi. Shuni aloxida e'tiborga olish kerakki eppendorf idishlarini tarozida tortish va xar bir eppendorf probirkalarni tartib bo'yicha raqamlash kerak.

Agaroza gelidan DNK ajratish uchun ishlatiladigan DNK tozalash to'plami.

PZR natijasidan olingan DNK larni tozalash uchun 0.9 % 100 ml li agarozaga gel tayyorlanadi. Elektroforezdan qolgan 21 mkl PZR mahsulotlarini 4 mkl Blue bo'yog'i bilan aralashdirib, har bir namuna aralashmalarini gel katakchalariga solinib, 100 Vt kuchlanish bilan 1-1,5 soat elektroforez kamerasida yurg'iziladi.

Elektroforez kamerasidan gelni olib, transillyuminatorida himoya ko'zoynagini taqqan holda, geldagi DNK nuqtalarini bir martalik skalpel yordamida kesib olinadi. Kesilgan gel bo'laklarini 1,5 ml eppendorf idishlariga solinadi. Shuni alohida e'tiborga olish kerakki eppendorf idishlarini tarozida tortish va har bir eppendorfni tartib bo'yicha raqamlash kerak.

PZR mahsulotlarini geldan tozalashda "Tsitokin" firmasida ishlab chiqarilgan to'plamlardan foydalanildi.

8. Eppendorf probirkasidagi gelni eritish uchun gel og'irligiga teng 10 mg bo'lsa 10 mkl bog'lovchi aralashma solindi.

9. Termostatga 65°S ga 15 daqiqa gel eriguncha saqlandi.

10. Termostatdan probirkani olib xona haroratida 1 daqiqa saqlanadi va vorteks qilinadi va 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

11. Tsentrifugadan probirkalarni olib ichidagi aralashmani yangi filtrli kolonkalariga solinadi va yuvuvchi aralashmadan 700 mkl solinadi, 1 daqiqa 16000 aylG'tez tsentrifuga qilinadi.

12. Probirkani ichidagi aralashma olib tashlanadi va 500 mkl yuvuvchi aralashma solinib, 5 daqiqa 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

13. Filtrli kolonka boshqa yangi 1,5 ml eppendorf probirkasiga o'tkaziladi va 50 mkl elyuat aralashmasi yoki tozalangan suv solindi, 1 daqiqa xona haroratida saqlandi, so'ng 1 daqiqa 16000 aylG'tez tsentrifuga qilindi.

14. Probirkadagi filtrli kolonkalar olib tashlanadi, eppendorf probirkani ostki qismiga tushgan geldan tozalangan mahsulotni -20°S sovutgichga solib olib qo'yiladi.

Geldan tozalangan PZR mahsulotlarini sekvenirlash uchun berildi.

Sekvenirlashga berishda PZR mahsulotlarini konsentratsiyasi aniqlanadi va shu konsentratsiyaga qarab DNK 1,0 ml Eppendorf probirkalariga solinadi. Shu bilan birga tegishli praymerlar ham beriladi.

4-amaliy mashg'ulot: Ligirlash reaksiyasini o'tkazish.

Ishning maqsadi: Ligirlash reaksiyasining o'tkazishni o'rganish

Kerakli asboblari va jihozlari: Mikrotsentrifuga, elektron tarozi, turli o'lchamdagi pipetkalar, T4 DNK- ligaza fermenti, 10X T4 DNK ligaza buferi, plazmida (vektor) *pTZ57RG'T*, geldan ajratilgan PZR-DNK fragmenti.

Ishning nazariy asoslari:

1. Ligirlash reaksiyasining asosiy tushunchasi;
2. Ligirlash reaksiyasining tarkibiy qismlari;
3. Plazmida vektorining afzalliklari.

Qisqacha nazariy qism: Ligirlash reaksiyasi - bu DNKning ikki molekulasini kovalent birikmasidir. Ligazalar, har xil DNK molekulasini fragmentlarini bir-biriga ulaydigan fermentlardir. Tajribalar o'tqazish uchun zarur bo'lgan sharoit, bu "vektorlardan" foydalanishdir. Vektorlar - viruslar yoki bakteriyalardan olinadigan qisqa xromosomalardan tashqaridagi DNK fragmenti - plazmidalar. Ligazalar yordamida vektorlarga DNKni kerak bo'lgan fragmentini (geni) kiritiladi. Vektorni vazifasi yangi DNK hujayraga kiritish va uni xo'jayin organizm DNKsiga joylashtirish.

Ligirlash reaksiya uchun quyidagi tarkibiy qismlar talab qilinadi: T4 DNK-ligaza fermenti, 10X T4 DNK ligaza buferi, plazmida (vektor) *pTZ57RG'T* va geldan ajratilgan PZR- DNK fragmenti.

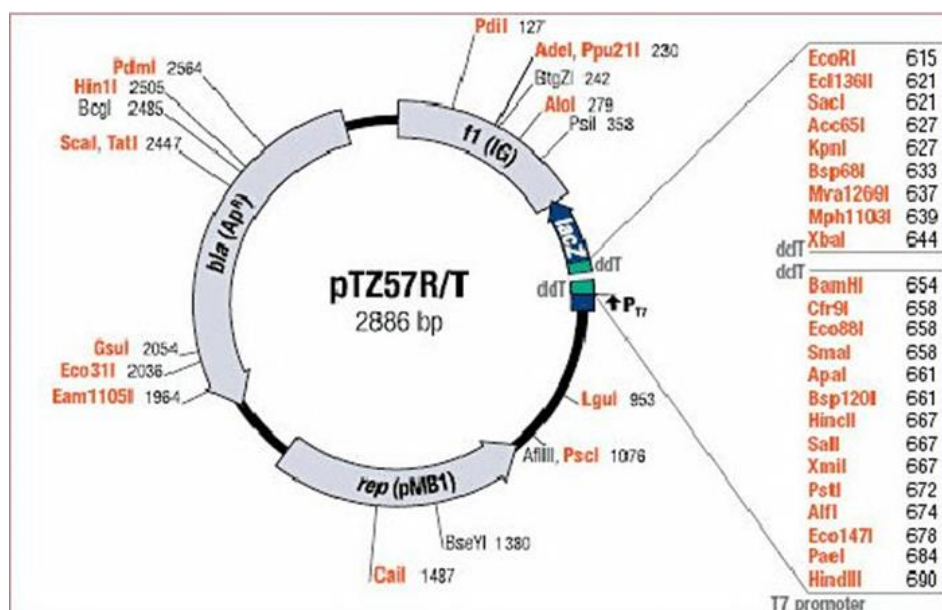
T4 ligaza - DNK fermenti - bu molekulyar og'irligi 55,3 kDa bo'lgan monomerik polipeptid. Ferment DNKning 5'-fosfat va 3'-gidroksil terminal guruhlari o'rtasidagi fosfodiefir aloqasini shakllanishini katalizlaydi. Yopishqoq uchlarni bog'lashdan tashqari, u ikki qanotli DNK parchalarini uchlari bilan birlashtirish reaksiyasini katalizatsiyalashga qodir. T4 fagadan rekombinant klonlangan DNK ligaza genini olib yuruvchi *Escherichia coli* shtammidan ajratilgan. Optimal ta'sir harorati $Q\ 16^{\circ}\ S$. Saqlash harorati $-20^{\circ}\ S$

Bufer 10X T4 DNK - Ligaza ligirlash reaksiyasi uchun mos sharoitlarni ta'minlaydi. U quyidagilardan iborat: 400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT (ditiotreitol), 5 mM ATF. ATF parchalanishining oldini olish uchun, buferni ($-20^{\circ}\ S$) bir oz qismini, qayta-qayta eritmasdan saqlash kerak.

Plazmid (vektor) pTZ57RG'T (5-rasm) PZR fragmentini TG'A klonlash va keyinchalik *E. coli* bakterial hujayralariga aylantirish uchun ishlatiladi. Vektorlar - viruslar yoki bakteriyalardan olinadigan qisqa xromosomalardan tashqaridagi DNK fragmenti - plazmidalar. *pTZ57RG'T* vektorining afzalliklari:

- Bu chiziqli ikki qatorli DNK molekulasi;
- Ikki zanjirning 3'-uchida dideoksitimidin (ddT) mavjud bo'lib, bu ligirlash paytida vektorning qayta ishlanishiga to'sqinlik qiladi va klonlash mahsulotlarining yuqori mahsuldorligini va yot mahsulotlarning past darajasini ta'minlaydi;
- Klonlash samaradorligini baholash uchun ko'k-oq testdan foydalanishga imkon beradi;

- Ko'p cheklangan endonukleazlarni tanib olish joylari mavjud, bu esa klonlangan parcha bilan keyingi manipulyatsiyalarni amalga oshirishga imkon beradi;
- M13G'pUC praymerini to'ldiruvchi nukleotidlar ketma-ketligini o'z ichiga oladi, bu DNK parchasini sektsiya qilish yoki PZR tahlilini o'tkazish imkonini beradi;
- T7 promotorlikka ega, u kiritilgan DNK parchasini *in vitro* da transkripsiya qilishga imkon beradi.



5-rasm. pTZ57RG'T vektorli xaritasi

Laboratoriya ishini bajarish tartibi:

1. Ishga kirishishdan oldin, reaksiyaning barcha tarkibiy qismlarini eritib oling (5-jadval), T4 DNK ligazasidan tashqari, ularni muzlatgichga 4° S haroratda vaqtincha saqlash uchun qo'ying.
2. 1,5 ml naychani muz ustiga qo'ying, 3,7 mkl agarozadan tozalangan PZR bo'lagi, 0,5 mkl 10X T4 DNK-ligaza buferini, 0,5 mkl pTZ57RG'T plazmidida va 0,3 mkl T4 DNK qo'shing. Ligazalar, oxirgi hajmi 5 mkl.
3. Reaksiya aralashmasini 1,5 ml naychada xona haroratida 1 soat davomida inkubatsiya qiling.

5-жадвал

Ligirlash reaksiyasi uchun reaksiya aralashmasining tarkibi

Reaksiya tarkibiy qismlari	Hajm, mkl
Plazmidida (vektor) PTZ57RG'T	0,5
DNK-ligaza buferi T4 10X	0,5
PZR-DNK fragmenti	3,7

DNK-ligaza T4	0,3
Yakuniy reaksiya hajmi	5

Mavzu: 8-ish. *Escherichia coli* kompetent hujayralarining tayyorlash talablari

Ishning maqsadi: *Escherichia coli* kompetent hujayralarining tayyorlash talablarini o'rganish

Kerakli asboblari va jihozlari: Termostat, mikrotsentrifuga, turli o'lchamdagi pipetkalar, *E. coli* shtammi, LB (Luria-Bertani muhiti) va agarlangan LB muhiti.

Ishning nazariy asoslari:

1. Kompetent hujayralar;
2. *E. coli* kompetent hujayralarining tayyorlash talablari.

Qisqacha nazariy qism: Agar xujayralar devorlari DNK osonroq o'tishi uchun o'zgartirilsa, *E. coli* hujayralari begona DNKlarni ko'proq o'z ichiga oladi. Bunday hujayralar vakolatli "kompetent" deyiladi. Hujayralar kaltsiy xlorid va issiqlik zarbidan foydalanish jarayonida kompetentli qilinadi. Hujayralar o'sishning juda tez o'sib borishi boshqa bosqichlaridagi hujayralarga qaraganda ko'proq kompetentlikka ega bo'ladi.

Kompetentlik holatida bakteriyalar avtolizin, endonukleaza 1 va DNKni bog'laydigan oqsil sintezini faollashtiradigan maxsus past molekulyar og'irlikdagi proteinni (vakolat omili) ishlab chiqaradi. Avtolizin hujayra devorini qisman yo'q qiladi, bu DNKning u orqali o'tishiga imkon beradi, shuningdek bakteriyalarning osmotik zarbaga chidamliligini kamaytiradi (Grant, 1980). Kompetentlik holatida metabolizmning umumiy darajasi ham pasayadi. Bakterial konvertsiya uchun DNK ikki qatorli bo'lishi kerak, uning uzunligi 450 juft nukleotidlardan kam emas. Jarayon uchun maqbul pH miqdori 7 ga teng.

Amaliy ishni bajarish tartibi:

E. coli shtammi XL1-Blue hujayralarini o'stirish uchun 1 turdagi oziqlantirish muhitidan foydalanish mumkin: LB (Luria-Bertani muhiti) va LB - agarlangan (mos ravishda 6 va 7-jadvallar).

6-jadval

LB (pH 7.5) tarkibi

Kompetent nomi	Miqdor
Tripton	10 gG'l
Hamirturush ekstrakti, tuz saqlamagan, tip D	5 gG'l
NaCl 5M	10 gG'l
Deionlangan suv	1 l

7-jadval

Agarlangan LB muhiti tarkibi

Kompetent nomi	Miqdor
Tripton	10 gG'l
Hamirturush ekstrakti, tuz saqlamagan, tip D	5 gG'l

NaCl 5M	10 gG'l
Agar	5 gG'l
Deionlangan suv	1 l

CaCl₂ usuli yordamida kompetentli *E. coli* hujayralarini tayyorlash (Cohen et al., 1972).

6. Kompetentli hujayralarni tayyorlash uchun, 37° C haroratda 16-20 soat davomida Petri idishlarida o'stirilgan, diametri 2-3 mm bo'lgan *E. coli* shtammi XL-Blue bakterial koloniyasini tanlang va uni LB vositasi bilan flakonga o'tkazing.
7. 37° C da 3 soat davomida termostatda inkubatsiya qiling, shundan keyin 25 ml kolba idishdan 2 ta sterillangan sovutilgan polipropilen probirkalarga o'tkazing va muz ustida 10 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.
8. Keyin probirkadagi kulturani 10 minut davomida 4°C da, 6 ming aylanma tezlikda tsentrifuga qiling, so'ngra suyuqlikni cho'kgan ostki qismini ehtiyotkorlik bilan chiqindi stakanga to'kib tashlang va uni ag'darmasdan filtr qog'oziga probirkani qoldiq suyuqlikni yo'qotish uchun tepadan pastga qaratib joylashtiring.
9. Har bir probirkada tarkibi 10 mM MgCl₂ va 5 mM CaCl₂ ni o'z ichiga olgan, oldindan tayyorlangan va sovutilgan 15 ml eritma bilan resuspenziya qiling.
10. Olingan aralashmani 10 minut davomida 4°C da, 6000 aylana tezlikda tsentrifuga qiling, so'ng suyuqlikni ostki qismini olib tashlang, har bir probirkadagi qoldiqni miqdorini oldindan tayyorlangan va sovutilgan 0,1 M CaCl₂ eritmasidan 2 ml solib resuspenziya qiling.

5-amaliy mashg'ulot: Plazmida DNKsi ajratish. Restriksion tahlil

1-qism: Plazmida DNKsi ajratish

Ishning maqsadi: Tayyor to'plamlar yordamida plazmida DNKsini ajratishni o'rganish.

Kerakli asboblari va jihozlari: Mikrotsentrifuga, termostat, turli o'lchamdagi pipetkalar, plazmida DNKsini ajratuvchi reaktivlar to'plami.

