

KOLIN RETLIJ, BYORN KRISTIANSON

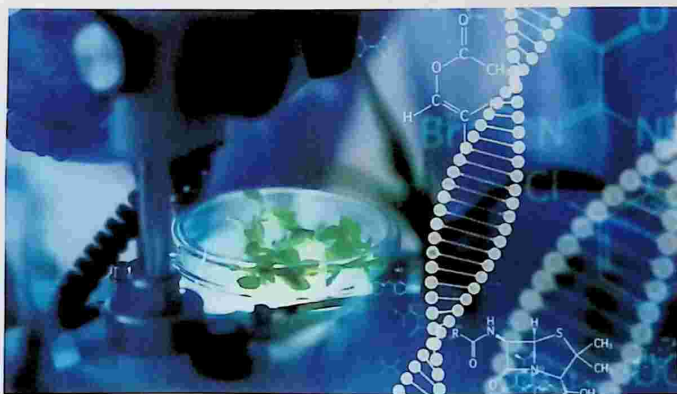
BIOTEXNOLOGIYA ASOSLARI



KOLIN RETLIJ, BYORN KRISTIANSO

BIOTEXNOLOGIYA ASOSLARI

O'simliklar to'qimalari madaniyati va genetik muhandislik



Toshkent — “Donishmand ziyosi” — 2025

**O'zbekiston Respublikasi Oliy ta'lim, fan va innovatsiyalar vazirligi
huzuridagi Oliy ta'limni rivojlantirish tadqiqotlari markazining
buyurtmasiga asosan nashrga tayyorlandi va chop etildi.**

Ingliz tilidan **Gulrux RO'ZIYEVA** tarjiması

Kolin Retlij, Byorn Kristianson.

Biotexnologiya asoslari [Matn]: qo'llanma / Kolin Retlij, Byorn Kristianson. —
Toshkent: Donishmand ziyosi, 2025. — 176 b.

Biotexnologiya XXI asrning asosiy texnologiyalaridan hisoblanadi. U keng qamrovli va ko'p tarmoqli faoliyatni o'z ichiga oladi hamda qayta tiklangan DNK texnologiyalari, klonlash, mikrobiologiya hamda hujayralar bilan bog'liq texnologiyalarida nondan tortib to antibiotiklarga bo'lgan turli xil mahsulotlarni ishlab chiqarishni tadbiq etadi. Biotexnologiya ko'plab kasalliklarni davolashda inqilob qilishda davom etmoqda.

Biotexnologiya asoslari qo'llanmasi biologiya va biojarayon singari mavzularni o'zida mujassam etgan. Mazkur qo'llanma biotexnologiya haqida to'liq tasavvur paydo qiladi. U biotexnologiyani asoslab beruvchi fundamental tamoyillarni tushuntiradi. Shuningdek, o'z o'rnida bu tamoyillarni qanday amalga oshirish mumkinligini keng miqyosda ko'rsatadi. Bunda xomashyoning dastlabki holatidan tortib, tayyor mahsulotgacha bo'lgan jarayon chuqur o'rganiladi.

Ushbu qo'llanma biotexnologiya yo'nalishidagi talabalar, amaliyotchilar va professor-o'qituvchilar, ilmiy-tadqiqot institutlari hamda sanoat korxonalari tadqiqotchilari uchun muhim qo'llanma hisoblanadi.

Mazkur xorijiy o'quv adabiyoti professor-o'qituvchilar, doktorantlar, magistrantlar va talabalarni o'quv va ilmiy faoliyatida foydalanish uchun mo'ljallangan. Shuningdek, ilmiy izlanishlar olib borayotgan mustaqil tadqiqotchilar va keng ilmiy jamoatchilik uchun tavsiya qilinadi.

Ushbu xorijiy o'quv adabiyotidan tijorat maqsadida foydalanish qat'iyan man etiladi.

IKKINCHI NASHRI UCHUN SO'ZBOSHI

Mazkur kitobning birinchi nashri chop qilinganiga 14 yil bo'ldi. Shuncha yil mobaynida biotexnologiyada ancha ishlar amalga oshirildi. 1980-yillar o'rtalaridan boshlab paydo bo'lgan va takomillashib borayotgan DNK texnologiyasi zamonaviy biotexnologiyaning muhim asoslaridan biriga aylandi. Bu yo'nalishdagi yutuqlar salomatlikni saqlash konsepsiyasini tubdan o'zgartirdi. Bugun 20 yil avval tasavvur qilish qiyin bo'lgan mahsulotlarni yaratish imkonini bor. Biotexnologiya shiddat bilan rivojlanayotgani bois kelgusi o'n to'rt yil ichida yanada ulkanroq muvaffaqiyatlar qo'lga kiritilishi kutilmoqda. Xususan, «Inson genomi loyihasi» kabi dasturlar ham ana shunday yutuqlar jumlasidandir. Ular kasalliklarni individual davolash imkoniyatini ochib beradi. Biroq barcha bunday yutuqlar bu boradagi muhim ilmni qo'llash va uni xavfsiz hamda iqtisodiy jihatdan maqbul tarzda ishlab chiqishga bog'liq.

Biotexnologiya faqat qayta tiklangan DNK, klonlash va genetikadan iborat emas. U, shuningdek, sitrat kislota, pivo, vino, non, pishloq va yogurt kabi fermentatsiya mahsulotlari, antibiotiklar va shu kabilarni ishlab chiqarishni o'z ichiga oladi. Biotexnologiya, shuningdek, yangi ming yillikda atrof-muhitga zarar yetkazmaydigan texnologiyalar bilan insoniyatni ta'minlash, chiqindilarni qayta ishlash va ekologik muammolarni hal qilish kabi vazifalarni amalga oshirishni o'z oldiga maqsad qilgan. Qisqacha aytganda, biotexnologiya XXI asrning ikki asosiy texnologiyalaridan biri. Kelajakda butun dunyo mamlakatlari o'z taraqqiyot yo'lida davom etishini va yer yuzida farovon hayot ravnaq topishini ta'minlaydi. U turli xil yutuqlar orqali insoniyat hayoti darajasini yaxshilashda davom etadi. Bu borada tibbiy xizmat ko'rsatish masalalarini yaxshilashdan tortib, oziq-ovqat mahsulotlari va atrof-muhitga bo'layotgan turli ta'sirlarni o'rganish, shuningdek, zararli jihatlarini bartaraf etishni ko'zlaydi. Hayotimizning hech bir jabhasi biotexnologiya ta'siridan xoli emas.

Mazkur kitob biotexnologiyani asoslaydigan ko'pgina fundamental masalalar haqida umumiy tushuncha beradi va bu boradagi prinsiplarni amaliyotga tatbiq etishni turli xil namunalar orqali ko'rsatadi. Xomashyoning dastlabki holati substratdan tortib tayyor mahsulotgacha bo'lgan jarayonlarni tahlil qiladi. Biotexnologiya g'oyat ulkan va ko'p tarmoqli fan. Aytish joizki, ushbu kitobda mazkur sohaga aloqador barcha mavzular, mahsulotlar yoki jarayonlarni qamrab olish imkoniga ega emasmiz. Buning uchun ensiklopediya yaratish talab qilinadi. Shunga qaramay, biz biotexnologiyaning hozirgi holatiga oid asosiy ma'lumotlarni taqdim etishga harakat qildik. O'quvchiga mazkur fanning san'at darajasiga ko'tarilgan jihatlar va bu boradagi ko'nikmalar bo'yicha ilhom va bilim berishni o'z oldimizga maqsad qilib qo'ydik.

Kitobning birinchi nashridan keyin, afsuski, hamkasbimiz va do'stimiz Jon Bu'Lok to'satdan vafot etdi. Kitobning ilk nashrida Jonning beqiyos xizmatlari bor. U 1996-yilda vafot etdi. O'shanda Jon ikkinchi nashrni tayyorlashni rejalashtirayotgan edi. Qo'llanmani chop etish jarayonida uning yo'lidan bordik va bu biz uchun katta sharaf bo'ldi. Jon ko'pchiligimiz uchun biotexnologiyada ilhom manbayi bo'lib qoladi. Uning ilmiy merosi, biotexnologiyaga sadoqati beqiyos edi, bundan tashqari inson sifatida ham qadrlashga arziydigan shaxs bo'lganini e'tirof etmoq joiz. Shu bois mazkur kitobni birodarimiz Jon Bu'Lok xotirasiga bag'ishlaymiz.

UCHINCHI NASHRI UCHUN SO'ZBOSHI

Antibiotiklar va umuman boshqa salomatlikni saqlash mahsulotlarini ishlab chiqarishdan tortib chiqindilarni qayta ishlash va ularni yo'q qilishgacha bo'lgan tarmoqlarni o'z ichiga olgani uchun biotexnologiya e'tiborimizni o'ziga tortmoqda. Biotexnologiyaning keng qamrovligi va miqyosi ortib borayotir. Ma'lumki, sohada har o'n yillikda keng qamrovli yo'nalishlarda ko'zga ko'ringan yangi yutuqlarga erishilgani kuzatiladi. Bu kitobning birinchi nashridan ikkinchi nashriga qadar orada o'n to'rt yillik farq bor. Ikkinchi va uchinchi nashri orasida esa bor-yo'g'i besh yillik farq mavjudligini ko'rish mumkin. Molekulyar biologiya va genetikadagi shiddat bilan erishilgan yutuqlar hamda ularning biotexnologiyada qo'llanilishi tufayli mikrobiologiya, hayvonlar va o'simliklar hujayralari texnologiyasining taraqqiyoti yanada yuksalishiga olib keldi. Bu esa insoniyatning farovon hayotini yaxshilash uchun hech qachon intilishdan to'xtamasligini ko'rsatadi.

Biotexnologiya bugun mahsulot ishlab chiqarishda asosiy harakatlantiruvchi kuchdir. Shuningdek, atrof-muhitni muhofaza qilish yo'lida ham bu jarayonlarni boshqaruvchi texnologiya sifatida g'oyat muhim. Biotexnologiya hozirgi asrning kamida birinchi yarmida yetakchi ilmiy va sanoat yo'nalishlaridan bittasi bo'lib qoladi, deya faraz qilinmoqda. Uning salomatlik, oziq-ovqat va ichimlik ishlab chiqarishdagi qo'shgan hissasi, umuman, taraqqiyot davom etar ekan, bu fan ham yanada shakllanib borishiga shubha yo'q, chunki biotexnologiya shu qadar ahamiyatlidir.

Biotexnologiya asoslarining bu yangi nashri sohamizdagi muhim yuksalishlarni aks ettiradi, shu bilan birga, fanning nechog'lik muhim ekanligini tushunishga yordam beradi va bu boradagi fundamental tamoyillarga doir bilimlarni mustahkamlaydi. Kitobning asoslar va tamoyillar bo'limiga yangi boblar va amaliy ko'rsatmalar kiritilgan. Boshqa boblarning aksariyati ham jiddiy qayta ko'rib chiqilgan va yangilangan.

Aytish joizki, bu qo'llanmadagi tadqiqotlar mualliflari biotexnologiya bo'yicha xalqaro miqyosda tan olingan olimlardir. Ularga o'zining qimmatli vaqtini ajratib kitobni yangi tadqiqotlari bilan boyitganlari va avvalgi izlanishlarni qayta tahrirlashga yordam berganlari uchun chin dildan minnatdorchilik bildiramiz. Mualliflarning bu himmati tufayli muharrir sifatidagi mas'uliyatimiz ancha yengillashdi: ma'lumotlarni qisqartirish yoki ayrim jabhalarda dalillarni aniqlashdan gina iborat bo'ldi.

Noshirlarning yangi kitobga bo'lgan qiziqishi ham muhim ahamiyatga ega. Kitobni mukammal nashr sifatida chop etishga yordam berganlari uchun ularga ham o'z minnatdorchiligimizni bildiramiz.

ASOSLAR VA TAMOYILLAR

I BOB. BIOTEXNOLOGIYA JAMOATCHILIK NAZARIDA

1.1 Kirish

Biotexnologiyaga nisbatan jamoatchilik nazari sohada yangi texnologiyalar yaratish, bu boradagi yangiliklar, kashfiyotlar va yo'nalishiga, shuningdek, mahsulot oqimi-yu, xizmat ko'rsatishni rivojlantirish sur'atiga sezilarli ta'sir ko'rsatishi mumkin. Jamoatchilik fikri muayyan hudud yoki mintaqaga (masalan, Shimoliy Amerika, Janubi-Sharqiy Osiyo va boshqalar) bog'liq bo'lishi mumkin. Bu quyidagi bir qancha omillarga qarab farqlanadi:

- iqtisodiy farovonlik;
- ta'lim darajasi;
- madaniy va diniy qadriyatlar, an'analar;
- jamiyat va institutlarning ishtiroki usullari.

Hozirgi paytda biotexnologiyaga jamoatchilik munosabati, ayniqsa, Yevropa Ittifoqida katta bahslarga sabab bo'layotir.

Zamonaviy biotexnologiya, xususan, genomika va proteomika jamoatchilik tomonidan qanday qabul qilinayotganini o'rganishdan oldin, biotexnologiyaning sanoat, tibbiyot, qishloq xo'jaligi, savdo va atrof-muhitga katta va ijobiy ta'sir ko'rsatishigacha bo'lgan tarixiy taraqqiyotini ta'kidlash o'rinlidir. Tarixga nazar tashlasak, biotexnologiyaning mikrobiologik jihatlarlari asrlar davomida rivojlanib kelganiga guvoh bo'lamiz, lekin bu jihatlar asrlar davomida ilmiy emas, balki hunarmandchilik malakasi tufayli taraqqiy etgan. Bunga pivo, vino, pishloq, yogurt, fermentatsiya qilingan go'sht kabi sohalar qadimdan davom etib kelayotgani misol bo'ladi. Bu mahsulotlarni ishlab chiqarish usullari yaxshi o'zlashtirilgan, biroq bu boradagi mikrobiologik va biokimyoviy mexanizmlar noma'lum edi. Haqiqatda, XVII–XVIII asrlarga kelibgina bu jarayonlarda ishtirok etuvchi mikroorganizmlarni aniqlash va ularning ijobiy rolini tasdiqlash imkoniyati paydo bo'ldi. Mikrobiologiya va biokimyoh sohasidagi taraqqiyot tufayli, oldindan empirik yo'sinda boshqarilgan jarayonlar yaxshi tushunilib, yaxshiroq nazorat qilina boshlandi. Bu an'anaviy mahsulotlarga yaqin yillarda antibiotiklar, vaksinalar, terapevtik oqsillar va ko'plab boshqa mahsulotlar qo'shildi. Bu mahsulotlarni ishlab chiqarish bilan bog'liq sanoat tarmoqlari mamlakatlar istiqboli va aholi salomatligiga katta hissa qo'shadi.

Shunday ekan, yaqin yillar ichida jamoatchilikda biotexnologiyaga bo'lgan qiziqish, shuningdek, xavotir ham ortib borayotganining sababini tushunish mum-

kin. Bunday o'zgarishlar, asosan, molekulyar biologiyada, xususan, rekombinat DNK (rDNK) texnologiyasi (gen texnologiyasi) sohasidagi shiddatli rivojlanishlar bilan bog'liq. Bu texnologiya biologik jarayonlarni chuqurroq anglash va nazorat qilish imkonini yaratdi. Gen texnologiyalaridan foydalangan holda, hozirda ma'lum bir hujayralarning irsiy komponentlarini (masalan, DNKning gen joylashgan kerakli qismlarini) turli organizmlar o'rtasida bevosita almashtirish imkoniyati paydo bo'ldi (masalan, mikroob va o'simlik yoxud hayvon o'rtasida, o'simlikdan hayvonga, hayvondan mikroobga va hokazo).

Genomika va yaqin o'tmishda rivojlangan proteomika sohalaridagi yutuqlar inson salomatligini saqlash sohasida muhim ilmiy muvaffaqiyatlarning qo'lga kiritilishiga olib keldi. Ular quyidagilarni o'z ichiga oladi:

- biofarmatsevtika mahsulotlari (masalan, insulin) va vaksinalar ishlab chiqarish uchun genetik modifikatsiya qilingan organizmlardan foydalanish;
- ko'plab kasalliklarning molekulyar asoslarini aniqlash;
- inson patogenlarining genamlari to'liq o'rgangan holda kasalliklarni yaxshiroq davolash imkoniyatini yaratish;
- genetik kasalliklar va saratonni davolash uchun samaraliroq gen terapiyasi usullarini ishlab chiqish;
- molekulyar, biologik va immunologik texnikalardan foydalangan holda kasalliklarga tezkor va oson tashxis qo'yish;
- oziq-ovqat o'simliklari genetikasi texnologiyasini qo'llash orqali mahsulotlar tarkibini yaxshilash;
- metabolitlarni kuzatish uchun DNK-probalar kabi biosensornlarni takomillashtirish.

O'simlik gen texnologiyasi – o'simlikning genetik tarkibini (ya'ni uning DNKsining g'oyat kichik qismini o'zgartirish) o'zgartirishga qaratilgan. Bu usul uning foydali yoki yaxshiroq xususiyatlarni taqdim etadi. Masalan, o'simlik hasharotlar yoki zamburug'lar hujumiga bardoshli bo'ladi. Bundan tashqari qurg'oqchilikka ham chidaydi. Ayrim hollarda shu birgina ta'sir orqali o'simlik o'zidagi foydali oqsil yoki moddalarni katta hajmda ishlab chiqarishi mumkin (1-jadvalga qarang) yoki uning keraksiz faoliyatini to'xtatishi ham ehtimoldan xoli emas. Masalan, bu pomidorlarda ferment faoliyatini kamaytirishga olib keladi. Pomidorlar bir necha hafta davomida mustahkam va yaxshi holatda qolishi uchun haddan ortiq pishib, yorilib ketishining oldini olish mumkin.

Genetik modifikatsiya jarayonida ekinning muhim xususiyatlari¹

- zararkunandalikka qarshi tura olish;
- virus, bakteriya va zamburug* kasalliklariga qarshi kurashish;
- yog*, kraxmal va oqsillarni modifikatsiya qilish – bioplastikalar, kir yuvish vositalari, qog'oz ishlab chiqarish va qadoqlash uchun yaroqli xomashyo manbalari uchun barqaror ta'minotni tashkillashtirish; shuningdek, non pishirish, pivo ishlab chiqarish sifatlarini yaxshilash;
- gerbitsidga chidamlilik – muayyan o'simlik turlarining ma'lum bir gerbitsidlarga chidamli bo'lishini ta'minlash; odatda gerbitsidlarni qo'llashni kamaytirish orqali begona o'tlar konrolini qo'lga olish; burchaklarni nazorat qilish;
- o'simlik arxitekturasini va gullash – bu o'simlik balandligi, gullash vaqti va gul rangini o'z ichiga oladi;
- yig'im-terim vaqtida to'kilish sabab urug'larni yo'qotishni kamaytirish;
- mevalar, tup, poya va kurtaklarni yetiltirish maqsadida modifikatsiya qilish;
- kartoshkalar ustida tadqiqotlar olib borish;
- ildiz va mevalarni o'stirishda ularning turli birikmalarga bo'lgan qaramligini kamaytirish;
- barcha turdagi o'simliklarning atrof-muhit ta'siriga, jumladan, sovuq, issiq, sho'r suv va tuproqqa chidamliligini oshirish;
- ma'lum bir o'simliklarning tuproq tarkibida toksik metallarni yo'q qilish qobiliyatini oshirish (bioremediatsiya), masalan, konlarda chiqindilardan tozalanish;
- ma'lum o'simliklardan allergenlarni yo'q qilish, masalan, guruch tarkibini ulardan tamoman xalos qilish;
- vitaminlar, minerallar va saratonga qarshi kurashuvchi moddalarni ko'paytirish;
- farmatsevtika mahsulotlarini ishlab chiqarish, masalan, antikoagulyant birikmalar va vaktsinalar.

Bunday mahsulotlarning bari – genetik jihatdan modifikatsiya qilingan (GM) ekinlar deb ataladi. Bunda qo'llanilayotgan texnologiyalar – molekulyar biologiya usullarini bevosita qo'llashni o'z ichiga oladi. Shu bois o'simliklarning o'ziga xos xususiyatlarini yaxshilash maqsadida ularni tanlangan tarzda o'zaro chatishtirish yo'li bilan istalgan xususiyatlarni shakllantirishga qaratilgan – o'simlik seleksiyasidan butunlay farq qiladi. Genetik modifikatsiya texnologiyalari aniqqligi va laboratoriya sharoitida amalga oshirilishi tufayli o'simlik seleksiyasiga qaraganda 100 barobar tez va natijasi aniqroq bo'ladi. (GM ekinlari bo'yicha kengaytirilgan ma'lumot olish uchun quyidagi qo'llanmaga murojaat qilishingiz mumkin: www.apec.umn.edu/faculty/frunge/globalbiotech04.pdf)

Agrotexnikaning asosiy e'tibori – sohaga barcha ilmiy yondashuvlarni qo'llash, shu jumladan, GM texnologiyasini, inson va hayvonlarga yetkazib beriladigan oziq-ovqat miqdori va tarkibini yaxshilashga qaratilgan. Chunki hozir yer yuzida odamlar soni ko'payib boryapti. Ekin yetishtirish uchun yerga ehtiyoj ham ortmoqda. Mazkur fan bu boradagi bir qancha muammolarni hal qilish imkonini

¹ Source: Dale, P. J. (2000). The GM debate: science or scaremongering? *Biologist* 47: 7-10. Reproduced with permission.

yatini taqdim qilishi mumkin. GM texnologiyasining butun dunyo bo'ylab qabul qilinishi va qo'llanilishi, ayniqsa, Amerika va Osiyoda tez rivojlanmoqda, ammo Yevropa mamlakatlarida ayrim qarshiliklarga duch kelmoqda.

GMning tirik mikroorganizmlarni turli ekosistemalarga moslashtirish, biopetsitsidlar yoki bioremediatsiyada qo'llashda, ayrim shaharlarda xavotirlarni yuzaga keltirdi. DNA tahlil usullari mikroorganizmlarning aniq identifikatsiyasini o'tkazishda keng qo'llanilmoqda. GM mikroorganizmlari esa aynan belgilab qo'yilgan birikmalar uchun oqsillarni yaxshilashda foydalaniladi. Zamonaviy biotexnologiyadagi aksariyat innovatsiyalar jamoatchilikni jiddiy tashvishga solmagan bo'lsa-da, uch yo'nalishda bir qancha bahs-munozaralarni keltirib chiqarishda davom etmoqda. Xususan: GM oziq-ovqatlari va biofarmatsevtika bilan bog'liq potensial masalalar yoki inson salomatligiga tug'ilishi mumkin bo'lgan xavf-xatarlar borasidagi taxminlar; inson reproduksiyasi hamda irsiyat muammolariga doir molekulyar genetik sohasidagi muvaffaqiyatlar, shuningdek, inson genetikasiga tegishli etik va moral masalalar yuzaga keldi.

1.2 Genetik muhandislik borasida jamoatchilikning ogohliligi

Biotexnologiyaga bo'lgan jamoatchilik munosabati nafaqat muhim, balki juda murakkab. So'nggi yillarda biotexnologiya yo'nalishida ommaviy qonunlarni ishlab chiquvchilar – joylarda hukumat odamlari, sanoatchilar, olimlar va atrof-muhitni muhofaza qilish guruhlarlari orasida muvofiqlashtirilgan manfaatlarida muvozanat va yechimlarni topishga harakat qilmoqda. Odatda, bu boradagi muzokaralar to'qnashuvlar bilan tugagan. Gen texnologiyasida eng muhim savol shundan iboratki, «Regulyatsiya – rDNK texnologiyasi tomonidan ishlab chiqilgan mahsulotlarining xususiyatlariga bog'liq bo'lishi yoki rDNK texnologiyasining o'ziga asoslanishi kerakmi?», deb ataladi. «Mahsulot va jarayon»ga tegishli bahs-munozaralar ko'p yillar davom etishiga sabab bo'ldi va yangi texnologiyalar takomilida jamoatchilik siyosati qanday bo'lishi kerakligi borasida qarama-qarshi qarashlarni yuzaga chiqardi. Eng muhim savol ham o'rtaga tashlandi: «Sohaga tegishli muhim qarorlar faqat olimlar va texnologlarga topshirilishi kerakmi yoki jamoatchilik ham bu jarayonga kirishishi kerakmi? Hozirda biotexnologiyaning ko'plab yangi jihatlarlari bilan jamoatchilik muhokamasi va munozarasiga taqdim etilyapti. Bu esa muhim qonuniy tavsiyalar va axloqiy masalalarga tegishli xulosalar, aniq sabablar, tanqidiy qarashlar, raddiyalar, kvalifikatsiya va ilmiy faktlarning diqqat bilan tahlil qilinishi kerakligini ko'rsatdi. Ijtimoiy qonunlarni ishlab chiqarish hamisha jamoatchilik diqqat-e'tiborida bo'lishi va siyosiy doiradan ham chetda qolib ketmasligi kerak. Demokratik mamlakatlarda ilm-fan qonunchiligi siyosati doimo aholi manfaatlarlari uchun xizmat qilishi va ular uchun ishlab chiqilishi lozim. Garchand aholi orasidan ozchilik ilm-fanning ishonchlilikini anglaydi.

Bugun gen texnologiyasi jamoatchilik qarashlari va qiziqishlarini yoritish borasida ancha ko'zga ko'rinarli ishlar qilingan, biroq boshqa yangi texnologiyalar borasida hali bunday deb bo'lmaydi. Turfa madaniy, diniy va siyosiy an'analariga ega jamiyatlarda demokratik qarorlar qabul qilish borasida ko'plab qarashlar mavjud bo'lib, ularni e'tiborga olish zarur. Gen texnologiyasi kabi ilmiy sohalarda jamoatchilikni ogoh qilish g'oyat muhim. Bundan tashqari odamlarning katta qismi ular hayotida texnologiyalarning ortib borayotgani va ko'pchilik ular ta'siriga tushib qolayotganiga oid xavotirlar ortmoqda, ayrim hollarda, olimlarga nisbatan asossiz ishonchsizlik kuzatilayotgani afsuslanarli holdir.

So'nggi o'n yillikda zamonaviy biotexnologiyaga bo'lgan jamoatchilik xabardorligini baholash uchun ko'plab tadqiqotlar, anketa, yevrobarometrlar va konsensus konferensiyalarini o'tkazishga harakat qilindi. Dastlabki Yevroittifoq tadqiqotlari genetik muhandislikning keng doirada qo'llanilishiga jamoatchilik munosabatini yoritdi (1.2-jadvalga qarang). Ularda bir qancha masalalar ko'tarildi. Masalan, jamoatchilikning biotexnologiya sohasida genetik texnologiyaga bo'lgan tushunchalarini qanday rivojlantirish kerak? Jamoatchilik nimani bilishi kerak va buni qanday qilib ta'minlash mumkin?

1.2-jadval.

Jamoatchilikning genetik manipulyatsiyadan foydalanishga munosabati	Qulay (%)	Neytral (%)	Noqulay (%)
Mikroorganizmlar tomonidan bioplastiklar ishlab chiqarish	91	6	3
O'simliklarni yaxshilash uchun hujayralarni qo'shish	81	10	10
Saratonga o'xshash kasalliklarni davolash	71	17	9,5
Pomidorning saqlanish muddatini uzaytirish	71	11	19
Neft mahsulotlari asoratlarini bartaraf qilish va tozalash	65	20	13
Sanoat chiqindilarini detoksikatsiya qilish	65	20	13
Kalamushlar tomonidan ishlab chiqariladigan qon ivishining oldini oluchi fermentlardan foydalanish	65	14	22
Tibbiy tadqiqotlar	59	23	15
Dori vositalarini yaratish	57	26	13
Uchinchi dunyo mamlakatlarida o'simliklarni yetishtirish	54	25	19
Genetik modifikatsiya orqali mastitga chidamli sigirlarni yetishtirish	52	16	31
Kasallikka chidamli o'simliklarni yetishtirish	46	29	23
Mikroorganizmlar tomonidan ximozin ishlab chiqarish	43	30	27
Hosildorlikni oshirish	39	31	29

Jamoatchilikning genetik manipulyatsiyadan foydalanishga munosabati	Qulay (%)	Neytral (%)	Noqulay (%)
Viruslardan zararkunanda hasharotlarga qarshi foydalanish	23	26	49
Sut hosildorligini oshirish	22	30	47
Chorvalarni klonlash	7,2	18	72
Inson jismoniy ko'rinishiga o'zgartirish kiritish	4,5	9,5	84
Gibrid hayvonlar yaratish	4,5	12	82
Biologik urush	1,9	2,7	95

Bundan tashqari mazkur texnologiya insoniyatga keltirishi mumkin bo'lgan ko'plab foyda o'rni 1990-yillar boshida Buyuk Britaniyadagi oziq-ovqatdan nurlanish ofati kabi qismatga ro'baro' kelgan jamoatchilik nimani bilishi kerak va bunga qanday erishish mumkin? Oziq-ovqat mahsulotlarini gamma nurlanishi patogen bakteriyalarni o'ldirishning xavfsiz va samarali usuli ekanligi isbotlangan bo'lsa-da, Chernobil fojiasidan keyin keng jamoatchilik tomonidan qabul qilinmadi, chunki ko'pchilik nurlanish jarayonini radioaktivlikdan ajrata olmadi. Genetika muhandisligining foyda va zarari to'g'risida samarali muloqot qilish jamoatchilikning asosiy xavotirlarini va oldindan ko'rilgan har qanday texnik xavflarni tushunishga bog'liq bo'ladi.

Yevrobarometr tadqiqotlari ko'rsatganidek, odamlarning fikrlari bir-biridan farq qiladi, bu esa millat, din va mavzu haqidagi bilim darajasi va texnologiyaning qo'llanilish sohasiga bog'liqdir (1.1-ramkadagi ma'lumotlarga qarang). Muhim omillaridan biri – tabiatning ma'naviy va diniy maqomi hamda insonlar bilan bo'lgan munosabatlar haqidagi aniq yoki noaniq qarashlar va nuqtayi nazarlar xilma-xilligidir.

Biz tabiatni insonning o'simlik va hayvonlarga bog'liqligi nuqtayi nazaridan tabiiy usullar orqali yaratilgan mukammal va to'liq holda ko'ramizmi? Shu sabab uni «sun'iy» yo'llar bilan o'rni bosish mumkin emas degan xayolga boramizmi? Yoxud biz uni inson uchun foydali xomashyo manbai sifatida ko'ramaymizmi?

Asrlar davomida insonlar o'simliklar va hayvonlar genomlarini bilvosita, asosan, istalgan xususiyatlarni kuchaytirish yoki noxush xususiyatlarni kamaytirish maqsadida boshqarilgan chatishtirishlar orqali modifikatsiya qilib kelgan. Shu yo'l bilan hozirgi oziq-ovqat o'simliklari va hayvonlari o'zlarining avvalgi ko'rinishlariga deyarli o'xshamaydi.

Aslida, bunday o'zgarishlar aholi yoki iste'molchilar ehtiyojlari va talablari bilan bog'liq bo'lgan va ular buni osonlikcha qabul qilgan; bu deyarli har doim oziq-ovqatning bosqichma-bosqich arzonlashuviga olib kelgan. Darhaqiqat, bug'doy uchun eng yuqori narx XIII asrda bo'lgan bo'lsa, eng past narx 2005-yilda kuzatilgan.

An'anaviy usullardagi o'zgarishlar butun organizm darajasida amalga oshiriladi, tanlov istalgan fenotip asosida qilinadi va genetik o'zgarishlar ko'pincha kam o'rganilgan bo'lib, ehtimoliy noxush genetik o'zgarishlar bilan birga yuz beradi.

Yangi usullar, aksincha, genetik materialni hujayra va molekulyar darajada o'zgartirish imkonini beradi, ular aniq bo'lib, yaxshi xususiyatlar va prognozlash-tiriladigan natijalarga olib keladi. Bu usullar klassik saralangan maqsadlarini saqlab qolgan holda amalga oshiriladi. Bunday o'zgarishlar an'anaviy usullarga qaraganda yaxshiroq va tezroq natijalar beradi.

1.1-ramka.

Yevrobarometer (1997) biotexnologiyaning jamoat tomonidan qabul qilinishiga oid ma'lumotlar sifatida quyidagilarni ko'rsatadi:

- yevropaliklarning aksariyati zamonaviy biotexnologiyani turli sohalarida jamiyat uchun foydali deb hisoblaydi. Ular dori-darmon ishlab chiqarish va ilmiy jihatdan ma'lum bir narsalarga aniqlik kiritish usullari foydali va deyarli xavfsiz, deb baholaydilar;
- oziq-ovqat ishlab chiqarishda biotexnologiyadan foydalanish va inson genlarini hayvonlarga, hayvonlardan insonlarga o'tkazishni foydasi oz, shuningdek, nihoyatda xavfli, deb topishgan;
- yevropaliklar biotexnologiya rivojlanayotgan mamlakatlarda ochlikni sezilarli darajada kamaytirishning ehtimolini past, deb hisoblashadi;
- yevropaliklarning aksariyati genetik jihatdan o'zgartirilgan mahsulotlar aniq belgilanishi lozim deyishadi;
- yevropaliklarning aksariyati o'simlik va hayvonlarning irsiy xususiyatlarini o'zgartirishdan ko'ra, an'anaviy seleksiya usullarini davom ettirish kerakligini ta'kidlashadi;
- yevropaliklarning 25% dan kamrog'i zamonaviy biotexnologiya xavfini kamaytirish uchun mavjud reglamentlar yetarli, deb bilishadi;
- atigi 20% yevropaliklar biotexnologiya reglamentlarini sanoat tomonidan nazorat qilish kerak, deb o'ylashadi;
- yevropaliklarning uchdan biri zamonaviy biotexnologiyani Birlashgan Millatlar Tashkiloti va Jahon sog'liqni saqlash tashkiloti kabi xalqaro tashkilotlar nazorat qilishi kerak, deb sanaydi.

Jamoatchilik fikri to'g'ri baholanishi kerak, chunki jamoat degani yagona birlik emas. Shunday ekan, unga bir xil qarashlar, manfaatlar, qadriyatlar va bilim darajasiga ega guruh sifatida qarash imkonsiz. 2003-yilda qishloq xo'jaligi biotexnologiyasini tijoriylashtirish masalasi ustida Buyuk Britaniyada o'tkazilgan jamoatchilik so'rovi shuni ko'rsatdiki, 35 000 nafar ishtirokchining aksariyati genetik jihatdan o'zgartirilgan (GM) o'simliklarga qarshi bo'lgan. Ular agrar-biotexnologiya sanoatiga va hukumatning bu mahsulotlarni nazorat qilish tizimiga ishongan. Bu so'rov «GM – Milliy jamoatchilik munozarasi» deb nomlangan edi. GM oziq-ovqatlari va ekinlariga nisbatan jamoatchilik qarashlari, shuningdek, jamoatchilikning bu masala bo'yicha ogohlik darajasini, anglash va munozaralarga bo'lgan e'tiborini o'rganish uchun keng qamrovli empirik tadqiqot sifatida ishlab chiqilgan edi. Hisobot qiziqarli ma'lumotlar to'plamini taqdim etdi, bu esa jamoat qarashlarini batafsil o'rganish imkonini berdi. Bunga javoban jamiyatni sa-

noatlashtirish tarafdori bo'lgan Agrar Biotexnologiya Kengashi (London) so'rov natijalariga nisbatan ayrim shubhalarini ma'lum qildi. Unga ko'ra, so'rov GMga qarshi guruhlar tomonidan o'tkazilgan. Genetik muhandislikka bo'lgan jamoat qarashining xavotiri shundaki, jamiyatning genetik hayot tizimlari asoslarini tushunish darajasi juda past. Alal-oqibat turli tashkilotlar jamoatchilikni xavotirga solib, qo'rqitishga harakat qilyaptilar, ayniqsa, GM mahsulotlarga nisbatan ochiq-oshkora bunday urinishlar davom etib kelayotir, ammo bu guruhlar o'z iddaolarini qo'llab-quvvatlaydigan birorta ilmiy ma'lumotni keltira olmaydilar.

1.3-jadval.

Xavfsizlik baholashda ko'rib chiqilishi kerak bo'lgan savollar²

- Donor organizmda genning funksiyasi qanday?
- O'zgartirilgan o'simlikda kiritilgan gen(lar)ning ta'siri qanday?
- Allergiya yoki toksinlarda o'zgarishlar borligi to'g'risida dalillar bormi?
- Atrof-muhitdagi organizmlarga maqsadsiz ta'sirlar bo'ladimi?
- O'simliklarning begona o'tlarga qarshilik ko'rsatib, chidamliligini oshirish borasida o'zgarish bormi?
- Kiritilgan gen boshqa o'simliklarga (masalan, changlatish orqali) yoki organizmlarga o'tishi mumkinmi, va bu qanday oqibatlariga olib kelishi mumkin?

«Yer aktivistlarining do'stlari» deb nomlangan faollar GM ekinlarining xavfsizligi va salohiyati bo'yicha nazorat ostidagi ilmiy tadqiqotlarni ta'minlash uchun mo'ljallangan qonuniy dala ekinlari tajribalarini oyoqosti qilib, yo'q qilmoqda. Bunday faollar va provokatsion matbuot maqolalari (odatda olimlar tomonidan emas, ilmdan yiroqlar tomonidan yozilgan), ayniqsa, GM ovqatlarga nisbatan sun'iy xavf hissining yuzaga kelishiga sababchilardir. AQSHda GM texnologiyasini jamoat tomonidan qabul qilinishida ham kichik muammolar bor va bu holat davom etmoqda. Qishloq xo'jaligida bir necha turdagi GM ekinlarning qo'llanishi o'rtib borayotir. Jahon miqyosida GM texnologiyasini qabul qilish va uning qo'llanilishi jadallik bilan rivojlanayotgani yaqqol ko'zga tashlanmoqda.

1.3 Regulyativ talablar

1.3.1 Genetik jihatdan o'zgartirilgan oziq-ovqatlar xavfsizligi

Butun dunyoda jamoat iste'moli uchun mo'ljallangan GM ekinlari va ulardan olinadigan mahsulotlarning xavfsizlik jihatlari bo'yicha munozaralar hali-hanuz davom etmoqda. Xavfsizlikka oid asosiy savollardan ba'zilar 1.3-jadvalda keltirilgan. Iqtisodiy hamkorlik va taraqqiyot tashkiloti (OECD, Parij) oziq-ovqat xavfsizligiga doir ta'rifga quyidagi so'zlarni kiritgan: «Kutilayotgan sharoitda mulohazali iste'moldan hech qanday zarar keltirmasligiga qat'iy ishonch bor.»

² Source: Dale, P. J. (2000). The GM debate: science or scaremongering? *Biologist* 47: 7--10. Reproduced with permission.

Agar oziq-ovqatlarning tarkibiy qismlari GM o'simliklardan olingan bo'lsa, u holda ular – an'anaviy o'zining analogi (tabiiy oziq-ovqat mahsulotlari) bilan bir xil darajada xavfsiz yoki ulardan ham xavfsizroq bo'lishi shart. «Muhim ekvivalentlik konsepsiyasi»ga ko'ra, mahsulot xavfsizligini ilmiy asoslangan holda aniqlash ko'zda tutiladi, undan mulohaza bilan iste'mol qilish va ta'sirni hisobga olish kerak. Aytish joizki, GM oziq-ovqatlari – an'anaviy mahsulotlar bilan solishtirish orqali keng qo'llaniladi. Bu usul – GM mahsulotlari va oddiy an'anaviy oziq-ovqatlari iste'molining ta'sir darajasini o'rganish va solishtirishga asoslanadi. Muhim ekvivalentlik konsepsiyasi Kodeks Alimentarius³ Komissiyasi (www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp yoki www.who.int/entity/foodsafety/codex/an) ning faoliyatiga asoslanadi. Mazkur komissiya iste'moldagi mahsulotlarga doir savollar bo'yicha oziq-ovqat standartlari va amaliyot kodlarini ishlab chiqadi. Hozir u tomonidan yaratilgan kodlar iste'molchilar, oziq-ovqat ishlab chiqaruvchilari, qayta ishlovchilar, milliy oziq-ovqat nazorat agentliklari va xalqaro oziq-ovqat savdosi uchun asosiy global manbaga aylangan. Muhim ekvivalentlik darajasini aniqlash uchun qo'llaniladigan ma'lumotlar, asosan, molekulyar va oqsil xarakterlashtirishga asoslanadi. Bu jarayon quyidagilarni testlarni o'z ichiga oladi:

- genlarni ifoda etuvchi namunalar;
- oqsillarni profilashtirish;
- oqsildagi o'zgarishlar;
- metabolit imkoniyatlaridagi farqlar.

Bunday murakkab test protokollari ko'plab rivojlanayotgan mamlakatlar uchun xalqaro oziq-ovqat xavfsizligi reglamentlariga moslashtirishni qiyinlashtirishi mumkin. Yangi mahsulotlar bozorga chiqarilayotganda, iste'molchilar ularning sifati va xavfsizligiga ishonch hosil qilishi kerak. Shu bois yangi oziq-ovqatlar va ingridiyentlarni rivojlantirishda toksikologik va oziqaviy yo'riqnomalar bo'lishi muhim. Bu yo'riqnomalar ehtimoliy xavf-xatarni aniqlab, ularga to'g'ri yechim topishga yordam beradi.

Yondashuv qabul qilingan ilmiy qarashlarga muvofiq bo'lishi, xavfsizlikni baholash natijalari mas'ul sog'liqni saqlash organlari uchun qayta ishlab chiqilishi mumkin va maqbul bo'lishi, shuningdek, natijalar iste'molchini qanoatlantirishi va ishtonirishi lozim!