Ishning nazariy asoslari:

1. Plazmida DNKsini ajratish tartibi.

2. Fermentas Gene Plasmid Kit to'plami yordamida plazmida DNKsini ajratish.

Qisqacha nazariy qism: Inkubatsiyadan keyin plazmida DNKsini bakterial hujayralardan ajratish kerak. Kit ishlab chiqaruvchilar tomonidan tavsiya etilgan tartibda turli xil to'plamlar yordamida bakterial hujayralardagi plazmida DNKsini ajratib olish mumkin. Misol uchun, Fermentas Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit # K050 to'plamida ajratishi va uning protokoldan foydalanish mumkin.

Amaliy ishni bajarish tartibi:

- 16.1,5 ml bakteriya kulturasini 1,5 ml tsestrifuga probirkasiga o'tkazing, 30 sekundda maksimal tezlikda (13,0 ming aylanish tezligi) tsestrifuga qiling, mikropipetka yordamida supernatantni olib tashlang.
- 17.Cho'kmaga 250 mkl Buffer PI qo'shing (-4°C da saqlanadi), cho'kma erimaguncha vorteksda aralashiring.
- 18.250 mkl Buffer P2 lizis buferini qo'shing (tarkibida SDS va NaOH ionlarini mavjud detergent; qo'shilganda hujayra membranasi yo'q qilinadi), 1,5 ml probirkani 6 marta ag'darilgan holda aylantiring. Vorteksda aralashirmang!
- 19.350 mkl neytrallovchi bufer Buffer P3 (tarkibida natriy yoki kaliy atsetati mavjud) qo'shing, 1,5 ml probirkani 6 marta ag'darma holda aylantiring.
- 20.Maksimal tezlikda 5 daqiqa davomida tsestrifuga qiling.
- 21.Ehtiyotkorlik bilan supernatantni sorbentli kolonkaga o'tkazing. Kolonkani 2 ml tsestrifuga probirkasiga joylashtiring.
- 22.Kolonkani 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsestrifuga qiling va probirkadagi tsestrifugatni (cho'kmani) to'kib tashlang.
- 23.Kolonkaga 500 mkl yuvish bufferi Buffer PB (tarkibida C₂H₅OH) qo'shing.
- 24.Kolonkani 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsestrifuga qiling. 2 ml probirkadagi tsestrifugatni to'kib tashlang.
- 25.Kolonkaga 750 mkl yuvish buferini Buffer PE qo'shing.
- 26.Kolonkani 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsestrifuga qiling. 2 ml probirkadagi tsestrifugatni to'kib tashlang.
- 27.Yuvish bufferini to'liq olib tashlash uchun kolonkani yana 2 ml probirkada 1 minut davomida maksimal tezlikda tsestrifuga qiling.
- 28.Kolonkani yangi 1,5 ml tsestrifuga probirkasiga o'tkazing, kolonkaga 50 mkl elyutsiya buferini (Elution Buffer) qo'shing. Xona haroratida 1 daqiqa davomida inkubatsiya qiling.
- 29.Kolonkani 1,5 ml probirkada 1 minut davomida maksimal aylanish tezligida tsestrifuga qiling. Plazmid DNKsi 1,5 ml probirkada qoladi, kolonkani tashlab yuboring.
- 30.To'plam bilan ajratilgan plazmid DNKsini Q 2°C dan Q 4°C gacha haroratda yoki -15°C dan -25°C gacha haroratda saqlash kerak.

2-qism: Restriktaza reaksiyasi tahlili

Ishning maqsadi: Restriktaza reaksiyasi uchun kerakli fermentazlarni tanlash va reaksiya tahlilini o'rganish.

Kerakli asboblari va jihozlari: Amplifikator, mikrotsentrifuga, termostat, muzlatgich, elektroforez tok manbai va to'plami, turli o'lchamdagi pipetkalar, ligirlash reaksiyasi reaktivlari to'plami, restriktaza fermentlari, agaroz.

Ishning nazariy asoslari:

1. Restriktaza reaksiyasi uchun kerakli fermentazlarni tanlash;
2. Ligirlash reaksiyasi reaktivlar to'plami yordamida o'tkazish;
3. Restriktaza reaksiyasi tahlili.

Qisqacha nazariy qism: Restriktazalar – DNK molekulasini aniq uchastkasidan kesadigan fermentlardir. Bu fermentlari ikki zanjirli DNKdagi ma'lum bir ketma-ketlikni tan oladigan va sayt ichidagi yoki yonidagi DNKni gidroliz qiladigan endonukleazlardir. Kamida 1 ming restriktaza fermentlari ma'lum. Restriktazalar juda ham muvoffaqiyatli – “biologik qaychi” degan nom olgan. Bular yordamida DNK molekulalarini fragmentlarga kesib, har xil manipulyatsiyalar o'tqazish mumkin. Restriktazalar va ligazalar yordamida olimlar vetorlarga DNK ni kerak bo'lgan gen fragmentini kiritdilar.

Amaliy ishni bajarish tartibi:

1. Ishga kirishishdan oldin reaksiya tarkibiy qismlarini eritib oling (9-jadval), restriktaza fermentlaridan tashqari (10-jadval) va vaqtincha saqlash uchun 4° S ga muzga qo'ying.
2. 1,5 ml probirkani muz ustiga qo'ying, 8 mkl plazmada DNK (*pTZ57R/T* COI20 mtDNK geni qo'shilishi bilan), 0,5 mkl Alu I fermenti, 0,5 mkl HAE III fermenti va 1 mkl 10x React Buffer 0 buferini qo'shing. Reaksiya aralashmasining yakuniy hajmi - 10 mkl.
3. Barcha tarkibiy qismlarni qo'shgandan so'ng, reaksiya aralashmasi 1,5 ml probirkada, 37 soat davomida 1 soat vaqtga inkubatsiya qiling.
4. DNK namunalari restriktaz tahlilidan keyin 0,8% agaroz geliga qo'ying (5-mashg'ulotga qarang), qo'llash uchun maxsus buffer qo'shing – 6X Loading Dye, shunda qo'llash uchun namunadagi oxirgi konsentratsiyasi 1X bo'lishi kerak.

Masalan, 8-rasmda 0,9 % agaroz gelidagi elektroforez yordamida plazmada DNKni restriktaz bo'linish natijalari tahlili ko'rsatilgan.

9-jadval

Ligirlash reaksiyasi uchun reaksiya aralashmasining tarkibi

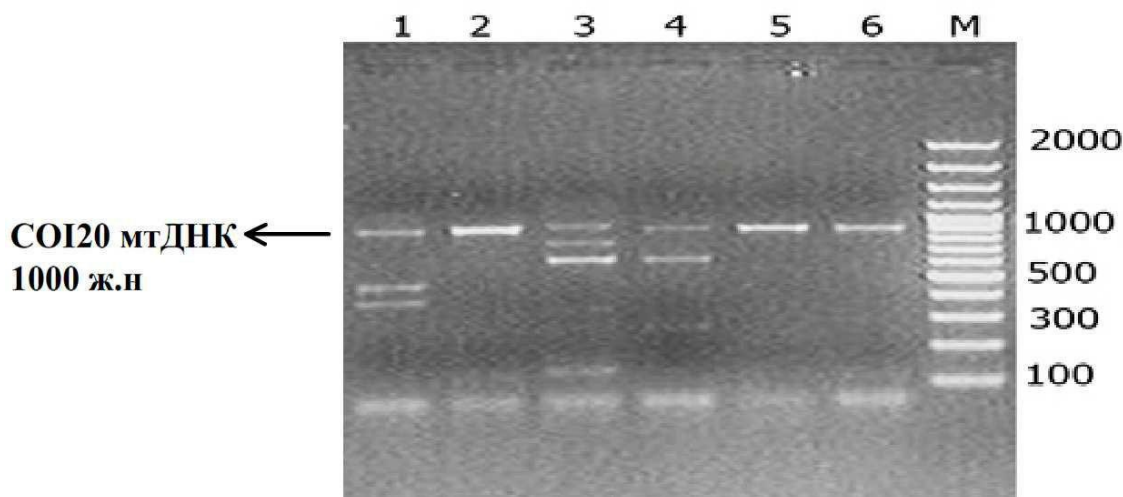
Reaksiya tarkibiy qismlari	Xajm, mkl
Alu I	0,5
HAE III	0,5
10x React Buffer 0	1
Plazmada DNKsi	8
Yakuniy reaksiya hajmi	10

10-jadval

Ishda ishlatiladigan restriktaza fermentlari

Restriktaza	Saytni tanish	Manba	Bufer eritmasi
EcoR1	G [^] AATTC CTTAA [^] G	<i>E. coli</i> shtammi, klonlangan genini tutuvchi <i>ecoRIR</i> - <i>E.</i>	Buffer EcoR1 yoki Buffer Tango

		<i>coli</i> RY13	
BamH1	G [^] GATCC CCTAG [^] C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H shtammi	Buffer BamH1 yoki Buffer Tango
Alu I	AG [^] CT	<i>Arthrobacter luteus</i> bakteriya shtammi	Blue 10 ^x Buffer yoki Buffer Tango
HAE III	GG [^] CC	<i>Haemophilus aegyptius</i> shtammi	Buffer R yoki Buffer Tango



8-rasm. 0,9 % agarozaga gelida plazmida DNKsini elektroforez orqali restriktaz bo'linish natijalarini tahlil qilish. 1-6 - tahlil qilingan namunalari, M - DNK-marker.

6-amaliy mashg'ulot: Sekvenirlash reaksiyasi. PZR-amplifikatsiya reaksiyasidagi asimmetrik fragmentlarni tozalash.

1-qism: Sekvenirlash reaksiyasi

Ishning maqsadi: Sekvenirlashga tozalangan DNKlarni tayyorlashni o'rganish.

Kerakli asboblari va jihozlari: Amplifikator, mikrotsentrifuga, turli o'lchamdagi pipetkalar, PZR mahsuloti, praymerlar.

Ishning nazariy asoslari:

1. Avtomatik DNK sekvenirlash printsipi va tartibi;
2. *PZR-amplifikatsiyaning asimmetrik reaksiyasini fluoretsent nishonli nukleotidlar yordamida tashkil etish.*

Qisqacha nazariy qism: Avtomatik DNK sekvenirlash printsipi aniq vaqt tartibida fluoretsentlangan mahsulotlarni elektroforetik ajratish, o'ziga xos terminatsiya sekvenirlash reaksiyalari va ularning detektsiyasini o'z ichiga oladi (Inoue et al., 1998). Detektsiya gelning pastki qismida, DNK qismlarining lazer nuri yordamida bo'yoq molekulari qo'zg'alishi natijasida amalga oshiriladi. Ajratish mahsus moslama, avtomatik DNK sekvenatori yordamida amalga oshiriladi.

Avtomatik DNK sekvenatori maxsus kompyuter dasturlari yordamida boshqariladi. Masalan, Applied Biosystems firmasi moslamasi yig'ish dasturi va ma'lumot tahlili bilan birga qo'shiladi. Elektroforetik bo'linish tugallangandan so'ng, Data Collection dasturi yordamida oldindan yig'ilgan ma'lumotlar o'ziga

xos dastur yordamida tahlilga yuboriladi. Bunda u yoki bu nukleotidlar asosidagi terminantlangan DNKning tegishli fragmentlarining nisbiy balandik cho'qqisi aniqlanadi va buzilganlari olib tashlanadi (Alphey, 1997).

Amaliy ishni bajarish tartibi:

Sekvenirlash reaksiyasidagi PZR bosqichlari uchun mo'ljallangan reatsiyalar aralashmasi komponentlari 11-jadvalda ko'rsatilgan.

11-jadval

Sekvenirlash reaksiyasidagi PZR bosqichlari uchun mo'ljallangan reatsiyalar aralashmasi tarkibi

Reaksiya komponentlari	Hajmi, mkl
2,5X Ready Reaction Premix	0,5
TMS Buffer 5X	3,75
3,3 mkM Praymer	1
DNK	1
Bidistillirlangan suv	13,75
Reaksiyaning yakuniy hajmi	20

Sekvenirlash reaksiyasidagi PZR bosqichlari uchun mo'ljallangan termotsikler xarorat tartibi va ishlatiladigan praymerlar nomi 12-13 jadvallarda ko'rsatilgan. DNK sekvenirlash M13G'pUC(-20) kabi standart praymerlar yordamida va ABI Prism 310 Genetic Analyzer avtomat sekvenatori yordamida o'tqaziladi.

12-jadval

Sekvenirlash reaksiyasini o'tkazishda temperaturalar davri tartibi

Temperatura	Vaqt	Tsikllar	Bosqichlar tasnifi
96° S	1 min	1	Dastlabki qizdirish
96° S	10 sek	35	denaturatsiya
55° S	50 sek	35	yumshatish
60° S	4 min	35	sintez
10° S	-	1	saqlash

13-jadval

DNK- sekvenirlashda praymerlarning nukleotid ketma-ketligi

Praymerning nomlanishi	Ketma-ketlik 5'→3'
Sekvenirlash uchun praymerning T7 promotor qismi	TAATACGACTCACTATAGGG
Sekvenirlash uchun to'g'ri praymer M13G'pUC (-20)	GTAAAACGACGGCCAGTG

Klonlangan fragmentlarni PZR amplifikatsiyasi buferi sifatida 5X TMS Buffer (400 mM Tris pH 9,0, 10 mM MgCl₂) qo'llaniladi.

2-qism: PZR amplifikatsiyasi assimetrik reaksiyasidagi fragmentlarini

tozalash

Ishning maqsadi: PZR amplifikatsiyasi assimetrik reaksiyasidagi fragmentlarini tozalashni *o'rganish*

Kerakli asboblari va jihozlari: Amplifikator, mikrotsentrifuga, termostat, vorteks, turli o'lchamdagi pipetkalar, PZR mahsuloti, praymerlar.

Ishning nazariy asoslari:

1. PZR amplifikatsiyasi assimetrik reaksiyasidagi fragmentlarini tozalash usuli.
2. BioEdit dasturlash paketi yordamida sekvenirlangan xromatogramma tahlili

Qisqacha nazariy qism: Avtomatik DNK sekvenirlashidagi fluotsentlangan mahsulotlarni ajratish terminantlangan sekvenirlash reaksiyalarida, elektroforezdan tashqari kapillyar-gel elektroforezi keng qo'llaniladi (Sambrook et al., 2001). Unga yuqori sezuvchanlik, kapillyarning juda kichkina ichki diametri natijasi hisoblanagan yuqori bo'linuv tezligi, kabi xususiyatlari mos keladi. Dastlabki ishlarda kapillyar elektroforezini amalga oshirish uchun oddiy poliakrilamid geli xizmat qilgan (Lario et al., 1997). Biroq uning o'zgaruvchanligi, havo pufakchalarining hosil bo'lishi kabi kamchiliklari metodning unumdorligini ko'rinar darajada pasaytirardi. Chiziqli poliakrilamid usulidan foydalanish quyidagi muammolarning echimi bo'ldi va bu metodning samaradorligini oshirishga xizmat qildi (Inoue et al., 1998).

Amaliy ishni bajarish tartibi:

1. PZR-fragmentlari saqlangan probirkaga 2 mkl 125 mM EDTA, 2 mkl 3M natriy atsetat va 70 mkl 95% etanol qo'shing.
2. Aralashmani xona sharoitida 15 daqiqa mobaynida inkubatsiya qiling so'ngra aralashmani vorteksda aralastiring.
3. Aralashmani 30 daqiqa mobaynida 20°S da inkubatsiya qiling.
4. 20 daqiqa mobaynida 13 ming daqG'ayl. tsentrifugalang.
5. Keraksiz cho'kmadagi suyuqlikli mikropipetka yordamida astalik bilan olib tashlang.
6. Cho'kindiga 100 mkl 70 % li etanol va 5 daqiqa mobaynida 13 ming daqG'ayl. tsentrifugalang.
7. Keraksiz cho'kmadagi suyuqlikli olib tashlang va probirkalarni 37°S termostatda ochiq holda quriting.
8. Keraksiz suyuqlik bug'langandan so'ng 20 mkl *Hi-Di formamida* qo'shing.
9. Aralashmani 20 sek davomida vorteksda aralastiring.
10. Probirkadagi aralashmani termotseklarga SeqPrep parametriga joylashtiring.
 - 2 daqiqa mobaynida 95° S gacha qizdiring;
 - Saqlash uchun 4° S gacha sovuting.
11. Probalar joylashgan probirkalarni termotsiklerden chiqargandan so'ng, qisqa vaqt mobaynida (20 sek) tsentrifugalab, tomchilarni yo'qotib oling

va probani mahsus sekvenslash uchun mo'ljallangan probirkaga joylashtiring.

Sekvenslash natijalariga BioEdit dasturlash paketi yordamida ishlov beriladi. Sekvensirlangan xromotogramma tahlili uchun Chromas dasturidan foydalaniladi. Misol tariqasida 9-rasmda BioEdit dasturlash paketi yordamida sekvensirlangan xromotogramma tahlili ko'rsatilgan. ITS2 rDNK geni qismidagi birlamchi nukleotidlar ketma-ketligini (uzunligi 370 p.n.):

>1_Potostrongylus sp.

```
TCGCGACTATTTGTCAAACGGTACTCGTCGTCAGTCTAAAGACGTGATTCCCGTTT  
TAGTGTAGAATAATGTGATAGCAACATGTAATGATACTTATGTATTATTACGCCAA  
ATTCAATATGCTGGAATATGTCCACATGCATGCTAGTGTTATCATTACTACCATCG  
TCGATGGATTTTCAACGAGTATCGCTGGAAATCATATAATGTTGAAGATTCGCCGA  
TGGACGTCGTGTGCTGTTTCAGTAATGATAGCTGTAACTAGACATGAAGCGAGC  
TGGGTGGACATAGTTTGCATATTGTTCTTGCTTATTGTAACATGCAACCTGAACTC  
AGATGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT
```



9-rasm. BioEdit dasturida sekvens xromotogrammasi namunasini ko'rinishi.

7-mavzu: Turlar xilma-xilligi. Jumboqli turlar Reja

1. Turlar xilma-xilligi.

2. Jumboqli turlar

Qisqacha mazmuni: Ko'p hollarda faqat morfologik mezonlar yordamida turlar tarkibini o'rganish qiyin yoki "baxsli, mujmal turlar"ni ajratish hatto imkonsiz [Bickford, 2006]. Bu holda albatta molekulyar genetik metodlarni qo'llash kerak.

Jumboqli (mujmal) deb nomlangan turlar, ikki yoki undan ortiq tur bir tur sifatida tasvirlangan (bir nomga ega) va eng kamida tashqi morfologik farqlar kuzatiladi [Bicford, 2007]. Birinchi, bu turlar molekulyar-genetik usullardan ancha avval Linney klasifikatsiyasi qabul qilingan paytda kashf etilgan.

Jumboqli turlar, shuningdek, o'xshash turlar yoki egizak turlar ham deyiladi. Birinchi marta "egizak-turlar" atamasini [Mayer, 1963] kiritgan. "Jumboqli turlari" termini keyinchalik paydo bo'ldi [Henry, 1985], ammo ko'proq to'g'riroq deb hisoblandi, ba'zi mualliflar "egizak-turlar" atamasini faqat qiz turlar uchun, qaysiki umumiy bir shoxdan rivojlangan turlarga xos deb hisoblashdi. Bir qancha, jumboqli turlar xaqiqatdan ham qiz turlarga mos keladi, bu xollarda sinonim hisoblash mumkin, ammo ko'p mualliflar hammasini "jumboqli turlar" deb atashmoqda [Knowlton, 1986]. Bundan tashqari, bir qancha mualliflar "jumboqli turlar" va "pseudomujmal turlar" tushunchalariga ajratgan. Aniqlangan morfologik belgilarga qarab ajratish bilan birga mujmal turlar molekulyar-genetik metodlar yordamida ajratiladi. Bu holda turlar "pseudokriptik" turlar deb ataladi [Saez, 2003].

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Osterman, L.A. Metodo' issledovaniya belkov i nukleino'x kislot: elektroforez i ultratsentrifugirovanie (prakticheskoe posobie) G' L.A. Osterman. - M.: Nauka, 1996. - 288 s.
2. Soloveva V.V., Morov A.R., Rizvanov A.A., Sabirov .M. Molekulyarno-geneticheskiy analiz bespozvonochno'x jivotno'x po nukleotidnoy posledovatelnosti gena 18s ribosomnoy RNK. Uchebnoe posobie. Kazan: Kazan. federalno'y un-t, 2011. – 52 s.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed G' J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Mirziyoev Sh.M. Buyuk kelajagimizni mard va olijanob xalqimiz bilan birga quramiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.
5. Mirziyoev Sh.M. Qonun ustuvorligi va inson manfaatlarini ta'minlash-yurt taraqqiyoti va xalq farovonligining garovi. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.
6. Mirziyoev Sh.M. Erkin va farovon, demokratik O'zbekiston davlatini birgalikda barpo etamiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2016.
7. Mirziyoev Sh.M. Tanqidiy tahlil, qat'iy tartib-intizom va shaxsiy javobgarlik- har bir rahbar faoliyatining kundalik qoidasi bo'lishi kerak. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.
8. O'zbekiston Respublikasi Prezidentining farmoni PF-4947 son 07.02.2017 y. O'zbekiston respublikasini yanada rivojlantirish bo'yicha harakatlar strategiyasi to'g'risida
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual G' Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength G' H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba G'G' Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.

11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. - 1968. - V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding. *Syst. Biol.* V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). *J. Nematol.* 33(1):1-70
14. Kuchboev A.E., Amirov O.O., Karimova R.R. Polimerazali zanjirli reaksiyada ishlatish uchun hayvonlarning o'pka va ichak nematodalari to'qimalaridan DNK ajratish usullari. *Zooveterinariya*. - Toshkent, 2015. №4. 24-26 b.
15. Shpeer V. S. DNK-shtrixkodirotivanie vidov jivotno'x i rasteniy - sposob ix molekulyarnoy identifikatsii i izucheniya bioraznoobraziya. *Jurnal obhey biologii*, 2009, tom 70, № 4, s. 296-315
16. Helkunov, S.N. Geneticheskaya injeneriya: Ucheb.-sprav., posobie G' S.N. Helkunov. – Novosibirsk: Sib. univ. izd-vo, 2004. – 496 s.

Internet saytlar

<http://www.ddbj.nig.ac.jp>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts>

www.ddbj.nig.ac.jp

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://www.cytokine.ru>

8-mavzu: Bioxilma-xillikni o'rganishda molekulyar-genetik usularning qo'llanilishi. Molekulyar markerlar.

Reja

1. **Bioxilma-xillikni o'rganishda molekulyar-genetik usularning qo'llanilishi.**
2. **Molekulyar markerlar**

Qisqacha sharh: Bioxilma-xillikni o'rganish biologiyaning asosiy vazifalaridan biri hisoblanadi. Ammo, birinchi navbatda "Biologik xilma-xillik" tushunchasiga nimalar kirishini aniqlash zarur. Zamonaviy kontseptsiyaga ko'ra, organizmlar bioxilma-xilliligini barcha muhitlardagi tirik organizmlar, quruqlik, dengiz va boshqa suv ekotizimlardagi ekologik komplekslar: tur ichida, turlar va ekotizimlar o'rtasida xilma-xillik tashkil qiladi. (*Rio-de-Janeyro, 3-14 iyun 1992 yil, Birlashgan Millatlar Tashkilotining atrof-muhit va rivojlanish konferentsiyasida qabul qilingan biologik xilma-xillik to'g'risidagi Konventsiya*).

Bunga ko'ra biologik xilma-xillik uch tipga bo'linadi:

- ekotizimlar va landshaftlar (yashash joyining xilma-xilligi);
- turlar xilma-xilligi;

- genofond (genetik xilma-xillik).

Genetik xilma-xillik yoki genetik polimorfizm – populyatsiyalarning belgilar yoki tabiatning genetik markerlari xilma-xilligi [Ramel, 1998]. Genetik xilma-xillik tur yoki populyatsiya guruhleri, populyatsiyalarning genetik xususiyatlari muhim tarkibiy qismi hisoblanadi. Genetik xilma-xillik genetik markerlarni tanlashga, bir qancha o'zgaruvchan parametrlarda ifodalanadi [Leffler, 2012]:

1. Virtual geterozigotali - π , ya'ni, populyatsiyada ikki tasodifiy tanlangan genotipli nofunktsional nukleotid sayt o'rtasidagi farq nisbati.

2. Lokusdagi allellar soni.

3. Genetik masofa (populyatsiyalar o'rtasidagi genetik xilma-xillikni baholash).

Biz bioxilma-xillikni faqat ikki turdagi ya'ni turlar xilma-xilligi va populyatsiyaning genetik polimorfizmini molekulyar-genetik metodlardan foydalanib o'rganamiz.

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга қураимиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, катъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қондаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary

- electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
 12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
 13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
 14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун хайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
 15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
 16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://www.cytokine.ru/>

9-mavzu: Kommertsiyali reagent to'plamlari yordamida umurtqasizlar to'qimasi namunasidan genom DNKsini ajratish

Reja

1. Kommertsiyali reagent to'plamlari usuli va uni asosiy xususiyatlari

2. Diatom DNA Prep 200 to'plami va uning tarkibi

Qisqacha sharh: Bu uslub reagentlar yoki kitlar yordamida nukleotidlarni ekstraksiya qilish uslublaridan biri hisoblanadi. Bu to'plam DNKni turli tabiiy materiallardan ajratish, shuningdek klinik namunalardan DNKni tez tozalab olish imkonini beradi. Bu usul FX uslubdan jadalligi (1 ta namunaga 30 min. – 1,5 vaqt sarflanadi), toksik (zaharli) reagentlarning ishlatilmasligi bilan ajralib turadi. Ta'sir qilish mexanizimi guanidintiotatsionatli lizis qiluvchi reagentning ishlatilishiga asoslangan bo'lib, u hujayrani lizisiga, hujayra solyubilizatsiyasiga, shuningdek hujayra nukleazali denaturatsiyaga olib keladi. Lizis qiluvchi (parchalovchi) – reagent ishtirokida DNK NucleosTM – sorbent to'plamida faol so'riladi, so'ngra

spirtli eritmada oqsil va tuzlardan oson yuviladi. Sorbentdan ajratilgan DNKni PZR da ishlatish mumkin. To'plamni tarkibi: parchalovchi reagent, tuzli bufer Nucleos sorbentining suspenziyasi, "Ekstra Gen" ion almashinuvchi arlashma suspenziyasi (1-b rasm). Laboratoriyada foydalaniladigan jihozlar toza bo'lishi kerak. Buning uchun avvalo jihozlar suvda yuviladi va distillangan suvda chayiladi. Ish uchun kerakli instrumentlar 96% li etanolda yuvilib olinadi. Ayrim jihozlar sterillizatorida sterilizatsiya qilinadi.

Eukariot organizmlardan nuklein kislotalarni ajratish va fraktsiyalashda klassik va kommertsiyali tayyor reagent-to'plam usullaridan foydalaniladi (Kuchboev va boshq., 2015).

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга қураимиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, катъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қондаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V.

217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
 13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
 14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун хайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
 15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
 16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://www.cytokine.ru/>

10-mavzu: *Escheria coli* komponent xujayralarini tayyorlash talablari

Reja

1. Kompetent hujayralar;

2. *E. coli* kompetent hujayralarining tayyorlash talablari.

Qisqacha sharh: Agar xujayralar devorlari DNK osonroq o'tishi uchun o'zgartirilsa, *E. coli* hujayralari begona DNKlarni ko'proq o'z ichiga oladi. Bunday hujayralar vakolatli "kompetent" deyiladi. Hujayralar kaltsiy xlorid va issiqlik zarbidan foydalanish jarayonida kompetentli qilinadi. Hujayralar o'sishning juda tez o'sib borishi boshqa bosqichlaridagi hujayralarga qaraganda ko'proq kompetentlikka ega bo'ladi.

Kompetentlik holatida bakteriyalar avtolizin, endonukleaza 1 va DNKni bog'laydigan oqsil sintezini faollashtiradigan maxsus past molekulyar og'irlikdagi proteinni (vakolat omili) ishlab chiqaradi. Avtolizin hujayra devorini qisman yo'q qiladi, bu DNKning u orqali o'tishiga imkon beradi, shuningdek bakteriyalarning osmotik zarbaga chidamliligini kamaytiradi (Grant, 1980). Kompetentlik holatida metabolizmning umumiy darajasi ham pasayadi. Bakterial konvertsiya uchun DNK ikki qatorli bo'lishi kerak, uning uzunligi 450 juft nukleotidlardan kam emas.

Jarayon uchun maqbul pH miqdori 7 ga teng.

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга кураимиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, қатъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қонидаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун ҳайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари

тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.

15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

www.ncbi.nlm.nih.gov

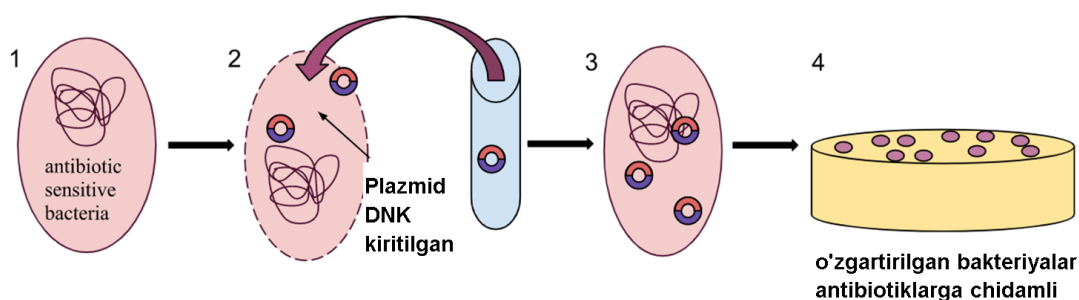
11-mavzu: *E.coli* xujayrasini genetik transformatsiyasini o'tkazish

Reja

1. Genetik transformatsiya usullari;
2. *E. coli* hujayralarining transformatsiyasi.

Qisqacha sharh: Olimlar begona DNK (gen) kiritishni bir necha usullarini ixtiro qilganlar: 1. Mikroin'ektsiya (6-rasm); 2. Liposomalarga o'rash; 3. Transfektsiya; 4. Elektroporatsiya.