Yevropa Ittifoqida inson salomatligi va atrof-muhitni – genetik o'zgartirilgan organizmlar bilan bog'liq salbiy ta'sirlardan himoya qilish maqsadida mukammal regulyativ yo'riqnomada ishlab chiqilgan. Bu yo'riqnomadagi ikki dastur orqali – nazorat joriy etilgan:

³ Kodeks Alimentarius (lotincha "Codex Alimentarius" – Oziq-ovqat kodeksi) – FAO / JSST Xalqaro oziq-ovqat standartlari va qoidalar kodeksini amalga oshirish bo'yicha Xalqaro komissiya tomonidan qabul qilingan oziq-ovqat mahsulotlarining standartlari to'plami hisoblanadi.

1. GMO'larni chegaralangan holda foydalanish;
2. GMOlarni atrof-muhitga qasddan chiqarib yuborish.

Yevropada GMOlarni chegaralangan holda qo'llash «Ishda salomatlik va xavfsizlik haqidagi qonun» asosida, Buyuk Britaniyada esa «Genetik o'zgartirilgan organizmlar (chegaralangan qo'llash) to'g'risidagi reglamentlar» orqali tartibga solinadi. Bu reglamentlar Buyuk Britaniya Sog'liqni saqlash va xavfsizlikni ta'minlash bo'yicha ijrochi komitet (HSE) tomonidan boshqariladi. HSE genetik modifikatsiya bo'yicha konsullik qo'mitasi (Advisory Committee on Genetic Modification)dan tavsiyalar oladi.

Bu reglamentlar (90/219/EEC dasturini amalga oshiruvchi) barcha GMOlarning chegaralangan holda qo'llashni o'z ichiga oladi va ishlab chiqarishda foydalaniladigan GMolar nazoratini qamrab olgan. Barcha dasturlar organizmning genetik o'zgarishlari va bunday o'zgarishlar ta'sirini batafsil o'rganishi va xavf-xatarni baholashi shart.

GMOlarni atrof-muhitga chiqarish masalasi Buyuk Britaniyada «Genetik o'zgartirilgan organizmlar to'g'risidagi reglamentlar» dasturi asosida tartibga solinadi. Bunday reglamentlar «Atrof-muhitni himoya qilish to'g'risidagi qonun»ga muvofiq (EC Directive 90/220/) ishlab chiqilgan. Ular GMOlarni tajribaviy maqsadlarda (masalan, tuproqni sinovdan o'tkazayotganda) yoki atrof-muhitga ta'sirini o'rganilgan holda bozorga chiqarishni qamrab oladi.

Barcha sinovlar hukumat tomonidan ma'qullangan bo'lishi shart. Ariza beruvchi inson salomatligi yoki atrof-muhitga yetayotgan zararining xavfini aniq baholashi kerak. Bu boradagi arizalarning barchasi va xavf-xatarni baholash ishlari mustaqil ekspertlardan tashkil topgan Atrof-muhitga ta'sir ko'rsatishni nazorat qilish bo'yicha maslahatlar qo'mitasi tomonidan sinchkovlik bilan ko'rib chiqiladi.

Yevropa komissiyasining «Yangi Oziq-ovqatlar Reglamenti (258/97) 1997-yil may oyida kuchga kirgan. Bu barcha yangi oziq-ovqatlarni Yevropa Ittifoqi bo'ylab bozorga chiqarishdan avvalgi tasdiqlash jarayonini nazarda tutadi. Reglamentda "yangi oziq-ovqat" tushunchasi Yevropa Ittifoqi hududida avval yetarli darajada iste'mol qilinmagan oziq-ovqat sifatida ta'riflanadi. Bu reglamentning bir qismi 90/220/EEC dasturida belgilanganidek, GMOlarni o'z ichiga oladi yoki ulardan iborat oziq-ovqatlarni, tarkibida GMO bo'lmagan tayyor mahsulotlarni ham qamrab oladi.

Buyuk Britaniyada barcha yangi oziq-ovqatlar, shu jumladan genetik o'zgartirilgan oziq-ovqatlarning xavfsizligi mustaqil Yangi oziq-ovqatlar va jarayonlar bo'yicha tavsiyalar berish qo'mitasi (ACNFP) tomonidan baholanadi. Bu qo'mi-

⁴ Genetik modifikatsiyalangan organizm (GMO) — genotipi genetik muhandislik usullari yordamida sun'iy ravishda o'zgartirilgan organizm. Ushbu jarayon o'simliklar, hayvonlar va mikroorganizmlar uchun qo'llanishi mumkin.

ta hozirda Buyuk Britaniyaning Oziq-ovqat standartlari agentligiga ham tavsiya va maslahatlar beruvchi tashkilot sanaladi (www.foodstandards.gov.uk). ACNFP yangi oziq-ovqatlarning xavfsizligini baholashda Jahon sog'liqni saqlash tashkiloti (WHO) va OESR tomonidan ishlab chiqilgan yondashuvlarga tayanadi.

Qo'mita o'z ishida oshkoralikni oshkoralikni ma'qul ko'radi, buning uchun kun tartibi, baholash hisobotlari, yillik hisobotlar, axborotnomalar va qo'mitaning veb-saytini nashr qiladi. Bu orqali jamoatchilik a'zolarida bo'lishi mumkin bo'lgan har qanday shubhalarni bartaraf etishga umid qiladi. Yakuniy qarorlar sanoat bosimiga ta'sir qilmaydi va faqat xavfsizlik omillariga asoslanadi.

Bu matnda GMO mahsulotlari va boshqa shunga o'xshash texnologiyalarning xavflarini baholash mutaxassislar tomonidan amalga oshirilib, iste'molchi xavfsizligi nuqtayi nazaridan baholanganligi ta'kidlanmoqda. Biroq shuni tan olish kerakki, mutaxassislar xavfni texnik jihatdan tor tushunchada izohlaydilar, holbuki, yetarlicha bilimga ega bo'lmagan jamoatchilik yoki iste'molchilar xavfni to'g'ri baholay olishmaydi. Ular bunday mahsulotga begona nigoh bilan qarashadi. Bundan tashqari, jamoatchilik odatda genetik muhandislik kabi texnologik xavfga haddan ortiq xavotirga tushadi va unga ortiqcha baho berishi mumkin, bir so'z bilan aytganda, pashshadan fil yasashadi. Lekin kundalik hayotda salomatlik uchun jiddiy xavf tug'dirishi mumkin bo'lgan ehtimollar (avtomobil haydash, chekish, ichkilik iste'mol qilish, yog'li ovqatlar)ga esa g'oyat past baho beradilar. Agarda mazkur texnologiyalar orqali salomatlik yoki atrof-muhitga foydalari tan olinsa, jamoatchilik xavotiri biroz kamayishi mumkin. Omma shubha-gumonlarini tarqatish uchun ochiq muloqotlar o'tkazish va yetarlicha bilim berib, odamlarni ogoh etish bunda muhim ahamiyat kasb etishi ta'kidlanmoqda.

1.3.2 Etiket qay darajada zarur?

Genetik muhandislik orqali yaratilgan oziq-ovqat mahsulotlari bilan bog'liq eng muhim masalalardan biri – etiket masalasi qanday tashkillashtirilishi kerak? Uning maqsadi – iste'molchilarga mahsulotni tanlashda, to'g'ri saqlash va tayyorlashda hamda xavfsiz iste'mol qilishda yetarli, aniq va tushunarli ma'lumot berishdan iborat. Biroq etiketda iste'molchi undagi ma'lumotlarning mazmunini tushunsagina, muhim ahamiyat kasb etadi.

AQSH Oziq-ovqat va farmatsevtika idorasi (FDA) fikriga ko'ra, mahsulotning ishlab chiqarilganligi usuliga asoslanish shart emas. Bu ko'plab oziq-ovqat mahsulotlari uchun shunchaki umumiy bir jarayon, ya'ni ular qishloq xo'jaligi yoki sanoat jarayonlari kabi ma'qullansa bo'ldi. Mahsulot tasdiqlansa, etiketlarga hojat ham qolmaydi. Shu bilan birga, ayrim iste'molchilar muayyan texnologiyalarga (masalan, genetik muhandislikka) qarshi bo'lishi mumkin. Bu kabi iste'molchilarning xohishiga muvofiq, mahsulotni ishlab chiqarishda mazkur texnologiya qo'llanilgan yoki qo'llanilmaganligini borasida ogohlantirilishi kerak, ular bu haqda xabardor bo'lish huquqiga ega, degan fikrni olg'a surish

mumkin. Etiket masalasida iste'molchilar huquqlari va texnologik ishlab chiqarish jarayonlarining ilmiy jihatdan baholanishi orasida muvozanatni saqlash muhimdir.

Genetik muhandislik yo'li bilan yaratilgan oziq-ovqatlarga etiket yopishtirishga bo'lgan kuchli ishtiyoq hech bo'lmaganda Yevropa Ittifoqi (YI) chegarasida mavjudligi haqida ko'plab dalillar mavjud. Etiket aslida iste'molchilarning tanlov huquqiga aloqador. Uning salomatlikka ham, xavfsizlikka ham aloqasi yo'q, degan fikrlarni ayrimlar olg'a surishi mumkin. Agar mahsulotlar xavfsizligiga oid aniq tashvishlar mavjud bo'lsa, etiket muammoni hal qila olmaydi (masalan, tamaki mahsulotlari sog'liqqa zarar ekanligi belgilanganiga qaramay, odamlar tomonidan sotib olinishda davom etmoqda).

Yevropa Ittifoqi yangi oziq-ovqat qoidalariga qo'yilgan mavjud talablardan tashqari qo'shimcha etiket talablarini ham joriy qildi. Yevropaliklar fikriga ko'ra, bahs-munozaralarga sabab bo'lishi mumkin bo'lgan holatlar – mahsulot tarkibida hayvon yoki inson genlarining nusxalari yoki tirik genetik modifikatsiya qilingan organizmlar mavjud bo'lsa, etiket zarur. Bundan tashqari, YI iste'molchilarga haqiqiy tanlov imkoniyatini berish uchun genetik modifikatsiya qilingan materiallarni o'z ichiga olgan barcha mahsulotlarni aniq belgilashga urinib kelmoqda.

Iste'molchilar genetik modifikatsiya qilingan (GM) yoki qilinmagan mahsulotlarni sotib olishni tanlashni talab qilsa, GM bo'lmagan mahsulotlar bilan bozorni yetarli miqdorda mavjudligi ta'minlanishi kerak.

Yevropa Ittifoqi besh yil davomida GM mahsulotlarini salomatlik uchun xavfli degan bahona qilib taqiqladi, ammo bu o'zgartirildi. Endi GM mahsulotlar miqdori etiketda aniq belgilab ko'rsatilgan bo'lsa, bozorga kiritish uchun ruxsat etiladi. YIning etiket to'g'risidagi yangi qonunlari muvofiq, barcha turdagi GMO oziq-ovqatlarida yoki mahsulot tarkibida qisman mavjud bo'lsa ham ko'rsatilishi talab qilinadi. Jumladan, hayvonlar uchun yetkazib beriladigan oziq-ovqat va yem mahsulotlari ham bundan mustasno emas. Soya va jo'xoridan olinadigan tarkibida 30dan oshiq ingridiyentlar 70 foizdan ortiq mahsulotlar (ayni damda GM oziq-ovqat o'simliklari asosiy qismi AQSHda) bu talabga javob berishi lozim, aks holda ishlab chiqaruvchilar qimmat va murakkab qadamlarni amalga oshirishlari kerak bo'ladi.

Bunday qonunlar oqilona bo'lib ko'rinsa-da, ularni amalda uni qo'llash qiyin. Bu qoidalar sanoatchilar va iste'molchilar uchun qimmatga tushadi. qayta ishlangan oziq-ovqat mahsulotlari narxi taxminan 3-5% ga oshishi kutilmoqda. YIning bu yondashuvi biroz eskirdi nazarimizda, chunki aksariyat rivojlangan mamlakatlar shunchaki «ehtiyotkorlik prinsiplari» bilan cheklanishadi.

2002-yilda Kanada GM mahsulotlar uchun etiketda «sog'liqqa xavf tug'diruvchi jihatlar yoki muhim ozuqaviy o'zgarishlarga tegishli aniq ilmiy dalillar mavjud bo'lmasa, mahsulotni xavfli deb bo'lasligini ta'kidladi. Lekin hozircha bunday dalillar mavjud emas. Buyuk Britaniyaning Qirollik Jamiyati ham GM

oziq-ovqatlarning sog'liqqa xavf tug'dirayotganligini ko'rsatuvchi dalil yo'qligini bildirgan. Aytish joizki, GM oziq-ovqatlari boshqa turdagi mahsulotlarga nisbatan ko'proq sinovlardan o'tgan va ular xavfsizdir. Ammo nega YI bunday turdagi mahsulotlarning jahon oziq-ovqat ta'minotida muhim o'rin egallashiga to'sqinlik qilishda davom etmoqda? GM texnologiyalari asosan Shimoliy Amerikada ishlab chiqilgan va u yerdagi kompaniyalar tomonidan tijoratlashtirilgan. Ko'plab Yevropa mamlakatlari bu zamonaviy qishloq xo'jaligi texnologiyasini rivojlantirishda sekin harakat qilmoqda. AQSH va Kanada YIning bu majburiy etiket talablarini «eski usuldagi savdo siyosatini himoya qilish» deb baholamoqda. AQSH va Kanada Jahon Savdo Tashkilotiga adolatsiz savdo amaliyotlari bo'yicha rasmiy shikoyat arizalari kiritdi. Ko'pgina Yevropa hukumatlari ovoz yig'ish maqsadida «iste'molchilar huquqlarini himoya qilish»ni vaj qilib ko'rsatmoqda. Ko'pchilik bunday qonunlar mukammal o'ylanmagan, shunchaki byurokratiyaning bir ko'rinishi va ular bir qancha muammolarni keltirib chiqaradi, ayniqsa, sanoatchilar hamda iste'molchilar uchun qimmatga tushadi, deb hisoblaydi.

Genetik modifikatsiya qilingan organizmlar (GMO) asosida ishlab chiqarilgan oziq-ovqatlarning etiketlari bo'yicha bahslar shiddatli va aksariyat hollarda ilmiy asoslardan yiroq bo'lgan muhokamalarga aylanmoqda. Kelajakda, asosiy oziq-ovqat manbalari, ayniqsa, o'simliklar, seleksiya dasturlarida ma'lum darajada genetik modifikatsiyadan o'tkazilishi kutilmoqda. Bu jahon aholisining oshib borayotgan oziq-ovqat ehtiyojlarini qondirish zarurati tufayli yuzaga keladi.

Bunday haqiqatni inkor etish yaramaydi: o'simlik seleksiyasida bu texnologiyadan foydalanilmasdan turib, jahonda, ayniqsa, rivojlanayotgan mamlakatlarda jiddiy oziq-ovqat yetishmovchiligi yuzaga keladi. Agar genetik modifikatsiyaning barcha jihatlari tan olinib, qayd etilishi talab qilinsa, bu murakkab etiket qoidalarini yuzaga keltirishi mumkin.

Yevropa Ittifoqida iste'molchilarning ma'lumot olish huquqi bog'liq qonun qabul qilingan. Bu esa ishlab chiqaruvchiga o'z navbatida ma'lumot taqdim etish majburiyatini yuklaydi. Shu bois etiket masalasini oqilona deb qabul qilish lozim, biroq u maqsadga muvofiq ham bo'lishi lozim.

AQSH Oziq-ovqat texnologiyalari instituti ekspertlar guruhining xulosalari:

Genetik modifikatsiya (rDNK biotexnologiyasi) orqali ishlab chiqilgan oziq-ovqat mahsulotlarining jamiyat uchun bir qator muhim foydalari mavjud:

1. Arzon va ko'p oziq-ovqat ta'minoti: jahon aholisini oziq-ovqat bilan ta'minlashning yaxshilanishi;

2. Ozuqaviy sifatni yaxshilash: yetarli moddalar yetishmasligi kuzatiladigan aholilar uchun tarkibi o'ziga xos oziq-ovqatlar;

3. Muddati uzoq bo'lgan yangi mahsulotlar: yangi meva va sabzavotlarning saqlash muddati uzaytirilganligi;

4. Qishloq xo'jaligida samaradorlikning oshishi: yaxshiroq ishlab chiqarish usullari va hosildorlikning oshishi;

5. Toksik tuproqlarni foydali yerlarga aylantirish: ayniqsa, rivojlanayotgan mamlakatlarda;

6. Ekologik jihatdan yaxshilangan amaliyotlar: pestitsidlardan foydalanishning samarali usullari va tropik o'rmonlar kabi ekologik hududlarni himoya qilish.

Ekspertlar rDNK texnologiyasi orqali ishlab chiqarilgan oziq-ovqatlar bo'yicha quyidagi xulosalarga ham keldilar:

- yangicha rDNK asosidagi oziq-ovqatlar inson salomatligiga – an'anaviy seleksiya usullari yordamida yaratilgan mahsulotlardan ortiq xavf tug'dirmaydi;

- barcha texnologiyalar, jumladan, rDNK texnologiyasidan yaratilgan yangi mahsulotlar uchun tegishli sinovlar – ishlab chiqaruvchilar, tarmoq vakillari va nazorat organlari tomonidan davom ettirilishi lozim;

- etiket masalasi mazmunli va iste'molchilarga tanlov imkoniyati beradigan darajada amalga oshirilishi kerak. Rivojlangan rDNK biotexnologiyasi nafaqat jahon oziq-ovqat ta'minotini yaxshilashga, balki atrof-muhit va jahon iqtisodiyoti uchun ham ijobiy ta'sir ko'rsatishga xizmat qiladi;

- rDNK texnologiyasidan olingan xavfsiz va arzon oziq-ovqat mahsulotlarining afzalliklari butun dunyoda, jumladan, rivojlanmagan mamlakatlarda ham mavjud bo'lishini ta'minlash uchun zarur dasturlarni ishlab chiqish kerak.

1.4 Siyosatni shakllantirish

Sanoatlashgan dunyoda genetik muhandislik bo'yicha siyosatni shakllantirishga hukumatlar, sanoat, akademik doiralar va ekologik guruhlar manfaatlari kuchli ta'sir ko'rsatmoqda. Besh yillik muhokamalardan so'ng ham, asosiy bahs shu yo'nalishda davom etmoqda: hukumat qoidalari rDNK texnologiyasi orqali modifikatsiya qilingan mahsulotlarning xususiyatlariga asoslanishi kerakmi yoki bu texnologiyaning qo'llanilishigami?

Genetik muhandislik bo'yicha munozaralar boshqa texnologiyalar kabi hukumat siyosatlariga ijtimoiy-iqtisodiy va ijtimoiy-mafkuraviy mezonlarni «to'rtinchi mezon»ni kiritish uchun muhim sinov maydoni bo'lib xizmat qilishi mumkin. Bu yondashuv tarafdorlari faqat samaradorlik, sifat va xavfsizlik mezonlari bu yangi texnologiyalar va ularning mahsulotlari bilan bog'liq ehtimoliy xatarlarni baholash uchun yetarli emas, deb hisoblaydilar. Bu mezonlarga ijtimoiy va ma'naviy mulohazalarni ham qo'shishni taklif qiladilar.

Bu yangi yondashuvlar qishloq xo'jaligi va atrof-muhitda genetik muhandislikni qo'llash sur'atiga jiddiy ta'sir ko'rsatmoqda. Shu bilan birga, biotibbiyot qo'llanmalarining rivojlanishi nisbatan tez sur'atlarda amalga oshmoqda. Yangi biotexnologiya kompaniyalari tomonidan ishlab chiqarilgan tibbiy diagnostika vositalari va dorilar butun dunyo bo'ylab millionlab odamlar tomonidan qabul qilingan va foyda keltirgan.

Masalan:

- eritropoetin – buyrak dializiga muhtoj bemorlar uchun;
- insulin – qand kasalliklariga chalinganlar uchun;
- genetik muhandislik vositalari orqali yaratilgan diagnostika – xavfli patogenlar (masalan, OIV va virusli gepatitlar) qon tarkibiga tushishining oldini olish uchun qo'llaniladi.

Qishloq xo'jaligida esa, GMga nisbatan qarshiliklar turli darajalarda namoyon bo'lmoqda. Masalan, aktivistlar genetik modifikatsiya qilingan sigir somatotropini (BST, sigir o'sish gormoni) ma'qullashmadi, ammo pishloq tarkibiga qo'shiladigan genetik muhandislik orqali ishlab chiqariladigan ximozin fermentiga deyarli e'tiroz bildirmadilar. Hozirda ximozin AQSH bozorining 40-45% ni tashkil etadi. Shunday ekan, endi bu jarayonga millionlab buzoqlardan foydalanish talab qilinmaydi.

Qishloq xo'jaligi va atrof-muhit siyosatida «to'rtinchi mezon»ning roli juda muhim. Genetik muhandislik uchun ijtimoiy-axloqiy mezonlar hozirgi vaqtda hal qiluvchi ahamiyatga ega. Jamoatchilikning ilm-fan bo'yicha savodxonligini oshirishga katta ehtiyoj bor. Ammo shunga qaramay, yaxshi xabardor qilingan jamoatchilik ham murakkab texnik masalalar bo'yicha ekspertlarga tayanishga majbur bo'ladi. Genetik muhandislik sohasidagi siyosat va qarorlar ijtimoiy, ma'naviy, ekologik va iqtisodiy jihatlarni hisobga olgan holda ishlab chiqilishi kerak. Shu bilan birga, keng jamoatchilikni xabardor qilish va ular fikrini shakllantirish ham dolzarb masalalardan biri bo'lib qolmoqda.

1.5 Jamoatchilikning ahamiyatga molik xavotirlari

1.5.1 Antibiotiklarga chidamli marker-genlar

Bugun DNKni yetkazib berish texnologiyasida rekombinant DNK marker-genlar bilan birga barqaror integratsiyalaydigan juda oz sonli hujayralarni yaratish imkonini beradi. Bu transformatsiya qilingan hujayralarni aniqlashdagi qiyinchilik marker-genlar konsepsiyasini yuzaga keltirdi. Bu genlar transformatsiyadan oldin ma'lum xususiyatga ega genlar bilan bog'lanadi. Ularning mavjudligi o'simlik hujayralariga maxsus muhitda o'sish imkonini beradi. Marker-genlarsiz esa bunday sharoitda o'sishning iloji yo'q, ularsiz ma'lum xususiyatga ega genlar o'simliklarning o'sishiga xalal beradi. Marker-genlar tasodifiydir va quyidagi maqsadlarga xizmat qiladi:

- ular transformatsiyadan hosil qilingan hujayralarni aniqlashga yordam beradi;
- ular o'zgartirilgan mahsulotda hech qanday funksiyaga ega emas.

Mabodo marker-genlar keng tarqalsa, o'simlik hujayralariga antibiotiklar va gerbitsidlarga chidamlilik xususiyatini ato etadi. Dunyodagi eng ommabop belgilar genlaridan biri – nptII, bu gen kanamitsin va neomitsin kabi antibiotiklarga chidamlilikni ta'minlaydi.

Antibiotiklarga chidamlilikni oshiruvchi genlar inson sog'lig'iga tahdid soladimi?

Antibiotiklarga chidamlilikni oshiruvchi genlar transformatsiya qilingan GMO o'simlik yoki mikroorganizmdan inson me'da-ichak mikroflorasiga o'tishi va bu orqali odamlarda antibiotiklarga nisbatan chidamlilik ortishi mumkinmi?

Tahlillar shundan dalolat bermoqdaki:

1. Bugungi kunda antibiotiklarga chidamlilik dunyo bo'ylab bakteriyalar orasida tarqalmoqda. Bu holat, ehtimol, antibiotiklarga chidamlilik genlarining bakteriyalar orasida o'tishi va antibiotiklarning qo'llanilishi natijasida kelib chiqqan seleksiya tufayli yuzaga kelgan.

2. Hozirga qadar GMO o'simlikdagi marker-genidan inson yoki hayvon me'da-ichak mikroflorasiga antibiotiklarga chidamlilikning o'tishi isbotlanmagan.

3. Shunday bo'lsa-da, bu xavf potensial ravishda mavjud va uni inkor etib bo'lmaydi.

Yevropa Ittifoqi 2006-yilga kelib klinik ravishda qo'llaniladigan antibiotiklarga chidamlilik xususiyatini o'simliklardan chiqarishni talab qilgan. Natijada:

- antibiotiklarga chidamlilik xususiyati transgen o'simliklardan chiqarib tashlash usullari rivojlantirilmoqda;
- bu usullar antibiotiklarga chidamlilik xususiyatini bosqichma-bosqich chiqarish va kiritilgan rekombinant DNK asoratini kamaytirish imkonini beradi.

Xulosa shuki, garchi transgen o'simliklarni iste'mol qilish orqali antibiotiklarga chidamlilik xususiyati insonda oshib ketishi mumkinligi hozirga qadar aniqlanmagan bo'lsa-da, bu xavfni kamaytirish uchun genetik muhandislik jarayonlarini takomillashtirish talab qilinadi. Yevropadagi qoidalar bu xavfni cheklash uchun muhim qadam bo'lib, yangi texnologiyalarni joriy qilish bilan bu masala yanada yaxshilanishi mumkin.

1.5.2 Allergenlarning o'tishi

Oziq-ovqat allergiyalari immun tizimining oziq-ovqatdagi o'ziga xos allergenlarga, odatda, oqsillar yoki glikoproteinlarga javob berishidan kelib chiqadi. Bu, ayniqsa, yeryong'oq va boshqa daraxt yong'oqlariga nisbatan jiddiy tashvish uyg'otmoqda va kuchli anafalaktik reaksiyalar kam uchraydigan holat emas. Shunday qilib, ayniqsa, yeryong'oqlarining mavjudligini belgilash oziq-ovqat mahsulotlarida keng qo'llanila boshlandi. GM ekinlari turlararo chegaralarni kesib o'tishi va GM oziq-ovqatlarga qo'shimcha oqsillarni kiritishi mumkin bo'lgani sababli iste'molchilarda allergik reaksiyalarni keltirib chiqarishi ehtimoli mavjud. Shuning uchun GM oziq-ovqatlarda donor turlardan qabul qiluvchi turlarga allergenlarning o'tishini oldini olish muhimdir. Bu murakkab jarayon bo'lib, barcha GMO ishlab chiqaruvchilar bunga to'liq e'tibor qaratmoqda va tegishli choralarni ko'rmoqda. Rekombinant DNK texnologiyasi jarayonida yangi allergiyalarning

yuzaga kelgani haqida hech qanday ma'lumot yo'q.

Oziq-ovqat materiallariga kiritilgan taqdirda muammo keltirib chiqarishi mumkin bo'lgan oqsillarni aniqlash imkonini beruvchi ko'plab ma'lumotlar bazalari hozirda mavjud. *StarLink*TM nomli GM makkajo'xori hayvonlar uchun ozuqada foydalanish uchun tasdiqlangan, biroq Cry9c oqsili test sinovlarida boshqa oqsillar kabi tez yo'q bo'lib ketmaganligi sababli inson iste'moli uchun tasdiqlanmagan. *StarLink*TM makkajo'xori takos qobiqlarida oz miqdorda paydo bo'lganda, bu katta GM mojarosiga olib keldi. Ortga nazar tashlaganda, ishlab chiqaruvchi *Aventis* kompaniyasi oziq-ovqat va ozuqa uchun tasdiqlanmagan makkajo'xori mahsulotini bozorga chiqarmasligi kerak edi, chunki hosiilni ishonchli ajratish mumkin emasligi aniq. Keyinchalik AQSH FDA Cry9c oqsiliga sezuvchanlikni aniqlash uchun antikor sinovi ishlab chiqdi va nazorat namunalari solishtirilganda, Cry9c oqsiliga bog'liq allergik reaksiyalar aniqlanmadi. *StarLink*TM hodisasi GM oziq-ovqatlar obro'siga katta zarar yetkazdi va quyidagi muhim masalalarni ko'rsatdi:

- GM mahsulotlarini marketing qilish bo'yicha AQSH tartibga solish tizimining yetarli emasligi;
- ayrim urug'lik kompaniyalari va fermerlarning GM ekinlaridan foydalanishda mas'uliyatsizligi;
- AQSH oziq-ovqat bozorlariga tasdiqlanmagan GM mahsulotlarini ajratish bo'yicha marketing tizimlarini ishlab chiqish muammosi;
- don yetkazib berish tizimi yaxlitligini ta'minlashda hukumatning roli;
- biotexnologiya sanoatida tadqiqot va marketing qarorlarini qabul qilish tartibi;
- GM texnologiyasiga salbiy ta'sir.

Umid qilamizki, GM oziq-ovqatni noto'g'ri boshqarishdagi bu nisbatan kichik voqea biotexnologiya kompaniyalarini, urug'lik kompaniyalarini, fermerlarni va tartibga soluvchi idoralarni butun oziq-ovqat tizimida to'g'ri tartib-qoidalarini amalga oshirishga jalb qiladi. Agar bunday hodisa takrorlansa, yaxshi tartibga solingan GM oziq-ovqat bozorining kelajagiga jiddiy ta'sir ko'rsatishi mumkin.

1.5.3 GM o'simliklardan changlanish orqali gen o'tishi

GM oziq-ovqatlarning xavfsizligi bo'yicha ko'plab tashvishlar bildirilgan bo'lsa-da, ekologik xavf-xatarlar ham ko'rib chiqilgan. Transgen ekin o'simliklaridan mos yovvoyi qarindoshlariga gen o'tishi ehtimoli jiddiy tajribaviy o'rganishga sabab bo'ldi. Barcha an'anaviy tijorat ekinlari hisobga olinganda, bunday holatlar deyarli sodir bo'lmagan, chunki bunday ekinlar maxsus yetishtirish amaliyotlarini talab qiladi va mahalliy yovvoyi o'simlik populyatsiyalari bilan raqobatlashishga qodir emas. Zararkunanda yoki gerbitsidga chidamlilik transgen o'simliklardan boshqa yaqin qarindosh o'simliklarga o'tib, ularning «yovvoyi o'simliklik» xu-

susiyatini oshirishi mumkinmi? Oddiy sharoitlarda yaqin qarindoshlar oʻrtasida changlanish orqali gen oʻtishi nihoyatda kam uchraydi va transgen oʻsimliklar bilan bu farq qilishi boʻyicha tasdiqlangan dalillar juda kam. Nazariy jihatdan bunday holatlar mumkin boʻlsa-da, ular amalda juda past chastotada sodir boʻladi va amalda muhim natijalar yoki tashvish tugʻdirmaydi. Biroq tijorat maqsadlarida oʻstirilgan (chiqarilgan) transgen oʻsimliklar muntazam ravishda kuzatilib, bu xulosalar tasdiqlanadi.

1.5.4 Dehqonchilik (Farming)

Insonda juda kichik konsentratsiyalarda uchraydigan va zamonaviy ekstraktsiya yoki sintez usullari bilan olinishi qiyin boʻlgan, masalan, insulin kabi insonni boshqaruvchi oqsillarni ishlab chiqarishga boʻlgan urinishlar tobora ortib bormoqda. Avval bunday moddalarning kichik miqdorlari murda organlaridan yoki qon banklaridan olinardi. Genetik muhandislik endi bu molekulalarni cheklanmagan miqdorda ishlab chiqarish uchun tobora koʻproq qoʻllanilmoqda. Bu insondan olingan gen konstruksiyalarini mos mezbun mikroorganizmlarga kiritishni talab qiladi, ular terapevtik oqsilni operatsiya hajmiga mos ravishda ishlab chiqaradi. Bunday mahsulotlar murdalardan ekstraktsiya qilishdan kelib chiqadigan xavfli ifloslantiruvchilardan xoli boʻladi.

Hozirgi vaqtda qishloq xoʻjaligi biotexnologiyasida eng hayajonli va bahsli masalalardan biri bu – «farming». Foydali mahsulot ishlab chiqarish uchun genetik jihatdan oʻzgartirilgan ekinlarni ishlab chiqarishdir. Hozirgi texnologiyalar tomonidan terapevtik oqsillarni ishlab chiqarishda kutilayotgan tanqislik sababli, bu shakldagi qishloq xoʻjaligini qabul qilish keng muhokama qilinmoqda. Biroq huquqiy jihatdan «farming» rivojlanishi oziq-ovqat mahsulotlarini ishlab chiqarishda xavfsizlikka oid xavf-xatarlar va bu bilan bogʻliq javobgarlik masalalari boʻyicha yangi tashvishlar tugʻdiradi.

Sohaning potentsiali katta, ammo hozirgi vaqtda diqqat oʻsimliklarni tanlash va oziq-ovqat mahsulotlari tizimiga moʻljallangan hosilni ifloslantirmasdan ishlab chiqarishni qanday tashkil qilishga qaratilmoqda.

1.5.5 Oʻsimlik va hayvonlarning GMO (genetik modifikatsiyalangan organizm)lari bilan bogʻliq ijtimoiy, moral va etik masalalar

Dastlab GMOlarga boʻlgan tashvishlar asosan xavfsizlik masalalari bilan bogʻliq boʻlgan, ammo yaqinda ijtimoiy, maʼnaviy va axloqiy masalalar qaror qabul qilish jarayonining bir qismiga aylandi. GM ekinlari va ularning urugʻlari ustidan koʻp millatli agrokimyo kompaniyalari tomonidan nazorat qilinishi va yuqori sarmoya xarajatlarini qoplash ehtiyoji shuni anglatadiki, faqat ilgʻor texnologiyalardan foydalangan fermerlar toʻliq xarajatlarni qoplash imkoniyatiga ega boʻlishadi. GM urugʻlari odatda fermerlar tomonidan qoʻshimcha koʻpayishni oldini

olish uchun steril qilinadi. Biroq bu urug'lik kompaniyalari uchun odatiy amaliyotdir, chunki tijorat maqsadlarida qo'llaniladigan urug'lar F1 gibridlari bo'lib, ular chinakam ko'paymaydi, shuning uchun fermerlar to'g'ri hosil yetishtirishlari uchun doimiy urug' ta'minoti zarur. Bu, dastlab ularni ishlab chiqarishga qilingan investitsiyadan adolatli daromadni ta'minlaydi.

Gerbitsidga chidamli GM ekinlarini ishlab chiqish fermerlarni muayyan gerbitsidlar va ularni ishlab chiqaruvchi kompaniyalarga qaram qilib qo'yishi mumkin. Bu rivojlanishdan yaqin kelajakda qashshoq uchinchi dunyo fermerlari ham foyda olishiga umid qilinmoqda.

«Samaradorlik» tushunchasi ayrim rivojlanayotgan davlatlarda keskin ijtimoiy ta'sir ko'rsatishi mumkin. Masalan, saxarozadan ko'p marotaba shirin bo'lgan bir nechta yangi shirinlantiruvchi moddalar ishlab chiqilgan bo'lib, bu oxir-oqibatda shakarqamish va qand lavlagi uchun an'anaviy bozorlarda qisqarishga olib kelishi mumkin. Shu tarzda, asosan rivojlanayotgan mamlakatlarda bu iqtisodiyotlar og'ir moliyaviy va bandlik buzilishlarini boshdan kechirishi mumkin, bunda muqobil yechimlarni topish qiyin bo'ladi. Xuddi shunday, genetik jihatdan muhandislik qilingan sigir o'sish gormonlarini (masalan, BST) muntazam yuborish orqali kamroq sigirlar orqali ko'proq sut ishlab chiqarish AQSH va Yevropa Ittifoqidagi kichik fermerlar uchun qiyinchilik tug'dirishi mumkin. Bu rivojlanish AQSHda muvaffaqiyatli davom etgan bo'lsa-da, ayni paytda Yevropa Ittifoqida uning qo'llanilishini oldini olish uchun moratoriy mavjud.

Demak, bu yangi genetik texnologiyaning ko'plab jihatlari, ayniqsa, qishloq xo'jaligi va oziq-ovqat ishlab chiqarishga tatbiq etilganda, rivojlanayotgan iqtisodiyotlarda kambag'allikning ortishi bilan bandlikning kamayishiga olib kelishi mumkin. Jamiyat uchun afzalliklarni kamchiliklarga qarshi muvofiq-lashtirishda turli qiymatli qarashlar amal qiladi. Rivojlangan davlatlar rivojlanayotgan davlatlarga bu qishloq xo'jaligi inqilobining bir qismi bo'lishi uchun texnik va moliyaviy yordam ko'rsatishga intilishi kerak. Hozirda bu qanchalik amalga oshirilayotgani o'zgaruvchan va shubhali. G'arbdagi genetik muhandislikka qarshi faolchilar tomonidan bunday masalalarga jamoatchilik e'tibori deyarli yo'qligi achinarli.

Transgen hayvonlar sohasida esa jamoatchilik xabardorligi va tashvishi hozirda ifodalanmoqda. Transgen hayvonlar – bu genetik muhandislik natijasida o'zgartirilgan yoki begona genetik ma'lumotni o'z ichiga olgan hayvonlar. Hayvonlarning genetik modifikatsiyasi va natijada transgeneziya ba'zilar tomonidan diniy nuqtayi nazardan tabiiy ko'payish to'siqlarining buzilishi sifatida qaralishi mumkin, bu esa evolyutsiya davomida turli xil turlar o'rtasidagi genetik o'zaro ta'sirni oldini olish uchun yaratilgan. Bunday qarashlar turlarni «muqaddas» deb hisoblaydi.

Murakkab in-vitro klonlash jarayoni orqali bosqichma-bosqich rivojlanish kuzatiladi. Bu jarayonda genni ko'p marta nusxalash bosqichlari amalga oshiriladi – odatda bakteriyada – natijada asl genetik material 1055 marta suyultiriladi. Shunday qilib, asl DNK to'g'ridan to'g'ri qo'llanilmaydi; balki unga o'xshash DNK sun'iy ravishda sintez qilinadi.

Hayvonlar huquqi masalasi juda bahsli hisoblanadi: ular o'ziga xos huquqlarga egami yoki yo'qmi? Ba'zilar sezgir hayvonlarga insonlar bilan teng ma'naviy ahamiyatni berishni taklif qiladilar, ammo chegarani qayerda chizish kerak?

Yangi oziq-ovqat va jarayonlar bo'yicha maslahat qo'mitasi (ACNFP) bir necha yil oldin ayrim transgen organlarning oziq-ovqatda qo'llanilishi bilan bog'liq asosiy axloqiy tashvishlarni ko'rib chiqdi va quyidagi cheklavlarni belgiladi:

1. Ba'zi diniy guruhlar tomonidan oziq-ovqat sifatida iste'mol qilish taqiqlangan hayvonlardan (masalan, cho'chqa genlarini qo'ylarga o'tkazish) genlarning odatda iste'mol qilinadigan hayvonlarga o'tkazilishi ko'pchilik yahudiylar va musulmonlarni xafa qiladi.

2. Odam genlarini oziq-ovqat hayvonlariga (masalan, qonni ivitishda ishtirok etuvchi Faktor IX oqsilining inson genini qo'ylarga) o'tkazish farmatsevtik va tibbiy maqsadlar uchun maqbul, ammo bunday hayvonlar so'yilgandan keyin oziq-ovqat zanjiriga kiritilmasligi kerak.

3. Hayvon genlarini oziq-ovqat o'simliklariga (masalan, vaksina ishlab chiqarish uchun) o'tkazish farmatsevtik va tibbiy maqsadlarda qabul qilinadi, lekin bunday o'simlik qoldiqlari odam va hayvon oziq-ovqat zanjiriga kiritilmasligi kerak, chunki bu vegetarianlar va ayniqsa, veganlar uchun qabul qilinmaydigan narsa bo'ladi.

4. Odam genlarini o'z ichiga olgan organizmlarni hayvon ozuqasi sifatida qo'llanish (masalan, insulin kabi farmatsevtik inson oqsillarini ishlab chiqarish uchun o'zgartirilgan mikroorganizmlar) ko'rib chiqilmasligi kerak.

Turli diniy konfessiyalar bilan yaqindan maslahatlashuvlar natijasida inson genlarining nusxalarini o'z ichiga olgan oziq-ovqat mahsulotlarini qo'llashni mutlaq taqiqlash uchun kuchli qarshilik mavjud emasligi aniqlandi (bu, ayniqsa, nusxa gen tushunchasi tushunilganda sezildi). Shu bilan birga, hisobot axloqiy jihatdan sezgir genlarning alternativ yondashuvlar mavjud bo'lganda oziq-ovqat organizmlariga kiritilishini kuchli ravishda qaytarishga chaqirdi. Agar diniy oziq-ovqat cheklavlariga amal qiladigan aholining ayrim guruhlari uchun qabul qilib bo'lmaydigan nusxa genlarini o'z ichiga olgan transgen organizmlar ayrim oziq-ovqatlarda mavjud bo'lsa, bunday oziq-ovqatlar majburiy ravishda aniq belgilanishi kerak.

1.5.6 Genetik axloqiy masalalar (*Genethics*)

Inson genom loyihasi (Human Genome Project) boshlangan ilk kunlardan boshlab, genetik testlar, genetik ma'lumotlar bazalari, genetik skrining, irsiy

chiziqdagi gen terapiyasi, klonlash, ksenotransplantatsiya va embrion ildiz hujayralaridan foydalanish bilan bog'liq tadqiqotlardan kelib chiqadigan kutilayotgan axloqiy, ijtimoiy, huquqiy va psixologik masalalar tobora kuchayib bormoqda (1.4-jadval). Bu tadqiqotlar birgalikda «genetik axloq» (genethics) sohasiga kiradi.