Transformatsiya - ularga yot DNKlarning kirib borishi natijasida hujayralarning irsiy xususiyatlarining o'zgarishi. DNKni o'zlashtira oladigan hujayralar holati kompetentsiya holati deyiladi. Odatda, kompetentli hujayralarning maksimal soni logaritmik o'sish fazasi (eksponentsional faza) oxirida kuzatiladi. Ushbu faza hujayra bo'linishining doimiy maksimal darajasi bilan ajralib turadi, hujayralar hajmi va ko'plab bakteriyalar tarkibidagi protein miqdori ham doimiy bo'lib qoladi.



6-rasm. Su'niy transformatsiya qilish chizmasi.

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга курамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, қатъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қонидаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromatogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун ҳайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия//

- Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.
<http://www.embl.org>
<http://www.megasoftware.net/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.
<http://www.skygen.com/zinexts/>
www.ddbj.nig.ac.jp
www.ncbi.nlm.nih.gov

12-mavzu: Blastn programmasi yordamida ko'plab tekislash ishlarini olib borish

Reja

- 1. Blastn programmasi yordamida ko'plab tekislash ishlarini o'tkazish;**
- 2. Bioinformatik dasturlar yordamida ko'plab tekislash ishlarini bajarish.**
- 3. Birlamchi nukleotidlar ketma-ketligi tahlili asosida organizmlarni identifikatsiyalash**

Qisqacha sharh: Organizmlarning identifikatsiyalash odatda nukleotidlar ketma-ketligi tahlili asosida, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ko'p marotabalik to'g'rilash dasturi yordamida malumotlar bazasida GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (<http://www.embl.org>) yoki DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) o'tkazish mumkin.

BLAST (ingl. *Basic Local Alignment Search Tool*) - birlamchi nukleotidlar va oqsillar ketma-ketligini solishtirishga yordam beruvchi algoritmi. BLAST algoritmi asosidagi kompyuter dasturlari birlamchi strukturasi (ketma-ketligi) yoki malumotlar bazasidagi fragmenti malum bo'lgan oqsil yoki nuklein kislotalar gomologlarini izlab topishga imkoniyat yaratadi.

BLAST seriyasidagi dasturlar. Biologik ketma-ketlikni tahlil qilish uchun 3 ta asosiy yondashuv mavjud: Nukleotidlar ketma-ketligi tahlili. Oqsil ketma-ketligi tahlili. Translyatsiya qilingan ketma-ketliklarni taxlil qilish.

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) /

- Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
 3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга кураимиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, қатъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қонидаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromatogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун хайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

13-mavzu: Nukleotid ketma-ketliklarni tuzish. Turli kompyuter dasturlari yordamida nukleotidlar ketma-ketligini ko'p marotabali to'g'irlash Reja

1. Kladistik taxlil

2. Nukleotid ketma-ketliklarni tuzish

3. Turli kompyuter dasturlari yordamida nukleotidlar ketma-ketligini ko'p marotabali to'g'rilashni o'rganish.

Qisqacha sharh: Filogenetik daraxtni tuzish uchun oldin tahlil uchun kerakli ketma- ketlikni aniqlab olish so'ngra, ularni ko'p marotabali to'g'rilash zarur. Keyin, maxsus dastur yordamida daraxt tuziladi va natijalar grafik ko'rinishida ko'rsatiladi (Philippe et al., 2011). Filogenetik daraxtni tuzish uchun FASTA formatida nukleotidlar ketma-ketligi tuziladi.

Ketma- ketlikni tanlashda kerak bo'ladi:

3) Unchalik katta bo'lmagan tanlamada to'xtash (< 50 ketma-ketlik)

4) Fragmentlarga, ksenologlarga, rekombinant ketma-ketlik, tandem qaytalanishlarga (ketma-ketliklarni qo'plab qaytalanishi) yo'l qo'ymaslik kerak.

Kladistik taxlil esa hozirgi paytda qabul qilingan biologik klassifikatsiyaning asosi bo'lib, tirik organizmlar o'rtasidagi munosabatlarni hisobga oladi.

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга қурамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, қатъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қонидаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун ҳайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

14-mavzu: Filogenetik daraxtni tuzish. MEGA-8 dasturidan foydalanish **Reja**

- 1. Filogenetik daraxtni tuzish talablari;**
- 2. MEGA-8 dasturidan foydalanish;**
- 3. Bioinformatik dasturlar yordamida foydalanib filogenetik daraxt tuzishni o'rganish.**

Qisqacha sharh: Filogenetik daraxtni tuzish maxsus dastur yordamida daraxt tuziladi va natijalar grafik yoki kladogramma ko'rinishida ko'rsatiladi. Kladogramma (inglizcha cladogram) – zamonaviy biologik sistematikadaga asosiy tushuncha – daraxtsimon graf bo'lib, taksonlar o'rtasidagi singillik munosabatlarini aks ettiradi.

Kladistika (qadimgi yunonchada kládos - tarmoq) – filogenetik sistemataning yo'nalishidir. Kladistik amaliyotning o'ziga xos jihati kladistik tahlil (taksonlar o'rtasidagi qarindoshlik aloqalarni rekonstruktsiya qilishda argumentatsiyaning qat'iy sxemasi), monofiliyani tushunish va loyihalashtirilgan filogeniya bilan ierarxik klassifikatsiya o'rtasidagi bir xil o'xshashlikni talab qilish hisoblanadi.

Foydalaniladigan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar:

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга қураимиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.

7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, қатъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қондаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун ҳайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

15-mavzu: Parazitlarni ekspress-tashxis qilish (PTsR texnologiyasi)

Reja

1. Biomaterial yig'ish.
2. Turga xos praymerlar tayyorlash.
3. Tirik hayvonlar parazitlarni ekspress-tashxis qilish usuli (PTsR)

texnologiyasi).

**Foydalaniladigan adabiyotlar:
Asosiy adabiyotlar:**

1. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
2. Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров .М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18s рибосомной РНК. Учебное пособие. Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
3. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.

Qo'shimcha adabiyotlar:

4. Мирзиёев Ш.М. Буюк келажакимизни мард ва олижаноб халқимиз билан бирга кураимиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
5. Мирзиёев Ш.М. Қонун устуворлиги ва инсон манфаатларини таъминлаш-юрт тараққиёти ва халқ фаровонлигининг гарови. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
6. Мирзиёев Ш.М. Эркин ва фаровон, демократик Ўзбекистон давлатини биргаликда барпо этамиз. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2016.
7. Мирзиёев Ш.М. Танқидий таҳлил, қатъий тартиб-интизом ва шахсий жавобгарлик- ҳар бир раҳбар фаолиятининг кундалик қонидаси бўлиши керак. Тошкент, Ўзбекистон нашриёти, 2017.
8. Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони ПФ-4947 сон 07.02.2017 й. Ўзбекистон республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида
9. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
10. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
11. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
12. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
13. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
14. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун ҳайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари

тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.

15. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

II. MUSTAQIL TA'LIM MASHG'ULOTLARI

Mustaqil ishni tashkil etishning shakli va mazmuni.

Tinglovchi mustaqil ishni muayyan modulni xususiyatlarini hisobga olgan xolda quyidagi shakllardan foydalanib tayyorlashi tavsiya etiladi:

- me'yoriy xujjatlardan, o'quv va ilmiy adabiyotlardan foydalanish asosida modul mavzularini o'rganish;

- tarqatma materiallar bo'yicha ma'ruzalar qismini o'zlashtirish;

- avtomatlashtirilgan o'rgatuvchi va nazorat qiluvchi dasturlar bilan ishlash;

- maxsus adabiyotlar bo'yicha modul bo'limlari yoki mavzulari ustida ishlash;

-tinglovchining kasbiy faoliyati bilan bog'liq bo'lgan modul bo'limlari va mavzularni chuqur o'rganish.

Mustaqil ta'lim mavzulari:

1. Genomika va genosistematika.
2. Bioxilma-xillikni o'rganishda molekulyar-genetik usularning qo'llanilishi.
3. Hayvonot olamida turlar ichidagi genetik polimorfizm.
4. Umurtqasizlar molekulyar sistematikasidagi hozirgi tadqiqotlar.
5. «DNK-shtrixkod» usuli va uning bioxilma-xillikdagi o'rni.
6. Ko'p xujayrali hayvonlarning zamonaviy sistematikasi.
7. Molekulyar taksonomiya tahlillarida qo'llaniladigan markerlar.
8. Polimeraza zanjirli reaksiya (PTsR) usuli printsiplari.
9. Elektroforez usuli printsiplari.
10. Ligirlash reaksiyasi va reaksiya o'tkazishdagi asosiy komponentlari
11. *Escherichia coli* xujayrasini komponentlarini tayyorlash va transformatsiyasi.
12. Bakterial koloniyalarida PTsR-skrining o'tkazish.
13. Restriksion tahlil.
14. Plazmida DNKsini ajratish.
15. BLAST ishlash printsiplari.
16. Filogenetik daraxt va uning xillari.

KEYSLAR BANKI

KEYS-1

Bioxilma-xillik nimaligini izohlang?

Bioxilma-xillik bu – “biologik xilma-xillik” atamasining qisqartma shakli bo'lib, Er sharidagi hayotning xilma-xilligini anglatadi. Ayrim hollarda buning uchun “hayot tizimi” atamasi ham qo'llaniladi. Ammo bioxilma-xillik juda murakkab tuzilma bo'lib, uchta tarkibiy qismdan tashkil topgan:

1. Genlar
2. Biologik turlar
3. Ekosistema

Gen bu – organizm belgilarini o'zida mujassamlashtirgan va hujayra yadrosida joylashgan DNK nukleotidlar ketma-ketligi asosida yozilgan ma'lumotlar yig'indisi hisoblanadi. Genlar ko'zning ko'k yoki qora bo'lishini, oyoqlarning yirik yoki kichik bo'lishini boshqaradi. Genlarning induvidial o'zgarishi har birimizni unikal bo'lishimizni ta'minlaydi.

Biologik turlar. Tur bu – ma'lum hududda tarqalgan, ayrim belgi xususiyatlari bilan alohidalashgan ammo chatishib nasl bera oladigan individlar yig'indisi hisoblanadi. Bu haqda biz o'ylasligimiz mumkin, ammo ha kuni bizga turli-tuman turlarga duch kelamiz. Turlar xima-xilligi bioxilma-xillikning eng ajoyib formalaridan bir i hisoblanadi. Bizning sayyoramiz milion turlarni o'zida mujassamlashtirgan bo'lib, hali ularning ko'pchiligi o'rganilmagan. Bugungi kunda 375 000 dan ortiq gulli o'simliklar va 15 000 tur sutemizuvchi va qushlarga bizga ma'lum.

Ekosistema bu – ma'lum bir tabiiy sharoitda hayot kechiruvchi va tirik va notirik omillar majmuasi hisoblanadi. Ekologlar turlar xima-xilligini tabiiy sharoitlarda o'rganadi. Er sharida judda ko'p va xilma-xil ekosistkmalar mavjud. Ulardan ayrimlari bizga ma'lum, masalan, o'rmon, tog' yoki dengiz kabilar.

KEYS-2

Qachon, qaerda va nima uchun bioxilma-xillik to'g'risidagi Konventsiya qabul qilingan?

Biologik xilma-xillik to'g'risidagi Konventsiya “Er planetasi” darajasida 1992 yilda Rio-de-Janeyroda (Braziliya) imzolangan bo'lib, 1993 yil 29 dekabrda kuchga kirgan. Bu birinchi bioxilma-xillikni saqlashga qaratilgan global kelishuv bo'lib, genetik resurslarni saqlashga juda katta yordam bergan.

Biologik xilma-xillikni saqlash Konventsiyasi sekretariyati Monrealda (Kanada) joylashgan bo'lib, Konventsiya maqsadlarini amlaga oshirishga mo'ljallangan.

KEYS-3

Bioxilmaxillikni aniqlashda qanday atamalar ishlatiladi?

Biologik xilma-xillik, Biologik resurslar, Biotexnologiya, genetik resurslar kelib chiqqan mamlakat, xonakilashtirilgan yoki madaniylashtirilgan turlar, ekosistema, ex-situ saqlash, Genetik material, Genetik resurslar, yashash joyi, in-situ sharoitlari, in-situ saqlash, **muhofaza ostidagi mintaqa.**

KEYS-4

O'zbekistonda biologik xilma-xillik haqidagi Konventsiya qachon va kim tomonidan imzolangan?

O'z barqaror rivojlanishi uchun biologik xilma-xillikni saqlashning muhimligini tan olgan O'zbekiston 1995 yilda biologik xilma-xillik haqidagi

Xalqaro konventsiyaga qo'shildi. Biologik xilma-xillikni saqlashning Milliy strategiyasi va rejasi Vazirlar Mahkamasining Raisi Islom Abdug'anievich Karimov tomonidan tasdiqlandi (1 aprel 1998 y. Farmon № 139).

KEYS-5

Genomika va genosistematika

Genomika o'zining asosida genosistematika deb ataladi. Bularning farqi organizmlar genomini o'rganishdagi yondashuvda o'z aksini topadi. Hozirgi paytda genosistematika asosan DNK bo'laklarining nukleotid ketma-ketligini (masalan, genlarni) o'rganadi va shu asosda organizmlarning qarindoshligi haqida xulosa chiqariladi. Genomika esa yadro va hujayra organellalarini butun genomlarini tadqiq qiladi va ularni solishtiradi.

Qaysi marker organizmlar evolyutsiyasini o'rganish uchun muhim qurol hisoblanadi?

1980 yillarda evolyutsiyaning muhim molekulyar markeri – ribosomal RNK taklif qilindi. Hozirgi paytda barcha ishlatilayotgan markerlar ichida (gemoglobin, tsitoxrom s va boshq.) aynan rRNK filogenetik tadqiqotlarning ommaviy quroli hisoblanadi. Buning bir qancha sabablari bor:

1. Ribosomal RNK er yuzidagi hayotning barcha hujayraviy shakllarida uchraydi va ularning barchasida bir xil funtsiyalarni bajaradi.

2. Ribosomal RNK etarlicha konservativdir.

3. Molekulasida o'zgaruvchanligi turlicha bo'lgan uchastkalarining mavjudligi tufayli rRNK turli taksonomik darajada evolyutsion qarindoshlikni aniqlash uchun ishlatilishi mumkin.

4. Genlarning PCR amplifikatsiyasi texnologiyasining rivojlanishi va ularning nukleotid ketma-ketligini tezda aniqlashning imkoniyati turli organizmlarda rRNK ning tuzilishi haqida katta ma'lumotlar bazasini olish imkonini beradi.

5. rRNK molekulasida barqaror ikkilamchi strukturaga ega bo'lib, u ancha yaxshi o'rganilgan. Ikkilamchi struktura prokariotlarning 5S va 16S molekulalarini uchun va eukariotlarning 5.8S i 18S uchun yaxshi o'rganilgan.

KEYS-6

Molekulyar biologiya va uning asosiy kashfiyotlari ?

Molekulyar biologiya – irsiy axborotni saqlash, ko'paytirish, uzatish va amalga oshirish mexanizmlari, biopolimerlar – nuklein kislotalar va oqsillarning strukturasi va funktsiyasi haqidagi fandir.

Asosiy kashfiyotlar.

1944y.	<i>DNK ning genetik rolini isbotlash.</i> Osvald Eyveri, Kolin Mak-Leod, Maklin Mak-Karti
1953y.	<i>DNK strukturasi haqida aniqlanishi.</i> Djeyms Uotson, Frensis Krik
1961y.	<i>Fermentlar sintezining genetik regulatsiyasini kashf etilishi.</i> Andre Lvov, Fransua Jakob, Jak Mono
1962y.	<i>Genetik Kodning ochilishi.</i> Marshall Nirnberg, Genrix Mattei, Severo Ochoa

1967y.	<i>Biologik faol DNK ni in vitro sintezi..</i> Artur Kornberg (molekulyar biologiyaning norasmiy lideri)
	<i>Gening kimyoviy sintezi.</i> Gobind Korana
1970y.	<i>Teskari transkriptaza fermentining kashf qilishini va teskari transkripsiya hodisasi.</i> Govard Temin, Devid Baltimor, Renato Dulbeko
1974y.	<i>Restriktazning ochilishi.</i> Gamilton Smit, Daniel Natans, Verner Arber
1978g.	<i>splaysingni kashf qilinishi.</i> Filipp Sharp
1982g.	<i>Avtosplaysingni kashf qilinishi.</i> Tomas Chek

KEYS-7

Ribosoma strukturasi.

Ribosomalar – membranalari bo'lmagan eng mayda hujayra organellalari bo'lishiga qaramasdan ular murakkab tuzilishga ega. E.coli hujayrasida taxminan 10³-5x10³ ribosoma mavjud. Prokariotik ribosomalarning chiziqli o'lchamlari 210x290 Å. Eukariotlarda esa 220 x 320 Å.

Ribosomalarning 4 ta sinfi mavjud:

1. Prokariotik 70S
2. Eukariotik 80S
3. Mitoxondriyalarning ribosomalari (55S – hayvonlarda, 75S-zamburug'larda).
4. Ribosomalarning xromosomalari (70S – yuksak o'simliklarda).

Izoh: S – sedimentatsiya koeffitsienti yoki Svedberg konstantasi. Turli molekulalar yoki ularning bo'laklarini tsentrifugalash vaqtida molekulalarning cho'kish tezligi.

III. GLOSSARIY

Termin	O'zbek tilidagi sharxi	Ingliz tilida
Biologik sistematika	Tirik organizmlar tasnifi tamoyillarini ishlab chiquvchi fan bo'lib bu tamoyillarni tizimni qurish uchun amaliy ilova sifatida ishlatadi. Tasnif deganda barcha mavjud bo'lgan va qirilib ketgan organizmlarni tizimda joylashtirish va ta'riflash tushuniladi.	Scientific discipline, which includes the principles of the development of the problem of classifying living organisms and the practical application of these principles to the construction of the system. Under the classification is defined here as the description and location of the system all existing and extinct organisms.
Biotexnologiya Ma'lumotlari Milliy Markazi (BMMM)	Biotexnologiya Ma'lumotlari Milliy Markazi (NCBI, National Center for Biotechnology Information) – AQSh milliy meditsina bibliotekasining bir qismi va AQSh sog'liqni saqlash instituti bir bo'lagi, ma'lumotlar mazmuni ochiq va Internet tarmog'i orqali Genbank baza ma'lumotlaridan foydalanish mumkin. Bu molekulyar biologiya ma'lumotlarini saqlash va qayta ishlash markaziy instituti sifatida 1988 yili Betesda shahri (Merilend shtati, AQSh) tashkil topgan.	The National Center for Biotechnology Information (NCBI) is part of the United States National Library of Medicine (NLM), a branch of the National Institutes of Health. The NCBI is located in Bethesda, Maryland and was founded in 1988 through legislation sponsored by Senator Claude Pepper.
Valid nom	Valid nom (lot. nomen validum) – taksonning to'g'ri va haqiqiy nomi, ya'ni Halqaro Zoologiya Nomenklaturasini Kodeksi qoidalariga amal kilingan holda amalga oshiriladi.	In zoological nomenclature, the valid name of a taxon is the zoological name that is to be used for that taxon following the rules in the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN).
Vektor	(genetikada) – nuklein kislota molekulasini, ko'pincha	nucleic acid molecule, often DNA used in genetic

	DNK bo'lib, u genetik injeraniyada genetik materialni boshqa hujayraga o'tkazish uchun foydalaniladi	engineering to transfer the genetic material of another cell.
Genom	muayyan tur organizmning hujayra xromosomalarini haploid to'plamida joylashgan irsiy material yig'indisidir.	a set of hereditary material contained in a haploid set of chromosomes of cells of this type of organisms. Treasure (from the Greek - "branch", "branch";. English clade.) - A group of organisms that are descended from a single common ancestor, and all descendants of that ancestor. The term is used in phylogenetics. Any treasure is regarded as a monophyletic group of organisms and can be represented by a cladogram (chart occurring organisms in the form of a tree, "pedigree").
Genom DNK	Umumiy DNK, turli xujayralardagi xromosoma yoki uning fragmentlari ajratish	Total DNA isolated from any cell type, chromosomes or fragments thereof.
Genbank	Genbank (GenBank) – Halqaro nukleotidlar sikvensi bazasi xamkorligi (NSBH) ma'lumotlarini Internet orqali foydalanish mumkin, asosan oqsil, DNK va RNK ketma-ketliklarining ochiq matbuotda chop etilgan ma'lumotlardan tashkil topgan.	The GenBank sequence database is an open access, annotated collection of all publicly available nucleotide sequences and their protein translations. This database is produced and maintained by the INSDC (the International Nucleotide Sequence Database Collaboration).
Gen banki (genom kutubxonasi)	DNK klonlanuvchi molekulasining to'plami bo'lib , genom har bir ketma-ketligining bittadan kam bo'lmagan nusxasini saqlaydi.	is a collection of cloned DNA molecules comprising at least one instance of each genome sequence.
Deletsiya	(lotincha deletio – yo'q qilish) - xromosoma qayta qurilishi bo'lib, bunda xromosoma	(From the Latin deletio -. Destruction) - chromosomal rearrangements, in which

	<p>uchastkasining yo'qotilishi yuz beradi. Deletsiya xromosoma uzilishining oqibati yoki notekis crossingover natijasi bo'lishi mumkin.</p>	<p>there is loss of chromosome region. Deletion may be due to rupture of the chromosomes or the result of unequal crossing-over.</p>
DNKni klonlash	<p>(genlarni klonlash) – berilgan ketma-ketlikdagi DNKni ajratish jarayoni bo'lib, in vitro da uning ko'pchilik nusxalarini olish uchun ishlatiladi. DNK ni klonlash ko'pincha genlarni saqlovchi bo'laklarni amplifikatsiyalash uchun qo'llaniladi.</p>	<p>the process of allocating a given DNA sequence and production of many copies of it in vitro. DNA Cloning often used to amplify fragments containing the genes, and any other sequences - for example, promoters, coding sequences, and chemically synthesized oligonucleotides of random DNA segments.</p>
DNK elektroforez	<p>analitik usul bo'lib, DNK fragmentlarini o'lchami (uzunligi) va shakliga qarab ajratishda ishlatiladi. Namunalarga berilgan elektr maydonining kuchi DNK fragmentlarini gel bo'ylab ko'chishga majbur qiladi. DNK molekulasining shakar-fosfat asosi manfiy zaryadlangani uchun DNK zanjirlari manfiy zaryadlangan katoddan musbat zaryadlangan anodga tomon harakatlanadi. Nisbatan uzunroq molekulalar sekinroq ko'chadi, negaki ular gelda ushlanib qoladi. Kalta molekulalar esa tezroq harakatlanadi.</p>	<p>is an analytical method used to separate DNA fragments by size (length) and shape (in case of DNA secondary structure forms, such as pins). The forces of the electric field applied to the samples, DNA fragments are forced to migrate through the gel. Sugar-phosphate backbone of DNA is negatively charged and therefore the DNA strand moving from the cathode, negatively charged, the positive anode. Longer molecules migrate more slowly as delayed gel, shorter molecules move faster.</p>
Ichki transkripsiyala nuvchi speyser (qisq. ITS).	<p>ribosoma DNK transkripsion birliklarining alohida komponentlarini kodlamaydigan uchastkalaridir. Bu uchastkalar rRNK genlariga nisbatan yuqori polimorfizm bilan</p>	<p>(Abbr. ITS). Noncoding regions separating the individual components of the ribosomal DNA transcription unit. These regions are characterized by a high polymorphism compared to</p>

	ajralib turadi va shuning uchun xuddi genlararo speyserlar kabi ribosoma DNK lokuslarining genetik markerlari sifatida ishlatiladi.	rRNA genes, and therefore, as intergenic spacers are used as genetic markers of ribosomal DNA loci.
Kladistika	(qadimgi yunonchada kládos - tarmoq) – filogenetik sistematikaning yo’nalishidir. Kladistik amaliyotning o’ziga xos jihati kladistik tahlil (taksonlar o’rtasidagi qarindoshlik aloqalarni rekonstruktsiya qilishda argumentatsiyaning qat’iy sxemasi), monofiliyani tushunish va loyihalashtirilgan filogeniya bilan ierarxik klassifikatsiya o’rtasidagi bir xil o’xshashlikni talab qilish hisoblanadi.	(From the ancient Greek (kládos) -. Branch) - the direction of phylogenetic systematics. Features cladistic practice to use so-called cladistic analysis (rigorous argumentation schemes in the reconstruction of the familial relationship between taxa), the strict sense of monophyly and demand one-to-one correspondence between the reconstructed phylogeny and hierarchical classification.
Kladistik tahlil	hozirgi paytda qabul qilingan biologik klassifikatsiyaning asosi bo’lib, tirik organizmlar o’rtasidagi munosabatlarni hisobga oladi.	the basis for most currently accepted biological classifications built taking into account the familial relationship between living organisms.
Kladogramma	(inglizcha cladogram) – zamonaviy biologik sistematikadaga asosiy tushuncha – daraxtsimon graf bo’lib, taksonlar o’rtasidagi singillik munosabatlarini aks ettiradi.	(English cladogram.) - One of the basic concepts in modern biological systematics - tree graph showing the relationship of nursing relationship between taxa.
Konspetsifiklik	biologik soha tushunchasidir. Ikki yoki undan ortiq organizmlar, populyatsiyalar yoki taksonlar bitta biologik turga tegishli bo’lsa ular konspetsifik hisoblanadi.	this concept in the field of biology. Two or more individual organisms, populations or taxa are conspecific if they belong to the same biological species.
Ligirlash	molekulyar biologiyada ishlatiluvchi atama bo’lib, nuklein kislota ikkita molekulasining DNK-ligaza fermenti yordamida birikishini anglatadi	a term used in molecular biology, which means the connection of two nucleic acid molecules with a DNA ligase enzyme.

Mitoxondrial DNK	Mitoxondriyada joylashgan DNK	Mitochondrial DNA - DNA localized in the mitochondria.
Molekulyar filogenetika	polimer makromolekulalar – DNK, RNK va oqsillarning strukturasi o'rganish asosida tirik organizmlar o'rtasidagi qarindoshlik aloqalarini qaror toptiruvchi usul. Molekulyar-filogenetik tahlilning natijasi tirik organizmlar filogenetik shajarasini tuzish hisoblanadi.	way to establish kinship between living organisms based on the study of the structure of polymer macromolecules - DNA, RNA and proteins. The result of a molecular phylogenetic analysis is the construction of a phylogenetic tree of living organisms.
Monofiliya	(qadimgi yunonchada “bitta” va “oilaviy avlod”) – taksonlarni bitta yagona umumiy ajdoddan kelib chiqishidir. Zamonaviy tasavvurlarga asosan, monofiletik va biologik sistematikada taxminiy yaqin ajdodning barcha ma'lum bo'lgan avlodlarni o'z ichiga oladi. Monofiliyani ba'zan golofiliya deb ham atashadi.	(Ancient Greek -. "One", and - "family clan") - the origin of the taxa from a common ancestor. According to modern concepts, monophyletic in biological taxonomy is a group that includes all known descendants of the nearest ancestor of the hypothetical, the total only for the members of this group and for anyone else. Sometimes monophyly in the sense accepted definition called golofiliy (see. Below).
Mutatsiya	Mutatsiya, o'zgarish, almashish – tirik organizmlarga xos xususiyat. Bunda irsiy informatsiya yoki belgilar tabiiy va irsiy omillar ta'sirida birdaniga o'zgarib, yangi barqaror belgilar hosil qiladi, keyinchalik bu belgilar nasldan naslga o'tish xususiyatiga ega bo'ladi. Irsiy asosning o'zgarish xarakteriga qarab mutatsiya genomli, xromosomal va genli	In biology, a mutation is the permanent alteration of the nucleotide sequence of the genome of an organism, virus, or extrachromosomal DNA or other genetic elements. Mutations result from errors during DNA replication or other types of damage to DNA, which then may undergo error-prone repair (especially microhomology-mediated

	mutatsiyalarga bo'linadi. Xujayra yadrosi bilan bog'liq bo'lmagan genlarning mutatsiyasi tsitoplazmatik mutatsiya deb ataladi.	end joining), or cause an error during other forms of repair, or else may cause an error during replication (translesion synthesis).
Mutagenез tabiiy yoki spontan	Mutagenез - tirik organizmlar genetik materiali ta'siri doirasida sodir bo'lib, bunda tashqi muhit omillarining mutagen ta'siri, ya'ni ultrabinafsha, radiatsiya, kimyoviy mutagenlar.	Mutagenesis - is a process by which the genetic information of an <u>organism</u> is changed, resulting in a <u>mutation</u> . It may occur spontaneously in nature, or as a result of exposure to <u>mutagens</u> . It can also be achieved experimentally using laboratory procedures.
Kontaminatsiya	Kontaminatsiya - tadqiq qilinayotgan namunaning begona biologik materiallar bilan zararlanishi	Contamination is the presence of an unwanted constituent, contaminant or impurity in a material, physical body, natural environment, workplace, etc.
Parafiliya	(qadimgi yunonchadan – yonida va oilaviy avlod) – monofiliya tushunchasiga filogenetik sistematika doirasida yanada kuchliroq qat'iylik berish natijasida paydo bo'lgan tushunchadir. Parafiletik guruhlar deb taxminiy umumiy ajdodning avlodlarini faqat bir qismini o'z ichiga oluvchi guruhlariga aytiladi.	(Ancient Greek and -series - Family clan.) - A concept which has arisen as a result of giving greater rigor the concept of monophyly within phylogenetic systematics. Paraphyletic groups are called groups, including only a part of the descendants of the hypothetical common ancestor (more formal definition reads: paraphyletic group is obtained from a monophyletic by withdrawing from the last one terminal group).
Plazmid DNK	Plazmida tarkibidagi bo'lgan DNK	DNA, leading into the plasmid.
Plazmida	DNKning katta bo'lmagan molekulasi, genom xromasomasidan tabiiy alohida va avtonom replikatsiya qilishga layoqatli	Small DNA molecule is physically separate from the chromosome and genomic able to replicate autonomously