Inson genomini tahlil qilish bo'yicha asosiy tadqiqotlar uzoq vaqt davomida zarur bo'lib qoladi, ammo bu tadqiqotlar bilan bog'liq bo'lgan potentsial oqibatlar sezilarli bo'lishi mumkin va quyidagi kabi ko'plab muammolarni keltirib chiqarishi aniq:

- Maxfiylik va shaxsiy hayot himoyasi: genetik ma'lumotlar qanday saqlanishi va ulardan kim foydalanishi kerak?
- Jamiyat roziligi: genetik tadqiqotlar va ma'lumotlar bazalari yaratishda jamoatchilik roziligi qanday ta'minlanadi?
- Stigmatizatsiya: genetik testlar natijalaridan kelib chiqadigan ijtimoiy tamg'alar yoki kamsitishlar ehtimoli qanday kamaytiriladi?
- Genetik test va skriningga kirish: bu xizmatlardan foydalanish imkoniyati tengmi va u qanday tartibga solinadi?
- Moliyaviy resurslarni taqsimlash: genetik tadqiqotlar va texnologiyalarni rivojlantirish uchun mablag' qanday ajratilishi kerak?

Genetik tadqiqotlarning ijtimoiy ta'siri ko'p qirrali bo'lib, u nafaqat texnik rivojlanishni, balki axloqiy va huquqiy ko'rsatmalarning uzviy ishlab chiqilishini talab qiladi. Shu sababli, *genethics* sohasida jamoatchilik xabardorligi, ma'lumotlarning oshkoraligi va axloqiy masalalarga e'tibor qaratish juda muhimdir.

1.4-jadval.

Inson genomini tadqiq qilishdagi jamoatchilik tashvishlari

- Test va skrining natijalarining maxfiyligi
- Genetik test va skrining doirasi
- Diskriminatsiya va tamg'alash (stigmatizatsiya)
- Inson genom ma'lumotlarining tijorat ekspluatatsiyasi
- Evgenika bosimlari
- Irsiy chiziqdagi gen terapiyasining keyingi avlodlarga ta'siri

Yaqin kelajakda har bir shaxsning «genetik portfeli» haqida to'liqroq ma'lumotga ega bo'lish va masalan, yurak kasalligi, saraton kabi kelajakda yuzaga kelishi mumkin bo'lgan tibbiy muammolarni aniqlash hamda kasallik boshlanishidan ancha oldin davolashni tavsiya qilish imkoniyati paydo bo'lishi mumkin. Genetik test va skrining faqat hozirgi vaqtda davosi mavjud bo'lgan kasalliklar uchun amalga oshirilishi kerak, degan fikrlar ilgari surilgan. Oilalarda genetik kasalliklar avvaldan aniqlangan va kuzatilgan holatlarda, cheklangan hollarda, homilada bu nuqson bor-yo'qligini aniqlash uchun tug'ilishdan oldin test o'tka-

zish mumkin. Ota-onalar shundan so'ng homiladorlikni to'xtatish yoki to'liq muddatli chaqaloqning ehtiyojlariga yaxshi tayyorlanish imkoniga ega bo'lishlari mumkin.

Genetik testlarning eng qo'rqinchli jihati bu ma'lumotlarning ish beruvchilar, sug'urta kompaniyalari va ipoteka tashkilotlari tomonidan qo'llanilishi mumkinligidir. Genetik ma'lumot biznes tashkilotlari uchun moliyaviy xavflarni kamaytirishi mumkin bo'lsa-da, bu, ayniqsa, aniqlangan genetik muammo yoki xavf keyinchalik hech qachon yuzaga kelmasligi mumkin bo'lgan holatlarda, shaxs uchun halokatli oqibatlariga olib kelishi mumkin. Axloqiy qo'mitalar sug'urta kompaniyalari va boshqa moliyaviy tashkilotlarning sug'urta yoki ipoteka olishda shaxsning genetik ma'lumotlarini talab qilishi yoki ularga kirish imkoniyatiga ega bo'lishi kerak emasligini tobora ko'proq taklif qilmoqda. Biroq bu nazorat qilish qiyin bo'lishi va ruxsat etilgan taqdirda dahshatli oqibatlariga olib kelishi mumkin.

Genlarni ko'chirish asosida davolash, ya'ni gen terapiyasi, irsiy genetik kasalliklarni davolashda muhim o'rin tutishi mumkin. Somatik (jinsiy bo'lmagan hujayralar) gen terapiyasining cheklangan amaliyoti sinab ko'rilgan, lekin unchalik muvaffaqiyatli bo'lmagan va u tibbiy xavfsizlik, huquqiy masalalar va jamoatchilik tashvishlarini qondirish uchun qat'iy nazorat ostida bo'lib qoladi. Germinal chiziqli (jinsiy hujayralar, masalan, spermatozoidlar) gen terapiyasiga ruxsat berilmaydi, chunki bu axloqiy va ijtimoiy jihatdan qabul qilinmaydi hamda evgenik masalalarni keltirib chiqaradi.

Inson ildiz hujayralaridan foydalanish imkoniyati – ko'pchilik holatlarda bitta urug'langan tuxumdan olingan ajralmagan ibtidoiy hujayralar – regenerativ tibbiyotda ko'plab kasalliklar, masalan, qandli diabet, alsgeymer kabi kasalliklarni davolash imkoniyatini yaratishi mumkin. Ildiz hujayralar organlarni (buyrak, yurak va boshqalar) terapevtik klonlash uchun transplantatsiya maqsadlarida ham foydalanishga yo'l ochishi mumkin. Bu rivojlanishdan foyda ko'rishi mumkin bo'lganlar orasida katta qiziqish mavjud bo'lsa-da, boshqalar buni axloqiy va ma'naviy sabablarga ko'ra rad etishmoqda. Ildiz hujayralar bo'yicha tadqiqotlar kasallarga bunday katta imkoniyatlarni taklif qilgani sababli, shubhasiz, muhim qayta baholashlardan o'tadi.

Shuni aytish kerakki, ba'zan haddan tashqari ishtiyoqli shaxslar biotibbiyotdan kasalliklar va qarishni nazorat qilish qobiliyati bo'yicha realistlik bo'lmagan umidlar yaratadi. Ko'pincha OAV biotexnologik yo'l bilan ishlab chiqilgan tubdan yangi terapiyalar yaqin orada paydo bo'ladi, degan bayonotlar bilan kasallarga va qarish belgilari bilan duch kelganlarga noto'g'ri umid uyg'otadi. Biotexnologiya orqali tibbiyotda ko'p narsaga erishiladi, ammo biotexnologiyani mutlaq e'tiqod tizimiga aylantirmaslik muhimdir.

1.6 Qo'shimcha adabiyotlar

Genetik jihatdan o'zgartirilgan organizmlarning xavfsizligi va jamiyatga ta'siri bo'yicha turli nuqtayi nazarlarni chuqurroq tushunish uchun quyidagi manbalarga murojaat qilishingiz mumkin:

1. Atherton, K. T. *Genetically Modified Crops: Assessing Safety*. London: Taylor and Francis, 2002.
2. Dale, P. J. *The GM debate: science or scaremongering?* Biologist, 47: 7–10, 2000.
3. Frewer, L. K. va Shepherd, R. *Ethical concerns and risk perceptions associated with different applications of genetic engineering: interrelationship with the perceived need for regulation of the technology*. Agriculture and Human Values, 12: 48–57, 1995.
4. Horlick-Jones, T., Walls, J., Rower, G. va boshqalar. *A Deliberative Future? Public Debate about Possible Commercialisation of Transgenic Crops in Britain, 2003. Understanding Risk Working Paper 04.02*. Norwich: Centre for Environmental Risk, 2004.
5. Konig, A. *A framework for designing transgenic crops: science, safety and citizen's concerns*. Nature Biotechnology, 21: 1274–1279, 2002.
6. Lawrence, S. *Agbio keeps on growing*. Nature Biotechnology, 23: 281, 2005.
7. Miller, H. *Cat and mouse in regulating genetic 'enhancement'*. Nature Biotechnology, 23: 171–172, 2005.
8. Moore, P. *A profile*. Nature Biotechnology, 23: 280, 2005.
9. OECD. *Safety Evaluation of Food Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles*. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 1993.
10. Poortinga, W. va Pidgeon, N. F. *Public Perceptions of Genetically Modified Food and Crops, and the GM Nation? Public Debate on the Commercialisation of Agricultural Biotechnology in the UK. Understanding Risk Working Paper 04.01*. Norwich: Centre for Environmental Risk, 2004.
11. Smith, J. E. *Biotechnology, fourth edition. Studies in Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
12. The Royal Society. *Genetically Modified Plants for Food Use*. London: The Royal Society, 1998, pp. 1–16.
13. The Royal Society. *Genetically Modified Plants for Food Use and Human Health: An Update*. London: The Royal Society, 2002.

II BOB. O'SISH VA METABOLIZM BIYOKIMYOSI VA FIZIOLOGIYASI

2.1 Kirish

Biologiyaning birinchi qonuni (agar shunday bo'lsa): mikroorganizmlarning maqsadi – boshqa bir mikroorganizmlarni yaratishdir.

Ba'zi hollarda biotexnologlar, mikroorganizmlardan foydalanishni maqsad qilgan holda, bu jarayon iloji boricha tez va ko'p sodir bo'lishini xohlaydilar; ya'ni jarayon oxirida maksimal miqdorda mikroorganizmlar olishni maqsad qiladilar. Boshqa hollarda, mahsulot o'zi mikroorganizmdan tashqari narsa bo'lsa, biotexnologlar mikroorganizmlarni asosiy maqsadidan chalg'itish uchun uni ma'lum usulda boshqaradilar. Shunda mikroorganizmlar o'zlarining ko'payish qobiliyatiga qo'yilgan cheklovlarni yengishga harakat qilarkan, biotexnologlar xohlagan mahsulotni ishlab chiqaradilar. Shu sababli, mikroorganizmlar o'sishi va ularning turli mahsulotlari o'zaro metabolism orqali chambarchas bog'liqdir.

Bu bobni yozishda bakteriyalar, xamirturushlar, zamburug'lar va mikroalgalar kabi asosiy mikroorganizmlarning hujayra tuzilishi haqida batafsil tushuntirishni maqsad qilmaganmiz. Bunday ma'lumotlarni biologiya darsliklarida topish mumkin, va agar hujayra tuzilishiga oid noaniqliklar yuzaga kelsa, bu manbalarga murojaat qilish tavsiya etiladi. Ammo biologiya darsliklari tirik hujayralardagi kimyoviy jarayonlarni (ya'ni ularning **biokimyosini**) odatda oddiy so'zlar bilan tushuntirmaydi. Shunday bo'lsa-da, hujayraning biokimyosi mikroorganizmlardan foydalanish uchun asosiy ahamiyatga ega bo'lgani sababli, mikroorganizmlar hujayralari ko'payishida qo'llaniladigan asosiy tizimlar bilan tanishish muhimdir⁵.

Hujayraning Biokimyosi va Fiziologiyasi

Biokimyo:

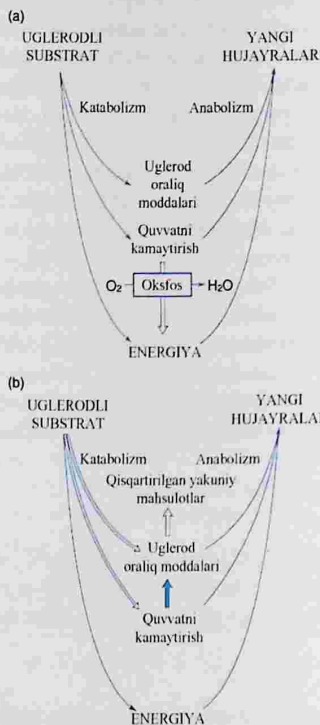
Bu hujayraning o'sishi va ikki hujayraga bo'linishi jarayonida sodir bo'ladigan kimyoviy o'zgarishlarning izohidir. Bu kimyoviy o'zgarishlar hujayraning ko'payish jarayonini boshqaradi va mikroorganizmlardan foydalanishni tushunish uchun muhimdir.

Fiziologiya:

1. Fiziologiya hujayraning biokimyosidan kengroq tushunchadir.
2. Hujayradagi uglerod va boshqa elementlarning oqimi.

⁵ Basic Biotechnology, third edition, eds. Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen. Published by Cambridge University Press. C Cambridge University Press, 2006.

Bu biokimyoviy jarayonlarning hujayraning umumiy o'sish va hayot sikliga qanday bog'liqligini tushuntiradi. Fiziologiya hujayraning ko'p o'lchovli ko'rinishini tasvirlaydi. Uch o'lchovli tuzilma – hujayraning makoniy murakkabligini ifoda qilsa, to'rtinchi o'lchov – vaqt, ya'ni hujayradagi kimyoviy reaksiyalarning dinamik xususiyatidir. Hujayrada sodir bo'lishi mumkin bo'lgan barcha kimyoviy reaksiyalar bir vaqtning o'zida yuz bermaydi. Ba'zilar hujayraning tez o'sish davrida sodir bo'ladi. Boshqalari esa o'sish tezligi sekinlashgan va statik holatga kirgan davrda yuzaga chiqadi. Shunday qilib, fiziologiya hujayraning kimyoviy jarayonlari va ularning rivojlanish, o'sish va hayot sikli bilan bog'liqligini to'liq tushunishni ifodalaydi. Bu bilimlar mikroorganizmlardan biotexnologik maqsadlarda samarali foydalanish uchun asosiy ahamiyatga ega.



2.1-rasm. Katabolizm (parchalanish) va anabolizm (biosintez) jarayonlari energiya ishlab chiqarish va tiklanish quvvatini ta'minlash bilan bog'liq.

(a) Aerobik metabolizm. Oxfhos: Oksidativ fosforlanish (2.5-bo'limga qarang).

(b) Anaerobik metabolizm

Rasmdagi so'zlar izohi quyida berildi:

1. Yuqoridagi diagramma (a):

Uglerod substrati mikroorganizmlar tomonidan katabolizm orqali parchalanadi. Katabolizm natijasida uglerodning tiklanish quvvati paydo bo'ladi. Oksid fosforlash jarayonida energiya yuzaga keladi. Anabolizm esa yangi hujayralar shakllanishini ta'minlaydi.

2. Quydagi diagramma (b):

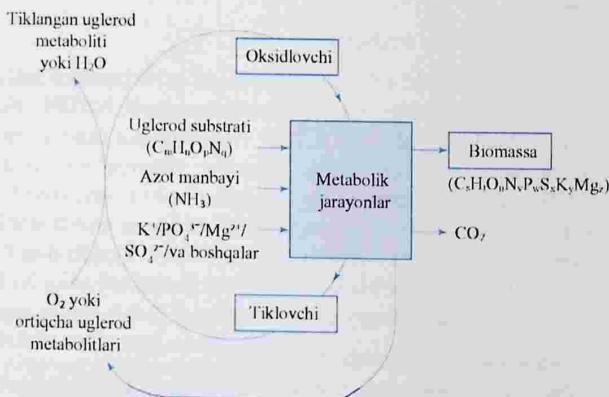
Uglerod substrati katabolizm orqali parchalanadi va tiklangan oxirgi mahsulotlarni hosil qiladi. Uning tiklanish quvvati yordamida energiya yuzaga keladi. Anabolizm orqali yangi hujayralar yaratiladi. Diagrammalar o'sish va metabolizm jarayonlarining aerobik va anaerobik yo'llarini ifodalaydi.

2.2 Metabolizm

2.2.1 Ba'zi ta'riflar

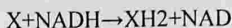
Metabolizm – bu o'zaro chambarchas bog'langan, ammo farqli ikki faoliyatdan iborat matritsa (2.1-rasmga qarang).

Anabolik jarayonlar hujayra materiallarini, nafaqat asosiy hujayra komponentlarini (oqsillar, nuklein kislotalar, lipidlar, uglevodlar va boshqalar), balki bu materiallarning oraliq prekursorlarini ham (masalan, aminokislotalar, purinlar, pirimidinlar, yog' kislotalari, turli shakarlar va shakar fosfatlari) hosil qilish bilan bog'liq. Anabolizm umumiy hisobda endotermik jarayonlardir (ya'ni ular energiya talab qiladi). Ular, shuningdek, har doim tiklanish quvvatini talab qiladi, bu esa substrat (yoki ozuqa) parchalanishi natijasida hosil bo'ladi. Kompensatsion ekzotermiklik turli katabolik (energiya ishlab chiqaruvchi) jarayonlar orqali ta'minlanadi (3-bobga ham qarang). Masalan, uglevodlarning (saxaroza yoki glyukozaning) CO_2 va suv hosil qilish uchun parchalanishi asosiy ekzotermik jarayondir, bunda «energiyaning hosil bo'lishi» amalga oshiriladi.



2.2-rasm. Metabolizm hujayrasi uchun termodinamik muvozanat.

Biz organizmlarni o'z metabolizmini aerobik tarzda, ya'ni havodan kislorod (O_2) yordamida amalga oshiradigan organizmlar va anaerobik tarzda, ya'ni kislorodsiz (O_2 holda) amalga oshiradigan organizmlarga ajratishimiz mumkin. Kislorod bilan tiklangan uglerod birikmalarining suv va CO_2 hosil qilish uchun bo'ladigan umumiy reaksiyasi juda ekzotermik jarayondir. Shu sababli, aerobik organizmlar ma'lum darajadagi anabolizmni (ya'ni o'sishni) ta'minlash uchun o'z substratlarining nisbatan kichikroq qismini katabolizm uchun qo'llanishi mumkin (2.1a-rasmga qarang). Anaerobik organizmlarda, substratlar asosan disproporsiyatsiya jarayonlari orqali o'zgaradi, bu esa nisbatan past «energiyani hosil qilish» bilan bog'liq. Shu sababli, anaerobik organizmlar ma'lum darajadagi anabolizmni ta'minlash uchun substratlarining kattaroq qismini katabolizm uchun qo'llanishi kerak (2.1b-rasmga qarang). Farqi nimada? Masalan, (*saccharomyces cerevisiae*) xamirturush kabi fakultativ anaerob organizmlar misolida ko'rish mumkin. Bu shuni anglatadiki, xamirturush aerobik yoki anaerobik sharoitlarda yashay oladi. Glyukozani bir xil tezlikda parchalaganda, Aerobik xamirturush CO_2 , suv va yangi xamirturush hujayralarining nisbatan yuqori hosilini beradi. Anaerobik xamirturush energiya va tiklanish quvvatini kamroq hosil qiladi, shuning uchun hujayralar soni aerobik sharoitdagiga qaraganda kamroq bo'ladi. Kislorodsiz sharoitlarda xamirturush katabolizm davomida hosil bo'lgan barcha tiklanish quvvatini (reducing power) oksidlashga qodir emas. Shu sababli, ortiqcha uglerod o'rtamchalari (xamirturush holatida bu pirouzum kislotasi) reduktorlar (tiklovchi modda)ni qayta ishlash uchun tiklanadi. Natijada, xamirturushda etanol hosil bo'ladi. Umumiy reaksiyaga ahamiyat qarating:



Bu yerda:

X – metabolit.

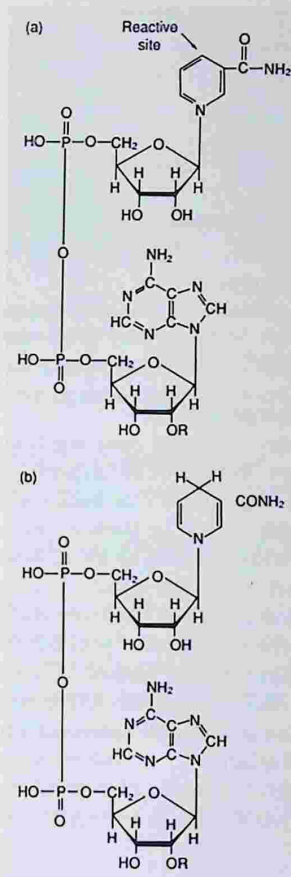
NADH – tiklovchi modda (reductant).

NAD^+ – oksidlangan shakl (tiklanish jarayonida qayta hosil bo'ladi). NAD (nikotinamid adenin dinukleotidi): NAD^+ – oksidlangan shakl. $NADH$ – tiklangan shakl (reduktor). $NADP$ (NAD fosfat): $NADP^+$ – fosfatlangan oksidlangan shakl. $NADPH$ – fosfatlangan tiklangan shakl (reduktor). Ularning bir-biridan farqi shundaki, $NADH$ odatda parchalanish jarayonlari (katabolizm) uchun qo'llaniladi. $NADPH$ odatda biosintez (anabolizm) jarayonlarida tiklovchi modda sifatida ishtirok etadi. Aerobik hujayralarda $NADH$ va $NADPH$ qayta oksidlanishi O_2 bilan bog'liq holda sodir bo'ladi. Anaerobik sharoitda esa bu imkoniyatsiz bo'lganligi sababli, muqobil oksidlanish strategiyalari talab qilinadi (2.6-bo'limga qarang).

Hujayraning o'sishidagi boshqa elementlar:

Hujayra o'sishi uchun karbon (C) zarur, ammo hujayra tarkibiga boshqa elementlar ham kiradi, masalan, azot (N) – odatda NH_3 shaklida, kislorod (O) – ae-

robik sharoitda havodan olinadi, anaerobik sharoitda esa ozuqa molekularining qayta tashkil etilishidan yoki suvdan olinadi. Kaliy (K^+), Magniy (Mg^{2+}), Oltingurt (S) (SO_4^{2-} shaklida), Fosfor (P) (PO_4^{3-} shaklida). Kichik miqdorlarda boshqa ionlar: temir (Fe^{2+}), rux (Zn^{2+}), marganes (Mn^{2+}) va boshqalar. Bu dinamik tizimlar 2.2-rasmda ko'rsatilgan.



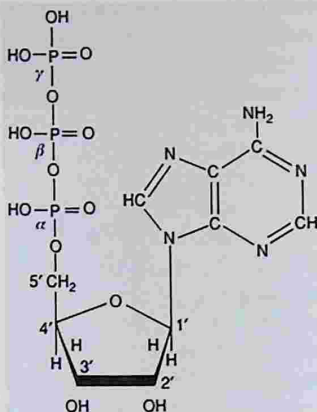
2.3-rasm.

(a) NAD⁺/NADP⁺ (oksidlangan);

(b) NADH/NADPH (kamaytirilgan).

NAD⁺ va NADH molekularida,

R = H; NADP⁺ va NADPH molekularida esa R = PO₂³⁻.

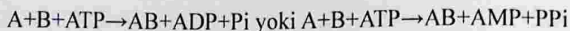


2.4-rasm. Adenozin trifosfat (ATP)

Energiya berganda, γ -bog' gidrolizlanadi va mavjud energiya boshqa molekulada yangi bog' hosil qilish uchun qo'llaniladi. Adenozin difosfat (ADP) oxirgi fosfat guruhisiz, adenozin monofosfat esa oxirgi ikki fosfat guruhisiz bo'ladi.

2.2.2 Katabolizm va energiya

Katabolizm va anabolizm o'rtasidagi zarur bog'lanish katabolik jarayonlarning reaktiv reagentlarni (son jihatidan oz bo'lsa ham), sintez qilishni ta'minlash qobiliyatiga asoslanadi. Bu reagentlar, o'z navbatida, keng ko'lamdagi anabolik reaksiyalarni «harakatlantirish» uchun qo'llaniladi. Bu asosiy oraliq moddalarning eng muhimi adenozin trifosfat (ATP) bo'lib, (2.4-rasmga qarang), biologlar tomonidan «yuqori energiyali bog'» deb ataladigan xususiyatga ega. ATPda bu bog' pirofosfat qoldig'idagi angidrid bog'lanishidir. Bu bog'ni ajratish natijasida hosil bo'ladigan potensial energiya bevosita yoki bilvosita anabolik sintezlarda bog'lar hosil qilish bosqichlari uchun qo'llaniladi. ATP kabi molekulalar hujayra-ning «energiya valyutasi» vazifasini bajaradi. ATP biosintetik reaksiyada qo'llanilganda, u gidroliz mahsuloti sifatida ADP (adenozin difosfat) yoki ba'zan AMP (adenozin monofosfat) hosil qiladi:



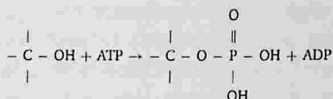
Bu yerda:

- A va B – hujayraning uglerod metabolitlari;
- P_e – noorganik fosfat;
- PP_e – noorganik pirofosfat.

ADP, hali ham «yuqori energiyali bog'ga ega bo'lib, adenilat kinaza reaksiyasi orqali yana ATP hosil qilish uchun qo'llanilishi mumkin:



Tirik hujayralarda juda keng tarqalgan fosforlanish reaksiyalari odatda ATP vositasida amalga oshiriladi:



Bu yerda fosforlangan mahsulot odatda dastlabki birikmaga qaraganda bir necha usulda ko'proq reaktiv bo'ladi.

2.3 Katabolik yo'llar

2.3.1 Glyukozaning parchalanishini umumiy ko'rib chiqish

Substratni parchalanishining asosiy maqsadi mikroorganizmlarni quyidagilar bilan ta'minlashdir:

1. Yangi hujayralar sintezi uchun qurilish bloklari.
2. Energiya, asosan ATP shaklida, yangi bog'lar va yangi birikmalarni sintez qilish uchun.
3. Tiklanish quvvati, asosan tiklangan NAD (NADH) yoki NADP (NADPH) shaklida.

ATP va NAD(P)H (bu yerda NADH va NADPH birgalikda ifodalanadi) turli fermentlar bilan birgalikda ishlaydi va bir birikmani boshqasiga aylantirishda ishtirok etadi. Mikroorganizmlar hujayrasi turli xil birikmalar yig'indisi sifatida qaralishi mumkin, ammo uni quyidagilarga qisqartirish mumkin:

Oqsillar:

- Funksional (masalan, fermentlar).
- Strukturaviy (hujayra devori yoki hujayra ichidagi tuzilmalar bilan bog'liq oqsillar).

Nuklein kislotalar:

DNK va RNK.

Lipidlar:

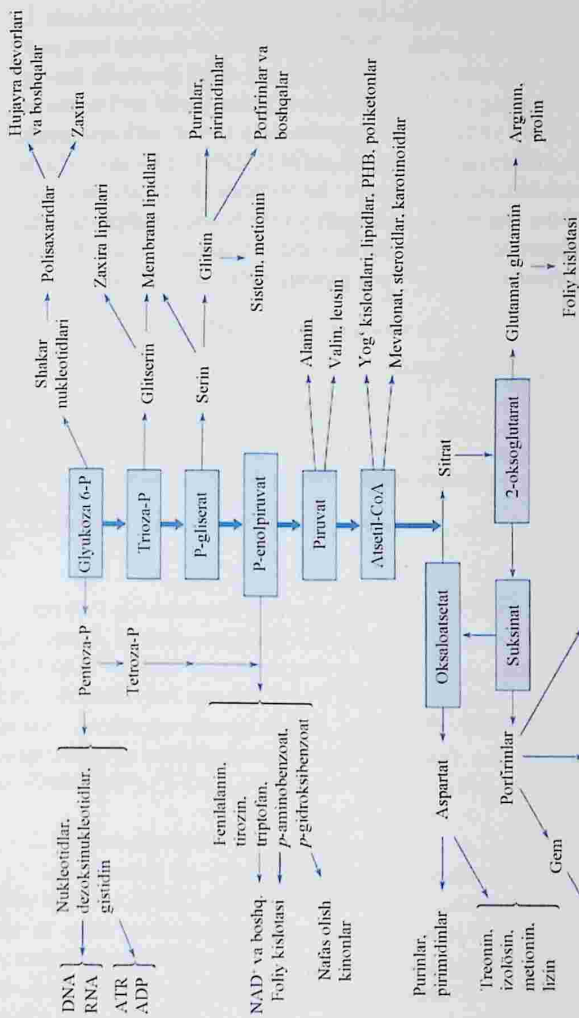
- Ko'pincha yog' kislotalariga asoslangan bo'lib, ular hujayraning yoki hujayra ichidagi organellalarning (mikro-organlar) membranaviy tuzilmalarini shakllantirish uchun qo'llaniladi.

Polisaxaridlar:

Asosan hujayra devorlari va hujayra kapsulalarini qurishda qo'llaniladi. Bu tarkibiy qismlar o'z navbatida oddiy prekursorlardan hosil qilinadi:

- Oqsillar – aminokislotalardan.
- Nuklein kislotalar – nukleotid asoslaridan (shuningdek, riboza va fosfat).
- Lipidlar – atsetat (C_2) birligidan hosil bo'ladigan yog' kislotalaridan.
- Polisaxaridlar – shakar molekularidan.

Shunday qilib, hujayra o'zining barcha molekularini hosil qilish va hatto o'zini takrorlash uchun atigi to'qqizta prekursor hosil qilish imkoniyatiga ega (2.5-rasmga qarang). Agar hujayra bu asosiy to'qqizta molekulani har qanday substratdan yoki substratlar kombinatsiyasidan hosil qila olsa, u o'zini qayta sintez qila oladi (albatta, bu prekursorlarning shakllanishi davomida ATP va NAD(P)H ham hosil bo'lishi sharti bilan). Agar glyukozani mikroorganizmlar o'sishi uchun odatiy substrat sifatida qarasak, uning bu to'qqizta asosiy prekursorga qanday parchalanishini tushunishimiz mumkin (2.5-rasmga qarang). Bu jarayon glikoliz orqali bog'lanadi, ba'zan uni Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) yo'li deb atashadi, bu haqida batafsilroq ma'lumot 2.6-rasmda keltirilgan. Shuningdek, glikoliz natijasida hosil bo'ladigan oxirgi mahsulot – piruvat – trikarboksilat kislota sikli (TCA sikli) reaksiyalari orqali qo'shimcha oksidlanadi (quyidagi 2.9-rasmga qarang). Glikolitik ketma-ketlikdan tashqari, pentoza (C_5) fosfatlarini hosil qilish uchun mas'ul bo'lgan muhim qo'shimcha yo'l ham mavjud.



2.5-rasm. Anabolik yo'llar (sintez) va markaziy katabolik yo'llar

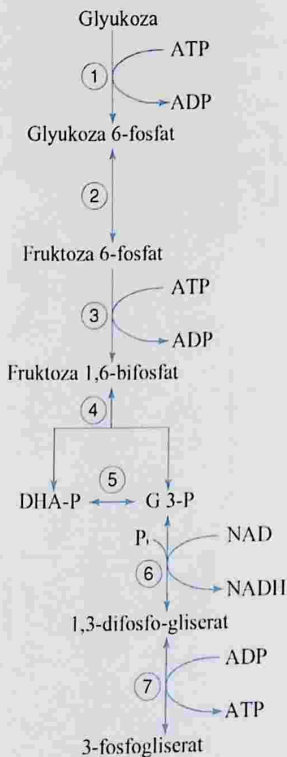
Faqatgina asosiy biosintez yo'nalishlari va ularning katabolik yo'llari bilan asosiy bog'lanishlari ko'rsatilgan, barchasi juda soddalashtirilgan shaklda berilgan. Energiya (ATP), redoks (NAD^+ , $NADP^+$) metabolizmi va azot metabolizmi kabi bog'lanishlar keltirilmagan.

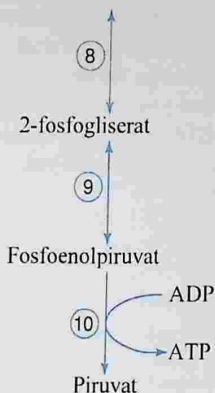
• PHB: Poli-β-gidrokisibutirat.

• P: Fosfat guruhi.

To'g'ri qizitirgan asosiy prekursorlar so'zlarida ko'rsatilgan.

Tetroza (C_4) fosfatlari va pentoza fosfat yo'llari quyidagichadir: pentoza fosfat yo'li (ba'zan pentoza fosfat «shunt»i deb ham ataladi, 2.7-rasmga qarang) ikkita asosiy maqsadga xizmat qiladi: C_5 va C_4 birikmalarini biosintez uchun taqdim etadi (2.5-rasmga qarang). Biosintez jarayonlari uchun NADPH ishlab chiqaradi. U glyukoza 6-fosfatdan ham, EMP yo'lidan (Embden–Meyerhof–Parnas) ham, pentoza fosfat yo'lidan (PP) dan ham foydalanadi. Bu yo'llarning qanchalik faolligi hujayraga bog'liq: Hujayraning eng faol o'sish bosqichida ikkala yo'l taxminan 2 : 1 nisbatda ishlaydi (EMP yo'li – PP yo'lga nisbatan). O'sish sekinlashganda, hujayraning biosintetik imkoniyatlari pasayadi, ya'ni NADPH va C_5 va C_4 shakar fosfatlariga bo'lgan talab kamayadi. Bu esa yo'llar nisbatini 10 : 1 yoki, hatto 20 : 1 ga o'zgartiradi. Bu shuni anglatadiki, metabolik yo'llar boshqariladigan tizimlar bo'lib, hujayraning o'zgaruvchan ehtiyojlarini qondirish uchun moslashuvchanlikka ega. Bu mavzu keyinroq (2.8-bo'limga qarang) muhokama qilinadi.





2.6-rasm. Embden–Meyerhof–Parnas glikoliz yo‘li

Umumiy reaksiya:



Jarayonni katalizlaydigan fermentlar:

1. Geksokinaza; 2. Glyukoza-6-fosfat izomeraza; 3. Fosfofruktokinaza; 4. Aldolaza; 5. Trioza fosfat izomeraza; 6. Glitseraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; 7. 3-fosfogliserat kinaza; 8. Fosfogliseromutaza; 9. Fosfoenolpiruvat dehidrataza; 10. Piruvat kinaza.

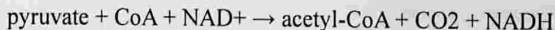
Belgilashlar:

DHA-P: Digidroksiatseton fosfat; G3-P: Glitseraldehid-3-fosfat; P_i: Noorganik fosfat guruhi.

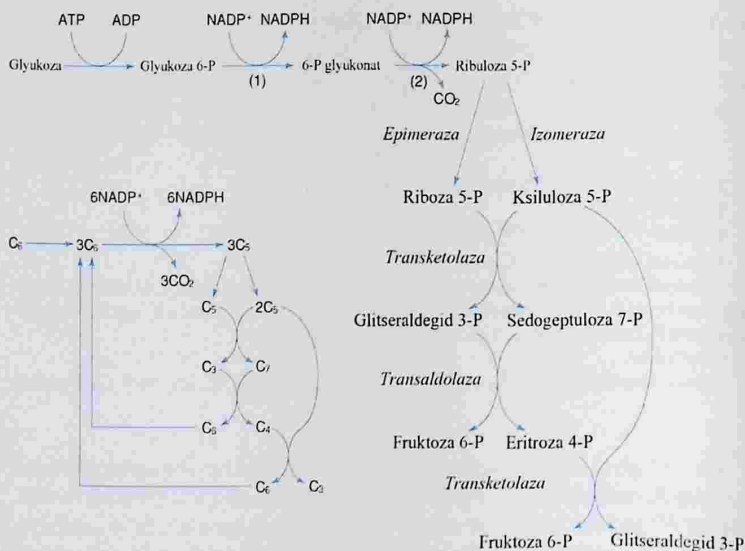
Bu yo‘l glyukozaning piruvatga parchalanish jarayonini bosqichma-bosqich katalizlaydi, natijada energiya (ATP) va tiklanish quvvati (NADH) hosil bo‘ladi. EMP va PP yo‘llari ko‘pchilik mikroorganizmlarda uchrasa-da, ba‘zi bakteriyalarda alternativ yo‘l mavjud. Bu yo‘l Entner-Doudoroff yo‘li bo‘lib (2.8-rasmga qarang), asosan psevdomonadlar va ularga yaqin bakteriyalarda uchraydi. Shunga qaramay, bu bakteriyalarda pentoza fosfat yo‘li hali ham mavjud, chunki Entner-Doudoroff yo‘li C₅ va C₄ fosfatlar hosil qila olmaydi.

2.3.2 Trikarboksilat kislota sikli

Glyukozaning qaysi yo‘l bilan parchalanishidan qat’iy nazar, u odatda piruvum kislota (CH₃CO.COOH) hosil bo‘lishiga olib keladi. Piruvatning keyingi taqdiri aerob va anaerob organizmlarda farqlanadi. Aerobik tizimlarda piruvat dekarboksillanadi (ya’ni CO₂ yo‘qotadi) va kimyoviy jihatdan faollashib, atsetil koenzim A (atsetil-CoA) hosil qiladi. Bu murakkab reaksiyada NAD⁺ ham ishtirok etadi:



Bu reaksiya piruvat degidrogenaza fermenti tomonidan katalizlanadi. (Anaerob hujayralarda piruvatning taqdiri keyinroq muhokama qilinadi.) Atsetil-CoA, tioester sifatida, yuqori reaktivlikka ega bo'lib, ko'plab oraliq moddalarni hosil qila oladi. Biroq uning asosiy (lekin yagona emas) taqdiri – siklik reaksiyalar seriyasi orqali oksidlanishdir. Bu siklik reaksiyalar «limon kislotasi sikli» deb nomlanadi. Shuningdek, u trikarboksilat kislotasi sikli yoki uni kashf qilgan olim nomi bilan Krebs sikli deb ham ataladi.



2.7-rasm. Pentoza fosfat sikli (geksomonofosfat shunt)

Enzimlar raqamlangan:

1. Glyukoza-6-fosfat degidrogenaza;
2. Fosfoglyukonat degidrogenaza.

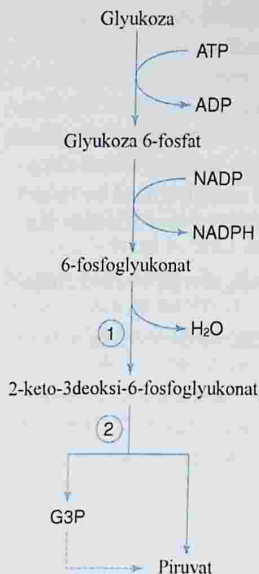
Fruktoza-6-fosfat izomeraza yordamida glyukoza-6-fosfatga qaytariladi; shuningdek, glitseraldegid-3-fosfat ham teskari glikoliz (2.6-rasmga qarang) orqali qayta ishlanishi mumkin. To'liq qayta ishlanishda bu yo'l NADPH generatori sifatida ishlaydi. Biroq transaldolaza va transketolaza reaksiyalari shakarlar o'zaro konversiyasini amalga oshiradi, bu esa boshqa jarayonlarda qo'llaniladi.

Umumiy reaksiya:



Izoh:

C₃ va C₄ shakarlar biosintez uchun chiqarib yuborilsa, qayta ishlanish jarayoni pasayadi va natijada NADPH hosildorligi kamayadi.



2.8-rasm. Entner–Doudoroff yo'li

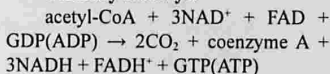
Bu yo'l ba'zi psevdomonadlar va ularga yaqin bakteriyalarda Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) yo'lini (2.6-rasmga qarang) almashtiradi. Enzimlar (raqamlangan): Fosfoglyukonat dehidrataza va Spesifik aldolaza.

Glitseraldehid-3-fosfat (G3P) bu yo'lda hosil bo'ladi va u 2.6-rasmga keltirilgan tegishli fermentlar orqali piruvatga aylantiriladi.

Bu yo'lning o'ziga xosligi shundaki, u NADPH va ATP hosil qilishda faollik ko'rsatadi, lekin C₅ va C₄ shakllarini hosil qila olmaydi.

2.9-rasm. Trikarboksilat kislotasi sikli (TCA sikli)

Umumiy reaksiya:



Reaksiyalarni katalizlaydigan fermentlar:

1. Sitrat sintaza
- 2-3. akonitaza;
4. Izotsitrat dehidrogenaza;
5. 2-oksoglutarat dehidrogenaza;
6. Suktsinat tiokinaza;
7. Suktsinat dehidrogenaza;
8. Fumaraza;
9. Malat dehidrogenaza.

Eslatma:

7-reaksiyada GTP/GDP o'rniga ATP/ADP qo'llanilishi mumkin. Bu sikl atsetil-CoA ning to'liq oksidlanishini ta'minlaydi va natijada CO₂, energiya tashuvchi molekullar (NADH, FADH₂,

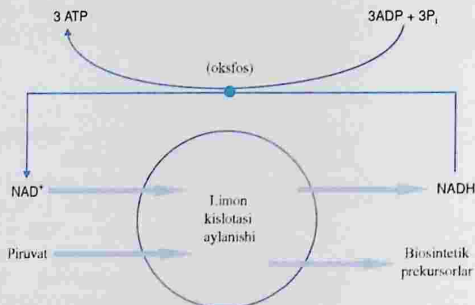
GTP/ATP) hosil bo'ladi. Bu molekullar keyinchalik oksidlanish fosforlanishida qo'llaniladi.