Polimerazali zanjir reaksiyasi (PTsR)	molekulyar biologiyaning tadqiqot metodi bo'lib, biologik materialda (namunada) nuklein kislota (DNK) fragmentlarini sezilarli darajada ko'paytirib beruvchi usuldir.	experimental method in molecular biology, which allows to achieve a significant increase in low concentrations of specific nucleic acid fragments (DNA) in the biological material (sample).
Polifiliya	(qadimgi yunonchada ko'psonli va -oilaviy avlod) – taksonni turli xil avlodlardan kelib chiqishidir. Biologik sistematikada polifiletik deb uni tashkil qiluvchi kenja guruhlarni mazkur guruhga kirmaydigan boshqa guruhlar bilan nisbatan yaqin qarindoshligi isbotlangan guruhga aytiladi. Uni odatda konvergent yoki parallel holda paydo bo'lgan yuzaki o'xshashlik asosida ajratishadi	(Ancient Greek -. And many, and - family clan) - the origin of taxa from different ancestors. Polyphyletic in biological taxonomy is a group for which is not contested a close relationship of its constituent sub-groups with other groups, are not included in this. Her selection is usually based on a superficial similarity that arose convergent or parallel.
Populyatsiya	bu konspetsifik individlar guruhi bo'lib, u demografik, genetik yoki makon jihatidan boshqa individlar guruhidan ajralib turadi.	a group of conspecific individuals that demographically, genetically or spatially separated from other groups of individuals.
Praymer	bu DNK molekulasidagi qisqa RNK- saqlovchi fragment bo'lib, replikatsiyani initsiatsiyasi uchun muhimdir.	it is a short RNA - containing fragment in the DNA molecule required for replication initiation.
Real vaqtdagi PTsR	Real vaqtdagi PZR (Real-time PCR) - polimer zanjirli reaksiyasining laboratoriya usuli bo'lib, bir vaqtda amplifikatsiyalash va mazkur DNK molekulasining miqdorini o'lchashda foydalaniladi. Real vaqt PZR usuli bir vaqtda namunadagi o'ziga xos DNK ketma-ketlikning miqdorini aniqlash va detektsiyasini o'z ichiga oladi.	A real-time polymerase chain reaction is a laboratory technique of molecular biology based on the polymerase chain reaction (PCR). It monitors the amplification of a targeted DNA molecule during the PCR, i.e. in real-time, and not at its end, as in conventional PCR.
Rekombinant	DNKning ximer molekulasi,	DNA chimeric molecule

DNK	turli tabiatli fragmentlardan tuzilgan	composed of fragments of different origin.
Restriksiya	maxsus ferment (restriktaza) tomonidan amalga oshiriluvchi DNK zanjirining bo'linishidir.	section of the DNA chain, implemented a special enzyme (restriction enzyme).
Restriksion fragmentlar uzunligining polimorfizmi (RFLP)	bu genom DNK sini restriksiya endonukleazasi yordamida kesib, hosil bo'lgan fragmentlarni (restriktlarni) gel-elektroforez (DNK elektroforez) yo'li bilan tadqiq qiluvchi usuldur	(RFLP, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) - is a method of investigation of genomic DNA by cutting the DNA with restriction enzymes and further analysis of the resulting fragments (restriction fragments) size by gel electrophoresis (electrophoresis of DNA).
Ribosomal DNK	ribosomal RNK ni kodlovchi lokus. Odatda bu katta va murakkab tuzilishga ega lokus bo'lib, bir-biridan genlararo speyserlar bilan ajralgan katta miqdordagi takrorlanuvchi birliklardan iborat. Takrorlanuvchi birlik har bitta individual va ribosomal RNK larning bittadan nusxasini saqlaydi.	The locus encoding ribosomal RNA. Usually it is large and difficult to organize locus, consisting of a large number of repeating units, separated by intergenic spacer. Repeat unit comprises a single copy of each individual gene of ribosomal RNA, which is located between the sequences of internal transcribed spacers.
Takson	(lotinchadan taxa; qadimgi yunonchadan "tartib", "tuzilma") – umumiy xossa va belgilar asosida birlashuvchi diskret ob'ektlardan tashkil topgan klassifikatsiyadagi guruhdir.	(Latin taxon, plural taxa; from the ancient Greek "order, arrangement, organization..." - A group classification, consisting of discrete objects, united on the basis of common properties and attributes.
Taksonomiya	(qadimgi yunonchadan tuzum, tartib va qonun) – tasniflash (klassifikatsiya) va tizimlash (sistemizatsiya) ning tamoyillari va amaliyoti haqidagi ta'limot.	(From the ancient Greek - BUD, order, and -. The law) - the teaching of the principles and practice of classification and systematization.
Filogeniya	biologiyaning bir qismi bo'lib,	part of biology, considering

	organizmlarni bir-biridan kelib chiqish muammolarini o'rganadi.	the origin of organisms from one another.
--	-----------------------------------------------------------------	-------------------------------------------

**I. ILOVALAR
NAMUNAVIY FAN DASTURI**

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIV VA O‘RTA MAXSUS TA‘LIM VAZIRLIGI
GULISTON DAVLAT UNIVERSITETI
TABIIY FANLAR FAKULTETI
BIOLOGIYA KAFEDRASI**

«TASDIQLANDI»
O‘quv ishlari bo‘yicha prorektor
_____ H.H.Qo‘shiyev
« ____ » _____ 2021 yil

**AMALIY MOLEKULYAR ZOOLOGIYA
FAN DASTURI**

Bilim sohasi: 100 000 – Gumanitar soha
Ta‘lim sohasi: 510000 – Tabiiy fanlar
Ta‘lim yo‘nalishi: 70510101 – Biologiya (1-k magistr)

Fan/modul kodi	O'quv yili 2021-2022	Semestr 2	ECTS - Kreditlar 6	
Fan/modul turi Majburiy	Ta'lim tili O'zbek/rus		Haftadagi dars soatlari 2 - semestr – 4	
1.	Fanning nomi	Auditoriya mashg'ulotlari (soat)	Mustaqil ta'lim (soat)	Jami yuklama (soat)
	Amaliy molekulyar zoologiya	60	90	150
2.	<p>I. Fanning mazmuni</p> <p>Fanni o'qitishdan maqsad - molekulyar ma'lumotlar yordamida hayvonot olamining taksonomiyasi, biogeografiyasi, sistematikasi va filogenetikasi bo'yicha yangi nazariy va amaliy bilimlarni berishdan iboratdir. Turlarning barcha morfologik belgilari DNK ketma-ketligida belgilanganligini e'tiborga olgan holda sistematika uchun genetik materialdan foydalanish evolyutsiya jarayonlarini yanada chuqurroq tushunish imkonini beradi va uning asosida turlarning sistematik joylashuvi haqida tasavvurga ega bo'lishi;</p> <p>- Fanning vazifasi - hayvonot olami biologik xilma-xilligi va uning o'rganishda molekulyar-genetik usullarni qo'llash, zoologik namunalarni dala sharoitida yig'ish va saqlash, hayvon organizmidan genom DNKsini ajratish, praymerlar tanlash, PZR-amplifikatsiyasini o'tqazishni maqsadi, optimallashtirish shart-sharoitlari, PZR maxsulotlarni gel-elektroforez orqali tekshirish va tozalash, sekvenirlash, olingan nukleotidlar ketma-ketligini Bioedit, MEGA 8 dasturlarida to'g'rilash, tahlil qilish, ketma-ketliklarni tuzish, ClustalW dasturi yordamida nukleotidlarni tekislash, Genbank (Blast, NCBI) ma'lumotlar bazasi bilan solishtirish, olingan natijalar asosida turlarni aniqlash yoki yangi tur yuo'yicha magistr talabalarga yangi ma'lumotlar beriladi. Hozirgi zamon hayvonlar molekulyar sistematikasi va filogenetikasi oid ma'lumotlar; PZR-amplifikatsiya o'tqazish shart-sharoitlari va maqsadi; gel-elektroforez o'tqazish; molekulyar klonlash. DNK transformatsiyasi va uni tarqatish. Plazmida DNKsi; PZR mahsulotlarini tozalash, sekvenirlashga berish; olingan nukleotidlar ketma-ketligi asosida turlarni identifikatsiya qilish; turli programmalarda filogenetik daraxtni tuzish va undan foydalanish; olingan nukleotidlar ketma-ketligini Halqaro Genbank joylashtirish kabi bilimlarga ega bo'lishi;</p> <p>zoologik ob'ektlardan namunalar yig'ish; hayvonlar to'qimasi, qoni, jini va fekalij namunasidan genom DNKsini ajratish; PZR-amplifikatsiyasini o'tqazish; gel-elektroforez qo'yish; olingan nukleotidlar ketma-ketligi bo'yicha Blast dasturi orqali (NCBI) turlarni identifikatsiya qilish haqida ilmiy bilimlar, amaliy o'quv ko'nikmalarga ega bo'lishi kerak.</p>			
3.	<p>II. Asosiy nazariy qism (ma'ruza mashg'ulotlari)</p> <p>II.I. Fan tarkibiga quyidagi mavzular kiradi:</p> <p>1-mavzu. Amaliy molekulyar zoologiya faniga kirish.</p>			

“Molekulyar zoologiya” fanining predmeti, maqsadi, vazifalari. Molekulyar zoologiya fanining boshqa fanlar bilan aloqasi va ahamiyati. «Bioxilma-xillik» tushunchasi. Biologik turlar. Baxsli turlar. Turlar ichidagi polimorfizm. Bioxilma-xillikni saqlashda interaktiv kataloglar va ma’lumotlar bazasi. (2s)

2-mavzu. Hayvonot olami xilma-xilligi o’rganishda molekulyar usullarni qo’llash.

Genosistematika. Filogenetika. Hayvonot olamini o’rganishda molekulyar bioximiy va genetika usullarni qo’llash tarixi. Polimeraza zanjirli reaksiya. Sekvenirlash. Turlarini identifikatsiyalashda foydalaniladigan molekulyar markerlar. Mitoxondrial genlar (DNK-barkoding), yadro genlari.

3-mavzu: Hayvonlar molekulyar sistematikasini o’rganishda dunyoda va O’zbekistonda bo’yicha olib borilayotgan tadqiqotlar

Ko’p xujayrali umurtqasiz hayvonlarning zamonaviy sistematikasi va filogenetikasi. Umurtqasiz hayvonlar molekulyar taksonomiyasi bo’yicha O’zbekistonda olib borilayotgan tadqiqotlar.

4-mavzu: Molekulyar-genetik tahlillar uchun zoologik namunalarni yig’ish talablari. Namunalarda morfologik va taksonomik tadqiqotlar

Zoologik ob’ektlardan invaziv va neinvaziv genetik namunalarni yig’ish. Namunalarni dala va amaliy sharoitida saqlash talablari. Namunalarni molekulyar tadqiqotlar uchun yaroqliligi. Yig’ilgan namunalarda morfologik va taksonomik tadqiqotlar o’tkazish.

5 mavzu. Zoologik ob’ektlardan genom DNKsini ajratish

Zoologik namunasidan genom DNKsini ajratish Standart fenol-xloroform va kummertsiyali reagent to’plamlari yordamida. Fenol – xloroformli uslubi, Diatom DNA Prep (Rossiya) reagentlari to’plami yordamida DNK ajratish uslubi va Dneasy Tissue Kit (Germaniya) reagentlar to’plami yordamida DNK ajratish uslubining usul va kamchiliklari.

6-mavzu: Polimeraza zanjirli reaksiya (PZR) uslubining asosiy tushunchasi. PZR – amplifikatsiya

Polimeraza zanjirli reaksiya (PZR) uslubini asosiy tushunchasi. PZR uchun kerakli yadro va mitoxondrial markyorlarini tanlash. PZR-amplifikatsiya o’tqazish. PZR rejimi.

7-mavzu: Agaroz gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi. Ribosomal va mitoxondrial DNK tozalash

Agaroz gelida elektroforez usulini asosiy tushunchasi. Agaroz gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o’tqazish. DNK konsentratsiyasini o’lchash. DNK tozalash to’plamlari yordamida DNKni tozalash va ajratish.

8-mavzu: Molekulyar klonlash. Ligirlash reaksiyasi. Komponent xujayralarni tayyorlash va transformatsiya qilish

Ligirlash reaksiyasi va uni o’tkazish uchun kerakli komponentlar. *Escherichia coli* xujayrasini o’stirish. *E. coli* komponent xujayralarni tayyorlash. *E. coli* xujayrasini genetik transformatsiyasini o’tkazish. Bakterial koloniyalarni PtsR-skrining qilish.

9- mavzu: Plazmida DNKsi ajratish. Restriksion tahlil

Plazmida DNKsini Fermentas Gene to’plamlari yordamida ajratish.

Restriksiya reaksiyasini o'tkazish printsiplari.

10-mavzu. Sekvenirlash – DNKning birlamchi nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash. Nukleotidlar ketma-ketligi asosida organizmlarni identifikatsiya qilish

PZR-amplifikatsiyaning asimmetrik reaksiyasini fluorestsent nishonli nukleotidlar yordamida tashkil etish (sekvenirlash reaksiyasi. PZR-amplifikatsiya reaksiyasidagi asimmetrik fragmentlarni tozalash. Blastn programmasi yordamida ko'plab tekislash ishlarini olib borish.

11-mavzu: Filogenetik daraxtni tuzish. Nukleotidlar ketma-ketligini ni Genbank (NCBI) bazasiga joylashtirish. DNK – diagnostika (PZR texnologiyasi)

Tahlil uchun olingan ketma-ketliklarni tuzish. Turli dasturlar yordamida nukleotidlar ketma-ketligini ko'p marotabali to'g'irlash. Filogenetik daraxtni tuzish MEGA dasturidan foydalanish (Ko'proq haqiqatga o'xshashlik usuli (maximal likelihood), maksimal iqtisod (maximal parsimony), chamalab ko'rilgan o'rtacha juftlik (UPGMA) va yaqin qo'shnilar (Neighbor-joining)dasturlari orqali tekshirish). Olingan nukleotidlar ketma-ketligini halqaro Genbank (NCBI) joylashtirish.

12 mavzu: Parazitar kasalliklarni PZR-diagnostikasi

Biomaterial yig'ish. Turga xos praymerlar tayyorlash. Tirik hayvonlar parazitozlarni ekspress-tashxis qilish usuli (PZR texnologiyasi).

III. Amaliy mashg'ulotlari buyicha ko'rsatma va tavsiyalar
((Laboratoriya ishlari), (Seminar mashg'ulotlari), (Kurs ishi), (Mustaqil ta'lim) o'quv rejada ko'rsatilgan turi (nomi) bo'yicha yoziladi)

Amaliy mashg'ulotlar uchun quyidagi mavzular tavsiya etiladi:

1. Standart fenol-xloroform usuli yordamida umurtqasiz hayvonlar to'qimasi namunasiidan genom DNKsini ajratish
2. Polimeraza zanjirli reaksiya (PZR) - amplifikatsiya o'tkazish .
3. **Agaroza gelini tayyorlash va PZR mahsulotlarida elektroforez o'tkaziish. Agaroza gelidan DNK ajratish va tozalash.**
4. **Ligirlash reaksiyasini o'tkazish.**
5. Plazmida DNKsi ajratish. Restriksion tahlil.
6. **Sekvenirlash reaksiyasi. PZR-amplifikatsiya reaksiyasidagi asimmetrik fragmentlarni tozalash.**
7. Turlar xilma-xilligi. Jumboqli turlar.
8. Bioxilma-xilikni o'rganishda molekulyar-genetik usularning qo'llanilishi. Molekulyar markerlar.
9. Kommertsiyali reagent to'plamlari yordamida umurtqasizlar to'qimasi namunasiidan genom DNKsini ajratish.
10. Escheria coli komponent xujayralarini tayyorlash talablari.
11. E.coli xujayrasini genetik transformatsiyasini o'tkazish.
12. **Blastn programmasi yordamida ko'plab tekislash ishlarini olib borish.**
13. Nukleotid ketma-ketliklarni tuzish. Turli kompyuter dasturlari yordamida nukleotidlar ketma-ketligini ko'p marotabali to'g'irlash

14. Filogenetik daraxtni tuzish. MEGA-8 dasturidan foydalanish

15. Parazitozlarni ekspress-tashxis qilish (PZR texnologiyasi).

Amaliy mashg'ulotlarni tashkil etish bo'yicha kafedra professor-o'qituvchilari tomonidan ko'rsatma va tavsiyalar ishlab chiqiladi. Ma'ruza mashg'ulotlarida olgan bilim va ko'nikmalarni misol va masalalar echish bilan mustahkamlaydilar hamda yanada boyitadilar. Bunga jamoa bo'lib mashq qilish va mustaqil ishlash yo'li bilan erishiladi.

Amaliy mashg'ulotlar multimedia qurilmalari bilan jihozlangan auditoriyada bir akademik guruhga bir professor-o'qituvchi tomonidan o'tkazilishi zarur. Mashg'ulotlar faol va interfaktiv usullar yordamida o'tilishi, mos ravishda munosib pedagogik va axborot texnologiyalar qo'llanilishi maqsadga muvofiq.

IV. Mustaqil ta'lim va mustaqil ishlar

Mustaqil ta'lim uchun tavsiya etiladigan mavzular:

Mustaqil ish uchun parazitologiya va uning asoslari yuzasidan ma'lumotlar bayon etilgan qo'shimcha adabiyotlar tavsiya etiladi. Mustaqil ish uchun beriladigan vazifalar fakultativ va individual xarakterga ega bo'lib, talabaning yo'nalishiga bog'liq jarayonlarni yanada chuqurroq o'rganishga qaratilgan.

Mustaqil ish uchun belgilangan mavzularni talabalar mustaqil ravishda ko'rsatilgan adabiyotlar yordamida o'zlashtirib joriy, oraliq nazorat shaklida yoki darslardan tashqari vaqtlarda referat yoki muloqot tarzida topshiradilar.

Talaba mustaqil ishni tayyorlashda fanning xususiyatlarini hisobga olgan holda, quyidagi shakllardan foydalanish tavsiya etiladi:

- Amaliy mashg'ulotlarga tayyorgarlik;
- Darslik va o'quv qo'llanmalar bo'yicha fan boblari va mavzularini o'rganish;
- Tarqatma materiallar bo'yicha ma'ruza qismini o'zlashtirish;
- Maxsus adabiyotlar bo'yicha fan bo'limlari yoki mavzulari ustida ishlash;
- Talabaning o'quv, ilmiy-tadqiqot ishlarini bajarish bilan bog'liq bo'lgan fan bo'limlari va mavzularni chuqur o'rganish;
- Faol va muammoli o'qitish uslubidan foydalaniladigan o'quv mashg'ulotlari;
- Masofaviy ta'lim.

Mustaqil ish uchun quyidagi topshiriqlarni bajarish tavsiya etiladi:

1. Amaliy mashg'ulotlarga tayyorgarlik ko'rish
2. Nazorat ishlariga tayyorgarlik ko'rish.
3. **PZR-amplifikatsiya reaksiyasidagi asimmetrik fragmentlarni tozalash.**
4. Parazitozlarni ekspress-tashxis qilish (PZR texnologiyasi).

V. Ta'lim natijalari / Kasbiy kompetentsiyalari

Talaba bilishi kerak:

- hozirgi zamon hayvonlar molekulyar sistematikasi va filogenetikasi oid ma'lumotlar; PZR-amplifikatsiya o'tqazish shart-sharoitlari va maqsadi; gel-elektroforez o'tqazish; molekulyar klonlash. DNK transformatsiyasi va uni

	<p>tarqatish. Plazmada DNKsi; PZR mahsulotlarini tozalash, sekvenirlashga berish; olingan nukleotidlar ketma-ketligi asosida turlarni identifikatsiya qilish; turli programmalarda filogenetik daraxtni tuzish va undan foydalanish; olingan nukleotidlar ketma-ketligini Halqaro Genbank joylashtirish kabi bilimlarga ega bo'lishi;</p> <p>- zoologik ob'ektlardan namunalar yig'ish; hayvonlar to'qimasi, qoni, juni va fekalij namunasidan genom DNKsini ajratish; PZR-amplifikatsiyasini o'tqazish; gel-elektroforez qo'yish; olingan nukleotidlar ketma-ketligi bo'yicha Blast dasturi orqali (NCBI) turlarni identifikatsiya qilish ko'nikmalarga ega bo'lishi va foydalanishi;</p> <p>“Amaliy molekulyar zoologiya” uslubi orqali baxsli, munozarali va yangi turlarni aniqlash; turlarni filogeniyasini o'rganish orqali filogenetik daraxt tuzish haqida ilmiy bilimlar, amaliy o'quv ko'nikmalarga ega bo'lishi kerak.</p>
4.	<p>VI. Ta'lim texnologiyalari va metodlari: ma'ruzalar; interfaol keys-stadilar; seminarlar (mantiqiy fiklash, tezkor savol-javoblar); guruhlarda ishlash; taqdimotlarni qilish; individual loyihalar; jamo bo'lib ishlash va himoya qilish uchun loyihalar.</p>
5.	<p>VII. Kreditlarni olish uchun talablar: Fanga oid nazariy va uslubiy tushunchalarni to'la o'zlashtirish, tahlil natijalarini to'g'ri aks ettira olish, o'rganilayotgan jarayonlar haqida mustaqil mushohada yuritish va joriy, oraliq nazorat shakllarida berilgan vazifa va topshiriqlarni bajarish, yakuniy nazorat bo'yicha yozma ishni topshirish.</p>
6.	<p>Asosiy adabiyotlar</p> <p>17.Osterman, L.A. Metodo' issledovaniya belkov i nukleino'x kislot: elektroforez i ultratsentrifugirovanie (prakticheskoe posobie) G' L.A. Osterman. - M.: Nauka, 1996. - 288 s.</p> <p>18.Soloveva V.V., Morov A.R., Rizvanov A.A., Sabirov .M. Molekulyarno-geneticheskiy analiz bespozvonochno'x jivotno'x po nukleotidnoy posledovatelnosti gena 18s ribosomnoy RNK. Uchebnoe posobie. Kazan: Kazan. federalno'y un-t, 2011. – 52 s.</p> <p>19.Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed G' J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.</p> <p style="text-align: center;">Qo'shimcha adabiyotlar</p> <p>1. Mirziyoev Sh.M. Buyuk kelajagimizni mard va olijanob xalqimiz bilan birga quramiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.</p> <p>2. Mirziyoev Sh.M. Qonun ustuvorligi va inson manfaatlarini ta'minlash-yurt taraqqiyoti va xalq farovonligining garovi. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.</p> <p>3. Mirziyoev Sh.M. Erkin va farovon, demokratik O'zbekiston davlatini</p>

birgalikda barpo etamiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2016.

4. Mirziyoev Sh.M. Tanqidiy tahlil, qat'iy tartib-intizom va shaxsiy javobgarlik- har bir rahbar faoliyatining kundalik qoidasi bo'lishi kerak. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.
5. O'zbekiston Respublikasi Prezidentining farmoni PF-4947 son 07.02.2017 y. O'zbekiston respublikasini yanada rivojlantirish bo'yicha harakatlar strategiyasi to'g'risida
6. Aleshin V.V., Kidrova O.S., Milyutina I.A. et al. Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: Molecular evidence for monophyly of Chromadorian and Secernentean nematodes G'G' Russ. J. Nematol. 1998a. Vol. 6, N 2. P. 175-184.
7. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics G' L. Alphey. - Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. - 224 p.
8. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs G' S.F.Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J.Lipman G'G' Nucleic Acids Res. - 1997. - V.25. -3389-3402.
9. Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation G'G' Trends Ecol. Evol. -2007. - V. 22. -No.3. -P. 148-155.
10. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda G'G' Nature. 1998. Vol. 392. P. 71-75.
11. Carroll S. B., Grenier J. K., Weatherbee S.D. From DNA to Diversity G'G' Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design (Blackwell, Malden, MA). - 2004. -2nd Ed.
12. Caterino M.S., Cho S., Sperling F.A.H., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel G'G' Annu. Rev. Entomol. V. 45. P. 1-54.
13. Chamary J.V., Parmley J.L., Hurst L.D. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals G'G' Nat. Rev. Genet. - 2006. - V. 7. -P. 98-108.
14. Clarridge V. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases G'G' Clinical microbiology reviews. -2004. -V. 17. - № 4. -P. 840-862.
15. Crow J.F. Mid-century controversies in population genetics G'G' Annu. Rev. Genet. -2008. -V. 42. -P. 1-16.
16. Cruickshank R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks G'G' Systematic & Applied Acarology. -2002. -V. 7. -P. 3-14.
17. Dallas J. F., Irvine R. J., Halvorsen O. DNA evidence that *Ostertagia gruehneri* and *Ostertagia arctica* (Nematoda: *Ostertagiinae*) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific. Int. J G'G' Parasitol, 2000. V. 30. S. 655-658.
18. Drózdź J. Polymorphism in the *Ostertagiinae* Lopez-Neyra, 1947 and comments on the systematics of these nematodes G'G' Syst. Parasitol, 1995. V. 32 (2) S. 91-99.
19. Glick B.R., Jack J. Pasternak J.J. Molecular Biotechnology Principles and

- Applications of Recombinant DNAG' Second edition, Asm Press, Washington, D.C. 2002. 589 p.
20. Godfray H.C.J, 2002. Challenges for taxonomy G'G' Nature. V. 417. № 6884. P. 17-19.
21. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual G' Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
22. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength G' H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba G'G' Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
23. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level G'G' Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
24. Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding G'G' Syst. Biol. V. 55. № 1. P. 162-169.
25. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
26. Kuchboev A.E., Amirov O.O., Karimova R.R. Polimerazali zanjirli reaksiyada ishlatish uchun hayvonlarning o'pka va ichak nematodalari to'qimalaridan DNK ajratish usullari G'G' Zooveterinariya. - Toshkent, 2015. №4. 24-26 b.
27. Shpeer V. S. DNK-shtrixkodirotivanie vidov jivotno'x i rasteniy - sposob ix molekulyarnoy identifikatsii i izucheniya bioraznoobraziya G'G' Jurnal obhey biologii, 2009, tom 70, № 4, s. 296-315
28. Helkunov, S.N. Geneticheskaya injeneriya: Ucheb.-sprav., posobie G' S.N. Helkunov. – Novosibirsk: Sib. univ. izd-vo, 2004. – 496 s.

Интернет ва Ziyonet сайтлари:

1. <http://www.sdbonline.org>.
2. www.ziyonet.uz.
3. www.pedagog.uz.
4. www.maik.ru.
5. www.libmmn.h.15.ru
6. www.cultinfo.ru
- <http://www.ddbj.nig.ac.jp>
- <http://www.embl.org>
- <http://www.megasoftware.net>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.
- <http://www.skygen.com/zinexts>
- www.ddbj.nig.ac.jp
- www.ncbi.nlm.nih.gov
- <http://www.cytokine.ru>

7. Fan dasturi Oliy va o'rta maxsus, kasb-hunar ta'limi yo'nalishlari bo'yicha O'quv-uslubiy birlashmalar faoliyatini Muvofiqlashtiruvchi Kengashning

	<p>202__ yil “__” _____dagi ____ -sonli bayonnomasi bilan ma’qullangan.</p> <p>O‘zbekiston Respublikasi Oliy va o‘rta maxsus ta’lim vazirligining 202__ yil “__” _____dagi ____ -sonli buyrug‘i bilan ma’qullangan fan dasturlarini tayanch oliy ta’lim muassasasi tomonidan tasdiqlashga rozilik berilgan.</p>
8.	<p>Fan/modul uchun ma’sular: Ergasheva F - GulDU, “Biologiya” kafedrası mudiri PhD, biologiya fanlari bo‘yicha falsafa doktori Ergasheva F - GulDU, “Biologiya” kafedrası o‘qituvchisi</p>
9.	<p>Taqrizchi: A.Pazilov - GulDU “Biologiya” kafedrası professori, biologiya fanlari doktori</p>

ADABIYOTLAR RO‘YXATI

I. Me’yoriy- huquqiy xujjatlar va prezident asarlari

1. O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2015 yil 12 iyundagi “Oliy ta’lim muassasalarining rahbar va pedagog kadrlarini qayta tayyorlash va malakasini oshirish tizimini yanada takomillashtirish chora-tadbirlari to’g’risida”gi PF-4732-sonli, 2017 yil 7 fevraldagi “O‘zbekiston Respublikasini yanada rivojlantirish bo’yicha Harakatlar strategiyasi to’g’risida”gi PF-4947-sonli Farmoni.
2. O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2017 yil 20 apreldagi “Oliy ta’lim tizimini yanada rivojlantirish chora-tadbirlari to’g’risida”gi PQ–2909-sonli Farmoni.
3. O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining «Oliy ta’lim muassasalarining rahbar va pedagog kadrlarini qayta tayyorlash va malakasini oshirish tizimini yanada takomillashtirish chora-tadbirlari to’g’risida» 2015 yil 12 iyundagi PF-4732-son Farmoni.
4. Kadrlar tayyorlash milliy dasturi. O‘zbekiston Respublikasi Oliy Majlisining Axborotnomasi, 1997 yil. 11-12-son, 295-modda.
5. O‘zbekiston Respublikasi Vazirlar Mahkamasining 2012 yil 28 dekabrda “Oliy o’quv yurtidan keyingi ta’lim xamda oliy malakali ilmiy va ilmiy pedagogik kadrlarni attestatsiyadan o’tkazish tizimini takomillashtirish chora-tadbirlari to’g’risida”gi 365-sonli Qarori.