TCA siklining reaksiyalari (2.9-rasmda ko'rsatilgan) ikki muhim funksiyani bajaradi. Birinchidan, biosintez uchun asosiy oraliq moddalarning ta'minlanish va 2-oksoglutarat: glutamat hosil qilishda qo'llaniladi, undan glutamin, arginin va prolin vugudga keladi. Suksinat: Porfirinlar sintezida qo'llaniladi. Oksaloatsetat: Aspartat va aspartat oilasiga mansub aminokislotalar sintezida qo'llaniladi (14-bobga qarang). Atsetil-CoA ning to'liq oksidlanishidan energiya ishlab chiqarish: atsetil-CoA ning CO_2 va H_2O ga to'liq oksidlanishi energiya hosil bo'lishini ta'minlaydi (2.5-bo'limga qarang). TCA sikli bu ikki maqsadni muvozanatda ushlab turadi:

1. Agar oraliq moddalar biosintez uchun ajratib olinsa, energiya ishlab chiqarishdan voz kechilishi kerak bo'ladi.

2. Agar barcha atsetil-CoA to'liq oksidlangan bo'lsa, biosintez uchun zarur bo'lgan oraliq moddalar qolmaydi.

Kirish va chiqish: piruvat (glyukozadan hosil bo'ladi) siklga kirish ta'minlaydi. Sikl chiqish sifatida energiya va biosintetik prekursorlarni beradi (2.10-rasmga qarang). Bu muvozanatlar TCA siklining hujayra ehtiyojlarini qondirish uchun qanday ishlashini tushuntiradi.



2.10-rasm. Trikarboksilat kislota siklining ikki tomonlama roli

TCA sikli ikkita asosiy funksiyani bajaradi:

1. Oraliq moddalarni ishlab chiqarish:

Bu moddalar biosintez uchun qo'llaniladi.

Misollar: 2-oksoglutarat, suksinat, oksaloatsetat.

2. Energiya ishlab chiqarish:

Atsetil-CoA ning oksidlanishi natijasida CO_2 va H_2O hosil bo'ladi.

Energiyaning asosiy qismi ATP shaklida, oksidativ fosforlanish (oxphos) orqali olinadi. Bu diagramma TCA siklining hujayraning energiya talabini qondirish va biosintez uchun zarur bo'lgan asosiy moddalarni ta'minlashdagi ikki tomonlama vazifasini ko'rsatadi.

Siklning ikki maqsadini (biosintez uchun oraliq moddalar va energiya ishlab chiqarish) amalga oshirishda oksaloatsetatni (OAA) qayta tiklash masalasi paydo bo'ladi. Bu modda siklning boshida sitrat hosil qilish uchun zarur bo'lsa-da, ora-

liq moddalar biosintez uchun qo'llanilishi kerak bo'ladi. Agar bu oraliq moddalar biosintez uchun qo'llanilmasa, sikl faqat energiya ishlab chiqarishi ma'nisiz bo'ladi, chunki biosintez uchun prekursorlar bo'lmagan holda energiya qo'llanib bo'lmaydi. Oksaloatsetatni hosil qilishning qo'shimcha yo'li mavjud bo'lib, u asosan piruvatning karboksillanishi orqali amalga oshiriladi:



Bu reaksiyani piruvat karboksilaza fermenti katalizlaydi. Oksaloatsetat TCA sikli orqali hosil bo'lishi mumkin bo'lsa-da, piruvatning karboksillanishi yaxshi boshqarilishi kerak, bu atsetil-CoA va oksaloatsetatning teng miqdorda ishlab chiqarilishini ta'minlaydi. Piruvat karboksilaza fermenti atsetil-CoA ga bog'liq bo'ladi. Atsetil-CoA esa ijobiy effektor sifatida fermentning faolligini oshiradi. Atsetil-CoA ferment reaksiyasida ishtirok etmasa-da, uning miqdori piruvat karboksilazaning tezligini oshiradi. Ko'proq atsetil-CoA bo'lsa, oksaloatsetat ishlab chiqarilishi tezlashadi.

Muvozanatni saqlash mexanizmi

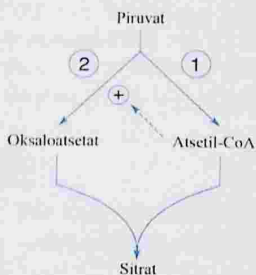
- Oksaloatsetat va atsetil-CoA teng miqdorda sarflanadi, bu sitrat hosil bo'lishiga olib keladi.

- Atsetil-CoA konsentratsiyasi pasaysa, piruvat karboksilaza sekinlashadi, ammo piruvat dehidrogenaza o'z ishini davom ettiradi, natijada ko'proq atsetil-CoA hosil bo'ladi.

Bu jarayon sitrat sintezining doimiy davom etishini va sitrat prekursorlariga olib keladigan ikkita reaksiyaning muvozanatda saqlanishini ta'minlaydi.

Anaplerotik reaksiyalar

Piruvat karboksilaza tomonidan katalizlanadigan reaksiyalar anaplerotik reaksiyalar deb ataladi, bu «to'ldiruvchi» ma'nosini anglatadi. Bu reaksiyalar hujayraning ehtiyojlarini qondirish uchun oraliq moddalarni qayta tiklashga xizmat qiladi.



2.11-rasm. Hujayra qanday qilib oksaloatsetat (OAA) va atsetil-CoA (AcCoA) ni teng miqdorda ta'minlaydi

1. Piruvat dehidrogenaza:

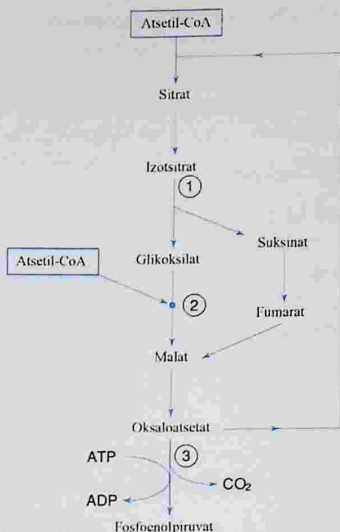
Piruvatni Atsetil-CoA ga aylantiradi.

2. Piruvat karboksilaza:

- Bu ferment piruvatni Oksaloatsetat (OAA) ga aylantiradi;

- Atsetil-CoA piruvat karboksilazaning faolligini oshiruvchi stimulyator (ijobiy effektor) sifatida ishlaydi.

Bu mexanizm hujayraning sitrat biosintezi uchun Atsetil-CoA va Oksaloatsetatni teng miqdorda ishlab chiqarishini ta'minlaydi.



2.12-rasm. Glikoksilat yo'li

Glikoksilat yo'liga qo'shimcha reaksiyalar (TCA siklidan tashqari, 2.10-rasmga qarang):

1. Izotsitrat liyaza;
2. Malat sintaza.

Glikoksilat yo'lining funksiyasi: bu yo'l atsetil-CoA dan shakar hosil bo'lishini ta'minlaydi va qo'shimcha reaksiyalarni o'z ichiga oladi;

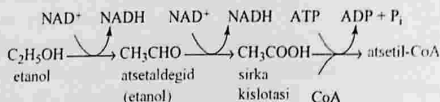
(3) Fosfoenolpiruvat karboksikinaza. Bu jarayon teskari glikoliz bilan davom ettiriladi (2.14-rasmga qarang).

Muhim eslatma (NB):

Bu yo'l faqat mikroorganizmlar va o'simlik hujayralarida uchraydi. O'simliklarda glikoksilat yo'li ko'pincha unib chiqqan urug'larda uchraydi, bu yerda uglerod manbai sifatida saqlangan triatsilglitserollar qo'llaniladi. Hayvon hujayralarida bu yo'l mavjud emas.

2.3.3 Glikoksilat yo'li: C₂ birikmalarda o'sish uchun

Agar mikroorganizmlar C₂ birikmalarida yoki yog' kislotalari, uglevododlar yoki asosan C₂ birikmalariga parchalanadigan har qanday substratda o'sadigan bo'lsa (2.3.4-bo'limga qarang), bu holda trikarboksilat kislotasi sikli (TCA sikli) metabolizmni to'liq ta'minlay olmaydi. Atsetil-CoA – agarda u uglerod manbai sifatida foydalanilsa, to'g'ridan to'g'ri atsetatdan hosil bo'lishi mumkin, shuningdek, atsetatga qaraganda ko'proq tiklangan C₂ birikmalaridan, masalan, atsetaldegid va etanoldan yuzaga keladi. Bu sharoitda hujayra TCA siklini to'ldirish uchun glikoksilat yo'lidan foydalanadi, bu siklning muayyan oraliq moddalari biosintezga olinib ketilsa ham uglerod oqimini saqlab qolishga imkon beradi.



Atsetat birikmalarining C₄ birikmalarga aylanish usuli glikoksilat yo'li deb ataladi (2.12-rasmga qarang). Bu yo'l uchun trikarboksilat kislotasi siklidan tashqari ikkita qo'shimcha ferment talab qilinadi:

1. Izotsitrat liyaza:

Bu ferment izotsitratni suksinat va glikoksilatga parchalab beradi.

2. Malat sintaza:

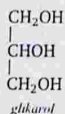
Bu ferment glikoksilatga ikkinchi atsetil-CoA ni qo'shib, malat hosil qiladi. Bu fermentlar faqat maxsus signal mavjud bo'lganda sintez qilinadi (induksiya qilinadi, 2.8.4-bo'limga qarang). Mikroorganizmlar C₂ birikmalarda o'stirilganda, bu fermentlarning faolligi 20-50 baravar ortadi. Glikoksilat yo'li TCA siklini to'liq almashtirmaydi; bu yo'lining asosiy vazifasi C₂ substratlarda o'sish sharoitida uglerod oqimini davom ettirish va biosintez uchun zarur oraliq moddalarni ta'minlashdan iborat.

2.3.3 Glikoksilat yo'li va C₂ birikmalardan C₄ birikmalarni hosil qilish

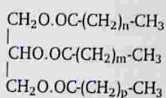
Izotsitratdan 2-oksoglutarat hosil bo'lishi hali ham zarur, chunki bu oraliq modda oqsil sintezida (masalan, glutamatni ta'minlash uchun) qo'llaniladi. Izot-sitrat liyaza tomonidan hosil qilingan suksinat odatdagidek metabolizmga kiradi va malat hamda undan keyin oksaloatsetat hosil qiladi. Shu tariqa, glikoksilat sikli reaksiyalari orqali C₂ birikmalardan C₄ birikmalar hosil qilinadi va ular barcha hujayra metabolitlarini sintez qilish uchun mavjud bo'ladi (2.5-rasmga qarang). Bu C₄ birikmalarning shakar birikmalariga aylanish jarayoni glyukoneogenez orqali amalga oshiriladi (2.4-bo'limga qarang).

2.3.4 Glyukozadan tashqari uglerod manbalari

Mikroorganizmlar tomonidan qo'llaniladigan har qanday birikma glyukoliz oraliq moddalari yoki hatto TCA sikli moddalari tarkibiga qo'shilsa, ular mavjud fermentlar yordamida metabolizm qilinishi mumkin. Biroq mikroorganizmlar juda ko'p turli xil substratlarni ham qayta ishlashga qodir. Boshqacha aytganda, barcha tabiiy birikmalar mikroorganizmlar tomonidan parchalanishga qodir. Bu parchalanish qobiliyatining ko'p qismi mikroorganizmlar tizimlarida mavjud. Mikroorganizmlar chiqindilarni utilizatsiya qilish vositasi sifatida qo'llaniladi. Bu faoliyat atrof-muhit biotexnologiyasining asosiy qismi hisoblanadi. Misol uchun: Yog' kislotalarining mikroorganizmlar tomonidan parchalanishini olaylik. Mikroorganizmlarning yog'lar va moylarda o'sish qobiliyati keng tarqalgan. Ma'lumki, moy – suyuq bo'ladi, yog' esa xona haroratida qattiqlashaladi. Kimyoviy jihatdan ikkalasi bir xil: Ular glitserinning yog' kislota triesterlari.



glukanol



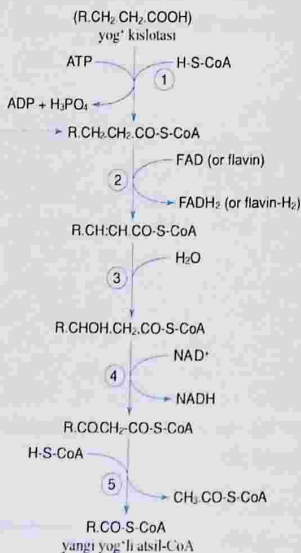
triatsetilglitserin

Yog' kislotalarining tarkibiy qismlari, odatda, n, m va p qiymatlari 14 yoki 16 ga teng bo'ladi. Uzoq alkil zanjiri ko'rsatilganidek to'yingan bo'lishi mumkin yoki bir yoki bir nechta qo'shbog'larni o'z ichiga olgan holda to'ynmagan yoki

ko'p to'yinmagan yog' kislota guruhlarini hosil qilishi mumkin. Yog'lar mikro-organizmlar madaniyatiga qo'shilganda: Lipaza fermenti yordamida dastlab gidrolizlanadi, natijada: yog' kislotalari va litserin hosil bo'ladi. Glitserin metabolizmidagi glitserin glitseraldegid-3-fosfatga aylantiriladi (2.6-rasmga qarang). Yog' kislotalar metabolizmi: yog' kislotalari hujayra ichiga kirgandan so'ng, darhol koenzim A tioesterlariga aylantiriladi. Yog' kislota-CoA tioesterlari siklik reaksiyalar ketma-ketligida parchalanadi (2.13-rasmga qarang).

β -oksidlanish sikli

Bu siklda yog' kislotalari zanjiri har safar C_2 birliklari (atsetil-CoA sifatida) yo'qotilishi orqali qisqaradi. Bu jarayon β -oksidlanish sikli deb nomlanadi, chunki yog' kislota zanjiriga dastlabki hujum β -pozitsiyada (yoki 3-pozitsiyada) sodir bo'ladi. Har bir sikl natijasida qisqaroq yog' kislota-CoA tioesteri hosil bo'ladi, bu esa to'rt reaksiya ketma-ketligini takrorlaydi. Tayyor mahsulot sifatida C_4 yog' kislota guruhi (butiril-CoA) hosil bo'ladi, bu esa keyinchalik ikki atsetil-CoA birligiga parchalanadi.



2.13-rasm. Yog' kislota-CoA tioesterlarining β -oksidlanish sikli

Fermentlar:

1. Yog' kislota-CoA sintetaza CoA tioesterini hosil qiladi.

2. Yog' kislota-CoA oksidaza (achitqi va zamburug'larda flavin bilan bog'langan) yoki Yog' kislota-CoA dehidrogenaza (bakteriyalarda FAD bilan bog'langan): β -pozitsiyadagi ugleroddan birinchi oksidlanishni amalga oshiradi.

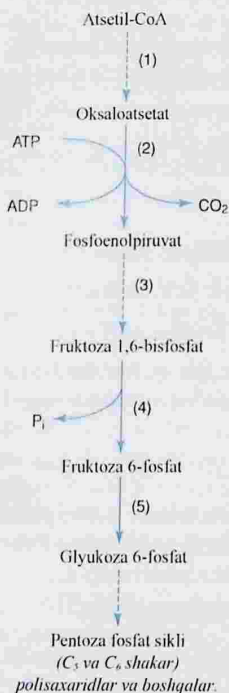
3. 2,3-enoyl-CoA gidrataza (shuningdek, krotanaza deb ham ataladi) ikkilamchi uglerodga suv molekulasini qo'shadi.

4. 3-gidroksiatsil-CoA dehidrogenaza: β -pozitsiyadagi gidroksi guruhni oksidlaydi.

5. 3-oksoatsil-CoA tioaza. Yangi moy oksidaza CoA keyin qayta ishlash paytida ajratib oladi.

To'yinmagan yog' kislotalari va ularning parchalanishi To'yinmagan yog' kislotalarining β -oksidlanish jarayoniga moslashuviga bog'liq. To'yinmagan yog' kislotalarida qo'shboq' β -oksidlanish siklidagi ikkinchi ferment – gidrataza tomonidan parchalanish uchun to'g'ri pozitsiyada va konfiguratsiyada bo'lishi kerak. Agar qo'shboq' noto'g'ri joylashgan bo'lsa, uni moslashtirish kerak (16-bobga

qarang). Yog' kislotalarining parchalanishi va energiya chiqarilishi Yog' kislotalarining parchalanishi natijasida energiya metabolik jihatdan foydali bo'lgan ATP shaklida emas, balki issiqlik shaklida ajraladi. Bu jarayon: FADH_2 ning qayta oksidlanishi orqali O_2 bilan bog'langan holda amalga oshiriladi, natijada H_2O_2 hosil bo'ladi. Katalaza fermenti H_2O_2 ni H_2O va $\frac{1}{2}\text{O}_2$ ga parchalab, katta miqdorda issiqlik ajralishiga olib keladi. Bunda yog' kislotalarining metabolizmidagi energiya va uglerod balansini nazorat qilish muhim. Yog' kislotalari va ularga bog'liq moddalar deganda (uzoq zanjirli alkanlar kabi) ko'p energiyaga ega va uglerodni oz birikmalar tushuniladi. Bu glyukoza va boshqa tarkibida shakar bo'lgan moddalar bilan solishtirilganda aksi bo'lib ko'rinadi, chunki ular kam energiyaga ega, ammo uglerodga boy birikmalar. Yog' kislotalar metabolizmi – katabolizm (parchalanish) ortiqcha energiyani issiqlik shaklida «isrof» qilishga va imkon qadar ko'proq uglerodni saqlab qolishga yo'naltiriladi. Shakarlar metabolizmi – bunda energiya maksimal darajada saqlanadi, ortiqcha uglerod esa CO_2 sifatida «isrof qilinadi». Bu energiya va uglerod balansiga asoslangan strategiya mikroorganizmlarning uglerod va energiya manbalariga moslashish qobiliyatini ta'minlaydi.



2.14-rasm. Glyukoneogenez ketma-ketligi

Ketma-ketlikning asosiy bosqichlari:

Atsetil-CoA dan boshlash: atsetil-CoA, glikoksilat yo'li reaksiyalari orqali (2.12-rasmga qarang) oksaloatsetatga aylantiriladi.

Fosfoenolpiruvat hosil qilish: fosfoenolpiruvat karboksikinaza yordamida oksaloatsetatdan fosfoenolpiruvat hosil bo'ladi.

Teskari glikoliz reaksiyalari: Fosfoenolpiruvat glikoliz fermentlari orqali teskari ketma-ketlikda ishlanadi va fruktoza 1,6-bisfosfat hosil qiladi (2.6-rasmga qarang).

Fruktoza 1,6-bisfosfat gidrolizi: fruktoza 1,6-bisfosfataza fermenti fruktoza 1,6-bisfosfatni gidrolizlaydi va noorganik fosfatni (Pi) chiqaradi.

Glyukoza-6-fosfat izomerlanishi: Hosil bo'lgan mahsulot glyukoza-6-fosfatga aylantiriladi. Glyukoza-6-fosfat quyidagi maqsadlarda qo'llanilishi mumkin: Pentoza fosfat yo'li reaksiyalari uchun kiruvchi substrat sifatida (2.7-rasmga qarang).

Hujayra kapsulasining polisaxaridlari biosintezi uchun zarurdir. Glyukoneogenez jarayoni organizmga energiya kam bo'lgan substratlardan shakar hosil qilish imkonini beradi, bu metabolik moslashuvchanlik uchun muhimdir.

2.4 Glyukoneogenez

Glyukoneogenez – bu organizmning C_2 yoki C_3 birikmalarda (masalan, atsetat, etanol, laktat yoki yog' kislotalari) o'sganida o'z metabolik ehtiyojlarini qondirish uchun turli shakarlarni sintez qilishi jarayoni. Bu jarayon (2.14-rasmga qarang) asosan glikoliz yo'lidan foydalansa ham, ayrim o'zgarishlarni talab qiladi. Glikoliz yo'lidagi barcha reaksiyalar qaytariluvchan emas. Piruvat kinaza va fosfofruktokinaza tomonidan katalizlangan bosqichlar qaytarilmas bo'lgani uchun hujayra ularni aylanib o'tishi kerak.

Asosiy jarayonlar:

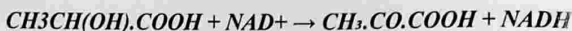
1. Piruvatdan fosfoenolpiruvat hosil qilish:

Piruvatdan to'g'ridan to'g'ri fosfoenolpiruvat hosil bo'lmaydi (ba'zi istisnolar bundan mustasno). Buning o'rniga, oksaloatsetat prekursor sifatida qo'llaniladi:



Bu reaksiyani fosfoenolpiruvat karboksikinaza katalizlaydi, bu glyukoneogenezning asosiy fermentidir.

2. Laktatdan piruvatga aylanishi:



Piruvat esa piruvat karboksilaza yordamida oksaloatsetatga aylantiriladi:



3. Fosfoenolpiruvatdan boshlangan reaksiyalar – oksaloatsetat fosfoenolpiruvatga aylanadi va glyukoneogenez davom etadi. Laktatda o'sish uchun umumiy reaksiya quyida berilgan:



Fruktoza 1,6-bisfosfat hosil bo'lishini ta'minlash uchun aylanib o'tish kerak. Fosfofruktokinaza tomonidan katalizlangan bosqichni aylanib o'tish uchun fruktoza bisfosfataza fermenti qo'llaniladi:



Glyukoneogenez sharoitida hujayra glikoliz jarayonini teskarisiga amalga oshiradi, bu esa shakarlarning turli metabolik ehtiyojlar uchun sintez qilinishi-

ga imkon beradi. Bu bosqichdan boshlab, geksoza shakarlar glikolizning teskarisi orqali hosil bo'lishi mumkin, shuningdek, C_5 va C_4 shakarlar pentoza fosfat yo'li orqali shakllanadi (2.7-rasmga qarang). Glyukoza glyukoneogenezning yakuniy mahsuloti hisoblanmaydi, lekin glyukoza-6-fosfat hujayra devori tarkibiy qismlari sintezi va tashqi va xaxira polisaxaridlarning keng turini hosil qilish quyidagilar uchun foydalaniladi.

2.5 Aerob mikroorganizmlarda energiya ishlab chiqarish

Glyukoza metabolizmi (2.6 va 2.7-rasmlar) va trikarboksilat kislota siklida (2.9-rasm) ko'rsatilganidek, turli metabolik oraliq moddalarning oksidlanishi bir nechta ko-faktorlarning (NAD^+ , $NADP^+$, FAD) tiklangan shakllarini ($NADH$, $NADPH$, $FADH_2$) hosil qilish uchun bog'langan. Oksidlovchi fosforlanish va elektron tashish zanjiri: tiklangan mahsulotlarning tiklash kuchi aerob tizimlarda murakkab reaksiyalar ketma-ketligi orqali chiqariladi, bu esa atmosferadagi O_2 ning tiklanishi bilan bog'lanadi. Bu jarayon oksidlovchi fosforlanish deb nomlanadi.

Elektron tashish zanjiri:

Bu jarayon vodorod ionlari va elektronlarni tashuvchilar yordamida O_2 bilan bog'lanib H_2O hosil qiladigan ketma-ketlikni ifodalaydi. Bu jarayonning asosiy vazifasi ATP sintezi bo'lib, bu elektron tashish bilan bog'langan fosforlanish (ETP) tizimi yordamida amalga oshiriladi.

Membranalar va ATP sintaza:

Elektron tashish zanjiri va ATP sintaza birgalikda membranaga integratsiyalashgan ko'p komponentli tizimni hosil qiladi. Prokaryotik hujayralar – sitozolik membrana, eukaryotik hujayralar esa mitoxondriya membranasini yuzaga keltiradi.

ATP ishlab chiqarish jarayoni:

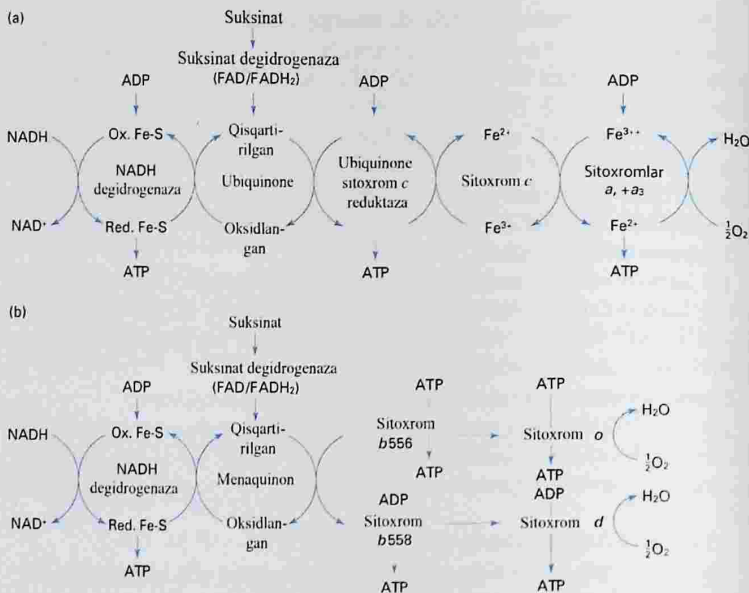
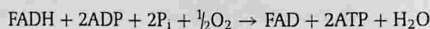
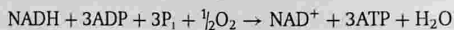
Elektron tashish jarayonida ADP va noorganik fosfat (P_i) birikishidan ATP hosil bo'ladi. Tiklovchi moddalar tabiatiga qarab ATP odatda ikki yoki uch nuqtada hosil bo'ladi (2.15-rasmga qarang). ATP sintaza membrana orqali joylashgan murakkab oqsil bo'lib, u quyidagicha ishlaydi: Membrananing bir tomonida tiklangan moddalar (reduksiya qiluvchi moddalar), boshqa tomonida protonlar (H^+) mavjud. Elektronlar zanjirga qo'shilganida, protonlar membranadan qayta o'tadi va bu ATP sintazani aylanishiga olib keladi. Bu harakat ADP va P_i ni ATPga aylantiradi. Proton harakatlantiruvchi kuch (PMF). Bu tizim proton harakatlantiruvchi kuchga (PMF) ega. Membrana ikkita mustaqil muhitni hosil qilmasdan, PMF, ETP va energiya ishlab chiqarish bo'lmas edi.

Uch tiklovchi moddaning umumiy reaksiyalari:

ATP sintezi mexanizmi barcha tizimlarda o'xshash bo'lsa-da, asosiy zanjirlar o'zgaruvchanlikka ega:

- Mitoxondriya tizimlari (eukaryotlarda);
- Bakteriyalardagi zanjirlar (masalan, *Escherichia coli*, 2.15-rasmga qarang).

Bu jarayonlar hujayralar energiya ehtiyojlarini qondirish uchun asosiy manba hisoblanadi.



2.15-rasm. Elektron tashish bilan bog'langan fosforlanish (ETP) tizimi

(a) Mitoxondriya tizimi:

Mitoxondriyada elektron tashish zanjiri 16 dan ortiq proteinlar yordamida amalga oshiriladi. Zanjirning har bir qismida elektronlar va protonlarning oqimi orqali energiya ishlab chiqariladi. ADP dan ATP hosil bo'lish nuqtalari ko'rsatilgan, lekin haqiqiy ATP hosil bo'lishi ATP sintaza orqali, protonlarning membranadan harakatlanishi natijasida amalga oshiriladi.

(b) *E. coli* tizimi:

E. coli tizimida elektron tashish zanjiri murakkab bo'lib, ikkita yo'lga bo'linadi. Elektronlar va protonlar har ikkala yo'lga ham oqishi mumkin. Bu turli tashuvchilar va yo'llarning mavjudligi bakteriyalarga moslashuvchanlik beradi. ADP ning ATPga fosforlanish nuqtalari ko'rsatilgan, ammo haqiqiy ATP sintezi ATP sintaza yordamida amalga oshiriladi.

Umumiy nuqtalar:

Har ikkala tizimda ham elektron tashish zanjirining o'zgaruvchanliklari mavjud. ATP sintezi uchun protonlar harakati bilan boshqariladigan proton harakatlantiruvchi kuch (PMF) talab qilinadi (2.16-rasmga qarang). Tizimning asosiy vazifasi hujayra energiya ehtiyojlarini qondirish uchun ATP hosil qilishdir.

Shunday qilib, ATP hosildorligini 3, 3 va 2, mos ravishda tavsiflash mumkin. Bu ko'rsatkichlar ko'pincha P/O nisbati deb ataladi, ya'ni bitta $1/2 O_2$ ning H_2O ga tiklanishi jarayonida hosil bo'ladigan ATP miqdorini bildiradi. Bu jarayon ikki elektron tashilishini o'z ichiga oladi.

Glyukozadan hosil bo'lgan ATP miqdori:

1. Embden-Meyerhof yo'li (2.6-rasm): glikoliz jarayonida glyukozadan ATP ishlab chiqariladi.

2. Trikarboksilat kislotasi sikli (2.9-rasm): glikolizdan keyin hosil bo'lgan piruvat TCA sikli orqali metabolizm qilinadi, bu esa qo'shimcha ATP ishlab chiqarishni ta'minlaydi.

3. Elektron tashish zanjiri: elektron tashish zanjiri TCA sikliga bog'liq bo'lib, katta miqdorda ATP hosil qiladi.

Har bir glyukoza molekulasi metabolizm qilinganda hosil bo'ladigan ATP miqdori 2.1-jadvalda ko'rsatilgan. Ko'rinib turibdiki, ATPning katta qismi elektron tashish zanjiri va TCA sikli reaksiyalaridan hosil bo'ladi. Bu jarayonlar hujayraning energiya ehtiyojlarini ta'minlashda elektron tashish zanjirining muhim rolini ko'rsatadi.

2.1-jadval.

Glyukoza metabolizmi uchun ATP hosildorligi

Bir molekula glyukozadan (geksosadan) ATP hosil bo'lishi

- Glikoliz (glyukozadan piruvatgacha):

Sof ATP hosili = $2 \text{ mol} \rightarrow 2 \text{ ATP}$ va $NADH = 2 \text{ mol} \times 3 \rightarrow 6 \text{ ATP}$

- Piruvatdan atsetil-CoA gacha:

$NADH = 1 \text{ mol} \times 3$ (2 piruvat uchun $\times 2$) $\rightarrow 6 \text{ ATP}$

- Trikarbon kislotasi sikli (TCA sikli):

$NADH = 3 \text{ mol} \times 3$ (2 atsetil-CoA uchun $\times 2$) $\rightarrow 18 \text{ ATP}$

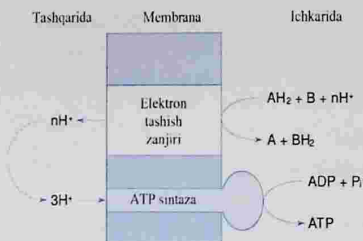
$FADH_2 = 1 \text{ mol} \times 2$ (2 atsetil-CoA uchun $\times 2$) $\rightarrow 4 \text{ ATP}$

$ATP = 1 \text{ mol}$ (2 atsetil-CoA uchun $\times 2$) $\rightarrow 2 \text{ ATP}$

- Jami: 38 ATP

a: Anaerob sharoitlarda (kislorodsiz sharoit) bu 2 mol ATP glyukoza metabolizmi jarayonida erishish mumkin bo'lgan maksimal hosilni ifodalaydi. Bu ATP «substrat darajasidagi fosforillanish» natijasida hosil bo'ladi (2.6.1-bo'limga qarang).

b: Bu ATP GTP (guanozin trifosfat) dan hosil bo'ladi, bu jarayon «nukleotid difosfat kinaza» yordamida amalga oshadi (2.9-rasmga qarang).



2.16-rasm. Elektron tashish zanjiri-ning (ETP) bog'lash mexanizmi

Elektron tashish zanjiri tashuvchilari (2.15-rasmga qarang) membranada joylashgan. Qaytaruvchi modda (AH_2) oksidlanganda, protonlarning membrana orqali harakati boshlanadi. Bu protonlar membrana orqali yana nasos kabi qayta o'tkaziladi va ATP sintaza orqali ADP va P_i ni bog'lash natijasida ATP hosil bo'lishiga yordam beradi.

Rasmdagi yozuvlar tarjimasini:

Tashqi tomoni (Outside) / Ichki tomoni (Inside) / Membrana (Membrane):

1. Elektron tashish zanjiri (Electron transport chain) reaksiyasi: $AH_2 + B + nH^+ \rightarrow A + BH_2$

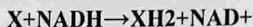
2. Protonlarning harakati ($3H^+$): protonlar membrana orqali ATP sintaza (ATP synthase) orqali o'tadi;

3. ATP sintezi (ATP synthesis): reaksiya: $ADP + P_i \rightarrow ATP + P_i$.

2.6 Anaerob metabolizm

2.6.1 Umumiy tushunchalar

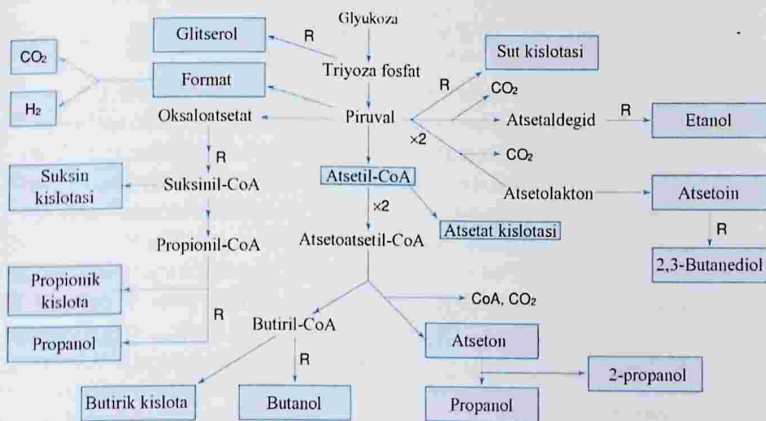
Anaerob sharoitda oksidativ fosforillanish jarayoni amalga oshmaydi ba hujayra energiya ishlab chiqarishning asosiy usulidan mahrum bo'ladi. Bunday sharoitda energiya bevosita dastlabki substratni parchalash jarayonidan ta'minlanadi. Bu jarayon substrat darajasidagi fosforillanish deb nomlanadi va aerob sharoitda ishlab chiqariladigan energiyaning atigi 5-10% qismini beradi. Shu sababli, anaerob sharoitda aerob sharoitga nisbatan ancha ko'proq substrat parchalanishi kerak. Boshqacha qilib aytganda, ma'lum bir miqdordagi substrat (masalan, glyukoza) uchun anaerob sharoitda ishlab chiqariladigan hujayralar soni aerob sharoitda ishlab chiqariladigan hujayralarga qaraganda ancha kam bo'ladi. Anaerob sharoitda hujayra mavjud energiyani maksimal darajada hosil qilishga intiladi. Substratni parchalash jarayonida hosil bo'lgan qaytaruvchi quvvat (reduksiya ekvivalentlari, NADH, qarang 2.1 va 2.2-rasmlar) jarayonni davom ettirish uchun qayta aylantirilishi kerak, chunki uning manbasi cheksiz emas. Shu sababli, reduksiya ekvivalentlarini oksidlanishi bu sharoitda to'plangan karbonat vositalarining qaytarilishi bilan bog'lanadi:



Qaytaruvchi quvvatning kichik qismi yangi hujayralar sintezi uchun zarur. Natijada, reduksiya ekvivalentlari karbonat vositalari bilan reaksiyaga kirishib, ularni qaytaradi (qarang: 2.1b-rasm). Hujayra uchun mavjud bo'lgan energiya faqat substratni anaerob parchalash jarayonida hosil bo'lgan ATPdan kelib chiqadi. Substrat darajasidagi fosforillanishga misollar 2.2-jadvalda keltirilgan. Substrat darajasidagi fosforillanishning energiya hosil bo'lish darajasi organizmdan organizmga qarab farq qiladi. Bu, o'z navbatida, qo'llanilayotgan o'sish substratiga va yakuniy mahsulot sifatida atsetatning to'planishiga bog'liq bo'ladi (bu jarayon atsetil kinaza faol bo'lganda yuzaga keladi, qarang 2.2-jadval).

Ferment	Katalizlangan reaksiya	Uchrashuvi
1. Fosfoglitserol kinaza	$1,3\text{-bisfosfoglitserat} + \text{ADP} \rightarrow 3\text{-fosfoglitserat} + \text{ATP}$	Keng tarqalgan, qarang 2.6-rasm
2. Piruvat kinaza	$\text{Fosfoenolpiruvat} + \text{ADP} \rightarrow \text{Piruvat} + \text{ATP}$	Keng tarqalgan, qarang 2.6-rasm
3. Atsetat kinaza	$\text{Atsetilfosfat} + \text{ADP} \rightarrow \text{Atsetat} + \text{ATP}$	Keng tarqalgan
4. Butirat kinaza	$\text{Butirilfosfat} + \text{ADP} \rightarrow \text{Butirat} + \text{ATP}$	Masalan, allanton bilan enterobakteriyalar
5. Karbamat kinaza	$\text{Karbamoilfosfat} + \text{ADP} \rightarrow \text{Karbamat} + \text{ATP}$	Masalan, arginin bilan klostridiyal
6. Formil-tetragidrofolat sintetaza	$\text{N}^{10}\text{-formil-H}_4\text{ folat} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{Formiat} + \text{H}_4\text{ folat} + \text{ATP}$	Masalan, ksantin bilan klostridiyal

Anaerob katabolizm jarayoni nafaqat mikroorganizmlarda, balki yirik hayvonlarda ham sodir bo'lishi mumkin: bunga misol sifatida sportchining intensiv faoliyati vaqtida mushak to'qimalarida sut kislotasining to'planishini keltirish mumkin. Mikroorganizmlarda esa anaerob sharoitda o'sayotgan organizmlar tomonidan turli qaytarilgan karbon birikmalari to'planishini kuzatishimiz mumkin. Bunga misollar orasida sut kislotasi (sut bakteriyalari tomonidan hosil qilinadi), shuningdek, qisqa zanjirli yog' kislotalari, masalan, butirik yoki propion kislotasi, va alkogollar, masalan, butanol, propanol va etanol kiradi (qarang: 2.17-rasm).



• Bu diagramma anaerob katabolizmda hosil bo'ladigan asosiy moddalar va ularning o'zaro bog'liqligini ko'rsatadi.

2.17-rasm. Turli mikroorganizmlarda anaerob metabolizm mahsulotlari

Rasmda NADH qayta aylanishi bilan bog'liq reaksiyalar R harfi bilan ko'rsatilgan. Soyabon bilan ajratilgan qutilarda berilgan yakuniy mahsulotlar, mikroorganizmlarga bog'liq ravishda yakka holda yoki guruh bo'lib hosil bo'lishi mumkin. Quydagi konversiyalar energiya (ATP) ishlab chiqarish bilan bog'liq:

- suksinil-CoA ning suksin kislotasiga aylanishi;
- butiril-CoA ning butirik kislotaga aylanishi;
- atsetil-CoA ning atsetat kislotasiga aylanishi.

Bu rasm anaerob metabolizm jarayonida hosil bo'ladigan asosiy mahsulotlarni va NADH qayta aylanishiga yordam beruvchi jarayonlarni ifodalaydi.

Ba'zi organizmlar, masalan, metanogen bakteriyalar, yanada rivojlangan holda to'liq qaytarilgan yakuniy mahsulot sifatida metan ishlab chiqarishi mumkin (2.17-rasmda ko'rsatilmagan). Muhim jihat shundaki, glikoliz yo'li orqali hosil bo'lgan piruvat (qarang: 2.6-rasm) hali ham trikarboksilik kislotaga (TCA) sikliga kiradi. Bu sikl energiya ishlab chiqarish uchun emas, balki biosintez uchun zarur bo'lgan, asosan, 2-oksoglutarat va oksaloatsetat kabi muhim prekursurlarni ta'minlash maqsadida, hech bo'lmaganda qisman davom ettirilishi kerak.

TCA siklida hosil bo'lgan NADH kislorod yetishmasligi sababli oksidativ fosforillanish orqali ATPga aylantirilishi mumkin emas. Ammo ayrim bakteriyalarda O_2 ga muqobil bo'lgan oxirgi elektron qabul qiluvchilar mavjud bo'lib, ular ETP (elektron tashish zanjiri) tizimiga bog'lanib, ATP hosil bo'lishini ta'minlaydi (qarang: 2.15-rasm). Bunday alternativlar quyidagilarni o'z ichiga oladi:

- Nitrat (NO_3^-), nitritga (NO_2^-) qaytariladi;
- Nitrit (NO_2^-), NH_4 yoki ba'zi hollarda denitrifikatsiya jarayonida N_2 ga qaytariladi (17-bobga qarang);
- CO_2 , metanogen bakteriyalar tomonidan metanga (CH_4) qaytariladi;
- Sulfat (SO_4^{2-}), sulfatni qaytaruvchi bakteriyalar tomonidan H_2S ga qaytariladi.

Har bir holatda ATP ishlab chiqarish darajasi aerob tizimlarga nisbatan kamroq bo'lsa-da, bu faqat substrat darajasidagi fosforillanish orqali olinadigan energiyadan ancha yuqori. Bu mikroorganizmlar turli sharoitlarda samarali energiya ishlab chiqarish uchun moslashganligini ko'rsatadi.

2.6.2 Anaerob metabolizm mahsulotlari

2.17-rasm anaerob mikroorganizmlarda kamaytirilgan yakuniy mahsulotlarning hosil bo'lishiga olib keluvchi asosiy reaksiyalarni umumlashtiradi.

Asosiy mahsulotlar:

1. Glitserol – yeastlar tomonidan ishlab chiqariladi, agar piruvatning etanolga aylanishi bloklangan bo'lsa.

2. Sut kislotasi (Laktik kislot) – sut kislotasi bakteriyalari tomonidan hosil qilinadi.

3. Formiat kislotasi – enterobakteriyalar tomonidan piruvat-formiat liaza orqali hosil qilinadi. Formiat kislotasi formiat dehidrogenaza orqali CO_2 va H_2 ga aylantirilishi mumkin.