II. Maxsus adabiyotlar

17. Aleshin V.V., Kidrova O.S., Milyutina I.A. et al. Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: Molecular evidence for monophyly of Chromadorian and Secernentean nematodes // Russ. J. Nematol. 1998a. Vol. 6, N 2. P. 175-184.
18. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics / L. Alphey. - Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. - 224 p.
19. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // Nucleic Acids Res. - 1997. - V. 25. - 3389-3402.
20. Andrews R.H & Beveridge I. Apparent absence of genetic differences among species of (Nematoda: Trichostrongylidae). Journal of Helminthology. 1990. 64: 290-294
21. Barrett R.D.H., Hebert P.D.N. Identifying spiders through DNA barcodes// Canadian Journal of Zoology. -2005. -V.83. - № 3. -P. 481-491.
22. Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation // Trends Ecol. Evol. -2007. - V. 22. -No.3. -P. 148-155.
23. Bisby F. A. The quiet revolution: biodiversity informatics and the Internet// Science. -2000. - № 289. -P.2309-2312.
24. Blaxter M. *Caenorhabditis elegans* is a nematode // Science. 1998. Vol. 282. P. 2041-2046.
25. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda // Nature. 1998. Vol. 392. P. 71-75.
26. Bleidorn C., Kruse I., Albrecht S., Bartolomaeus T. Mitochondrial sequence data expose the putative cosmopolitan polychaete *Scoloplos armiger* (Annelida, Orbiniidae) as a species complex// BMC Evol Biol. - 2006. -V.6. -№ 1. - P.1-13.
27. Carr C. M. Polychaete diversity and distribution patterns in Canadian marine waters //Marine Biodiversity. -2012. -V. 42. - №. 2. - P. 93-107.
28. Carroll S. B., Grenier J. K., Weatherbee S.D. From DNA to Diversity//Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design (Blackwell, Malden, MA). - 2004. -2nd Ed.
29. Caterino M.S., Cho S., Sperling F.A.H., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel // Annu. Rev. Entomol. V. 45. P. 1-54.
30. Chamary J.V., Parmley J.L., Hurst L.D. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals// Nat. Rev. Genet. - 2006. -V. 7. -P. 98-108.
31. Clarridge V. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases// Clinical microbiology reviews. -2004. -V. 17. - № 4. -P. 840-862.
32. Crow J.F. Mid-century controversies in population genetics// Annu. Rev.

- Genet. –2008. –V. 42. –P. 1–16.
33. Cruickshank R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks // Systematic & Applied Acarology. -2002. -V. 7. -P. 3-14.
 34. Dallas J. F., Irvine R. J., Halvorsen O. DNA evidence that *Ostertagia gruehneri* and *Ostertagia arctica* (Nematoda: *Ostertagiinae*) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific. Int. J // Parasitol, 2000. V. 30. C. 655-658.
 35. De Leon G.P.P., Nadler S.A. What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species // J. Parasitol. - 2010. -V. 96. - P. 453-464.
 36. De Ley P., Blaxter M. Systematic position and phylogeny // The biology of nematodes / Ed. by D.L.Lee. L.; N.Y.: Taylor and Francis, 2002. P. 1-30.
 37. Dretzen, G. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels / G. Dretzen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // Anal. Biochem. - 1991. - V.112. - P.295-298.
 38. Drózdź J. Polymorphism in the *Ostertagiinae* Lopez-Neyra, 1947 and comments on the systematics of these nematodes // Syst. Parasitol, 1995. V. 32 (2) C. 91-99.
 39. Drózdź J. The question of genetic isolation and of permanent coincidence of some species of the subfamily *Ostertagiinae*. Third Int. Congr // Parasitol, 1974. V. 1. C. 477-478.
 40. Dubnau D., Smith I., Morell P., Marmur J. Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1965. - Aug. -V. 54(2). -P. 491-498.
 41. Eckert G.L. Effects of the planktonic period on marine population fluctuations // Ecology. - 2003. -V.84. -P. 372-383.
 42. Fay J.C., Wu C.I. Sequence divergence, functional constraint, and selection in protein evolution // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. - 2003. -V. 4. -P. 213-235.
 43. Folmer M., Black W., Hoeh R., Lutz and Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular marine biology and biotechnology. - 1994. -V. 3(5). -P. 294-299.
 44. Girvitz, S.C. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels / S.C. Girvitz, S. Bacchetti, A.J. Rainbow, F.L. Graham // Anal. Biochem. - 1990. - V.106. - P.492-496
 45. Glick B.R., Jack J. Pasternak J.J. Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA/ Second edition, Asm Press, Washington, D.C. 2002. 589 p.
 46. Godfray H.C.J, 2002. Challenges for taxonomy // Nature. V. 417. № 6884. P. 17-19.
 47. Green M.R. Molecular cloning: a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook. – 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.
 48. Harris D.J., 2003. Can you bank on GenBank? // Trends Ecol. Evol. V. 18. № 7. P. 317-319.

49. Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004a. - V.101. -P. 14812-14817
50. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemplak T. S., and Francis C. M. Identification of birds through DNA barcodes// PLoS Biology. - 2004b. - V.2. -P.1657-1663.
51. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard JR., 2003a. Bar-coding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 27. P. 96-99.
52. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard JR., 2003b. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 270. № 1512. P. 313-321.
53. Henry C. S. Sibling species, call differences, and speciation in green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: Chrysoperla)// Evolution. - 1985. - V.39. -P. 965-984.
54. Hogg I.D., Hebert P. D. N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes// Canadian Journal of Zoology. - 2004. - V. 82(5). -P. 749-754.
55. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. - 1998. - V.802. - P.179-184.
56. James, T.Y. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny /T.Y. James, F. Kauff, C.L. Schoch et al. // Nature. – 2006. – V.443. – P.818-822.
57. Jousson O., Bartol P. Molecules, morphology and morphometrics of *Cainocreadium labracis* and *Cainocreadium dentecis* n. sp. (Digenea: Opecoelidae) parasitic in marine fishes // International Journal for Parasitology. - 2001. -V. 31. - Issue. 7. - P. 706-714.
58. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level// Nature. - 1968. -V. 217. - P. 624-626.
59. Kjer K. M. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs// Molecular phylogenetics and evolution. - 1995. - V. 4. -P. 314-330.
60. Knowlton N. Cryptic and sibling species among the decapods// Crustac. Biol. - 1986. -V. 6.-P. 356- 363.
61. Kramp P.L. Synopsis of the Medusae of the World// J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom. -1961.-P. 469.
62. Kuchboev A.E., Krucken J., Ruziev B.H., von Samson-Himmelstjerna G. Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan// Parasitology Research 2015, 114 (4). - P 1355-1364.
63. Kwok, S. Identification of human immunodeficiency virus sequences by

- using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection / S. Kwok, D.H. Mack, K.B. Mullis et al. // *Virology*. - 1987. - V.61, №5. - P.1690-1694.
- 64.Lario,A. Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing / A. Lario, A. Gonzpalez, G. Dorado // *Anal. Biochem.* - 1997. - V.247. - P.30-33.
- 65.Leffler E. M., Bullaughey K., Matute D., Meyer W. K., Segurel L, Venkat A., Andolfatto P., Przeworski. Revisiting an Old Riddle: What Determines Genetic Diversity Levels within Species? // *Plos. Biology*. -2012. -V. 10. - Issue. 9. -P. 1-13.
- 66.Margulis L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 1071-1076
- 67.Marshall E. Will DNA barcode breathe life into classification? // *Science*. – 2005.–V. 307. –P. 1037.
- 68.Mayr E. *Animal species and evolution*// Belknap Press, Cambridge, Mass. 1963.
- 69.Mayr E. *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution* // Harvard University Press. -1970.
- 70.Mendelson T. C. 2003. Sexual isolation evolves faster than hybrid inviability in a diverse and sexually dimorphic genus of fish (Percidae:Ettheastoma)// *Evolution*. - - V. 57. - P. 317-327.
- 71.Moore W.S., Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees// *Evolution*. - 1995. -V. 49. -P. 718 - 726.
- 72.Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // *Meth. Enzymol.* – 1987. – V.155. – P.335-350.
- 73.Nadler S.A., Adams B J., Lyons E.T. et al. Molecular and morphometry evidence for separate species of *Uncinaria* (Nematoda: Ancylostomatidae) in California sea lions and Northern fur seals: Hypothesis testing supplants verification // *Ibid.* 2000. Vol. 86, N 5. P. 1099-1106.
- 74.Nielsen R, Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // *Syst. Biol.* V. 55. № 1. P. 162-169.
- 75.Nygren A., Norlinder E., Panova , M., Pleijel F. Colour polymorphism in the polychaete *Harmothoe imbricate* (Linnaeus,1767) // *Marine Biology Research*. - 2011. -V. 7. -P. 54-62.
- 76.Paggi, L., Nascetti G., Cianchi R., Orecchia P., Mattiucci S., D'amelio S., Berland B., Bratney J., Smith J. W., Bullini L.. 1991. Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. In. *J. Parasitol.* 21: 195–212
- 77.Patterson D. J. (1994) Protozoa: evolution and systematics. In: *Progress in Protozoology: Proceedings of the IX International Congress of Protozoology*, Berlin, 1993, (Eds. K. Hausmann, N. Hülsmann). G. Fischer, Stuttgart, 1-14

78. Patwardhan A., Ray S., Roy A. Molecular markers in phylogenetic studies - A review // J Phylogen Evolution Biol 2014, 2:2
79. Persson C. Phylogeny of the neotropical Alibertia group (Rubiaceae), with emphasis on the genus Alibertia, inferred from ITS and 5S ribosomal DNA sequences // American Journal of Botany. -2000. - V. 87. - № 7.-P. 1018-1028.
80. Philippe, H.; Brinkmann, H.; Lavrov, D. V.; Littlewood, D. T. J.; Manuel, M.; Wörheide, G.; Baurain, D. (2011). Penny, David, ed. "Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough". PLoS Biology 9 (3):
81. Ramel C. 1998. Biodiversity and intraspecific genetic variation // Pure & Appl. Chem., Vol. 70, No. 11, pp. 2079-2084
82. Saez AG, Probert I, Geisen M, Quinn P, Young JR, Medlin LK. Pseudocryptic speciation in coccolithophores. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 100(12):7163-8.
83. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - 1626 p.
84. Scharf, S.J. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences / S.J. Scharf, G.T. Horn, H.A. Erlich // Science. - 1986. - V.233, №4768. - P.1076-1078.
85. Schmidt S.L., Bernhard D., Schlegel M. and Foissner W. Phylogeny of the Stichotrichia (Ciliophora; Spirotrichea) Reconstructed with Nuclear Small Subunit rRNA Gene Sequences: Discrepancies and Accordances with Morphological Data// Journal of Eukaryotic Microbiology. -2007.-V. 54. - №. 2. - P. 201-209.
86. Stevenson L.A., Gasser R.B., Chilon N.B. The ITS-2 rDNA of *Teladorsagia circumcincta*, *T. trifurcate* and *T. davtiani* (Nematoda: Trichostrongylidae) indicates that these taxa are one species // Int. J. Parasitol. 1996. V. 26. № 10. P. 1123–1126.
87. Sudhaus, W., and Fitch, D., 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of Rhabditidae (Nematoda). J. Nematol. 33(1):1-70
88. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. 2002. 5S Ribosomal RNA Database. Nucleic Acids Res. 30 (1): 176–8
89. Tautz D, Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy // Trends Ecol. Evol. V. 18. № 2. P. 70-74.
90. Venter et al., 2001 The sequence of the human genome. Science. 291(5507):1304-51.
91. Wong, C. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA / C. Wong, C.E. Dowling, R.K. Saiki et al. // Nature. - 1987. - V.330, №6146. - P.384-386.
92. Woodruff D.S. Declines of biomes and biotas and the future of evolution// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2001. -V. 93. -P 5471-5476.
93. Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Fenton B. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and

- ITS sequences// Experimental & applied acarology. - 2000. - V. 24. -P. 863-880.
94. Zhang D.-X., Hewitt G.M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects // Insect. Mol. Biol. -1997. -V. 6. -P. 143-150.
95. Abramатов М.В., Amirov О.О., Kuchboev А.Э., Khalilov I.M., Abdurakhmanov I.Y. Morphological and Molecular characterization of species *Haemonchus contortus* and *H. placei* (Nematoda: Trichostrongylidae) from Uzbekistan by sequences of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA// Sci Parasitol., Cluj-Napoca, Romania, 2013.14 (4): 1-7.
96. Амиров О.О., Кучбоев А.Э. *Ostertagia ostertagi* ва *O. lyrata* (Trichostrongylidae) турларининг молекуляр-генетик таҳлили // ГулДУ хабарлари. - Гулистон. 2014а, № 3. Б.28-32.
97. Амиров О.О., Кучбоев А.Э. Молекулярная характеристика нематод *Teladorsagia circumcincta* и *T. trifurcata* (Trichostrongylidae: Ostertagiinae) с использованием спейсерных участков рибосомальной ДНК // Вестник НУУз. – Ташкент, 2013. № 4/2. С.278-284.
98. Амиров О.О., Мирзаева Г.С., Кучбоев А.Э. *Teladorsagia circumcincta* ва *Teladorsagia davtiani* (Nematoda: Ostertagiinae) турларининг молекуляр-генетик таҳлили // Инфекция, иммунитет и фармакология. –Ташкент, 2014б. №4. Б.25-30.
99. Болдырева, М.Н. Генодиагностика заболеваний: качественный и количественный подходы / М.Н. Болдырева // Цитокины и воспаление. - 2005. - №3. - С.40-41.
100. Кучбоев А.Э., Абраматов М.В., Халилов И.М., Шерматов Ш.Э., Абдурахмонов И.Ю., Азимов Д.А. Сравнительное изучение второго внутреннего спейсера (ITS2) рибосомальной ДНК видов *Haemonchus contortus* и *H. placei* (Nematoda: Trichostrongylidae) Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2012. - № 1. – С.38-42.
101. Кучбоев А.Э., Амиров О.О., Каримова Р.Р. Полимеразали занжирли реакцияда ишлатиш учун хайвонларнинг ўпка ва ичак нематодалари тўқималаридан ДНК ажратиш усуллари // Зооветеринария. - Тошкент, 2015. №4. 24-26 б.
102. Кучбоев А.Э., Каримова Р.Р., Рузиев Б.Х., Салахутдинов И.Б., Эгамбердиев Ш.Ш. Морфологическая и молекулярная характеристика некоторых видов нематод семейства Protostrongylidae Leiper, 1926// Российский паразитологический журнал, 2015. - № 3. - С. 7-14.
103. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1996. - 288 с.
104. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии. 2-е изд., перераб. и доп.: Учебник для вузов / В.Н. Рыбчин. - СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. - 522 с.
105. Саики, Р. Полимеразная цепная реакция / Р. Саики, У. Гиленстен,

- Г. Эрлих //Анализ генома: Методы / Пер. с англ., под ред. К. Дейвиса.
М.: Мир, 1990. - С.176-190.
106. Шпеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений - способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия// Журнал общей биологии, 2009, том 70, № 4, с. 296-315
107. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайтлар

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/index.html>.

<http://www.embl.org>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

<http://www.skygen.com/zinexts/>

www.ddbj.nig.ac.jp

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://www.cytokine.ru/>