4. Etanol – yeastlar (masalan, *Saccharomyces cerevisiae*), bakteriyalar (masalan, *Zymomonas*) va ba'zi zamburug'lar tomonidan ishlab chiqariladi.

5. 2,3-butandiol – turli bakteriyalar, jumladan, *Serratia marcescens* va turli *Bacillus* turlari tomonidan ishlab chiqariladi.

6. Butanol, atseton va propanol yoki 2-propanol – *clostridium* turlari tomonidan hosil qilinadi, ba'zilar butirik kislot ham ishlab chiqaradi.

7. Propionik kislot – *propionibacterium* tomonidan ishlab chiqariladi.

Bu mahsulotlar anaerob sharoitda turli mikroorganizmlar tomonidan turli xil metabolik yo'llar orqali hosil qilinadi va ular energetik jihatdan kislorodli sharoitdagi mahsulotlarga nisbatan kamroq foydali bo'lsa-da, mikroorganizmlar yashashini ta'minlash uchun yetarli bo'ladi. Anaerob metabolizm natijasida glyukozadan tashqari boshqa birikmalardan ham mahsulotlar hosil bo'lishi mumkin. Masalan, organik kislotalar, masalan, limon kislotasi (sitrik kislot) va aminokislotalar yoki ba'zan purinlar.

Metan (2.17-rasmda ko'rsatilmagan) ehtimol eng oxirgi qaytarilgan karbon birikmasi hisoblanadi. Bu birikma yuqori darajada ixtisoslashgan Arxealar (ilgari Arxeabakteriyalar deb atalgan) tomonidan ishlab chiqariladi. Metan – atsetatning CH_4 va CO_2 ga bo'linishi jarayonlari orqali hosil bo'ladi. Ba'zi hollarda CO_2 , metanol (CH_3OH), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) yoki formiat kislotasining (HCOOH) H_2 ishtirokida qaytarilishi orqali. Bu jarayonlar anaerob sharoitda energiya hosil qilish uchun maxsus moslashgan mikroorganizmlar tomonidan amalga oshiriladi. Metanogen arxealar anaerob muhitda uglerodning qaytarilgan shaklini hosil qiluvchi asosiy organizmlardir.

2.7 Biosintez

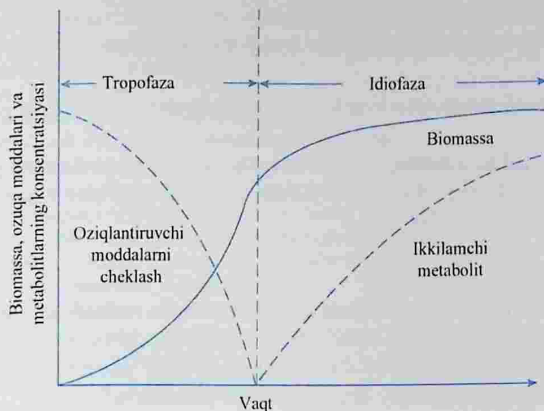
Substratning parchalanishi natijasida energiya (ATP), qaytaruvchi quvvat (NADH va NADPH) va turli monomer prekursorlari (qarang: 2.5-rasm) hosil bo'lishi hujayraga o'zini qayta tiklash uchun zarur bo'lgan vositalarni taqdim etadi. Hujayra bu oddiy qurilish bloklaridan foydalanib, hujayraning makromolekularini biosintez qiladi. Bunga quyidagilar kiradi:

- nuklein kislotalar (DNK va RNK);
- oqsillar (fermentlar va boshqa funksiyalar uchun);
- membranalar uchun lipidlar;
- hujayra qobig'i tarkibiy qismlari sifatida polisaxaridlar.

Bu o'rinda birlamchi va ikkilamchi metabolizm o'rtasidagi farqni ajrata bilish kerak, chunki ular biotexnologik mahsulotlarni hosil qilishda katta ahamiyatga ega. Birlamchi metabolizm asosiy hayot jarayonlarini ta'minlaydigan molekulalar hosil qilinishini o'z ichiga oladi, masalan, energiya va asosiy qurilish materiallari. Ikkilamchi metabolizm esa odatda, hujayra yashashi uchun zarur bo'lmagan, ammo ekologik yoki sanoat ahamiyatiga ega bo'lgan molekulalarni hosil qilishga xizmat qiladi. Bu farq, ayniqsa, biotexnologiyadagi dasturlar uchun muhimdir, chunki ikkilamchi metabolizm mahsulotlari (masalan, antibiotiklar yoki pigmentlar) sanoat uchun katta qiymatga ega.

2.7.1 Birlamchi metabolizm

Birlamchi metabolizm odatda hujayraning muvozanatli o'sishi davrida, ba'zan trofofaza deb ataladigan bosqichda sodir bo'ladi. Bu bosqichda hujayra o'sishi uchun zarur bo'lgan barcha ozuqa moddalar muhitda ortiqcha miqdorda mavjud bo'ladi (qarang: 2.18-rasm). Bunday sharoitlarda hujayralar o'zlarining ko'payish uslubiga mos ravishda eksponensial tezlikda o'sadi. Bu bosqichda hujayralar o'zlarining turli xil makromolekulalari – DNK, RNK, oqsillar, lipidlar va boshqalarning optimal miqdoriga ega bo'ladi. Ammo o'sish davom etar ekan, bu makromolekulalarning o'zaro nisbatlari o'zgaradi va o'sish sekinlashadi. Oxir-oqibatda, hujayra biron-bir ozuqa moddasidan (hatto bu faqat O_2 bo'lsa ham) mahrum bo'ladi va natijada o'sish tezligi sekinlashadi, so'ngra to'xtaydi. Ammo metabolizm to'xtamaydi. Metabolizm faqat hujayra o'lganda to'liq to'xtaydi. Demak, hujayra tirik qolish uchun muayyan metabolik jarayonlarni amalga oshirishi kerak. Eng muhimi, hujayra hayotini davom ettirishni xohlasa, metabolik jarayonlarning hech bo'lmaganda minimal darajada davom etishini ta'minlashi kerak. Bu jarayon hujayralarning tirikligini saqlab qolishi va muhim biologik funksiyalarni bajarishda asosiy ahamiyatga ega.



2.18-rasm. Mikroorganizmlarning o'sishi: birlamchi va ikkilamchi metabolizm fazalari
Metabolizm o'sishi.

Boshlang'ich bosqichda (muvozanatli o'sish = tropofaza) barcha ozuqa moddalar ortiqcha miqdorda bo'ladi. Bir ozuqa moddasi (karbon emas) sarflanib bo'lgach, hujayra o'sishi (biomassa) sekinlashadi va ikkilamchi metabolit(lar) idiofaza davrida hosil bo'la boshlaydi.

Asosiy tushunchalar:

- Tropofaza: Ozuqa moddalarining yetarli miqdorda mavjud bo'lgan birlamchi o'sish bosqichi. Bu bosqichda hujayralar asosan biomassa hosil qiladi;
- Idiofaza: Bir yoki bir nechta cheklovchi ozuqa moddalari tugagandan so'ng boshlanadi. Bu bosqichda hujayra ikkilamchi metabolitlarni ishlab chiqarishga o'tadi;
- Cheklovchi ozuqa modda: Karbon moddasidan boshqa bir ozuqa (masalan, azot yoki fosfor), u tugagach o'sish sekinlashadi.

Bu rasma mikroorganizmlarning o'sish jarayonida metabolizمنىng qanday o'zgarishini va birlamchi hamda ikkilamchi metabolitlar hosil bo'lishini tushuntiradi.

2.7.2 Ikkilamchi metabolizm

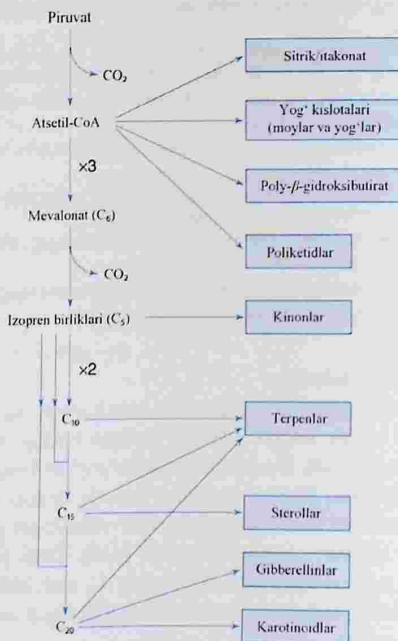
Hujayraning faol ko'payishi to'xtaganida ham karbon oqimini saqlab qolish zaruriyati, hujayrani asosiy metabolitlardan tashqari boshqa mahsulotlarga e'tibor qaratishga majbur qiladi. Bu mahsulotlar ko'payish bosqichida shunchalik ko'p miqdorda zarur emas. Shunga qaramay, hayotiy muhim komponentlarning saqlanishi davom ettirilishi kerak. Barcha oqsillar almashinuv jarayonida ishtirok etgani uchun asosiy oqsillar yangilanib turishi kerak. DNK ta'mirlanishi, RNK saqlanishi kabi jarayonlar amalga oshirilishi kerak. Demak, birlamchi metabolizm ma'lum darajada davom etadi, lekin hujayra endi ikkilamchi metabolizm rejimiga o'tadi (qarang: 2.18-rasm).

Ikkilamchi metabolizm mahsulotlari:

1. Hujayra ichida saqlovchi mahsulotlar: turli polisaxaridlar yoki triatsilglitserollar.
2. Birlamchi metabolitlarning ko'payishi: aminokislotalar yoki organik kislotalar.
3. Yangi mahsulotlarning sintezi: bu mahsulotlar odatda o'sishning muvozanatli bosqichida katta miqdorda mavjud emas. Masalan, ko'plab biofaol birikmalar, jumladan, antibiotiklar.

Biotexnologik ahamiyat:

Ikkilamchi metabolizm natijasida hosil bo'ladigan mahsulotlar, ayniqsa, antibiotiklar va boshqa biofaol moddalar biotexnologiyada katta ahamiyatga ega. Bu jarayon hujayraning resurslarini maksimal darajada samarali qo'llanishga va ko'payishdan tashqari funksiyalarni bajarishga imkon beradi.



2.19-rasm. Atsetil-CoA dan ikkilamchi metabolitlarning hosil bo'lishi

Rasmda atsetil-CoA dan hosil bo'ladigan ikkilamchi metabolitlar tasvirlangan. Ikkilamchi metabolitlar soyali qutilarda ko'rsatilgan. Bu metabolitlarning ba'zilarining tarkibiy tuzilmalari sezilarli darajada farq qilishi mumkin.

Asosiy tushunchalar:

Atsetil-CoA – bu birlamchi metabolizmida hosil bo'ladigan muhim molekula bo'lib, u turli xil ikkilamchi metabolitlarni hosil qilishda ishtirok etadi.

Ikkilamchi metabolitlar:

Citrate/itaconate: Sitrik yoki itakonat kislotalari.

Fatty acids (oils & fats): Yog' kislotalari, moylar va yog'lar.

Poly- β -hydroxybutyrate: Bio-polimer sifatida tanilgan gidroksibutirat.

Polyketides: Poliketidlar, ko'plab biofaol moddalar (masalan, antibiotiklar) sintezining asosi.

Quinones: Kinonlar, elektron tashuvchi molekular.

Terpenes: Terpenlar, efir moylari va boshqa moddalar tarkibiy qismi.

Sterols: Sterollar, hujayra membranasi va gormonlar tarkibiy qismlari.

Gibberellins: Gibberellinlar, o'simlik gormonlari.

Carotenoids: Karotinoidlar, antioksidant va pigment sifatida qo'llaniladi.

Bu rasm atsetil-CoA ning metabolizmida muhim markaziy rolini va turli xil murakkab molekulalarga aylanish jarayonini ko'rsatadi. Bu jarayonlar turli organizmlarda farqlanishi mumkin, ammo ularning biologik va biotexnologik ahamiyati juda katta.

Metabolizmning bu bosqichi idiofaza deb ataladi, bu trofofaza (muvozanatli o'sish bosqichi) bilan qarama-qarshi holatda joylashgan. Ikkilamchi metabolitlar odatda glyukoza yoki yog' kislotalarining katabolizmidan hosil bo'ladigan keraksiz monomerlardan sintezlanadi. Atsetil-CoA ko'pincha bu jarayonlar uchun asosiy boshlang'ich nuqta sifatida qo'llaniladi (qarang: 2.19-rasm). Ikkilamchi metabolitlarning aniq funksiyasi hali to'liq tushunilmagan. Ular muvozanatli o'sish davomida ishlab chiqarilmagani sababli, ular o'sish va ko'payish uchun zarur emasligi ko'rinadi. Ularning turlari va uchrashuvi katta farq qiladi, bu esa ularning rollari ham shunchalik xilma-xil bo'lishi mumkinligini ko'rsatadi. Bu borada ikkita asosiy nazariya ilgari surilgan:

1. Ikkilamchi metabolitlar hujayraning tabiiy muhitda omon qolishi uchun foyda keltiruvchi funksional rolni bajaradi. Ular hujayraning ma'lum bir javobini ta'minlaydi, lekin bu javobni laboratoriya sharoitida ko'paytirish qiyin.

2. Ikkilamchi metabolitlarning o'zlari hujayra uchun ahamiyatsizdir, lekin ularning hosil bo'lish jarayoni muhimdir, ya'ni yakuniy mahsulot emas, balki jarayonning o'zi biologik jihatdan kerakli.

Nima sababdan ikkilamchi metabolitlar turli-tuman bo'lmasin, ularning xususiyatlari ularni biotexnologiyaning eng ko'p foydalaniladigan mahsulotlaridan biriga aylantiradi. Ikkilamchi metabolitlar, masalan, antibiotiklar va biofaol moddalar, sanoat va tibbiyotda katta ahamiyatga ega.

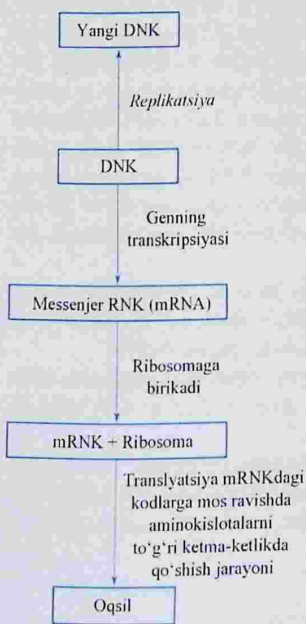
2.8 Metabolik jarayonlarni boshqarish

2.8.1 Metabolik oqim

Metabolik oqim (yoki harakat) tushunchasi metabolik oraliq moddalar turli yo'llar bo'ylab qanday tezlikda harakatlanishini matematik jihatdan tasvirlashga harakat qiladi. Bu harakat odatda tegishli fermentlar faoliyati orqali amalga oshi-

riladi. Shuning uchun, alohida ferment reaksiyalarining tezligini o'lash ba'zan birgina tezlikni nazorat qiluvchi bosqichni aniqlashga yordam beradi. Agar bu reaksiya boshqaruvdan chiqarilsa yoki uning tezligi oshirilsa (yoki genetik muhandislik yordamida bu fermentni kodlovchi gen o'zgartirilsa yoki kuchaytirilsa – qarang 2.20-rasm, shuningdek, 4 va 5-boblar), nazorat qiluvchi bosqich olib tashlanadi va mahsulot hosil bo'lishining ko'payishi kutiladi. Afsuski, bu usul kamdan kam hollarda kerakli natijani beradi, chunki odatda yo'lga jalb qilingan barcha fermentlar o'xshash tezlikda ishlaydi. Natijada, bir nazorat qiluvchi bosqichni olib tashlash faqat keyingi nazorat qiluvchi bosqichni aniqlaydi. Shu sababli, maxsus mahsulot uchun boshqaruvdan chiqarilgan yo'l kerak bo'lsa, barcha yo'l genetik darajada «muhandislik» qilinishi kerak.

Bu jarayonlar biotexnologiyada ko'p mahsulotlarni samarali ishlab chiqarish uchun muhim ahamiyatga ega. Genetik muhandislik fermentlarni boshqarish va metabolik yo'llarni optimallashtirishda asosiy vosita hisoblanadi.



2.20-rasm. DNKning replikatsiyasi va transkripsiyasi

Bu diagram DNKning qanday qilib yangi DNK (yangi hujayra sintezi uchun) hosil qilish uchun replikatsiyalanishi yoki messenger RNK (mRNK) sifatida transkripsiyalanishi mumkinligini ko'rsatadi.

- Replikatsiya: DNK nusxasini yaratish jarayoni, bu yangi hujayra sintezi uchun zarur.

- Transkripsiya: DNKda joylashgan gen (bazalar ketma-ketligi) mRNKga aylantiriladi.

- mRNK ribosomaga birikadi.

- Ribosoma mRNKni dekodlaydi (translyatsiya qiladi) va aminokislotalarni ketma-ket qo'shish orqali oqsil molekulasini hosil qiladi.

Shunday qilib, DNKdagi asl bazalar ketma-ketligi (gen) dastlab mos keluvchi mRNK bazalar ketma-ketligiga o'tkaziladi, bu esa yangi oqsilni shakllantiradi. Bu jarayon genetik ma'lumotning oqsil sinteziga aylanishini ko'rsatadi. Qo'shimcha ma'lumot uchun 4-bob va 4.1-rasmga qarang.

Uglerodning turli mahsulotlarga oqimi-ni boshqaruvchi asosiy fermentlarni aniqlash har qanday jarayonning samaradorligini oshirish uchun muhimdir. Uglerod oqimi tur-

li usullar bilan boshqarilishi mumkin va bu usullar quyida qisqacha tavsiflanadi. Shuni ta'kidlash joizki, ko'plab mahsulotlar ishlab chiqarishni oshirish uchun mikroorganizmlarni tasodifiy mutatsiyalash usuli qo'llanilgan. Bunda minglab boshqa hujayralar ichidan kerakli mahsulotni ko'proq ishlab chiqarishga qodir

bo'lgan bitta yoki ikkita yaxshilangan hujayra tanlab olinadi. Ammo biokimyo, genetika va genetik manipulyatsiyalar bo'yicha sezilarli bilimlarimizning oshishi bilan, hozirgi tendentsiya aniq fermentlar yoki fermentlar guruhlarini o'zgartirishga qaratilgan. Bu rational (asosli) yondashuv fermentlarni aniqlash va ularga ta'sir qilishni aniqroq qilish imkonini beradi.

Asosiy masalalar:

- **Asosiy fermentni aniqlash** – ferment noto'g'ri aniqlansa, katta resurslar sarflangan holda hech qanday natijaga erishilmasligi mumkin.

- **Fermentlarni boshqarishning ahamiyati** – fermentlarning qanday boshqarilishi va tartibga solinishi haqidagi bilim jarayonlarni optimallashtirishda katta ahamiyatga ega.

Ratsional yondashuv natijadorlikni oshirish uchun fermentlarning aniq mo'ljaldagi modifikatsiyasiga asoslanadi. Bu usul vaqt va resurslarni samarali qo'llanishga imkon beradi.

2.8.2 Ozuqa moddalarning qabul qilinishi

Hujayra metabolizmini boshqarish, birinchi navbatda, hujayraning ozuqa moddalarni o'zlashtirishini tartibga solishdan boshlanadi. Kislorod (O_2) va bir nechta uglerod birikmalaridan tashqari, ko'pgina ozuqa moddalar maxsus tashuvchi mexanizmlar yordamida qabul qilinadi, bu esa hujayra ichida ular konsentrlanishini ta'minlaydi. Bunday «faol» transport tizimlari energiya talab qiladi. Bu jarayonlar boshqarilishi mumkin, shunda hujayra ichiga kirgan ozuqa moddalarining ma'lum bir konsentratsiyasiga erishilgandan keyin, ortiqcha (yoki zararli) ozuqa qabul qilish to'xtatiladi. (Batafsil ma'lumot uchun 2.8.5-bo'limda katabolit repressiyasi muhokama qilingan.) Masalan, uglerod manbayi, masalan, glyukoza kabi moddalar hujayraga qabul qilish tezligi ko'pincha hujayra o'sishi uchun cheklovchi jarayon bo'ladi va bioprotsess mahsuldorligini oshirishda potensial «tor joylar»ni baholashda alohida e'tibor talab qiladi.

2.8.3 Bo'linmalar (Kompartmentsiya)

Metabolik nazoratning sodda shakli hujayra ichidagi organoidlar yoki bo'linmalardan foydalanishdir. Bu bo'linmalar metabolitlarning alohida havzalarini saqlashga imkon beradi.

- **Mitoxondriya** eukaryotik hujayrada uchraydi va **trikarboksilik kislota siklini** sitoplazmadagi reaksiyalardan ajratadi.

- Yog' kislotalarining **biosintezi** eukaryotik hujayralar sitoplazmasida sodir bo'ladi, lekin yog' kislotalarining **parchalanishi** maxsus organoid – **peroksisomada** amalga oshiriladi. Peroksisomal yuqori darajada peroksidaza/katalaza fermentlariga ega bo'lib, bu degradatsion reaksiyalarda ishtirok etadi.

Fermentlar to'plamini ajratish ortiqcha sikl yoki foydasiz oraliq mahsulotlarning qayta qo'llanilishini oldini oladi. Vakulalar, yadro, peroksisomalar kabi boshqa organoidlar ham hujayraning boshqa reaksiyalarini boshqarishda qo'llaniladi.

Ammo bakteriyalar bunday organoidlarga ega emas, shuning uchun ular metabolismik nazoratning boshqa usullariga tayanadi.

2.8.4 Ferment sintezini boshqarish

Hujayradagi ko'plab fermentlar konstitutiv ravishda mavjud, ya'ni ular barcha o'sish sharoitlarida doimiy ravishda mavjud bo'ladi. Boshqa fermentlar esa faqat kerak bo'lganda hosil qilinadi.

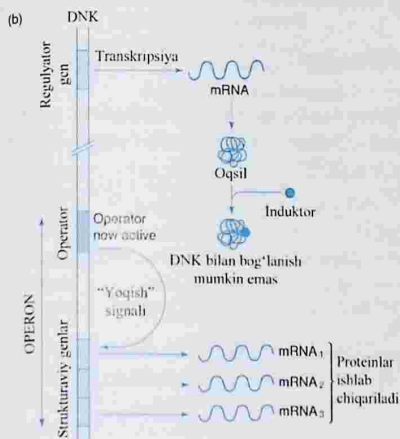
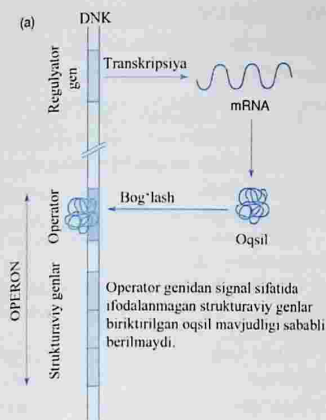
Induksiya – *glioksilat by-pass* uchun isotsitrat liaza fermenti faqat hujayra C₂ substratda o'sganda hosil bo'ladi. Bu ferment sintezining induksiyasi deb ataladi.

Repressiya – agar hujayra ehtiyojini qondiradigan miqdorda tashqi gistidin bo'lsa, gistidin biosintezi uchun fermentlar ishlab chiqarilishi to'xtaydi. Bu ferment sintezining repressiyasi deb ataladi. Agar kerakli birikma tashqaridan kelmasa, material sintezi uchun fermentlar qaytadan paydo bo'ladi (ya'ni sintezning derepressiyasi sodir bo'ladi).

Induksiya va repressiyaning asosi shundaki, oqsil sintezini kodlovchi genlar (transkripsiya jarayonida) hujayradagi metabolitlarning mavjudligi yoki yo'qligiga qarab faollashadi (yoqiladi) yoki sustlashadi (o'chiriladi). Bu jarayonlarning diagrammatik ko'rinishi tegishli rasmda tasvirlangan. Bu nazorat mexanizmlari hujayraning resurslarini samarali boshqarishga va metabolismik jarayonlarni optimallashtirishga imkon beradi.

2.8.5 Katabolit repressiyasi

Katabolit repressiyasi ferment induksiyasi va repressiyasi bilan bog'liq bo'lgan metabolismik nazoratning bir ko'rinishi bo'lib, u mikroorganizmlar madaniyatiga tashqi ozuqa moddalarining qo'shilishi orqali amalga oshiriladi. Katabolit repressiyasi mikroorganizmlar bir vaqtning o'zida ikkita yoki undan ortiq turli uglerod manbalariga ega bo'lganida ulardan birini tanlash hodisasini ifodalaydi. Mikroorganizmlar ularga taqdim etilgan ozuqa moddalaridan o'ziga qulayroq bo'lganini tanlaydi va undan foydalanishni boshlaydi. Masalan, agar mikroorganizmlarga glyukoza va laktoza bir vaqtning o'zida taqdim etilsa, ular avval glyukozani to'liq iste'mol qiladi va undan keyingina laktozaga e'tibor beradi. Bu hodisa mikroorganizmlarning energiya va resurslarni samarali boshqarish qobiliyatiga asoslangan. Glyukoza kabi sodda va tez metabolismga kiradigan moddalar odatda murakkabroq substratlardan oldin qo'llaniladi. Katabolit repressiyasi mikroorganizmlar uchun energiya samaradorligini oshiradi va metabolismik yo'llarni tartibga solishda muhim rol o'ynaydi.



2.21-rasm. DNK ekspressiyasini tartibga solish orqali ferment sintezini boshqarish

(a) Repressiya:

Vaziyat: Induktor molekula yo'q bo'lgan holat.

Jarayon:

Regulyator gen tomonidan sintezlangan mRNA oqsil ishlab chiqaradi. Bu oqsil DNK molekulasida joylashgan operator gen bilan bog'lanadi. Operator genning bog'lanishi uning inaktiv bo'lishiga olib keladi. Natijada, signal yuborilmaydi va struktural genlar (faol fermentlarni sintez qilish uchun mas'ul) ifodalanmaydi. Struktural genlarning ekspressiyasi bloklanadi, fermentlar hosil qilinmaydi.

(b) Induksiya:

Vaziyat: Induktor molekula mavjud bo'lgan holat.

Jarayon:

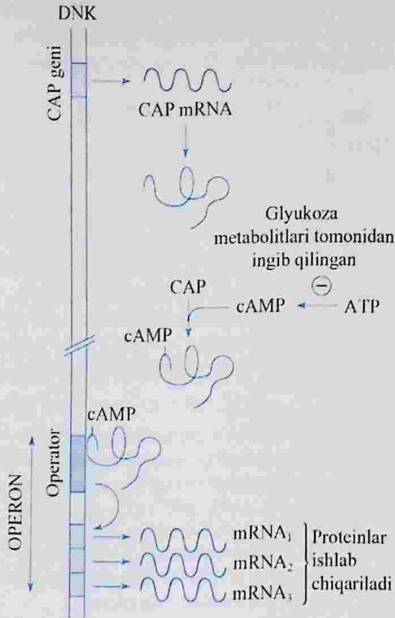
Regulyator gen tomonidan hosil qilingan oqsil induktor molekula bilan bog'lanadi. Bu bog'lanish oqsilning operator gen bilan bog'lanish qobiliyatini yo'q qiladi. Operator gen faollashadi va struktural genlarni «yoqish» uchun signal beradi. Struktural genlardan mRNA sintezlanadi va faol oqsillar (fermentlar) hosil qilinadi.

Natija: Struktural genlar faollashadi va fermentlar sintezlanadi.

Rasm genetik nazorat orqali ferment sintezining qanday tartibga solinishini ko'rsatadi. Repressiya va induksiya jarayonlari mikroorganizmlar o'sish sharoitlariga moslashishda va ozuqa moddalardan samarali foydalanishda muhim ahamiyatga ega.

Bu jarayon diauxik o'sish deb ataladi. Hujayra bitta uglerod manbayidan ikkinchisiga o'tadigan bu tanlovga o'xshash hodisa azot manbasi bir nechta mavjud bo'lsa ham kuzatilishi mumkin. Hujayra energiya ishlab chiqarish va metabolitlarni ta'minlash uchun eng samarali substratni tanlab, undan foydalanadi. Bu tanlov hujayraning resurslarni optimal foydalanishni oshiradi va o'sish sharoitlariga moslashish imkonini beradi. Masalan, agar bir vaqtning o'zida ikki xil uglerod manbasi (masalan, glyukoza va laktoza) mavjud bo'lsa, hujayra avval glyukozani qo'llaydi, chunki u energiya ishlab chiqarish uchun samaraliroq substrat hisobla-

nadi. Keyinchalik glyukoza tugagach, hujayra laktozaga o'tadi. Bu jarayon hujayraning optimal o'sishiga va energiya tejamkorligiga yordam beradi.



Faollashish: Glyukoza yo'q bo'lganda cAMP hosil bo'ladi, CAP bilan kompleks hosil qiladi va operator gen orqali struktural genlarni «yoqadi».

Bu mexanizm mikroorganizmlarning energiyani samarali boshqarish va metabolik yo'llarni moslashtirish qobiliyatini ko'rsatadi. Katabolit repressiyasi orqali hujayra energiya ishlab chiqarish uchun optimal substratni tanlaydi.

Oddiy misollardan biri *E. coli* bakteriyasida kuzatiladi, bu yerda nazorat effektor molekula, ya'ni siklik AMP (cAMP) orqali amalga oshiriladi. (cAMP molekulasida AMPning yagona fosfo guruhi ribozning 3'-gidroksil guruhi va 5'-gidroksil guruhi o'rtasida ko'priq hosil qilib, siklik difosfoester tuzilishini shakllantiradi; qarang: 2.4-rasm.) cAMP o'ziga xos oqsil – katabolit aktivator oqsili (CAP) (shuningdek, CRP – katabolit retseptor oqsili sifatida tanilgan) bilan o'zaro ta'sir qiladi. cAMP-CAP kompleksi DNKga bog'lanadi va bog'lanish joyidan keyingi (quyi oqimdagi) genlarning transkripsiyasiga sabab bo'ladi (qarang: 2.22-rasm). Bu genlar keyingi substratni (masalan, laktoza, agar hujayralar glyukoza/laktoza aralashmasida o'sayotgan bo'lsa) qabul qilish va metabolizmini ta'minlash uchun

2.22-rasm. Katabolit repressiyasi

Bu mexanizm siklik AMP (cAMP) orqali boshqariladi va quyidagi jarayonlarni o'z ichiga oladi:

Operon boshqaruvi:

Operonning faoliyati operator gen tomonidan boshqariladi.

Operator gen katabolit aktivator oqsili (CAP) va siklik AMP (cAMP) orasidagi kompleks orqali faollashtiriladi.

cAMP faqat glyukoza yo'q bo'lganda hosil bo'ladi.

Agar glyukoza yoki uning katabolitlari mavjud bo'lsa, cAMP shakllanmaydi.

Repressiya mexanizmi:

Glyukoza mavjud bo'lganda cAMP hosil bo'lmagani uchun CAP-cAMP kompleksi shakllanmaydi.

Bu holatda struktural genlar «o'chirilgan» (ya'ni repressiyalangan) holatda bo'ladi.

Bir nechta operonlar cAMP-CAP signaliga javob berishi mumkin.

Repressiya: Glyukoza mavjud bo'lganda struktural genlar ifodalanmaydi (repressiya holati).

yangi oqsillarni sintez qilishda qo'llaniladi. Bu genetik nazoratning ijobiy tizimi bo'lib, 2.21-rasmda ko'rsatilgan salbiy nazorat tizimining teskarisidir. Shunday qilib, asosiy molekula cAMP hisoblanadi. Glyukoza yoki uning katabolitlari mavjud bo'lganda, cAMP hosil bo'lmaydi, chunki uning sintezini amalga oshiruvchi ferment (adenilat-siklaza) bu katabolitlar tomonidan bostiriladi. Natijada, laktozani qabul qilish va metabolizm jarayoni sodir bo'lolmaydi. Katabolitlar yangi fermentlar sintezini bostiradi. Bu repressiya faqat katabolitlar yo'qolgandan (masalan, glyukoza to'liq sarflangandan) keyin olib tashlanadi.

2.8.6 Ferment faoliyatini o'zgartirish

Ferment sintezlangandan keyin uning faoliyati turli usullar bilan modulyatsiya qilinishi (tartibga solinishi) mumkin. Bu jarayon ferment sintezlangandan, ya'ni transkripsiya orqali hosil qilingandan keyin amalga oshiriladi (qarang: 2.20-rasm). Fermentlar bir shakldan boshqa shaklga o'tkazilishi mumkin, bunda bir shakli faol (aktiv) va ikkinchi shakli faol emas (yoki kam faoliyatli) bo'lishi mumkin:

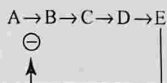


Bu faollashtirish yoki faoliyatni pasaytirish jarayoni boshqa bir alohida ferment tomonidan amalga oshiriladi, bu ferment asl fermentning kataliz reaksiyasiga hech qanday aloqasi yo'q. Fermentni bir shakldan boshqasiga aylantirishning keng tarqalgan usullaridan biri uni fosforlashdir. Bunda yangi ferment – oqsil kinaza (protein kinase) qo'llaniladi. Oqsil kinazalar odatda faqat bitta ferment bilan reaksiyaga kirishadi va shuning uchun ular juda o'ziga xosdir. Ular ATP-dan fosfor guruhini olib, fermentdagi maxsus gidroksil guruhiga (odatda, serin qoldig'iga) qo'shadi. Faol shakl fosforlangan shakl yoki fosforsiz shakl bo'lishi mumkin. Fosfor guruhini olib tashlash jarayoni esa maxsus fosfataza fermenti tomonidan amalga oshiriladi. Oqsil kinaza va fosfataza faoliyatlari hujayradagi boshqa omillar tomonidan boshqariladi va ular hujayraning metabolik holatiga mos ravishda ishlaydi. Bundan tashqari, ferment faoliyatini o'zgartirishning boshqa mexanizmlari ham mavjud. Bular, masalan, fermentdagi ma'lum aminokislota qoldig'iga sodda molekulaning qo'shilishi (yoki olib tashlanishi) orqali amalga oshiriladi. Biroq fosfor guruhining qo'shilishi eng keng tarqalgan usul hisoblanadi. Bu mexanizmlar hujayraning metabolik jarayonlarini nozik nazorat qilishda muhim rol o'ynaydi.

Ba'zi oqsillarning faolligini o'zgartirishning boshqa mexanizmlari ham mavjud, bunda fermentdagi ma'lum bir aminokislota qoldig'iga oddiy molekulani birlashtirish (yoki olib tashlash) amalga oshiriladi, lekin fosfo guruhini qo'shish eng keng tarqalgan usuldir.

Effektorlarning ta'siri

Ferment faolligini boshqarishning ikkinchi usuli uning turli effektorlarga javob reaksiyasi orqali amalga oshiriladi. (Effektorlar ijobiy ta'sir ko'rsatishi mumkin, ya'ni ular promotorlar, yoki salbiy ta'sir ko'rsatishi mumkin, ya'ni ular ingibitorlardir.) Bunga misol sifatida teskari bog'lanish ingibitsiyasi deb nomlanuvchi jarayonni keltirish mumkin. Bu yerda, biosintez ketma-ketligida oxirgi mahsulot – E birikmasi, ketma-ketlikdagi birinchi fermentni (A ni B ga aylantiruvchi fermentni) ingibitlash imkoniyatiga ega bo'lishi mumkin. Bu jarayon faqatgina hujayra tomonidan o'zining zudlik bilan kerakli ehtiyojlari uchun yetarli miqdorda E ishlab chiqarilganda yuz beradi va natijada, bu yo'ldan keyingi karbon oqimini yo'naltirishga hojat bo'lmaydi.



Hujayra o'sishda davom etar ekan, yig'ilgan E birikmasini iste'mol qiladi va shu bilan uni muomaladan kamaytiradi. Shu tariqa, E hujayraning o'z ehtiyojlari uchun qo'llanilgan sari, ingibitsiya ta'siri pasayadi va A ning B ga aylanishi qayta boshlanadi, natijada E ning sintezi hujayraning ehtiyojlarini qondirish uchun davom ettiriladi. Bu jarayon organizmning o'sish muhitiga oxirgi mahsulot – E qo'shilganda ham sodir bo'ladi. Bunda mahsulot bilan ta'minlanayotgani bois hujayra o'z resurslarini E sinteziga «bekor» sarflashga hojat sezmaydi va shu sababli yo'l to'sqinlik qiladi. Tayyor mahsulotning yuqori konsentratsiyasi butun yo'l fermentlarining repressiyasiga ham olib kelishi mumkin; shunday qilib, tayyor mahsulotning yuqori konsentratsiyasiga ikki javob rejimi mavjud:

1. Tezkor javob rejimi – yo'lning boshlang'ich fermenti to'sqinlik qiladi va yo'l bo'ylab karbon oqimi to'xtaydi.

2. Uzoq muddatli javob rejimi – yo'l uchun zarur bo'lgan barcha fermentlarning sintezi DNK darajasida repressiya (yuqoriga qarang) orqali to'xtatiladi, chunki ular ehtiyojdan ortiqcha bo'lib qoladi va ularning sintezi qimmatbaho aminokislota prekursorlarining behuda sarfi bo'ladi.

Albatta, yo'l yuqorida tasvirlangandek chiziqli bo'lmasa, balki ko'p yo'nalishli bo'lsa va bir nechta yakuniy mahsulotga ega bo'lsa, bu jarayon yanada murakkablashishi mumkin. Bu, ayniqsa, birlamchi umumiy yo'lni bo'lishadigan bir nechta aminokislotalarning biosintezi uchun muhimdir (masalan, fenilalanin, tirozin va triptofan). Bu masala 14-bobda batafsil muhokama qilinadi.

2.8.7 Fermentlarning parchalanishi

Fermentlar, ayniqsa, barqaror molekulalar emas va tezda qaytarib bo'lmaydigan tarzda buzilishi mumkin. Ularning yarim umr muddati juda o'zgaruvchan

bo'lib, bir necha daqiqadan bir necha kungacha davom etishi mumkin. Fermentlarning sintezi genetik darajada boshqarilishi mumkin bo'lsa-da (qarang: 2.8.4-bo'lim), ferment bir marta sintez qilingandan so'ng, u ma'lum bir vaqt davomida faoliyat ko'rsatishi mumkin. Agar atrof-muhit sharoiti to'satdan o'zgarsa, ferment sintezini «o'chirish», ya'ni repressiya qilish kifoya qilmasligi mumkin; hujayra fermentni faoliyatdan chiqarishi kerak bo'lishi mumkin, bu esa keraksiz yoki hatto zararli metabolik faollikning oldini olish uchun amalga oshiriladi. Bu jarayon teskari bog'lanish ingibitsiyasi orqali amalga oshirilishi mumkin (qarang: 2.8.6-bo'lim). Bundan tashqari, azot cheklangan sharoitlarda, ya'ni hujayra azotdan mahrum bo'lib, endi o'sishni davom ettira olmaganida (chunki N nuklein kislotalar va oqsillar sintezi uchun zarurdir), proteolitik fermentlar – proteazlar faollashishi mumkin. Bu fermentlar ortiqcha oqsil nusxalarini (masalan, fermentlarni) parchalaydi, natijada aminokislotalar ajralib chiqadi va hali zarur bo'lgan yangi fermentlarning biosintezi uchun qo'llaniladi. Shu tariqa, fermentlar oddiy denaturatsiya jarayonidan ko'ra tezroq «yangilanib» turishi mumkin.

2.9 Mikroorganizmlarning o'sish samaradorligi

Mikroorganizmlarning o'sish samaradorligi bo'yicha umumiy tushunchalar qat'iy termodinamik nuqtayi nazardan 3-bobda muhokama qilinadi. Odatda bu, iste'mol qilingan har bir karbon substratining birlik vazniga nisbatan hosil qilingan hujayralarning miqdori sifatida ifodalanadi. Molekulyar o'sish hosildorligi (YS) – bu substratning har bir moliga nisbatan hujayralar hosili (quruq vaznda), uglerod aylanish koeffitsiyanti esa substratning turli molekulyar o'lchamlarini taqqoslash uchun qo'llaniladi va bu karbon substratining har bir grammiga nisbatan hujayralar hosilidir. 2.3-jadvalning o'ziga xos xususiyati shundan iboratki, fakultativ organizmlar aerob sharoitdan anaerob sharoitga o'tkazilganda pastroq o'sish hosildorligiga erishadi. Bu hodisa, albatta, mazkur sharoitlarda energiya ishlab chiqarishning pasayishi bilan bog'liq.

2.3-jadval.

Turli substratlarda o'sayotgan mikroorganizmlarning o'sish hosildorligi va uglerodni aylantirish koeffitsiyentlarini ko'rsatadi			
Substrat	Organizm	Molyar o'sish hosildorligi (g organizm quruq vazni mol ⁻¹ substrat)	Uglerodni aylantirish koeffitsiyenti (g organizm quruq vazni g ⁻¹ substrat uglerodi)
Metan (Methane)	<i>Methylomonas sp.</i>	17.5	1.46
Metanol (Methanol)	<i>Methylomonas sp.</i>	16.6	1.38

Turli substratlarda o'sayotgan mikroorganizmlarning o'sish hosildorligi va uglerodni aylantirish koeffitsiyentlarini ko'rsatadi

Etanol (Ethanol)	<i>Candida utilis</i>	31.2	1.30
Glitserol (Glycerol)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50.4	1.40
Glyukoza (Glucose)	<i>Escherichia coli</i> (aerob)	95.0	1.32
	<i>Escherichia coli</i> (anaerob)	25.8	0.36
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (aerob)	90	1.26
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (anaerob)	21	0.29
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	81	1.13
Saxaroza (Sucrose)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	173	1.20
Ksiloza (Xylose)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	52.2	0.87
Atsetik kislota (Acetic acid)	<i>Pseudomonas sp.</i>	23.5	0.98
	<i>Candida utilis</i>	21.6	0.90
Geksadekan (Hexadecane)	<i>Yarrowia (Candida) lipolytica</i>	203	1.06

Amalda, mikroorganizmning o'sish hosildorligi quyidagi omillarga bog'liq:

1. Karbon manbasining xususiyati.
2. Substrat katabolizmining yo'llari.
3. Murakkab substratlarning qo'shimcha ta'minoti (ba'zi anabolik yo'llarning ishlash zaruratini yo'q qiladi).
4. Boshqa ozuqalarni, ayniqsa, azotni o'zlashtirish uchun energiya talablari.
5. ATF hosil qiluvchi reaksiyalarning o'zgaruvchan samaradorligi.
6. Ingibitor substratlar mavjudligi, salbiy ion balanslari yoki tashish tizimlari-ga qo'shimcha talablar qo'yadigan boshqa muhit komponentlari.
7. Organizmning fiziologik holati: deyarli barcha mikroorganizmlar tashqi muhitga qarab o'z rivojlanishini moslashtiradi va turli jarayonlar (masalan, bir-lamchi va ikkilamchi metabolizm) turli massa va energiya balanslarini talab qiladi.

Doimiy madaniyatlardagi tizimlarda, ya'ni hujayralarning o'sish sur'ati va ozuqaviy holati nazorat qilinadigan tizimlarda qo'shimcha (3-bobga qarang) quyidagi omillar aniqlanishi mumkin:

8. Cheklovchi substratning tabiati: karbon cheklangan o'sish, odatda, azot cheklangan o'sishga qaraganda «samaraliroq» bo'ladi. Azot cheklangan sharoitda ortiqcha karbon substratining katabolizmi energiya nuqtayi nazaridan «behuda» bo'lgan yo'llar bo'yicha amalga oshishi mumkin (garchi bu biotexnolog uchun foydali bo'lsa ham!).

9. Ruxsat etilgan o'sish sur'ati: o'sish sur'ati pasayganda, substratning hujayralarni saqlashga yo'naltirilgan ulushi oshadi, bu esa substratning boshqa mahsulotlarga yo'naltiriladigan miqdorini kamaytiradi. Va nihoyat, mikroorganizmlarning barcha ishlash jihatlarini boshqaruvchi yakuniy omil sifatida quyidagini qo'shish mumkin:

10. Mikrobiologning malakasi.

Bu omillar mikroorganizmlarning o'sishi va mahsuldorligini nazorat qilishda hamda optimallashtirishda muhim ahamiyatga ega. Biotexnologik jarayonlarni samarali boshqarish uchun har bir omilni e'tiborga olish zarur.

2.10 Qo'shimcha adabiyotlar

1. Hames B.D. va Hooper N.M. *Instant Notes: Biochemistry*, ikkinchi nashr. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2000.
2. Holms H. Flux analysis: a basic tool of microbial physiology. *Advances in Microbial Physiology* 45: 271–340, 2001.
3. Horton H.R., Moran L.A., Scrimgeour K.G., Perry M.D. va Rawn D. *Principles of Biochemistry*, 4-nashr. New Jersey, AQSH: Pearson Education Inc., 2006.
4. Lengeler J.W., Drews G. va Schlegel H., tahrirchilar. *Biology of the Prokaryotes*. Oxford: Blackwell Science, 1999.
5. Moat A.G., Foster J.W. va Spector M.P., tahrirchilar. *Microbial Physiology*. New York: John Wiley & Sons, 2002.
6. White D. *Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford: Oxford University Press, 1999.

III BOB. MIKROORGANIZMLAR O'SISHINING TERMODINAMIK NUQTAYI NAZARDAN STOXIOMETRIYASI VA KINETIKASI

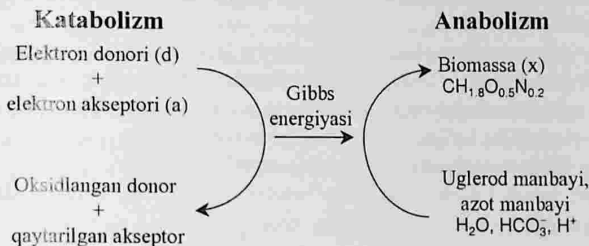
Terminologiya (Nomenclature)

1. c_i – Modda i konsentratsiyasi – (mol i m^{-3}).
2. $-\Delta G_{\text{CAT}}$ – Katabolizmda organik yoki noorganik elektron donordan har mol uchun ishlab chiqarilgan Gibbs energiyasi (kJ mol^{-1}).
3. ΔG_f° – Standart Gibbs energiyasining hosil bo'lishi (kJ mol^{-1}).
4. ΔH_f° – Standart entalpiya hosil bo'lishi (kJ mol^{-1}).
5. K_s – Affinitet (yaqinlik) konstantasi (mol l^{-1}).
6. m_i – Modda i uchun texnik xizmat ko'rsatish koeffitsiyenti ($\text{C-mol i per C-mol x h}^{-1}$).
7. q_i – Biomassa uchun modda i ning o'ziga xos aylanish tezligi ($\text{mol i per C-mol x h}^{-1}$).
8. r_i – Modda i ning o'ziga xos aylanish tezligi (mol i).
9. V – Reaktor ichidagi suyuqlik hajmi (m^3).
10. X – Biomassa (C-mol).
11. Y_{ix} – i modda uchun biomassa hosildorligi. O'lchov birligi: (C-mol x per mol i). Bu modda i asosida qancha biomassa (C-mol) hosil bo'lishini ko'rsatadi.
12. $Y_{\text{max/sx}}$ – Substrat (s) yoki elektron donordan (d) biomassa hosildorligining maksimal qiymati. O'lchov birligi: $\text{C-mol x per C-mol s}$. Bu substrat yoki elektron donor birligi asosida hosil bo'ladigan biomassa miqdorining maksimal qiymatini anglatadi.
13. μ – o'sishning o'ziga xos tezligi. O'lchov birligi: h^{-1} . Bu biomassa miqdorining vaqt birligi ichida o'zgarish tezligini ifodalaydi.
14. μ_{max} – o'sishning maksimal o'ziga xos tezligi. O'lchov birligi: h^{-1} . Ma'lum sharoitlarda mikroorganizmlar uchun eng yuqori o'sish tezligini anglatadi.
15. Y – Qaytarilish darajasi. Bu substrat yoki elektron donorning qaytarilish holatini tavsiflaydi, ya'ni elektronlarning nisbiy zichligini ko'rsatadi.

3.1 Kirish

Fermentatsiya va biologik chiqindilarni qayta ishlash jarayonlarida mikroblarning o'sishi bo'yicha miqdoriy ma'lumotlar zarur. Odatda, o'sishni aniqlash uchun ma'lum bo'lgan parametrlar qo'llaniladi, masalan, substrat S (elektron donori D deb ham ataladi) bo'yicha maksimal biomassa samaradorligi ($Y_{\text{max/sx}}$ yoki $Y_{\text{max/dx}}$), substrat s yoki elektron donor d uchun texnik xizmat talablari (ms yoki md), μ_{max} va K_s . Amaliy muammo shundaki, bu parametrlarning qiymatlari

o'sish tizimlariga qarab bir yoki ikki darajaga farq qilishi mumkin. Amaliy muammo – bu qadriyatlar, parametrlar kattalik darajasiga qarab birdan ikki darajagacha o'zgaradi. Bunday o'zgarishlar odatda (3.1-rasm) ularning katabolizmi bilan tavsiflanadi. Mavjud elektron donor va elektron qabul qiluvchi yordamida katabolizmi va mavjud C manbai va N manbadan foydalangan holda ularning anabolizmi bilan tavsiflanadi. Bundan tashqari, har bir tizim HCO_3^- , H_2O va H^+ ni o'z ichiga oladi. Amaliy nuqta shundaki, ko'plab mikroorganizmlar $\text{C}_1\text{H}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ biomassa-si uchun bitta C-mol formulasi bilan o'xshash elementar tarkibga ega. Bu, agar bu ma'lumot mavjud bo'lmasa, standart biomassa tarkibidan foydalanishga imkon beradi. Biroq biomassa tarkibini elementar tahlil yordamida aniqlash har doim afzaldir. Amaliy maqsadlar uchun o'sishning to'liq stoxiometriyasini bilish muhimdir. Fermentatsiya jarayonlarida substratdan biomassa hosili (Y_{sx} yoki Y_{dx}), O_2 talabi, CO_2 ishlab chiqarish va issiqlik ishlab chiqarish haqidagi ma'lumotlar optimal jarayonni loyihalash uchun muhimdir. Shuning uchun stoxiometrik hisoblash usullari fundamental ahamiyatga ega. Bundan tashqari, o'zboshimchalik bilan o'sish tizimlari uchun o'sish stoxiometriyasini baholash, masalan, biologik chiqindilarni tozalash yoki biologik jarayonlarda ham muhimdir.



3.1-rasm. O'sish – anabolizm/katabolizm sifatida ifodalanadi

$$\frac{1}{Y_{dx}} \text{ electron donor} - \frac{1}{Y_{ax}} \text{ electron acceptor} + 1 \text{ C-mol biomass} + \frac{1}{Y_{hx}} \text{ kJ heat} + \frac{1}{Y_{Gx}} \text{ kJ Gibbs energy} + (\dots) \text{ N source} + (\dots) \text{ H}_2\text{O} + (\dots) \text{ HCO}_3^- + (\dots) \text{ H}^+$$

3.2-rasm

Bir C-mol biomassa hosil bo'lishining umumiy stoxiometrik tasviri. Yix – bir mol yoki kJ birikma i bo'yicha bir C-mol X unumi; (. . .) noma'lum stoxiometrik koeffitsiyentlardir.

$1/Y_{dx}$ – elektron donori.

$1/Y_{ax}$ – elektron akseptori.

1C-mol biomassa.

$1/Y_{hx}$ kJ issiqlik

$1/Y_{Gx}$ kJ Gibbs energiya

3.2 Stixiometriya hisoblari

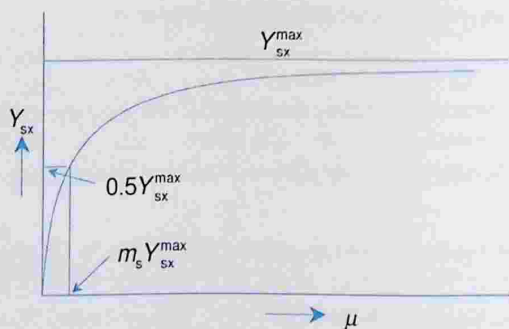
3.2.1 O'sish tizimini aniqlash

Mikroorganizmlarning o'sish tizimi umumiy jihatdan qulay tarzda ifodalana-di. Kimyoviy reaksiya (3.2-rasm)da bir C-mol biomassa hosil bo'ladi va bu N, H₂O, HCO₃⁻ manbalar rolini hisobga oladi, H⁺, elektron donor va elektron qabul qiluvchi. Bundan tashqari, issiqlik va Gibbs energiyasi ham ishtirok etadi. Bir C-mol biomassa miqdori 12 gramm uglerodni o'z ichiga oladi.

Bir C-mol biomassa – bu 12 gramm uglerod saqlovchi biomassa miqdori-ni anglatadi. Bu odatda taxminan 25 gramm quruq modda hisoblanadi, chunki biomassaning uglerod tarkibi odatda 45% ga teng. Mikroorganizmlar o'sishida murakkab biomassa molekulalarini oddiy uglerod birikmalaridan qurish uchun energiya hosil qilinishi kerak. Bu energiya elektron donor va elektron akseptor o'rtasidagi redoks reaksiyasida ishlab chiqariladi. O'sish jarayonida sarflangan energiyaning to'g'ri o'lchovi issiqlik chiqarilishi emas, balki Gibbs energiyasidir, chunki Gibbs energiyasi (ΔG) issiqlik bilan bog'liq entalpiya (ΔH) va entropiya (ΔS) hissa qo'shishlarini birlashtiradi ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ = $\Delta H - T\Delta S$). Reaksiyadagi stixiometrik koeffitsiyentlar (3.2-rasm) yaxshi ma'lum bo'lgan hosildorlik koeffitsiyentlari bilan bog'liq. Quyidagilar asosiy hosildorlik koeffitsiyentlari sifatida qaraladi:

- Y_{dx} – biomassaning elektron donoriga bo'lgan hosildorligi (organik birikmalar uchun har bir C-mol va noorganik birikmalar uchun har bir mol uchun);
- Y_{sx} – elektron akseptoriga bo'lgan hosildorlik (har bir mol akseptor uchun);
- Y_{hx} – issiqlikka bo'lgan hosildorlik (kJ uchun);
- Y_{gx} – Gibbs energiyasiga bo'lgan hosildorlik (kJ uchun).

Biomassa uchun 1 C-mol tarkibi qo'llaniladi. Har qanday tenglamada minus belgisining paydo bo'lishi iste'molni anglatadi.



3.3-rasm. Biomassa hosildorligi Y_{sx} ning o'ziga xos o'sish tezligi bilan bog'liqligi (texnik xizmat ko'rsatish effekti), bu yerda m_s – substratning texnik xizmat ko'rsatish koeffitsiyenti, Y_{sx}^{max} – substratga nisbatan maksimal biomassa hosildorligi

Y_{sx} (yoki Y_{dx}). Doimiy hajmli partiyali madaniyatda (0 vaqt nolni anglatadi), Y_{sx} quyidagicha bo'ladi:

$$Y_{sx} = (C_x - C_{x0}) / (V_0 C_{s0} - V C_s) \quad (3.2a)$$

Kemoshtatda, kirish va chiqish tezliklari teng bo'lgan holatda, shunga o'xshash tenglama amal qiladi, bunda $C_{x0} = 0$ va C_{s0} kiruvchi substratning konsentratsiyasi C_s bilan almashtiriladi. Agar hajm o'zgarishlari yuz bersa, massa balansi asosida murakkabroq munosabatlarni hosil qilish mumkin. Dastlabki hajmi V_0 va o'zgaruvchi hajmi V bo'lgan batch reaktorlar uchun quyidagi tenglamalar olinadi:

$$Y_{sx} = (V C_x - V_0 C_{x0}) / (V C_{s0} - V_0 C_s) \quad (3.2b)$$

3.2.3 Texnik xizmat ko'rsatish ta'siri

Dastlab Y_{sx} doimiy qiymat sifatida kiritilgan edi. Biroq xemostat joriy etilgandan so'ng, maksimal o'sish tezligidan (μ_{max}) ancha past o'sish tezligida mikroorganizmlarni o'stirish Y_{sx} ning o'ziga xos o'sish tezligi (μ) ga bog'liqligini ko'rsatdi. Bu hodisa endogen nafas olish yoki texnik xizmat ko'rsatish tushunchasi bilan tushuntiriladi. Bu tushunchaga ko'ra, hujayra funksiyalarini saqlab qolish (masalan, oqsillar degradatsiyasini bartaraf etish, ion gradientlarining oqimini tiklash va boshqalar) uchun Gibbs energiyasi oqimining mavjudligi talab qilinadi. Gibbs energiyasi ma'lum bir tezlikda elektron donor (substrat)ning katabolizmi orqali ishlab chiqariladi. Bu texnik xizmat ko'rsatish tezligi m_s (yoki m_d) deb ataladi va C-mol substratni har bir C-mol biomassga soatiga ifodalaydi. Quyidagi tenglama mazkur jarayonni ifodalaydi: Maintenance (xizmat) darajasi bilan bog'liq hosildorlik jarayonlari stixiometrik va kinetik o'sishni tahlil qilishda muhimdir.

3.3-rasmida Y_{sx} μ ga bog'liqligi ko'rsatilgan:

- yuqori μ qiymatlarida Y_{sx} model parametriga yaqinlashadi;
- past μ qiymatlarida Y_{sx} sezilarli darajada pasayadi va $\mu = m_s \frac{1}{2} Y_{max/sx} = \mu_{ms} Y_{max/sx}$ ga teng bo'ladi.

Ko'pgina an'anaviy jarayonlar uchun shuni ko'rsatish mumkinki, odatdagi o'sish haroratlarida $\mu > 0.05 h^{-1}$ bo'lganda texnik xizmat ko'rsatishning hosildorlikka ta'siri e'tibordan chetda qoladi. Bu shuni anglatadiki, batch madaniyatlari-da eksponensial o'sish davomida ($\mu \approx \mu_{max}$) $Y_{sx} \approx Y_{max/sx}$. Biroq sanoat ilovalarining ko'pchiligida qo'llaniladigan fed-batch jarayonlarida, ya'ni $\mu < 0.05 h^{-1}$, texnik xizmat ko'rsatish biomassaning hosildorligiga dominant ta'sir ko'rsatadi. Organizmning atrof-muhitdagi qo'llanilishida ham μ past bo'ladi va texnik xizmat ko'rsatishning ahamiyati dolzarb bo'lib qoladi.

$$\frac{1}{Y_{sx}} = \frac{1}{Y_{sx}^{max}} + \frac{m_s}{\mu} \quad (3.3)$$

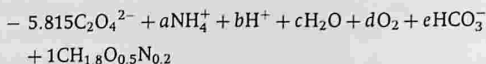
Ekspirimental ravishda Ysx kemoshtatda turli o'sish tezliklari μ ostida o'lanadi. Olingan Ysx va μ qiymatlari asosida, 3.3-tenglamadan foydalanib, model parametrlari Ymax/sx va ms ni hisoblashimiz mumkin.

3.2.4 O'sishning to'liq stoxiometriyasini hisoblash uchun konservatsiya prinsiplari

3.2-rasm shuni ko'rsatadiki, Ysx (yoki Ydx) dan tashqari, boshqa ko'plab stoxiometrik koeffitsiyentlar mavjud. Yaxshiyamki, ularni eksperimental ravishda aniqlash shart emas. Konservatsiya prinsiplari qo'llanilishi orqali, bitta koeffitsiyent (Ysx) o'lgachanda, boshqa barcha koeffitsiyentlarni hisoblash mumkin. Quyidagi misolda bu hisoblash va konservatsiya prinsiplari qanday qo'llanilishi tushuntiriladi:

Konservatsiya prinsiplari yordamida stoxiometrik koeffitsiyentlarni hisoblash

Aerob mikroorganizm oksalatda o'sadi va azot manbayi sifatida NH_4^+ dan foydalanadi. O'lgangan biomassaning hosildorligi 1/5.815 C-mol X mol⁻¹ oksalat. Standart biomassa tarkibi qo'llaniladi. 3.2-rasmga muvofiq, quyidagi umumiy reaksiya yozilishi mumkin:

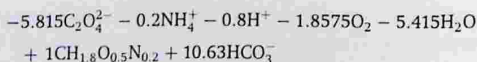


Bu yerda beshta noma'lum stoxiometrik koeffitsiyent (a dan e gacha) mavjud, ular uchun beshta konservatsiya cheklovlarini formulalash mumkin:

C conservation	$-11.63 + e + 1 = 0$
H conservation	$4a + b + 2c + 1e + 1.8 = 0$
O conservation	$-23.26 + c + 2d + 3e + 0.5 = 0$
N conservation	$a + 0.2 = 0$
Charge conservation	$+11.63 + a + b - e = 0$

1. C – uglerod konservatsiyasi;
2. H – vodorod konservatsiyasi;
3. O – kislorod konservatsiyasi;
4. N – azot konservatsiyasi;
5. Zaryad konservatsiyasi.

Bu tenglamada yakuniy stoxiometriya quyidagicha ifodalanadi:



Shunday qilib, quyidagi holatni ko‘rishimiz mumkin:

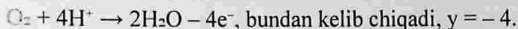
$$Y_{ax} = 1/1.8575 \text{ C-mol} \times \text{mol}^{-1} \text{ O}_2$$

$$Y_{cx} = 1/10.63 \text{ C-mol} \times \text{mol}^{-1} \text{ HCO}_3^-$$

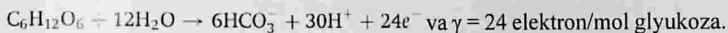
Umumiy reaksiya uchun, termodinamik jadvallardan (3.1-jadval) ΔH^0 va ΔG^0 f qiymatlaridan foydalanib, $(-\Delta H_r)$ va $(-\Delta G_r)$ ni ham hisoblashimiz mumkin. Shunday qilib, $\frac{1}{Y_{ax}}$ va $\frac{1}{Y_{cx}}$ qiymatlarini aniqlashimiz mumkin.

3.2.5 Reduksiya darajasini balanslash

Konservatsiya cheklovlarini qo‘llash sodda va to‘g‘ridan to‘g‘ri amalga oshiriladi. Shunday hisoblashlarni osonlashtirish uchun reduksiya darajasini balanslash (γ) qo‘llaniladi. Reduksiya darajasi (γ) har bir birikma uchun aniqlanadi va stoxiometrik kattalik bo‘lib, shunday ta‘riflanadi: $\gamma = 0$ quyidagi ma‘lumotlar H_2O , H^+ , HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Fe^{3+} , va azot manbayi. Reduksiya darajasi (γ) qanday aniqlanadi? Har bir birikma γ uchun redoks yarim reaksiyasi asosida hisoblanadi. Bu yarim reaksiya birikmani oldindan aniqlangan mos yozuvdagi kimyoviy moddalar va elektronlar soniga aylantiradi. Shundan so‘ng, γ qiymati organik va noorganik birikmalar uchun molga nisbatan ishlab chiqarilgan elektronlar soni sifatida aniqlanadi.

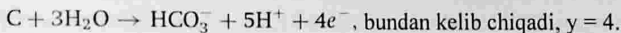


Glyukoza uchun redoksning yarim reaksiyasi quyidagicha:



Odatda organik birikmalar uchun γ qiymati uglerod moliga (C-mol) nisbatan normallashtiriladi. Glyukoza uchun: $\gamma = 24/6 = 4$.

Oksidlanish-qaytarilish yarim reaksiyalaridan foydalanib, indivial atomlar uchun γ -qiymatlari va elektr zaryadi hisoblash ham mumkin (3.2-jadval). Masalan, Biz uglerod atomini olishimiz mumkin:



Shuni ta‘kidlash kerakki (3.3-jadval), biomassada mavjud bo‘lgan azot atomi va o‘sish N manbayidagi azot uchun γ qiymati o‘sish uchun qo‘llaniladigan N manbaga bog‘liq. Masalan, NH_4^+ manbayi sifatida NH_4^+ uchun 3.3-jadval ($\text{H} = 1$ uchun γ , + zaryad = -1) va 3.3-jadval (N atomi uchun $\gamma = -3$)dan foydalan-gan holda NH_4^+ uchun pasayish darajasi bo‘ladi: $-3 + 4 - 1 = 0$. Molekulaning qisqarish darajasi (3.1-jadval) bu molekuladan mos birikmalarga oksidlanganda mavjud bo‘ladigan elektronlar soni. Organik molekulalar uchun mavjud elektronlar soni odatda C-mol uchun, noorganik molekulalar uchun – har bir mol uchun normallashtiriladi. 3.1-jadvalda organik molekulalar uchun γ ning qiymati 0 dan 8 gacha bo‘lganligi ko‘rsatilgan. Biomassa (standart tarkib) uchun quyidagicha:

Table 3.1 Standard Gibbs energy and enthalpy (298 K, pH = 7, 1 bar, 1 mol l⁻¹), degree of reduction for relevant compounds in growth systems

Compound name	Composition	ΔG_f° (kJ mol ⁻¹)	ΔH_f° (kJ mol ⁻¹)	Degree of reduction (C atom ⁻¹)
Biomass	CH _{1.8} O _{0.5} N _{0.2}	-67	-91	4.2 (N source NH ₄ ⁺)
Water	H ₂ O	-237.18	-286	-0
Bicarbonate	HCO ₃ ⁻	-586.85	-692	0
CO ₂ (g)	CO ₂	-394.359	-394.1	0
Proton	H ⁺	-39.87	0	0
O ₂ (g)	O ₂	0	0	-4
Oxalate ²⁻	C ₂ O ₄ ²⁻	-674.04	-824	+1
Carbon monoxide	CO	-137.15	-111	+2
Formate ⁻	CHO ₂ ⁻	-335	-410	+2
Glyoxylate ⁻	C ₂ O ₃ H ⁻	-468.6	-	+2
Tartrate ²⁻	C ₄ H ₄ O ₇ ²⁻	-1010	-	+2.5
Malonate ²⁻	C ₃ H ₂ O ₄ ²⁻	-700	-	+2.67
Fumarate ²⁻	C ₄ H ₂ O ₄ ²⁻	-604.21	-777	+3
Malate ²⁻	C ₄ H ₄ O ₅ ²⁻	-845.08	-843	+3
Citrate ³⁻	C ₆ H ₅ O ₇ ³⁻	-1168.34	-1515	+3
Pyruvate ⁻	C ₃ H ₃ O ₃ ⁻	-474.63	-596	+3.33
Succinate ²⁻	C ₄ H ₄ O ₄ ²⁻	-690.23	-909	+3.50
Glucuronate ⁻	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	-1154	-	+3.67
Formaldehyde	CH ₂ O	-130.54	-	+4
Acetate ⁻	C ₂ H ₃ O ₂ ⁻	-369.41	-486	+4
Dihydroxy acetone	C ₃ H ₆ O ₃	-445.18	-	+5.33
Lactate ⁻	C ₃ H ₅ O ₃ ⁻	-517.18	-687	+4
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	-917.22	-1264	+4
Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	-942.61	-	+4.33
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	-488.52	-676	+4.67
Propionate ⁻	C ₃ H ₅ O ₂ ⁻	-361.08	-	+4.67
Ethylene glycol	C ₂ H ₆ O ₂	-330.50	-	+5
Acetoin	C ₄ H ₈ O ₂	-280	-	+5
Butyrate ⁻	C ₄ H ₇ O ₂ ⁻	-352.63	-535	+5
Propanediol	C ₃ H ₈ O ₂	-327	-	+5.33
Butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	-322	-	+5.50
Methanol	CH ₄ O	-175.39	-246	+6
Ethanol	C ₂ H ₆ O	-181.75	-288	+6
Propanol	C ₃ H ₈ O	-175.81	-331	+6
n-Alkane (l)	C ₁₅ H ₃₂	+60	-439	+6.13
Propane (g)	C ₃ H ₈	-24	-104	+6.66
Ethane (g)	C ₂ H ₆	-32.89	-85	+7
Methane (g)	CH ₄	-50.75	-75	+8
H ₂ (g)	H ₂	0	0	+2
Ammonium	NH ₄ ⁺	-79.37	-133	+8
N ₂ (g)	N ₂	0	0	+10

Table 3.1 (cont.)

Compound name	Composition	$\Delta G_f^\circ, \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_f^\circ, \text{kJ mol}^{-1}$	Degree of reduction (C atom ⁻¹)
Nitrite ion	NO_2^-	-37.2	-107	+2
Nitrate ion	NO_3^-	-111.34	-173	0
Iron II	Fe^{2+}	-78.87	-87	+1
Iron III	Fe^{3+}	-4.6	-4	0
Sulphur	S^0	0	0	+6
Hydrogen sulphide (g)	H_2S	-33.56	-20	+8
Sulphide ion	HS^-	+12.05	-17	+8
Sulphate ion	SO_4^{2-}	-744.63	-909	0
Thiosulphate ion	$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	-513.2	-608	+8
Ammonium	NH_4^+	-79.37	-133	+8

3.1-jadvalda Gibbsning standart energiyasi va entalpiyasi (298 K, pH = 7, 1 bar, 1 mol l-1), o'sish tizimlarida tegishli birikmalar uchun pasayish darajasi keltirilgan. Bu jadvalda muhim termodinamik ma'lumotlar ko'rsatilgan. Bu ma'lumotlar asosan quyidagi uchta ko'rsatkichni o'z ichiga oladi:

Standart Gibbs erkin energiyasi (ΔG° kJ/mol):

Bu qiymat birikmaning termodinamik barqarorligini va kimyoviy reaksiyalar uchun qanchalik energiya talab qilinishini yoki chiqarilishini ko'rsatadi. Manfiy qiymatlar reaksiyaning o'z-o'zidan sodir bo'lish imkonini bildiradi.

Standart entalpiya (ΔH° kJ/mol):

Bu qiymat birikmaning shakllanish jarayonida ajraladigan yoki yutiladigan issiqlik miqdorini aks ettiradi. Manfiy qiymatlar ekzotermik jarayonlarni, ijobiy qiymatlar esa endotermik jarayonlarni bildiradi.

Tiklanish darajasi (C-atom) bo'yicha:

Bu ko'rsatkich birikmaning karbon atomi boshiga elektronlarning mavjudligini ifodalaydi. Tiklanish darajasi yuqori bo'lgan modda elektron donor sifatida xizmat qilishi mumkin, past bo'lganlar esa elektron akseptorlar bo'lishi mumkin.

Birikma nomlari va ularning tarkibi: Har bir birikmaning kimyoviy formulasini va uning termodinamik xususiyatlarini ifodalaydi.

Oksidlangan va tiklangan shakllar: Oksalat ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) va formiat (CHO_2^-) kabi birikmalardan boshlab yuqori tiklanish darajasiga ega metan (CH_4) kabi moddalarga o'tish kuzatiladi.

Tiklanish darajasining ahamiyati: Masalan, metan singari birikmalarning tiklanish darajasi yuqori (+8), bu ularning juda kuchli elektron donorlari ekanligini bildiradi.

$gx = 4,2 (1 \times 4 + 1,8 \times 1 + 0,5 (-2) + 0,2 (-3) = 4,2$ dan) NH_4^+ uchun N manba sifatida 4 va N manba sifatida NO_3^- uchun $gx = 5,8$ elektronlar saqlanib qolganligi sababli, qaytarilish balansini quyidagi misolda ko'rsatilganidek hisoblash mumkin.

Qaytarilish balansini qo'llash oksalatda aerob o'sishining oldingi misolini va reaktivlar sifatida $C_2O_4^{2-}$, NH_4^+ , H^+ , H_2O , O_2 , HCO_3^- va biomassani ($C_{1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}}$) o'z ichiga olgan umumiy kimyoviy reaksiyani ko'rib chiqing. ($C_2O_4^{2-}$) molekula oksalatning qisqarish darajasini (3.3-jadvaldagi atomlar va zaryadlarning γ qiymatlari yordamida) hisoblash $\gamma = 2 \times 4 + 4 \times (-2) + (+2) = 2$ ni beradi.

3.3-jadval.

Azot manbayi va biomassada mavjud bo'lgan N uchun reduksiya darajasi (γ)

Azot manbayi (N source)	N uchun γ qiymati
NH_4^+	-3
N_2	0
NO_3	+5

Biomassa uchun γ qiymati (N ning manbayi sifatida NH_4^+ , shuning uchun 3.3-jadvalga muvofiq atom $N = -3$ uchun γ va undan foydalanish biomassa sifatida $C_{1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}}$, tarkibi quyidagicha bo'ladi:

$$1 \times 4 + 1.8 \times 1 + 0.5 (-2) + 0.2 (-3) = 4.2$$

Xuddi shunday, O_2 ni kamaytirish darajasi -4 bo'ladi. HCO_3 biz quyidagi natijaga erishamiz:

$$\gamma = 1 \times 1 + 1 \times 4 + 3 \times (-2) + 1 = 0$$

va N manba NH_4^+ (3.2 va 3.3-jadvallar yordamida) biz quyidagilarni olamiz:

$$\gamma = -3 + 4 - 1 = 0$$

Shuningdek, reaksiyaning qolgan birikmalari uchun (H_2O , H^+), $\gamma = 0$. Bu o'sish uchun qo'llaniladigan pasayish darajasini beradi.

$$-5.815 \times 2 - 4d + 4.2 = 0$$

Ko'rinib turibdiki, bu muvozanatda faqat stoxiometrik koeffitsiyentlar mavjud substrat (yoki elektron donor), elektron qabul qiluvchi va biomassa yuzaga keladi. Bu to'liq yechim bilan bir xil bo'lgan $d = -1.8575$ ni beradi. Boshqa koeffitsiyentlar muntazam cheklovlarini qo'llashdan kelib chiqadi, ya'ni N balansidan N manba koeffitsiyenti, HCO_3 dan C balans va boshqalar. Misoldan bir nechta fikrlarni ta'kidlash kerak: Qaytarilish darajasi muvozanati har doim elektron donor, elektron qabul qiluvchi va biomassaning stoxiometrik koeffitsiyentlari o'rtasidagi bog'liqlikni belgilaydi va bu munosabatni juda foydali qiladi. Qisqartirish darajasining muvozanati yangi cheklov emas: bu faqat C, H, N va zaryadni saqlashning

mos kombinatsiyasi cheklovlar. Cheklovlarining boshqa foydali ilovalari bo'lishi mumkin.

- Tiklanish darajasi muvozanati har doim elektron donori, elektron akseptori va biomassaning stoxiometrik koeffitsiyentlari o'rtasida chiziqli bog'liqlikni aniqlaydi, bu esa bu bog'liqlikni amaliyotda juda foydali qiladi.

- Tiklanish darajasi muvozanati yangi cheklov emas; bu shunchaki uglerod (C), vodorod (H), azot (N) va zaryadni saqlanish qonunlarining mos birikmasidir.

3.3 Gibbs energiyasining tarqalishiga asoslangan stoxiometrik bashoratlar

Korrelyatsiyalar asosida biomassa hosildorligini (Y_{dx}) baholashning bir qancha usullari taklif qilingan. $\text{kJ C-mol}^{-1} \text{ X}$ da biomassa birligi uchun Gibbs energiya iste'moli ($1/Y_{gx}$) dan foydalangan holda termodinamik asosga ega bo'lgan yondashuv juda oddiy, ammo foydali va yangi usul bo'ldi. Bu stoxiometrik miqdor bo'lib, uni quyidagicha yozish mumkin:

$$\frac{1}{Y_{gx}} = \frac{1}{Y_{gx}^{\max}} + \frac{m_g}{\mu} \quad (3.4)$$

Bu erda m_g – biomassaning o'ziga xos darajasi Gibbs energiya sarfini saqlash uchun $\text{kJ C-mol}^{-1} \text{ X h}^{-1}$ va $Y_{\max gx} - \text{C-mol X kJ}^{-1}$ da Gibbs energiyasi uchun maksimal biomassa rentabelligi. Tenglama (3.4) shuni ko'rsatadiki, Gibbs energiya iste'moli o'sish va parvarish bilan bog'liq atamani o'z ichiga oladi. $Y_{\max}/s_x$ va m_g uchun oddiy korrelyatsiyalar taklif qilingan. Bu korrelyatsiyalar mikroorganizmlarning o'sish tizimlari va temperaturalarining keng doirasini qamrab oladi (heterotrof, avtotrof, aerob, anaerob, C manbalarining keng diapazoni bo'yicha denitrifikatsion o'sish tizimlari, teskari elektron o'tkazuvchan va teskari elektron uzatilmasdan o'sish tizimlari (RET)).

3.3.1 Gibbs energiyasiga xizmat ko'rsatish uchun korrelyatsiya

Gibbs energiyasini saqlash uchun quyidagi bog'liqlik to'g'ri ekanligi aniqlandi:

$$m_g = 4.5 \exp \left[-\frac{69\,000}{8.314} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad (3.5)$$

Bu korrelyatsiya 278 dan 348 K gacha bo'lgan harorat oralig'ida, aerob va anaerob sharoitlarda amal qiladi. Bu aniq m_g C manbasidan yoki foydalaniladigan elektron donor yoki qabul qiluvchidan mustaqil va faqat sezilarli haroratga bog'liqligini ko'rsatadi. Bu mantiqiy ko'rinadi, chunki parvarishlash jarayonlari Gibbs energiyasini ta'minlaydigan elektron donor/akseptor birikmasidan qat'i nazar, faqat Gibbs energiyasini talab qiladi.

3.3.2 O'sish uchun zarur bo'lgan Gibbs energiyasining korrelyatsiyasi

1/Y max gx ning ortishi bilan bog'liq Gibbs energiya talabi uchun ishlab chiqarilgan kJ Gibbs energiyasida C-mol-1 X, quyidagi korrelyatsiyalardan foydalanish mumkin. RETsiz geterotrof yoki avtotrof o'sish uchun:

$$\frac{1}{Y_{gx}^{max}} = 200 + 18(6 - c)^{1.8} + \exp[(3.8 - \gamma_s)^2]^{0.16}(3.6 + 0.4c) \quad (3.6 a)$$

RET talab qiladigan avtotrof o'sish uchun:

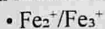
$$\frac{1}{Y_{gx}^{max}} = 3500 \quad (3.6 b)$$

Tenglama (3.6a) shuni ko'rsatadiki, heterotrofik o'sish uchun Y_{max}/s_x darajasi, asosan, qo'llaniladigan C manbasining tabiati bilan belgilanadi. C manbayi qisqarish darajasi, γ_s va mavjud C atomlarining soni (parametr c) bilan tavsiflanadi. C manbasida (masalan, glyukoza uchun $C=6$ va $\gamma_s=4$). Tenglama (3.6a) shuni ko'rsatadiki, Y_{max}/s_x foydalaniladigan C manbasiga qarab, bir mol C biomassasini sintez qilish uchun zarur bo'lgan Gibbs energiyasining taxminan 200 va 1000 kJ oralig'ida bo'ladi va bu C manbasiga bog'liq.

C manbayi sifatida glyukoza uchun pastroq diapazon olinadi. CO ga yuqori qimmat qo'llaniladi. Bundan tashqari, uglerod atomlari kamroq bo'lgan va pasayish darajasi taxminan 3,8 dan yuqori yoki past bo'lgan C manbalari uchun $1/Y_{gx}$ ortib borishini ko'rish mumkin. Buning sababi shundaki, past C manbayi biomassa sintezi uchun zarur bo'lgan C_4 - C_6 birikmalarini ishlab chiqarish uchun ko'plab biokimyoviy reaksiyalarni talab qiladi. Bundan tashqari, biomassaning taxminan 4 ga qisqarish tezligida, biomassadan ko'ra ko'proq kamayadi yoki ko'proq oksidlangan C manbalari mos ravishda oksidlanish yoki qaytarilish uchun qo'shimcha biokimyoviy reaksiyalarni talab qilishi aniq bo'ladi. Shu sababli, ortib borayotgan $1/Y_{max}/s_x$ qiymatlari qo'shimcha biokimyoviy reaksiyalarga bo'lgan talabning oshishini aks ettiradi, bu esa Gibbsning energiya talabini ko'paytiradi. Masalan, CO₂ dan biomassa olish uchun ($\gamma_s = 0$, $c = 1$) tenglamaga muvofiq talab qilinadi. (3.6a), Gibbs energiyasining miqdori 986 kJ C-mol-1 X, glyukozadan foydalanish ($\gamma_s = 4$, $C = 6$) esa atigi 236 kJ C-mol-1 X talab qiladi. Bu ancha yuqori ekanligini aks ettiradi. energiyaga bo'lgan talab tufayli o'sish uchun zarur bo'lgan biokimyoviy reaksiyalar sonining ko'pligi CO₂ dan C manbayi sifatida foydalanishdan iborat.

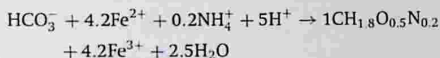
Avtotrofik o'sish uchun $1/Y_{max}/s_x$ qiymatini baholash uchun biz RET talab qilinadimi yoki yo'qligini bilishimiz kerak. Bu elektron manbayi sifatida mavjud elektron donordan foydalangan holda CO₂ dan biomassa hosil bo'lish reaksiyasini o'rnatishdan keyin sodir bo'ladi. Agar bu reaksiya uchun $\Delta G > 0$ bo'lsa, elektron donor elektronlarning energiya darajasi CO₂ ni biomassaga kamaytirish uchun

yetarli emasligi aniq. Mikroorganizm keyinchalik RET deb ataladigan jarayon yordamida donor elektronlarining bir qismini yuqori energiya darajasiga aylantirishi kerak. Bunday kam energiyali elektron donor juftlariga misollar:



- $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Elektron donორlarni talab qiluvchi RETlar uchun $1/Y_{\text{max}}/s_x$ qiymatlari $3500 \text{ kJ C-mol}^{-1} \text{ X}$ (3.6b) ni tashkil qiladi. Bu shuni ko'rsatadiki, RET ko'plab qo'shimcha biokimyoviy reaksiyalarni talab qiladi, natijada Gibbsning energiya talabi ancha yuqori bo'ladi. H_2/H^+ yoki CO/CO_2 kabi avtotrof elektron donor juftlari RETni talab qilmaydi. Bu elektron donორlar uchun $1/Y_{\text{max}}/s_x \approx 1000 \text{ kJ C-mol}^{-1} \text{ X}$, (3.6a) tenglamadan topilganidek, $y_s = 0$ va $c = 1$ (CO_2 C ning manbayi).

Avtotrofik o'sishda teskari elektron transportining (RET) paydo bo'lishi elektron donor sifatida $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ dan foydalangan holda avtotrofik aerob mikroorganizmlarning o'sishiga nazar tashlang. HCO_3^- C uchun manba hisoblanadi. Bu bizga quyidagi biomassa hosil bo'lish reaksiyasini (anabolik) qurish imkonini beradi, bunda HCO_3^- donor elektronlar yordamida kamayadi:



3.1-jadvaldan foydalanib, $\Delta G_{r \circ 1} = +454 \text{ kJ}$ hisoblash mumkin. Shubhasiz, elektron donor $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ RETni talab qiladi va (3.6b) tenglamaga amal qiladi.

3.3.3 Gibbs energiya korrelyatsiyasidan foydalangan holda stoxiometrik bashoratlar

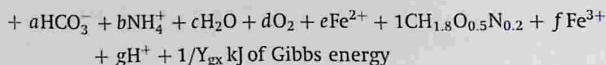
(3.5), (3.6a) va (3.6b) tenglamalarda mg va $1/Y_{s_x}^{\text{max}}$ uchun aniqlangan korrelyatsiyalar har bir mikroorganizm o'sish tizimi uchun to'liq stoxiometriyani baholash uchun qo'llanilishi mumkin. O'sish tenglamasining funksiyalar sifatida:

- C – qo'llaniladigan manba;
- elektron donor/akseptor birikmalari;
- o'sish sur'ati va haroratni ko'rsatish mumkin.

Bu mikrobologik o'sish tizimlarining keng doirasi uchun ekanligini ko'rsatdi Ydx ni 0,01 dan 1 C-mol X mol-1 oraliq'ida baholash mumkin. Donor nisbiy aniqligi taxminan 10-15%. Tugal stoxiometriyani hisoblash – eng yaxshi misol bilan ko'rsatilgan.

Gibbs yordamida o'sish stoxiometriyasini baholash

Energiya korrelyatsiyalari 50°C da elektron donor sifatida Fe^{2+} dan Fe^{3+} ga, 1,5 pH qiymatida 0,01 h–1 tezlikda o'sadigan va N manba sifatida NH_4^+ dan foydalangan holda mikroorganizmning aerob avtotrof o'sishini ko'rib chiqaylik. A dan g gacha bo'lgan yettita noma'lum stoxiometrik koeffitsiyentlardan foydalangan holda bitta C-mol X ishlab chiqarish uchun quyidagi o'sish reaksiyasini belgilash mumkin:



Biz yettita (a dan g gacha) noma'lum stoxiometrik koeffitsiyentlarni hisoblash uchun oltita cheklovlarni va bitta Gibbs energiya balansini belgilashimiz mumkin. (3.4) tenglamadan foydalanib, $1/Y_{\text{gx}}$ korrelyatsiyadan kelib chiqadi (RET ishtirok etganligini, $m = 0,01 \text{ h}^{-1}$ va $T = 323 \text{ K}$ ekanligini esda tutgan holda):

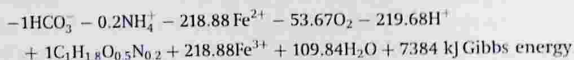
$$1/Y_{\text{gx}} = 3500 + 38.84/0.01 = 7384 \text{ kJ C-mol}^{-1} \times$$

Olti saqlash cheklovlari va Gibbs energiya balansini (foydalanish 3.1-jadvaldagi ΔG° qiymatlari quyidagicha:

1. **Uglerodning saqlanishi** – $(a + 1 = 0)$;
2. **Kislorodning saqlanishi** – $(3a + c + 2d + 0.5 = 0)$;
3. **Tiklanish darajasi** – $(-4d + e + 4.2 = 0)$;
4. **Temirning saqlanishi** – $(-e + f = 0)$;
5. **Azotning saqlanishi** – $(b + 0.2 = 0)$;
6. **Zaryadning saqlanishi** – $(-a + b + 2e + 3f + g = 0)$;
7. **Gibbs energiya balansini** – $(-586.85)a + (-79.37)b + (-237.18)c + (-78.87)e + (-67)d + (-4.6)f + (-8.54)g + 7384 = 0$.

Mazkur tenglama reaksiya davomida sodir bo'ladigan Gibbs energiyasi o'zgarishini ifodalaydi. Bu tizimni hal qilish orqali har bir o'zgaruvchining qiymatlari aniqlanadi, bu esa reaksiyaning barcha talablariga javob beruvchi kimyoviy tarkibni aniqlashga imkon beradi.

Shuni ta'kidlash kerakki, H^+ uchun $\Delta G^\circ - \text{pH} = 7$ dan (3.2-jadval) $\text{pH} = 1.5$ ga o'zgartirilgan (bu ΔG° ni -38.87 kJ/mol dan -8.54 kJ/mol ga o'zgartiradi). Shuningdek, tiklanish darajasi balansini H balansini o'rniqa cheklov sifatida qo'llanilgan. Oltita chiziqli tenglama yechilgandan so'ng quyidagi to'liq stoxiometriya aniqlanadi:



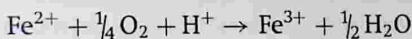
Olingan stoxiometriyadan foydalanib, ΔH° ni 3.1-jadvaldagi qiymatlari yordamida o'sish issiqligini ham hisoblashimiz mumkin va natijada $12\,620 \text{ kJ}$ issiqlik ishlab chiqarilishi aniqlanadi.

3.3.4 Stoxiometriyani hisoblash uchun algebraik munosabatlar

Barcha stoxiometrik koeffitsiyentlar saqlanish cheklovlari orqali $1/Y_{\text{gx}}$ bilan bog'langanligi sababli, ba'zi soddalashtiruvchi taxminlardan foydalanib, $1/Y_{\text{ix}}$

va $1/Y_{gx}$ orasidagi algebraik munosabatlarni hosil qilish ham mumkin. Masalan, elektron donori bo'yicha biomassaning chiqimi Y_{dx} uchun quyidagi munosabat olinadi:

Bu yerda ΔG_{CAT} bitta mol organik elektron donori yoki bitta mol noorganik elektron donorining katabolik reaksiyasi uchun Gibbs energiyasi bo'lib, kJ (C)-mol⁻¹ donor bilan ifodalanadi. γ_x va γ_d mos ravishda biomassaning va elektron donorning tiklanish darajasini mol⁻¹ bildiradi. Oldingi misolda, bitta mol elektron donorining katabolik reaksiyasi quyidagicha:



3.1-jadvaldagi ΔG° qiymatlarini $pH = 7$ da G_f qiymati bilan foydalanish. H+ uchun -8.54 kJ mol⁻¹ dan 1.5 , $\Delta G_{CAT} = -35.78$ kJ mol⁻¹ Fe^{2+} ni olamiz. Bundan tashqari $\gamma_x = 4.2$, $\gamma_d = 1$ va $1/Y_{gx} = 7384$ kJ C-mol⁻¹ X, natijada $Y_{dx} = 0.0047$ C-mol X mol⁻¹ Fe^{2+} . Bu shuni ko'rsatadiki, oldingi misoldagi stoxiometrik koef-fitsiyent e 215 molga teng. Fe^{2+} C-mol⁻¹ X, bu 218,9 hisoblangan qiymatga juda yaqin mol Fe^{2+} -mol⁻¹ X. (3.7) tenglama shuni ko'rsatadi:

- Y_{dx} katabolizmida Gibbs energiyasining ishlab chiqarilishi ($-\Delta G_{CAT}$) ortis-hi bilan giperbolik tarzda ortadi. Bu anaerob o'sish tizimlarida ($-\Delta G_{CAT}$) qiymat-lari past bo'lgani sababli, ular Y_{dx} qiymatlari aerob tizimlarga qaraganda pastroq bo'lishini tushuntiradi.

- Y_{dx} biomassani sintez qilish uchun kamroq Gibbs energiyasi talab qilina-digan holatlar uchun yuqori bo'ladi. Bu, yuqori maxsus o'sish tezligi (μ), past harorat, qulay uglerod manbayi va RET (revers elektron transporti) yo'qligida aniqlangan past $1/Y_{gx}$ qiymatlarini anglatadi.

- Y_{dx} , texnik xizmat ko'rsatish ta'sirlariga muvofiq, $1/Y_{gx}$ (3.4) tenglamasi yordamida almashtirish mumkin. Natijasida μ ga nisbatan giperbolik bog'liqlikka yuzaga keladi (tenglama (3.3) ga muvofiq).

- Y_{dx} ikkinchi termodinamika qonuniga ko'ra, nazariy maksimal chegaraga ega bo'lib, u γ_d/γ_x C-molX donor mol⁻¹ elektron donor doir hisoblanadi (ikkinchi qonunga ko'ra, $1/Y_{gx}$ ning nazariy minimal qiymati 0 kJ C-mol⁻¹ X bo'ladi).

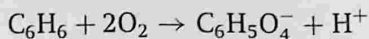
3.3.5 Noan'anaviy substratlar va katabolik reaksiyalar uchun o'sish samaradorligini baholash

$1/Y_{max/sx}$ uchun korrelyatsiyalar asosan bir molekulada oltita uglerod atomi yoki undan kam bo'lgan va birlamchi metabolizmga bevosita bog'langan an'ana-viy substratlardagi mikrobiologik o'sishga asoslangan. Atrof-muhit biotexnologi-yasida ko'plab substratlar, masalan, aromatik birikmalar (benzen), polisiklik aro-matik uglevodorodlar (PAH), nitrilotriozot kislotasi (NTA) kabi xelatorlar mavjud bo'lib, ular darhol birlamchi metabolizmga yo'naltirilmaydi. Mazkur substratlar

uchun kislorod iste'mol qiluvchi mono va dioksigenazalarni talab qiladigan maxsus yo'llar zarur. Bu yo'llar noan'anaviy substratni hujayra ichidagi birlamchi metabolitga (masalan, piruvat) aylantiradi. Bu maxsus yo'llarda iste'mol qilingan kislorod metabolik energiya emas, faqat issiqlik hosil qiladi. Bunday holatlar uchun hosildorlikni prognoz qilish usullari taqdim etilgan, ammo ular juda murakkab. Sodda yondashuv esa, noan'anaviy birikmaning birlamchi metabolitlarga oksidlanishiga oid metabolik bilimlardan foydalanishdir. Bu reaksiya faqat issiqlik hosil qiladi. Hosil bo'lgan birlamchi metabolitlar o'sish uchun uglerod va energiya manbasi sifatida qo'llaniladi va ularning stoxiometriyasi (3.5), (3.6a) va (3.6b) tenglamalari yordamida hisoblanishi mumkin. Bu jarayon 3.3.3-bo'limdagi misolda ko'rsatilgan. Quyidagi ikkita misol bu usulni tushuntiradi.

Benzolda o'sishning stoxiometriyasi

Benzol (C_6H_6) organizmlar tomonidan quyidagi reaksiya natijasida gidroksimukonik yarimaldegidga ($C_6H_5O_4^-$) aylanadi:



Mazkur reaksiya kislorodlanish reaksiyalari tufayli foydali Gibbs energiyasini bermaydi. Metabolik oraliq mahsulot (gidroksimukon semialdegidi) o'sish uchun «haqiqiy» uglerod va energiya manbayi sifatida xizmat qiladi va $G_{CAT} = 2516$ kJ mol⁻¹ gidroksimukon semialdegidga teng. (3.6a) tenglamasi yordamida $c = 6$ va $\gamma = 22/6 = 3.666$ bo'lganda $1/Y_{max/gx} = 233$ kJ C-mol⁻¹ X hosil bo'ladi. (3.7) tenglamasi yordamida $\gamma X = 4.2$ va $\gamma d = 22$ elektron mol⁻¹ semialdegid hisobga olinib, $Y_{dx} = 3.57$ C-mol⁻¹ X mol⁻¹ benzolga teng bo'ladi. Bu qiymat o'lcangan qiymatga yaqin: 1.20 g X⁻¹ g⁻¹ benzol (biomassadagi organik moddaning 90% bo'lishi va 24.6 gramm organik biomassa C-mol⁻¹ X hisobga olinganda 3.42 C-mol X mol⁻¹ benzolga teng). Fenantren oksigenazalar yordamida piruvat va formiatga quyidagi tenglama bo'yicha aylantiriladi: -1 fenantren ($C_{14}H_{10}$) – $6 O_2 + 4$ piruvat ($C_3H_3O_3^-$) + 1 formiat (CHO_2^-). Sarflangan O_2 faqat issiqlik hosil qiladi. Biomassa piruvat va formiat asosida hosil bo'ladi. Piruvatga asoslangan biomassa hosildorligi $G_{CAT} = 1048.74$ kJ mol⁻¹ piruvat va $1/Y_{max/gx} = 373$ kJ (3.6a tenglama bilan $c = 3$, $\gamma_s = 3.333$ va (3.7) tenglama bilan $\gamma X = 4.2$, $\gamma d = 10$ elektron mol⁻¹ piruvat) hisobida 1.29 C-mol X mol⁻¹ piruvatga teng. Formiatga asoslangan biomassa hosildorligi ($G_{CAT} = 251.85$ kJ mol⁻¹ formiat, $1/Y_{max/gx} = 651$ kJ C-mol⁻¹ X, $\gamma d = 2$) esa 0.213 C-mol X mol⁻¹ formiatni tashkil qiladi. Shundan so'ng fenantren asosidagi biomassa hosildorligi quyidagicha bo'ladi: $4 \times 1.29 + 1 \times 0.213 = 5.37$ C-mol X mol⁻¹ fenantren. O'lcangan hosil esa 6.5 C-mol X mol⁻¹ fenantrenga teng. 18% farq, ehtimol, fenantren holatida piruvat va formiatni hujayra membranasi orqali tashish uchun energiya talab qilinmasligi bilan bog'liq. Bu piruvat va formiat asosidagi biomassa hosildorligining ozgina kam baholanishiga olib keladi.

Mazkur misollardan ko'rinib turibdiki, termodinamik hosil bashorati, agar oksidlovchi oksigenaza asosidagi asosiy metabolitlarga aylantirish jarayoni ma'lum bo'lsa, noan'anaviy substratlarga ham osongina kengaytirilishi mumkin. Bio-geokimyoviy qo'llash sohalarida va ekstremal muhitlarda (masalan, gidroksidi, yuqori tuz darajalari) metallar va ekstremal sharoitlarni o'z ichiga olgan turli xil katabolik reaksiyalar uchraydi. Bunday hollarda katabolik Gibbs energiyasini hisoblash uchun termodinamik usullar murakkablashadi.

3.3.6 Termodinamik yondashuvdan foydalanib hosildorlikni bashorat qilishning cheklavlari

Taqdim etilgan usul Ysx taxminlarini taqdim etadi, bunda har bir mikroorganizmlar uchun xos bo'lgan oddiy substratlarning metabolizmi bilan bog'liq biokimyoviy tafsilotlar hisobga olinmaydi. Bu usulning jozibador jihati, chunki bu bilimlar ko'pincha mavjud emas. Noan'anaviy substratlar uchun esa ba'zi metabolik bilimlar kerak, bu 3.3.5-bo'limda ko'rsatilgan. Ammo har doim biokimyofarqlari muhimligini anglash kerak. Masalan, glyukozadan etanol fermentatsiyasi *Saccharomyces cerevisiae* tomonidan Ysx taxminan $0.15 \text{ C-mol X C-mol}^{-1}$ glyukoza bilan amalga oshiriladi. Yuqoridagi usul yordamida ham shunga o'xshash Ysx qiymati olinadi. Ammo *Zymomonas mobilis* etanol fermentatsiyasini $Y_{sx} = 0.07$ bilan amalga oshiradi. Farq biokimyoviy yo'lning turli (glukolizga nisbatan Entner-Doudoroff yo'li, 2-bobga qarang) bo'lishidan kelib chiqadi. Bu misol ko'rsatadiki, agar taxmin qilingan Ysx qiymati o'lchangan Ysxdan keskin farq qilsa, katabolizm (yoki anabolizm)da noodatiy, ehtimol, yangi biokimyoviy yo'l qo'llanilayotgan bo'lishi mumkin.

3.4 Termodinamik nuqtayi nazardan o'sish kinetikasi

O'sish kinetikasi odatda ikki parametr $\mu_{\max}$ va K_s bilan tavsiflanadi. K_s qiymatlarining o'zgarishi passiv diffuziya, osonlashtirilgan transport yoki mikroorganizmlarga elektron donor (substrat)ni o'tkazish uchun faol transport mavjudligiga bog'liq bo'lishi mumkinligi ma'lum. Shuning uchun K_s uchun umumiy termodinamik korrelyatsiya mumkin emas. Shuningdek, $\mu_{\max}$ uchun ham juda keng (0.001 dan 1 h^{-1} gacha) qiymatlar diapazoni topilgan, bu mikroorganizmlar va yetishtirish sharoitlariga bog'liq. Ammo katabolizmida Gibbs energiyasini maksimal spetsifik ishlab chiqarish tezligi past bo'lsa, maksimal spetsifik o'sish tezligi past bo'lishi mumkinligi mantiqiy ko'rinadi. Mazkur energiya cheklavlari konsepsiyasidan foydalanib, Gibbs energiyasini maksimal spetsifik ishlab chiqarish tezligi $q_{\max} G$ ($\text{kJ C-mol}^{-1} \text{ biomass h}$) uchun quyidagi ifodalarni olish mumkin:

$$q_G^{\max} = 3[(-\Delta G_{\text{CAT}})/\gamma_d] \exp \left[\frac{-69\,000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad (3.8)$$

Mazkur munosabat quyidagilarga asoslangan: 298 K haroratda 3 mol elektronlar $C\text{-mol}^{-1} \times h$ da maksimal elektron tashish tezligi (3.8-tenglama koeffitsiyenti 3 ni aniqlaydi). Haroratning Arrhenius munosabati bo'yicha ta'siri, bunda 69 000 $J\text{ mol}^{-1}$ aktivlanish energiyasi harorat 10 °C ga oshganda ikki marta tezlashuvga olib keladi ($R = 8.314\text{ J mol}^{-1}\text{ K}$). Katabolik Gibbs energiyasini ishlab chiqarishning maksimal tezligi $q_{\max}$ G, elektron donor/qabul qiluvchi reaksiya davomida uzatilgan elektron mollariga to'g'ri keladigan katabolik energiya bilan ($-G_{\text{CAT}}/y_d$) ko'paytiriladi. Katabolik Gibbs energiyasini ishlab chiqarishning maksimal tezligi, 3.8-tenglama, maksimal o'sish tezligi sharoitida o'sish uchun zarur bo'lgan Gibbs energiyasi bilan tenglashtiriladi ($\mu_{\max}/Y_{\max}$ gx va texnik xizmatni o'z ichiga oladi, bu 4.5 marta harorat korrelyatsiyasiga teng, 3.5-tenglamaga qarag'an, bu esa 3.9 tenglamaga ko'ra, $\mu_{\max}$ qiymatini quyidagicha beradi (h^{-1} da):

$$\mu_{\max} = \frac{[3(-\Delta G_{\text{CAT}})/Y_d - 4.5]}{1/Y_{\max}} \exp \left[\frac{-69\,000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad (3.9)$$

3.9-tenglama ko'plab mikroorganizmlar (masalan, nitrofiklar, metanogenlar, geterotrofik aeroblarga) uchun $\mu_{\max}$ qiymatlarini mantiqiy ravishda baholash imkonini beradi.

3.5 Qo'shimcha adabiyotlar

1. Amend, J. P. and Shock, E. L. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 175–243, 2001.
2. Heijnen, J. J. Bioenergetics of microbial growth. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, eds. M.C.Flickinger and S. W. Drew. New York: John Wiley & Sons, 1999.
3. Heijnen, J. J. and van Dijken, J. P. In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 39: 833–858, 1992.
4. Heijnen, J. J., van Loosdrecht, M. C. M. and Tijhuis, L. A black box mathematical model to calculate auto- and heterotrophic biomass yields based on Gibbs energy dissipation. *Biotechnology and Bioengineering* 40:1139–1154, 1992.
5. Tijhuis, L., van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. A thermodynamically based correlation for maintenance Gibbs energy requirements in aerobic and anaerobic chemotrophic growth. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 509–519, 1993.
6. van Briesen, J. M. Thermodynamic yield predictions for biodegradation through oxygenase activation reactions. *Biodegradation* 12: 265–281, 2001.

7. van dam Westerhoff, H. V. K. *Mosaic Non-equilibrium Thermodynamics and the Control of Biological Free Energy Transduction*. Amsterdam: Elsevier, 1987.

8. van der Heijden, R. T. J. M., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. and Luyben, K. Ch. A. M. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rate. *Biotechnology and Bioengineering* 43: 3–10, 1994.

9. van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. and Luyben, K. Ch. A. M. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnology and Bioengineering* 43: 11–20, 1994.

10. van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. and Luyben, K. Ch. A. M. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: III. Sequential application of data reconciliation for sensitive detection of systematic errors. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 781–791, 1994.

IV BOB. GENOM BOSHQARUVI VA TAHLILI: PROKARYOTLAR

4.1 Kirish

Genlarni manipulyatsiya qilish keng turdagi akademik va sanoat ilovalari uchun asosiy texnologiya hisoblanadi⁶. Bu nafaqat kuchli tahliliy vosita sifatida xizmat qiladi, balki quyidagilar uchun ham qo'llanilishi mumkin: (I) mavjud mahsulotlar hosildorligi va sifatini oshirish (masalan, oqsillar, metabolitlar yoki butun hujayralar); (II) mavjud mahsulotlar xususiyatlarini yaxshilash (masalan, oqsil muhandisligi orqali); (III) mavjud mahsulotlarni yangi usullar bilan ishlab chiqarish (masalan, yo'l muhandisligi orqali); va (IV) tabiatda ilgari mavjud bo'lmagan yangi mahsulotlarni ishlab chiqish (masalan, yo'naltirilgan yoki gibrid biosintez orqali).

4.1-jadval.

Bakterial hujayralarda uchraydigan turli genetik elementlarning odatiy hajm oralig'i

Genetik element	Hajm oralig'i (bp)
Transpozonlar	800–30 000
Plazmidlar	1 000–150 000
Profaglar	3 000–300 000
Bakterial xromosomalar	600 000–9 450 000

Eslatma:

bp – DNKdagi nukleotid juftlari soni.

Bu bo'lim nuklein kislotalarning asosiy tuzilishi va xususiyatlari, genlar va operonlarga genetik ma'lumotning tashkil etilishi hamda bakteriyalar mazkur kodlangan ma'lumotni oqsillarni sintez qilish uchun qanday transkripsiya va tarjima qilishi mexanizmlariga oid bilimlarni bilish talab etadi (shuningdek, 2-bobga qarang).

4.2 Bakterial xromosomalar va tabiiy gen transferi

4.2.1 Bakterial xromosomalar

Agar mo'ljaldagi DNK klon populyatsiyasida kam uchraydigan bo'lsa (masalan, genomik kutubxona holatida, qarang: 4.5.5-bo'lim), ko'p sonli klonlarni

⁶ Molekulyar biologiya va genetikada qo'llaniladigan ko'pgina maxsus atamalarning lug'ati 5-bob ibtidosida keltirilgan.

skrining qilish talab qilinadi. Bunday hollarda, eng samarali usul bakterial koloniyalar yoki fag vektorlar bilan hosil bo'lgan virus plakatlarini gibridizatsiya qilishdir. Koloniya yoki plakat gibridizatsiyasi, ma'lum DNK ketma-ketliklarini aniqlash uchun belgilangan nuklein kislota zondlari (DNK yoki RNK)dan foydalanadi. Transformant koloniyalar yoki plakatlarning biomassasi membranaga o'tkaziladi, bunda hujayralar ochilishi orqali ajralib chiqqan denaturatsiyalangan DNK membranaga bog'lanadi. Shundan so'ng membrana belgilangan zond bilan ishlov beriladi (qarang: 4.4.7-bo'lim). Zond immobilizatsiyalangan mo'ljaldagi DNKga o'ziga xos tarzda bog'lanadi va shu orqali kerakli klonlangan DNKni o'z ichiga olgan koloniyalar yoki plakatlarni aniqlaydi.

Bakteriyalarning genetik materiali ikki zanjirli (ds) DNKdan iborat. Nukleotid asoslari odatda o'zgartirilmagan bo'ladi, bundan tashqari metil qoldiqlari qo'shishi kuzatiladi, bu quyidagi vazifalarni bajaradi:

- replikatsiyadan so'ng «eski» (saqlanib qolgan) DNK zanjirini aniqlash;
- DNKni ma'lum nukleazalar ta'siridan himoya qilish;
- ayrim hujayra sikli jarayonlarini vaqtga bog'lash.

Ko'plab viruslar ham genetik ma'lumot sifatida ikki zanjirli DNKdan foydalanadi (masalan, T-faglar va lambda), boshqalari esa quyidagilarga ega:

- yagona zanjirli DNK (ssDNA) (masalan, ϕ X174 va M13);
- yagona zanjirli RNK (ssRNA) (masalan, MS2);
- ikki zanjirli RNK (dsRNA) (masalan, rotaviruslar).

Mikroblar xromosomalari o'lchami bir necha marta kattalik darajasida farq qiladi va ularning soni, tarkibi va topologiyasi o'zgaruvchan bo'ladi (4.2-jadval).

4.2-jadval.

Virus, bakteriya va zamburug' xromosomalarining hajmi, tarkibi va topologiyasi bo'yicha taqqoslash xususiyatlari

Organizm	Turi	Soni	Hajmi	Nuklein kislota	Topologiya
MS2	Bakteriofag	1	3.6 knt	ssRNK	Halqasimon
ϕ X174	Bakteriofag	1	5.4 knt	ssDNK	Chiziqli
Lambda	Bakteriofag	1	48.5 kbp	dsDNK	Chiziqli
T4	Bakteriofag	1	174 kbp	dsDNK	Chiziqli
Mycoplasma genitalium	Eubakteriya	1	580 kbp	dsDNK	Halqasimon
Borrelia burgdorferi	Eubakteriya	1	910 kbp	dsDNK	Chiziqli
Campylobacter jejuni	Eubakteriya	1	1.7 Mbp	dsDNK	Halqasimon
Rhodobacter sphaeroides	Eubakteriya	2	3.2 Mbp + 0.9 Mbp	2 × halqasimon	Halqasimon

Bacillus subtilis	Eubakteriya	1	4.2 Mbp	dsDNK	Halqasimon
Escherichia coli	Eubakteriya	1	4.6 Mbp	dsDNK	Halqasimon
Streptomyces coelicolor	Eubakteriya	1	8.6 Mbp	dsDNK	Chiziqli
Myxococcus xanthus	Eubakteriya	1	9.45 Mbp	dsDNK	ND
Methanococcus jannaschii	Arxea	1	1.6 Mbp	dsDNK	Halqasimon
Archaeoglobus fulgidus	Arxea	1	2.8 Mbp	dsDNK	Halqasimon
Schizosaccharomyces pombe	Eukaryot	3	3.5-5.7 Mbp	dsDNK	Chiziqli
Saccharomyces cerevisiae	Eukaryot	15	0.2-2.2 Mbp	dsDNK	Chiziqli

a ND – aniqlanmagan; dsDNK – ikki zanjirli DNK; ssDNK – bir zanjirli DNK; bp – nukleotid juftlari; M – million; nt – nukleotid(lar); k – ming.

Genom hajmi odatda organizmning tuzilish murakkabligi va turmush tarzini aks ettiradi. Majburiy bakterial parazitlar, masalan, *Mycoplasma genitalium* (580 kbp), kichik genomlarga ega bo'lishga moyil bo'ladi. Bunga qarshi ravishda, murakkab hayotiy siklga ega bakteriyalar, masalan, *Streptomyces coelicolor* (8,6 Mbp, ya'ni 8,6 million asos jufti nukleotidlar) va *Myxococcus xanthus* (9,45 Mbp), kattaroq genomlarga ega bo'ladi. Hozirgi vaqtda 250 dan ortiq eubakteriyalar, arxeylar va oddiy eukaryotik mikroorganizmlarning genomlari to'liq sekvensiyalangan.

Escherichia coli xromosomasi ko'plab eubakteriyalarga xosdir:

- uning vazni 5 femtogramm (5×10^{-15} g) bo'lib, uzunligi 1100 mikrometr (μm)ni tashkil qiladi;

- bu xromosoma 4,6 Mbp DNKdan iborat bo'lib, taxminan 4400 ta oqsilni kodlaydi;

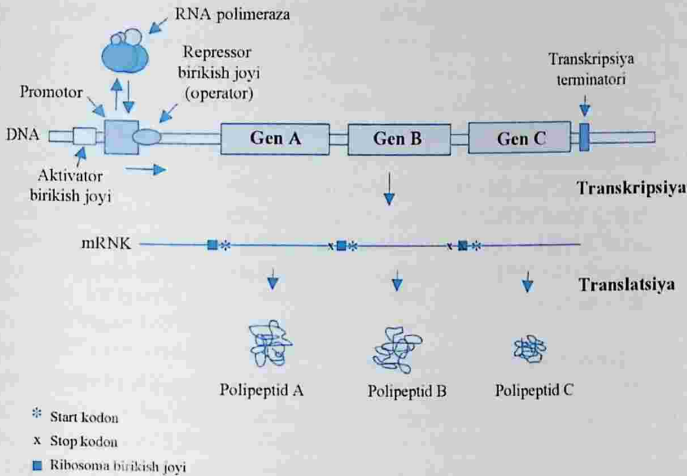
- xromosomada faqat bitta gen to'plami mavjud (ribosomal RNKni kodlovchi genlardan tashqari).

DNKning kamida 90% qismi oqsil/polipeptidlarni kodlaydi, qolgan 10% esa gen ekspressiyasini boshqarish yoki faqat strukturaviy funksiyaga ega. O'xshash funksiyalarga ega genlar xromosomada odatda, lekin har doim emas, bir joyda to'planadi.

Gen ekspressiyasi ikki asosiy, yaxshi muvofiqlashtirilgan jarayonni o'z ichiga oladi:

DNK avval RNK polimeraza fermenti tomonidan messenjer RNK (mRNK) ga transkripsiya qilinadi. mRNK beqaror molekula bo'lib, uning yarim umr (ya'ni

RNKning yarmi parchalanish uchun zarur bo'lgan vaqt) bir necha daqiqa ichida o'lchanadi.



4.1-rasm. Bakterial operonning asosiy komponentlarini ko'rsatadigan sxematik diagramma. U bakterial gen ekspressiyasi jarayonining transkripsiya va translyatsiya asosiy bosqichlarini tasvirlaydi

Aktivator va repressorga bog'lanish joylari transkripsiya boshlanishining chastotasini boshqaradigan nazorat joylaridir. Start va stop kodonlari, shuningdek, ribosomaga bog'lanish joylarini DNK ketma-ketligida aniqlash mumkin bo'lsa-da, ular faqat mRNA'da funksional hisoblanadi.

Yuqori qism: Transkripsiya

- RNA polimeraza: DNKdagi genlarni o'qib, ulardan mRNA'ni (messenjer RNK) sintez qiluvchi ferment.

- Promotor: RNA polimeraza birikadigan va transkripsiya jarayonini boshlaydigan DNKdagi maxsus joy.

- Repressor birikish joyi (operator): Gen ekspressiyasini boshqarish uchun repressiv oqsillar birikadigan DNK hududi.

- Aktivator birikish joyi: Gen ekspressiyasini rag'batlantiruvchi aktivator oqsillar birikadigan DNK hududi.

- Transkripsiya terminatori: RNA polimerazani transkripsiyani to'xtatishga majbur qiladigan joy.

O'rta qism: mRNA

- Start kodon (yulduzcha): Translyatsiyani boshlaydigan RNKdagi signal kod.

- Stop kodon (x belgisi): Translyatsiyani to'xtatadigan RNKdagi signal kod.

- Ribosoma birikish joyi (kvadrat): Ribosomalarning mRNA'ga birikadigan joyi.

Quyi qism: Translatiya

- Ribosomalar mRNA'ni o'qib, aminokislotalarni ketma-ket biriktirib, polipeptidlar (oqsillar) hosil qiladi.

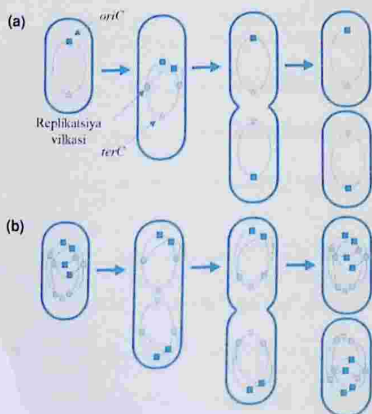
- Poliipeptid A, B va C: Har bir gen uchun sintez qilingan oqsillar.

Ribosomalar (katta nukleoprotein komplekslari) transkripsiya qilinayotgan paytda mRNKdagi maxsus joylarga, ribosomaning bog'lanish joylariga, birikadi va kodlangan ma'lumotni chiziqli polipeptidga tarjima qiladi. Bakterial hujayralarga gen ifodalanishini boshqarish imkonini berish uchun DNK transkripsion birliklar yoki operonlarga o'ziga xos nazorat ketma-ketliklari hamda transkripsiya va translyatsiyaning boshlanish va yakuniy nuqtalari bilan tashkil etilgan (4.1-rasm).

E. coli xromosomasi replikatsiya boshlanish nuqtasidan (*oriC*) yakuniy nuqtasiga (*terC*) ikki yo'nalishda, asosan, DNK polimeraza III fermentidan foydalangan holda replikatsiya qilinadi (4.2-rasm). Replikatsiya tezligi 37°C da taxminan ~800 asoslari s-1 bo'lib, natijada butun xromosomani replikatsiya qilish uchun taxminan 40 daqiqa talab etiladi. Yuqorida ko'rsatilgan muhitda o'sayotganda *E. coli* har 20 daqiqada ikkiga bo'linib, o'xshash o'lchamdagi ikkita hujayraga aylanishi mumkinligi bois bitta hujayra xromosomasida replikatsiya qilish uchun bir nechta joy bo'lishi mumkin.

4.2.2 Genlarning o'tish mexanizmlari

Bakteriya xususiyatlarini o'zgartirish imkoniyatini o'rganish 1928-yilda Fred Griffitning tajribalaridan boshlangan. U *Streptococcus pneumoniae* tomonidan namoyon etilgan ikkita kolonial morfologiya – qo'pol (rough) va silliq (smooth) xususiyatlardan faqat oxirgisi sichqonlarni yuqtira olishini kuzatgan. Qo'pol va silliq xususiyatlar (fenotiplar) bakterianing immun javobdan qochishiga imkon beruvchi polisaxarid kapsulaning mos ravishda yo'qligi yoki borligiga bog'liq edi. Griffit ko'rsatib berganidek, agar qo'pol (kapsulasiz) shtammni silliq shtammdan issiqlik yordamida o'ldirilgan bo'lagi bilan birga sichqonlarga yuborsa, qo'pol shtamm silliq shtammga aylanishi va o'limga olib keluvchi infeksiyani keltirib chiqarishi mumkin edi.



4.2-rasm. Bakterial xromosomaning ikki yo'nalishda replikatsiyasi

(a) Sekin o'suvchi hujayralar (ikki barobar o'tish vaqti >60 min):

- Replikatsiya boshlanish nuqtasi (*oriC*) va replikatsiya vilkasi ko'rsatilgan.
- Xromosomaning har ikki tomonida faqat bitta replikatsiya vilkasi mavjud.

(b) Shiddat bilan o'suvchi hujayralar (ikki barobar o'tish vaqti ~20 min):

- Replikatsiya boshlanish nuqtasida yangi replikatsiya davri boshlanadi, hattoki avvalgi davr tugallanmagan bo'lsa ham.
- Xromosomaning har ikki tomonida bir nechta replikatsiya vilkalari mavjud.

• Yakunda xromosomalarning har birida bir nechta replikasiya vilkalari hosil bo'lgan yangi hujayralar ajraladi.

Bu o'zgarish uchun mas'ul bo'lgan kimyoviy modda DNK ekanligi faqat 16 yil o'tib (1944-yilda) Avery, MacLeod va McCarty tomonidan aniqlangan va yana 9 yil o'tib (1953-yilda) Watson va Krick uning tuzilishini aniqlagan. Izolyatsiya qilingan DNKni bakteriyaga o'tkazish mexanizmi hali ham transformatsiya deb ataladi, bu Griffithning pnevmokoklaridagi qo'poldan silliqqa o'tish jarayonini aks ettiradi. Transformatsiyalangan DNKni olgan hujayralar transformantlar deyiladi. Tabiiy genetik transformatsiya *Azotobacter*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Streptococcus* va *Streptomyces* kabi bakteriyalarning ko'plab turkumlarida namoyon bo'ladi. Bundan tashqari, odatda transformatsiyalanmaydigan ko'plab shtammlar kimyoviy ishlov berish yoki elektr maydonni qo'llash orqali izolyatsiya qilingan DNKni qabul qilishga undalishi mumkin (4.4.5-bo'limga qarang). Griffith ishlaridan so'ng bakteriyalar orasida DNKni o'tkazishning ikkita boshqa mexanizmi – transduksiya va konyugatsiya aniqlangan. Transduksiya donor hujayradan qabul qiluvchi hujayraga DNKni bakterial virus (bakteriofag yoki oddiygina fag) orqali o'tkazishdir. Bu birinchi marta 1952-yilda Zinder va Lederberg tomonidan «*Salmonella*»da P22 fagi yordamida namoyish qilingan. Donor hujayrada fag replikasiyasi davomida fag zarralarining (virionlar) kichik qismi bakterial emas, balki fag DNKni qamrab oladi. Bunday transduksion zarralar hali ham yuqumli bo'lib, ular fag DNKni emas, balki donor shtammdan xromosomal DNKni qabul qiluvchi hujayraga yuboradi. Transduksiya qilingan DNKni qabul qilganlar transduktantlar deb ataladi.

Genlarni o'tkazishning uchinchi mexanizmi – konyugatsiya – 1946-yilda Lederberg va Tatum tomonidan kashf etilgan. Konyugatsiya odatda «xromosomalardan tashqari merosiy determinantlar» deb ataluvchi plazmidlar sinfi orqali amalga oshiriladi. Plazmidlar odatda ikki zanjirli DNKdan iborat kovalent yopiq doira (ccc) shaklidagi molekulalardan tashkil topgan bo'lib, ular mezbon xromosomasidan mustaqil ravishda replikasiya qilish qobiliyatiga ega, ammo ba'zan mezbon xromosomasiga integratsiyalashishi mumkin.

Plazmidlar bakterial shtammlar orasida keng tarqalgan bo'lib, odatda antibiotiklarga chidamlilik, toksin ishlab chiqarish, o'simliklarini shakllantirish, uglevodorodlar va aromatik birikmalarni (masalan, kamfora, naftalin, salitsilat) parchalash hamda fertilitet kabi hayot uchun muhim bo'lmagan fenotiplarni ta'minlaydi. Plazmidlar odatda 1 dan 150 kbp (kilobaza juftligi, ya'ni DNKning ma'lum bir qismi tarkibidagi nukleotid asoslari sonini bildiradi) oralig'ida bo'ladi, ammo 150 kbp dan katta mega-plazmidlar *Agrobacterium*, *Pseudomonas* va *Streptomyces* kabi bakteriya turkumlarida aniqlangan. Plazmidlar mezbon genotipining 0,1 dan taxminan 4% gacha qismini tashkil qilishi mumkin, ba'zi hol-

larda bu ko'rsatkich 20% ga yetishi mumkin. Mezbon hujayralarga fertilitetni ta'minlaydigan, masalan, *E. coli* ning F plazmidi kabi plazmidlar konyugativ plazmidlar deb ataladi.

Bakterial konyugatsiya donor hujayradan qabul qiluvchi hujayraga DNKning o'tkazilishini o'z ichiga oladi. Odatda, qabul qiluvchiga o'tkaziladigan DNK plazmid DNK hisoblanadi va juda kam hollarda u donor xromosomal DNKning bir qismi bo'ladi. Bunda ishtirok etadigan mexanizmlar deyarli to'liq konyugativ plazmid tomonidan kodlanadi, asosiy istisno esa DNKni o'tkazish va replikatsiyaga jalb qilingan fermentlardir. O'tkaziladigan DNK har doim bir zanjirli shaklda bo'ladi va uning komplementar zanjiri qabul qiluvchida sintezlanadi. Mezbon xromosomal genlarining o'tkazilishi odatda plazmidlarga nisbatan juda past chastotada yuz beradi, ammo ba'zi plazmidlar mezbon xromosomal genlarini yuqori chastotada, masalan, yuqori rekombinatsiya chastotasi (Hfr) shtammlarida *E. coli* kabi holatlarda ko'chirishga qodir.

Ko'plab kichik plazmidlar o'zlarining fertilitet funksiyalariga ega bo'lsa-da, konyugativ transfer qobiliyatiga ega. Bu plazmidlar mobil plazmidlar deb ataladi va ular birga mavjud bo'lgan konyugativ plazmidlarning fertilitet xususiyatlaridan foydalanadi. Ular faol transfer kelib chiqishi (oriT) va ko'chirish uchun zarur bo'lgan proteinlarni kodlovchi mobilizatsiya (mob) genlariga ega. Bunday plazmidlar klonlash vektorlari asosida qo'llanilganda, klonlangan genlarning yovvoyi tur populyatsiyalariga tarqalishini oldini olish uchun mob genlari odatda cheklov qoidalariga asosida olib tashlanadi.

Bakterial hujayralar orasidagi transfer konyugatsiyaning eng keng tarqalgan turi bo'lsa-da, bakteriyalar va zamburug'lar orasida, shuningdek, bakteriyalar va o'simliklar orasida ham transfer amalga oshishi ko'rsatilgan. Ikkinchi holatda, *Agrobacterium tumefaciens*⁷ katta (>200 kbp) o'simta-induksiyalovchi (Ti) plazmidlariga ega shtamlari o'z plazmid DNKlarining bir qismini – T-DNK (20–30 kbp) – o'simlik hujayralariga o'tkazishi mumkin, bu yerda u o'simlik yadroviy genom bilan o'zaro ta'sir qiladi. Bu transfer virulentlik (vir) genlari tomondan amalga oshiriladi, ular bakterial konjugatsiya tizimlarining komponentlariga o'xshashlikni ko'rsatadi. Agrobakterial Ti plazmidlar o'simlik turlariga yangi xususiyatlarni (transgen o'simliklar), masalan, ma'lum hasharot zararkunandalariga qarshi chidamlilikni kiritish uchun moslashtirilgan.

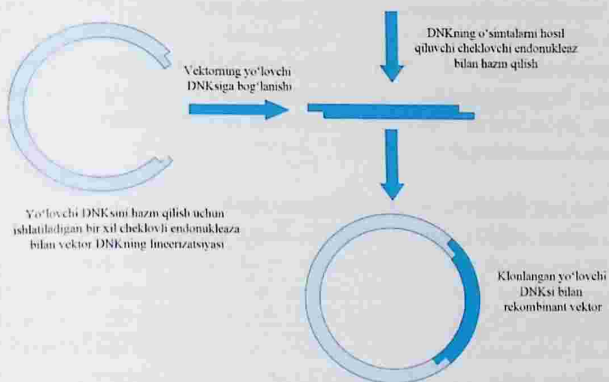
Tabiiy genlarni transfer qilish usullari ko'plab bakterial turlar genetik xaritalarini yaratishda qo'llanilib, turli genlar orasidagi tartib va nisbiy masofalarni ko'rsatib berdi. Bu klassik genetik xaritalash texnikalari nisbatan oz sonli bakterial turlarda yuqori darajada ishlab chiqilgan bo'lib, gen tuzilmasi va gen ifodalanishini boshqarishning batafsil tahliliga imkon berdi. Bu usullar yangi xususiyatlar-

⁷ Meva ekinlarining ildiz saratonining qo'zg'atuvchisi. Bu tayoqcha shaklidagi gramm manfiy tuproq bakteriyasi.

ga ega shtamm⁸larni yaratishga imkon berdi va so'nggi yillarda ishlab chiqilgan genetik muhandislik texnikalari bilan moslashtirildi.

4.3 Genetik muhandislik nima va u qay maqsadda qo'llaniladi?

DNKni manipulyatsiya qilish va tahlil qilish imkoniyati genetik muhandislik texnikalari (rekombinant DNK texnologiyasi) yordamida 1960-yillar o'rtalarida bashorat qilingan va 1970-yillar boshlarida amalga oshgan. Tez rivojlanayotgan bu texnologiya biokimyo va mikroorganizm genetikasi kabi o'zaro bog'liq fanlar sohasida o'tkazilgan bir qator asosiy tadqiqotlardan rivojlandi. Bu tadqiqotlar orasida eng muhimlaridan biri Verner Arber tomonidan bakterial cheklash va modifikatsiya tizimlarining molekulyar asoslarini aniqlash bo'lib, keyinchalik DNKni aniq joylarda (mo'ljallangan joylar) bo'lish uchun fermentlarni taqdim etdi. Bu restriksiya endonukleazalari (restriksiya fermentlari) tezda turli manbalardan olingan DNK molekularini tahlil va manipulyatsiya qilish uchun qo'llanila boshlandi. Bu nuklein kislotalarining (DNK va RNK) ikkala turini manipulyatsiya va tahlil qilish texnikalari DNK sekvenirlash, oligonukleotid sintezi va polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR) kabi muhim texnologiyalarning rivojlanishi yordamida juda kuchayib ketdi. Shu bilan birga bu texnologiyani osonlashtirish uchun kimyoviy moddalar, reaktivlar va uskunalarni yetkazib berish ko'p million dollarlik sanoatga aylandi.



4.3-rasm. Vektor va yo'lovchi DNK yordamida genetik muhandislikning asosiy tushunchasini ko'rsatuvchi sxematik diagramma

Pessenjer DNKning parchalanishi:

Pessenjer DNKni cheklovchi endonukleaza yordamida parchalanadi.

Vektor DNKni linearlashtirish:

* Shtamm – bakteriyalar, zamburug'lar va boshqa mikroorganizmlarning, shuningdek, viruslar va prionlarning ma'lum bir manbadan ajratilgan kulturasidir.

Pessenjer DNKni parchalash uchun qo'llanilgan cheklovchi endonukleaza bilan vektor DNKni linearlashtirish.

Vektor va pessenjer DNKni bog'lash – vektor va pessenjer DNKni bir-biriga ligatsiya qilish.

Rekombinant vektor:

Pessenjer DNK klonlangan rekombinant vektor hosil bo'ladi.

Rekombinant DNK texnologiyalarining rivojlanishi DNKni avvalgi bir necha yil ichida tasavvur qilib bo'lmaydigan darajada tahlil qilish mumkinligini anglashga olib keldi va natijada deyarli har qanday organizmning, prokaryot, arxeot yoki eukaryotning genomlari modifikatsiya qilinib, odatda faqat ularning tabiiy mezboblari tomonidan ishlab chiqariladigan biologik mahsulotlarni sintez qilishga yo'naltirilishi mumkin bo'ldi. Mazkur texnologiya, 4.3-rasmda tasvirlanganidek, nafaqat ilgari erishib bo'lmaydigan miqdor va sifatda ayrim oqsillarni ishlab chiqarishni osonlashtirdi, balki yuqori darajada modifikatsiyalangan yoki butunlay yangi bioaktiv mahsulotlarni ishlab chiqish imkoniyatini ham ochib berdi. Bu texnologiya keng ko'lamli sanoatlarga, ayniqsa farmatsevtika sanoatiga tatbiq qilindi, bu yerda asosiy maqsad terapevtik qiymati isbotlangan yoki taxmin qilingan tabiiy birikmalar va tabiiyda uchramaydigan butunlay yangi mahsulotlarni ishlab chiqarish edi.

4.4 Genetik muhandislikning asosiy vositalari

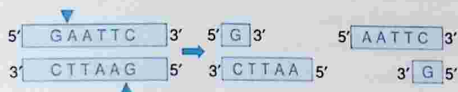
DNK molekularini ajratish, bo'lish va ulash texnikalari 1970-yillar boshlarida ishlab chiqilib, nuklein kislotalarni muhandislik va tahlil qilish uchun hozirgi texnologiyamizning asosini yaratdi. Mazkur texnikalar DNK bo'laklarini deyarli har qanday organizmdan klonlashni, ularni bakteriya ichida vektor (tashuvchi) molekulaga joylashtirish orqali amalga oshirish imkonini beradi. Bu molekula bakterial mezbonda barqaror saqlanadi.

4.4.1 Nuklein kislotalarni ajratish va tozalash

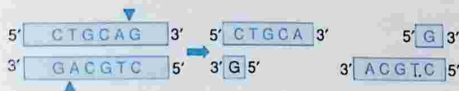
Mikroorganizmlarning hujayralaridan nisbatan sof nuklein kislotalarning katta miqdorini tayyorlash uchun biokimyoviy texnikalar in-vitro gen texnologiyasi uchun zaruriy shartdir. Nuklein kislotalarni ajratishning birinchi bosqichi hujayra ichidagi komponentlarni, jumladan nuklein kislotalarni chiqarish uchun hujayrani mexanik yoki fermentativ yo'l bilan buzishdir. Hujayradan chiqarilgandan so'ng, nuklein kislotalar nuklein kislotani modifikatsiya qiluvchi fermentlar uchun mos tozalikka ega substratni ta'minlash uchun oqsillar va polisakkaridlar kabi boshqa hujayra komponentlaridan tozalanishi kerak. Ajratilgan nuklein kislotalar sentrifugatsiya, elektroforez, inert erimaydigan substratlarga adsorbsiyalanish yoki suvdan tashqari erituvchilar bilan cho'ktirib olish kabi usullar kombinatsiyasi yordamida qayta olinadi.

4.4.2 DNK molekularini maydalash

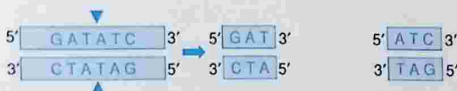
DNK molekularini tasodifiy yoki aniq nishon joylarda bo'lish qobiliyati ko'plab rekombinant DNK texnikalari uchun talab qilinadi. DNKni mexanik yoki fermentativ usullar yordamida bo'lish mumkin. Mexanik kesish maxsus emas va tasodifiy DNK bo'laklarini hosil qiladi, ular ko'pincha genomik kutubxonalarni yaratish uchun qo'llaniladi (4.4.5-bo'limga qarang). DNK molekulari mexanik bo'laklanganda, masalan, ma'lum bir gen yoki operonni o'z ichiga olgan maxsus bo'lakni ajratib olishning imkoni bo'lmaydi. Aksincha, DNKni ikki zanjirli DNKda (dsDNK) aniq nishon baza ketma-ketliklarini aniqlab va kesib tashlaydigan restriksiya endonukleazalari yordamida kesilganda, maxsus bo'laklarni ajratib olish mumkin. Restriksiya endonukleazalari DNKning fosfodiester skeletini ikkala zanjirida kesib, 3' OH va 5' PO₄ uchlarini hosil qiladi. Turli mikroorganizmlar turlaridan bir necha yuz restriksiya endonukleazalari ajratib olingan. Restriksiya endonukleazalari o'ziga xos biokimyoviy xususiyatlarga ega bo'lgan guruhlariga bo'linadi; II turdagi fermentlar genetik muhandislik maqsadlari uchun qo'llaniladigan asosiy sinfdir.



EcoRI asimmetrik ravishda kesib, 5' chiqib turuvchi qismini qoldiradi.



PstI asimmetrik ravishda kesib, 3' chiqib turuvchi qismini qoldiradi.



EcoRV simmetrik ravishda kesib, tekis uchlar hosil qiladi.

4.4-rasm. 3' yoki 5' o'simtalar (bir-biriga yopishish) yoki to'ntoq uchlarini hosil qilish uchun ma'lum maqsadli joylarda DNK molekularining endonukleaza bo'linishini cheklash.

Restriksiya endonukleazalari o'zlari dastlab ajratib olingan organizm turiga ko'ra nomlanadi; masalan, *Haemophilus influenzae* dan ajratib olingan fermentlar *Hin* deb belgilanadi, *Bacillus amyloliquefaciens* dan ajratib olinganlari esa *Bam* deb nomlanadi. Agar bir xil tur yoki shtammdan bir nechta ferment ajratib olinasa, nomiga shtamm va izolyatsiya raqami (rim raqamlarida) qo'shiladi. Masalan, *H. influenzae* shtamm Rd dan ajratilgan uchta restriksiya endonukleazasi Hind I, Hind II va Hind III deb belgilanadi.

II turdagi restriksiya fermentlarining maqsadni tanib olish ketma-ketliklari (restriksiya joylari) odatda qisqa bo'ladi, odatda to'rt dan olti bazagacha uzunlikda. Restriksiya joylarining uzunligi va ularning nukleotid tarkibi (ya'ni GC va AT bazalarining mutanosibligi) maqsad DNK bilan solishtirilganda DNKning qayerda kesilishi chastotasini aniqlashda muhimdir. Masalan, agar DNKda barcha to'rt xil nukleotid bazasi tasodifiy va bir xil chastotada uchrasa, har qanday to'rt baza juftlikli ketma-ketlik o'rtacha har 256 bazaviy juftlikda (4^4) uchraydi, olti bazaviy juftlikni belgilangan ketma-ketligi esa har 4096 bazaviy juftligida (4^6) faqat bir marta uchraydi.

Ko'pgina hollarda cheklash joylari palindromik, ya'ni markaziy nuqta atrofida simmetriyaga ega bo'lgan ikkala sxemada ham bir xil o'qiladi (4.4-rasm). Bo'linish odatda ketma-ket yuz beradi. Natijada tekis uchlar yoki bir zanjirli chiqindilarga ega bo'lgan qiya uchlar hosil bo'ladi. Eng ko'p qo'llaniladigan restriksiya fermentlari, ularning ketma-ketligi va bo'linishi 4.3-jadvalda ko'rsatilgan.

4.4.3 DNK fragmentlarini birlashtirish

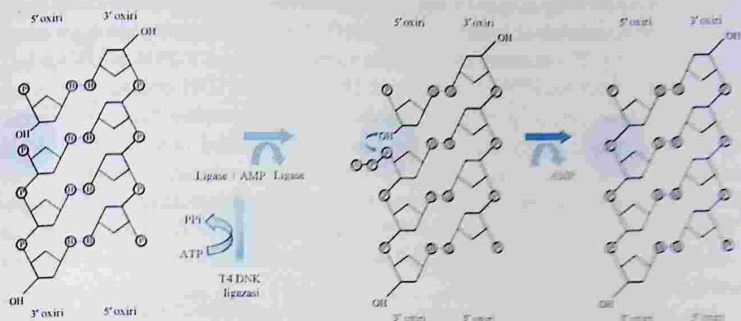
DNK molekulari tekis uchlar yoki mos (yopishqoq) chiqib turuvchi uchlar bilan *in vitro* sharoitida maxsus «birlashtiruvchi fermentlar» deb ataluvchi DNK ligazalari yordamida birlashtirilishi mumkin. Mazkur fermentlar bitta zanjirning 3'-OH guruhlarini boshqa zanjirning 5'-PO₄ uchlar orasida fosfodiester bog'lanishlarini katalizlaydi. Fag T4 tomonidan kodlangan DNK ligazasi DNK molekularini tekis uchlar yoki yopishqoq uchlar bilan birlashtirish uchun keng qo'llaniladi. T4 DNK ligazasi faoliyati ATPni ferment-AMP oraliq kompleksini hosil qilish uchun kofaktor (qo'sh faktor) sifatida talab qiladi. U keyinchalik o'zaro ta'sir qiluvchi DNK molekularining ochiq 3'-OH va 5'-PO₄ uchlariga bog'lanib, kovalent fosfodiester bog'ini hosil qiladi (4.5-rasm).

4.3-jadval.

Eng ko'p qo'llaniladigan restriksiya fermentlari

Ferment	Manba (Source)	Aniqlash joyi (Recognition site)
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G↓GATCC
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓AATTC
EcoRII	<i>Escherichia coli</i> R245	↓CCTT/AJGG
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A↓AGCTT
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GGTAC↓C
NotI	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC↓GGCCGC
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA↓G

Sau3A	Staphylococcus aureus 3A	↓GATC
SmaI	Serratia marcescens	CCC↓GGG



4.5-rasm. Fag T4 DNK ligazasining katalitik faoliyati

Fag T4 DNK ligazasi fosfodiester zanjirining uzilgan joylariga bog'lanadigan va uzilishning ikki tomonida joylashgan ochiq 3'-OH va 5'-PO₄ guruhlarini o'rtasida kovalent bog' hosil qiladigan ferment-AMP kompleksini shakllantiradi.

Ligatsiya reaksiyalari odatda passajir DNK (ya'ni «tashuvchi») sifatida ishlatiladigan yangi DNK parchasi)ni vektor molekulasiga bilan birlashtirishni o'z ichiga oladi (4.3-rasm). Vektorning boshqa vektor molekulasiga yoki birikishidan ko'ra, passajir DNKga birikish ehtimolini oshirish uchun, passajir DNK va vektor DNKning molyar nisbatini (ya'ni massaga emas, balki DNK molekulari soniga ko'ra) odatda taxminan 10:1 qilib belgilashadi. Boshqa bir strategiya – fosfataza yordamida lineallashtirilgan vektor DNKning 5'-PO₄ uchlari fosfat guruhlarini olib tashlash. Bu fosfat guruhi vektor uchlari bir-biriga bog'lash uchun muhim bo'lgani bois qayta halqasimonlanish (rekircularizatsiya) imkonsiz bo'ladi. Ammo passajir DNK mavjud bo'lganda, u vektorning 3'-OH uchlari ligatsiya uchun zarur bo'lgan 5'-PO₄ uchlari taqdim etadi.

Buning natijasida har bir nukleotid zanjirida passajir DNK uzunligi bilan ajratilgan yagona bo'shliq (ochiq joy) bo'lgan halqasimon molekula hosil bo'ladi. Bu tuzilma klonlash xostiga (ya'ni mezbon hujayraga) transformatsiya qilinishi uchun yetarlicha barqaror hisoblanadi, va xostning ta'mirlash tizimlari bu bo'shliqlarni muhrlaydi.

T4 DNK ligazasi yordamida amalga oshiriladigan ligatsiya reaksiyalari nisbatan samarasiz (taxminan 60%) va tekis uchli DNK substrat sifatida ishlatilganda ancha ko'proq vaqt talab etadi (2–12 soat). So'nggi yillarda ligatsiya reaksiyalarining samaradorligini oshirish uchun turli texnologiyalar joriy etildi. Shunday

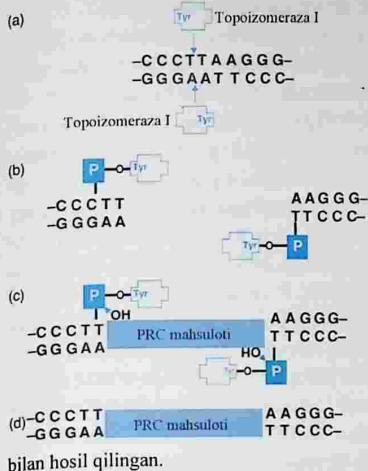
usullardan biri *Vaccinia* virusidan olingan DNK topoizomeraza I fermentidan foydalanadi. Bu ferment tabiiy holatda cheklovchi endonukleaza va DNK ligazasi sifatida ishlaydi (4.6-rasm). Tabiatda bu ferment ikki zanjirli DNKdagi o'ralib qolishni bartaraf etadi, bunda u maxsus pentamerik ketma-ketlikni (5'-(C/T) CCTT-3') aniqlab, belgilangan ketma-ketlikdan keyin yagona zanjirli uzilish hosil qiladi va DNKni bo'shashishiga imkon beradi. Uzilish davomida ajralgan energiya fermentning 274-pozitsiyadagi tirozin va hosil bo'lgan 3'-PO₄ orasidagi kovalent o'zaro ta'sir orqali saqlanib qoladi. Bu reaksiya 5'-OH qoldiqlari mavjud bo'lganda, qayta tiklanishi mumkin, bunda bu qoldiqlar vektordagi fosfo-tirozil bog'iga hujum qilib, yuqori samarali ligatsiya reaksiyasini hosil qiladi. Tijorat tizimlarida, linearlashtirilgan vektorlar *Vaccinia* topoizomeraza I fermenti bilan ularning 3' uchlari kovalent bog'langan holda taqdim etiladi. Bu tizim tekis uchli fragmentlar yoki Taq kabi xatolikni tuzmaydigan DNK polimerazasi yordamida hosil qilingan 3' adenozin chiqib turuvchi PCR mahsulotlarining yuqori samarali ligatsiyasini (95%) ta'minlaydi.

Mo'ljalidagi DNK ketma-ketliklarini klonlash vektoridan boshqasiga o'tkazish samaradorligini oshirish uchun yangi usullar ishlab chiqilgan. Bunday yondashuvlardan biri lambda fagining joylashuvga xos integratsiya/chiqarish mexanizmining xususiyatlariga asoslanadi. Lambda fag *E. coli*ni yuqtirganda, u ikkita sikldan biriga kiradi:

1. Litik sikl, bu jarayonda mezbon hujayra hisobiga o'zining taxminan 200 nusxasini yaratadi.
2. Lizogenik holat, bunda u bakterial xromosomaga maxsus joylashuv (att) joyida integratsiyalanadi.

Integratsiya jarayoni, fag tomonidan kodlangan integraza (Int) tomonidan boshqariladi va bakterial xromosomaning attB joyi bilan fag xromosomasining attP joyi o'rtasida joylashuvga xos kross-over rekombinatsiyasini o'z ichiga oladi. Bu jarayon fag va bakterial genomlar o'rtasidagi chegaralarda attL va attR joylarini hosil qiladi. Reaksiya qaytaruvchan, lekin Int va fagna xos bo'lgan ikkinchi chiqarish fermenti Xisning birgalikdagi harakatlarini talab qiladi. Bu tizim DNKni turli vektorlar orasida ko'chirishda ishlatilganda, mo'ljalidagi DNK lambda «att» ketma-ketliklari orasida joylashadi ($\text{attB} \times \text{attP} \leftrightarrow \text{attL} \times \text{attR}$; qarang: 4.7-rasm). Reaksiyaning kerakli yo'nalishi faqat Int yoki Int + Xis qo'shilishi orqali boshqariladi va hosil bo'lgan mahsulotlar *E. coli* klonlash xostiga transformatsiya qilinadi.

Kerakli mo'ljalidagi DNKni o'z ichiga olgan mo'ljalidagi plazmid antibiotikga qarshilik geni asosida tanlanadi. Ammo dastlabki mo'ljalidagi plazmidni tanlashning oldini olish uchun, att joylari orasidagi ketma-ketlik *E. coli* uchun halokatli bo'lgan toksinni kodlaydi.



bilan hosil qilingan.

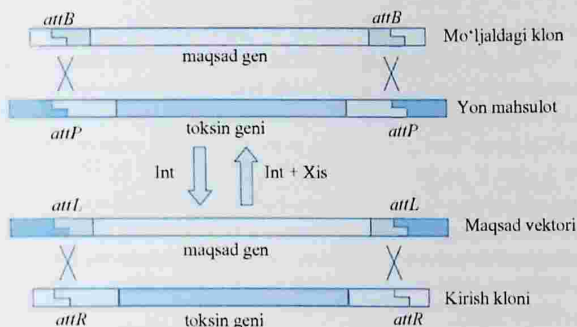
(d) PRC mahsuloti vektorga fosfodiester (fosfodiefir) birikma orqali ligatsiya qilinadi, mos ravishda 3' -PO₄ va 5' -OH guruhlari vektor va PCR mahsuloti uchlarida birikadi.

4.6-rasm. *Vaccinia* virusidan olingan DNK topoizomeraza I restriksiya endonukleazasi va ligaza faolliklariga ega bo'lib, DNK fragmentlarini klonlash uchun qo'llanilishi mumkin

(a) DNK topoizomeraza I 5' -CCCTT-3' ketma-ketligini taniydi.

(b) DNK topoizomeraza I belgilangan ketma-ketligidan darhol keyin bir ipli kesma hosil qiladi – bu yerda har bir ipda ma'lum ketma-ketlik mavjud bo'lib, ular bir-biriga qarama-qarshi joylashgan ikkita bir ipli kesma hosil qiladi. Ferment 274-pozitsiyadagi tirozin (Tyr) qoldig'i orqali kesilgan uchga kovalent tarzda birikib qoladi.

(c) Fosfor-tirozil bog' 5' uchidagi OH qoldig'i tomonidan hujumga uchraydi, bu PRC mahsuloti yordamida fosforlanmagan primerlar



4.7-rasm. Klonlangan DNKni an'anaviy subklonlash zaruriyatisiz turli vektorlarga ko'chirish mumkin

Tizim lambda fagingning sayt-spetsifik rekombinatsiya tizimidan foydalanadi. Maqsad DNK dastlab kirish kloni hosil qilish uchun kirish vektoriga klonlanadi. Kirish kloni DNKsi yakuniy vektor bilan aralashtiriladi va Int hamda Xis rekombinazalari aralashmasi qo'shiladi. Rekombinatsiya bir yo'nalishda sodir bo'lib, yuqori samaradorlik bilan yakuniy klon va qo'shimcha mahsulotni hosil qiladi. Xostga o'tkazilgandan so'ng, u toksin geni tomonidan kodlangan toksinga sezgir bo'ladi va yakuniy klonlar antibiotikga chidamlilik fenotipi asosida tanlab olinadi. Agar faqat Int reaksiya aralashmasiga qo'shilsa, reaksiya teskari bo'lishi mumkin. Bu holda turli vektorlarning rollari o'zgaradi va kirish va yakuniy klon o'rin almashadi.

4.4.4 Polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR) va uning qo'llanilishi

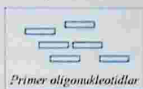
1980-yillar o'rtalarida kiritilganidan beri polimeraza zanjiri reaksiyasi (PCR) rekombinant DNK texnologiyasiga katta ta'sir ko'rsatdi. PCR deyarli har qanday DNK fragmentini kuchaytirishni osonlashtiradi. Hajmi taxminan 0,2 dan 40 kbit/s gacha. Kuchaytirish reaksiyasi siklik bo'lgani va har bir siklda DNK konsentratsiyasi ikki barobar ortib borishi sababli reaksiyadagi DNK ning umumiy miqdori eksponensial ravishda ortadi. Ko'paytirish reaksiyasi siklik bo'lganligi va har bir siklda DNK konsentratsiyasi ikki baravar oshganligi bois reaksiyadagi DNK miqdori eksponensial ravishda ortadi; har bir dastlabki shablon molekuladan nazariy hosila 20-sikldan keyin taxminan 10^6 molekulani, 30-sikldan keyin esa taxminan 10^8 molekulani tashkil qiladi. PCR uchun termostabil DNK polimeraza, shablon DNK, maxsus oligonukleotid primerlar jufti va deoksinnukleotid trifosfatlarning (ya'ni dATP, dCTP, dGTP va dTTP) to'liq to'plami kerak bo'ladi. PCR uchun oligonukleotid primerlar kimyoviy yo'l bilan sintez qilindi va ko'paytiriladigan hududni chegaralovchi ketma-ketliklarga komplementar bo'ladi. Primerlar odatda 20 ta nukleotiddan iborat bo'ladi. PCR ning muhim xususiyati shundaki, butun DNK ko'paytirish reaksiyasi ferment, shablon, primerlar va substratlarni o'z ichiga olgan bitta probirkada amalga oshiriladi. Har bir ko'paytirish sikli bog'lanish (annealing), uzaytirish (extension) va denaturatsiya reaksiyalarini o'z ichiga oladi, har biri har xil haroratda amalga oshiriladi (4.8-rasm).

Dissotsiatsiya reaksiyasi harorati 95 °C gacha yetishi mumkin va bitta PCR jarayonida 35 tagacha sikl bo'lishi mumkinligi sababli yuqori darajada termostabil DNK polimeraza PCR uchun asosiy talab hisoblanadi. Taq polimeraza Islandiyadagi issiq buloqlarda o'suvchi *Thermus aquaticus* arxe bakteriyasidan ajratib olingan va PCRda qo'llanilgan birinchi termostabil DNK polimeraza bo'lgan. Taq polimeraza 3' dan 5' gacha exonukleaza orqali xatolarni tuzatish (proofreading) funksiyasiga ega emas va shuning uchun noto'g'ri nukleotidlarni kiritish bo'yicha yuqori xato darajasiga ega. Biroq *Pyrococcus furiosus* kabi boshqa arxe bakteriyalardan olingan Pfu polimeraza kabi proofreading funksiyasiga ega termostabil DNK polimerazalar yaqinda joriy qilindi va ularni xato kiritish darajasi sezilarli darajada kamaytirilgan.

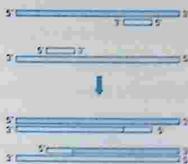
1-sikl, 1-qadam: denaturatsiya



2-qadam: annealing

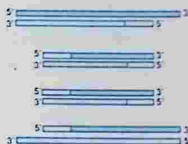


3-qadam: DNK sintezi
(primerning kengayishi)

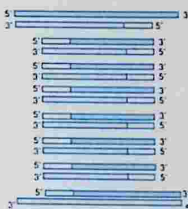


2-sikl: Denaturatsiya (1-qadam)
va annealing (2-qadam)dan so'ng

3-qadam: DNK sintezi
(primerning kengayishi)



3-sikl: Denaturatsiya (1-qadam)
va annealing (2-qadam)dan so'ng



Sikllar 20–35 marta takrorlanadi,
bu esa eksponensial ko'payishga
olib keladi.

4.8-rasm. Polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR)

Bu rasm annealing (primerlarning bog'lanishi), sintez (DNKni ko'paytirish) va denaturatsiya (iplarning ajralishi) reaksiyalarining siklik tabiatini ko'rsatadi. Mazkur jarayonlar avtomatik ravishda maxsus termosiklor (PCR qurilmasi) ichida amalga oshiriladi.

1-sikl, 1-qadam: denaturatsiya – 1-qadam: Ikki zanjirli DNKning denaturatsiyasi.

2-qadam: annealing – Primer oligonukleotidlar komplementar ketma-ketliklarga bog'lanadi.

3-qadam: DNK sintezi (primerning kengayishi) DNK polimeraza primerni kengaytirib, komplementar DNK zanjirlarini sintez qiladi.

2-sikl: Denaturatsiya (1-qadam) va annealing (2-qadam)dan so'ng DNK sintezi (primerning kengayishi).

3-sikl: Denaturatsiya (1-qadam) va annealing (2-qadam)dan so'ng DNK sintezi mo'ljaldagi DNK ketma-ketligining eksponensial ko'payishga olib keladi.

Sikllar 20–35 marta takrorlanadi, bu esa eksponensial ko'payishga olib keladi.

Polimeraza zanjir reaksiyasining birinchi bosqichi (4.8-rasm) ikki ipli DNK shablonini denaturatsiya qilish, ya'ni taxminan 95 °C gacha qizdirish orqali iplarni ajratishdir. Keyin reaksiya aralashmasi sovutiladi, bu esa oligonukleotid pri-

merlarining hosil bo'lgan bir ipli shablonlarga bog'lanishiga (annealing) imkon beradi. Bog'lanish harorati primer ketma-ketliklarining uzunligi va G+C tarkibiga bog'liq, ammo odatda 50–65 °C oralig'ida bo'ladi. Bog'lanish bosqichidan keyin harorat taxminan 70 °C gacha ko'tariladi, bu termostabil DNK polimerazalari uchun komplementar ipni sintez qilish uchun optimal harorat hisoblanadi. Denaturatsiya, bog'lanish va sintezdan iborat sikl odatiy PCR jarayonida 20–35 marta takrorlanadi. Taq polimeraza yordamida ko'paytirish mumkin bo'lgan fragmentlarning maksimal uzunligi taxminan 4 kbp bo'lsa-da, reaksiya tarkibiy qismlarini optimallashtirish va termostabil polimerazalar aralashmasidan foydalanish orqali endi uzunligi 40 kbp gacha bo'lgan DNK fragmentlarini ko'paytirish mumkin. PCR boshqa ko'plab maqsadlar uchun ishlab chiqilgan, jumladan DNK ketma-ketligini aniqlash, ma'lum nukleotid o'zgarishlarini kiritish (saytga yo'naltirilgan mutagenez), DNKni belgilash va chimerik genlar hosil qilish uchun DNK fragmentlarini birlashtirish. Bundan tashqari, oligonukleotid primerlarning 5' uchlari restriksiya endonukleazalarining nishon joylarini kiritish orqali PCR mahsulotlari kesilib, klonlash vektorining ma'lum joyiga ligatsiya qilinishi mumkin (4.5-bo'lim). Shuningdek, real vaqtli PCR (RT-PCR) muayyan genlarning ekspressiyasini aniqlash uchun tobora kengroq qo'llanilmoqda. mRNKni teskari transkriptaza (RNKga bog'liq DNK polimeraza) yordamida DNKga aylantirish va hosil bo'lgan nusxa DNKni RT-PCR yordamida miqdoriy aniqlash amalga oshiriladi. Real vaqtli ko'paytirish reaksiyalari floresan bilan belgilangan primerlardan foydalanib termosiklarda amalga oshiriladi, bunda yig'ilgan floresans signal kuzatiladi. Floresan modda inkorporatsiya qilinmagan primerda joylashgan bo'lib, u «so'ndirilgan» holatda bo'ladi (ya'ni juda kam floresans chiqaradi), ammo ikki ipli DNKga kiritilganda so'ndirilmagan holatga o'tadi. Reaksiyalar kapillyar naychalarda olib boriladi va ketma-ket PCR sikllarida hosil bo'lgan so'ndirilmagan floresans signal termosiklarga o'rnatilgan mikrohajmli florimetr orqali real vaqt rejimida o'lchanadi. RT-PCR jarayoni nihoyatda sezgir, aniq va qayta takrorlandigan hisoblanadi.

4.4.5 Transformatsiya va boshqa gen o'tkazish usullari

Bakterial hujayra xostiga begona DNKni kiritish qobiliyati rekombinant DNK texnologiyasining markaziy asosini tashkil etadi. Transformatsiya – bu ekzogen DNK xost hujayra tomonidan qabul qilinadigan jarayon bo'lib, klonlash maqsadlari uchun eng keng qo'llaniladigan gen o'tkazish texnikasi hisoblanadi. Ba'zi bakteriyalar tabiiy transformatsiya tizimlariga ega bo'lsa, boshqalari, masalan, *E. coli*, DNKni qabul qilishga layoqatli bo'lishi uchun kimyoviy oldindan ishlov berishni talab qiladi. Transformatsiya ko'pchilik klonlash maqsadlari uchun samarali bo'lsa-da, genomik kutubxonalar yaratish kabi ba'zi protseduralar uchun yetarli darajada samarali emas. Bunday holatlarda transformatsiya jarayonini chetlab o'tish uchun rekombinant DNKni in vitro virus zarrachalariga qadoqlash usulidan

foydalanish mumkin (4.5.2-bo'lim). Yaqinda bakteriyalarni yuqori kuchlanishdagi impuls yordamida DNKni qabul qilishga qodir ekanligi ko'rsatildi. Bu jarayon elektroporatsiya deb ataladi va bunda hujayralar va ekzogen DNK aralashmasi qisqa muddatli (odatda millisekund davomiyligidagi) 2500 voltgacha bo'lgan elektr impulsi ta'siriga qo'yiladi. Yuqori kuchlanish maydoni hujayra membranasida teshikchalar hosil bo'lishiga sabab bo'ladi, bu esa elektr gradienti tomonidan harakatga keltirilgan manfiy zaryadlangan DNKning hujayraga kirishini ta'minlaydi. Ko'p hollarda elektroporatsiya transformatsiyaga qaraganda samaraliroq va ba'zi bakteriya turlarini faqat mazkur protsedura yordamida transformatsiya qilish mumkin.

4.4.6 Rekombinantlarni tanlash va skrining qilish

Ko'pgina klonlash jarayonlaridan so'ng, kerakli gen yoki DNK fragmentini o'z ichiga olgan klonlarni ajratib olish uchun skrining o'tkazish zarur. Eng oddiy usul bu vektorni o'z ichiga olgan bakterial transformantlarni tanlashdir. Bu vektor tarkibiga antibiotikga qarshilik marker geni kiritish orqali amalga oshiriladi, shunda faqat vektor nusxasini olgan transformatsiyalangan bakteriyalar tegishli antibiotikni o'z ichiga olgan ozuqa muhitida o'sish qobiliyatiga ega bo'ladi. Rivojlangan tizimlar esa klonlangan insertni o'z ichiga olgan yoki olmagan vektorlarni farqlash imkonini beradi. Bu tizimlar begona DNKning kiritilishi natijasida ma'lum bir xususiyatni yo'qotishga olib keladigan gen buzilishi usullarini o'z ichiga oladi (4.5.4-bo'limga qarang).

Konkret gen yoki DNK fragmentini o'z ichiga olgan klonlarni aniqlash bevosita selektsiya usullari yoki bilvosita cheklovchi endonukleaza xaritalash, PCR yoki gibridizatsiya usullari yordamida amalga oshiriladi. Agar mo'ljaldagi gen ifodalanadigan bo'lsa, uning mavjudligi klonlash xostidagi nuqsonni to'ldirish orqali aniqlanishi mumkin (masalan, ma'lum bir substratdan foydalanish qobiliyatini yoki boshqa holatda zarur bo'lgan oziq moddalar yo'qligida o'sish qobiliyatini tiklash). Cheklovchi xaritalashda, vakil klonlardan olinadigan plazmid DNK ma'lum cheklovchi endonukleazalar yordamida hazm qilinadi. Faqat kerakli gen yoki DNK fragmentini o'z ichiga olgan klonlar agaroz geli elektroforezidan so'ng to'g'ri bantlar namunasi hosil qiladi. Biroq bu usul faqat skrining qilinadigan populyatsiyada mo'ljaldagi klonlar yuqori chastotada uchrashi ehtimoli mavjud bo'lganda amalda qo'llanadi. Diagnostik PCR, mo'ljaldagi DNK ketma-ketligiga xos oligonukleotid primerlar yordamida, kerakli gen yoki DNK fragmentini o'z ichiga olgan klonlarni aniqlash uchun ishlatiladi. PCR bevosita qayta ishlanmagan koloniya namunalari qo'llanilishi mumkinligi sababli, ko'plab klonlarni sinash imkonini beradi va jarayonni tezlashtiradi. (4.5.4-bo'limga qarang)

Agar mo'ljaldagi DNK klon populyatsiyasida past chastotada uchrasa (masalan, genomik kutubxona holatida, qarang: 4.5.5-bo'lim), katta miqdordagi klonlarni skrining qilish talab qilinadi. Bunday holatlarda eng samarali usul bir hujayradan o'suvchi bakterial koloniyalarni (yoki fag vektorlar holatida virus

plakatlarini) gibrizatsiya qilishdir. Koloniya yoki plakat gibrizatsiyasi maxsus DNK ketma-ketliklarini aniqlash uchun belgilangan nuklein kislota zondlari (DNK yoki RNK)dan foydalanadi. Jarayon quyidagicha amalga oshiriladi: Har bir transformant koloniya yoki plakatdan olingan biomassa membranaga ko'chiriladi. Hujayralar ochilishi orqali ajralib chiqqan denaturatsiyalangan DNK membrana-ga bog'lanadi. Membrana belgilangan zond (qarang: 4.4.7-bo'lim) bilan ishlov beriladi. Bu zond immobilizatsiyalangan mo'ljaldagi DNKga o'ziga xos tarzda bog'lanadi. Bu jarayon orqali klonlangan DNKni o'z ichiga olgan koloniyalar yoki plakatni aniqlashga imkon beradi. Mazkur usul katta populyatsiyadagi klon uchiroldigan klonlarni samarali aniqlash imkonini beradi.

4.4.7 Nuklein kislota zondlari va gibrizatsiya

Nuklein kislota zondlari maxsus mo'ljaldagi DNK molekularini aniqlash uchun ishlatiladi. An'anaviy usulda erituvchan zond mo'ljaldagi DNK bilan bog'lanadi, g'alt gibrizatsiya qiladi), bu DNK neylon, nitrotsellyuloza, shisha yoki kremniy kabi qattiq matrisaga immobilizatsiyalangan bo'ladi. Ammo, DNK massivlari (qarang: 4.4.3-bo'lim) holatida bu jarayon teskari tarzda amalga osha-di. Gibrizatsiya klonlangan DNKni aniqlash (4.4.6-bo'lim), genetik tuzilmani tahlil qilish va genetik kasalliklarni diagnostika qilish kabi bir qator biotexnologik qo'llanmalarin qo'llaniladi. Garchi nuklein kislota gibrizatsiyasi turli kontekst-lorda qo'llanilsa-da, uning asosiy tamoyillari bir xil bo'lib qoladi. Bu texnika bir zanjirli zond nuklein kislotalarining (DNK yoki RNK) boshqa mos kelmaydigan nuklein kislota molekulari populyatsiyasida komplementar bir zanjirli mo'ljal-dagi ketma-ketliklarga bog'lanish (annealing) qobiliyatidan foydalanadi.

Southern blotlash texnikasi, uning ixtirochisi *Ed Southern* nomi bilan ataladi. Bu usul quyidagilarni o'z ichiga oladi:

- cheklovchi endonukleazalar yordamida hazm qilingan DNK fragmentlarini gel elektroforezi orqali o'lchamlariga qarab ajratish;
- DNK fragmentlarini nitrotsellyuloza membranalariga blotlash (ko'chirish) orqali transfer qilish.

Zond nuklein kislota suvli eritma shaklida qo'llanadi va mos gibrizatsiya sharoitida immobilizatsiyalangan mo'ljaldagi DNKga bog'lanadi. Bog'langan zond nuklein kislotalarining joylashuvi osongina aniqlanadigan belgi yordamida ko'rsatiladi. Bu texnika mo'ljaldagi RNKni aniqlash uchun kengaytirilganda, u *Northern* blotlash deb nomlanadi (4.7.1-bo'lim).

Gibrizatsiya reaksiyalarida ishlatiladigan nuklein kislota zondlari bir zanjirli (ss) RNK yoki DNK molekulari shaklida bo'lishi kerak. Agar ikki zanjirli DNK ishlatilsa, gibrizatsiyadan oldin u denaturatsiya qilinishi talab qilinadi. Zondning vazifasi mo'ljaldagi ketma-ketliklarni aniqlash bo'lganligi sababli, uning o'zi ham oson aniqlanadigan bo'lishi kerak. An'anaviy usulda bu 32P yoki 35S kabi ra-dionuklidlarni zond tarkibiga kiritish orqali amalga oshiriladi. Bu zondlar keyin fotografik (masalan, rentgen) plyonka yordamida aniqlanadi.

So'nggi yillarda xavfsizlik va ifloslanish bilan bog'liq xavotirlar radionuklidlardan foydalanishni cheklashga olib keldi. Shu sababli, nuklein kislotalarni belgilash uchun biotin yoki digoksineninni o'z ichiga olgan nukleotid analoglaridan foydalanadigan usullar ishlab chiqildi. Bu usulda yuqori affinitetga ega ligand molekullari (masalan, biotin uchun streptavidin) ishlatiladi. Bu ligandlar peroksidaza yoki ishqoriy fosfataza kabi fermentlar bilan kemotraglangan bo'lib va gibrizatsiyadan so'ng zondni aniqlash uchun qo'llanadi. Aniqlash jarayoni fermentativ reaksiyaga asoslanadi:

- * Rangsiz xromogen substrat fermentativ parchalanayotganda rangli mahsulot hosil qilinadi.

- * Kimilyuminestsent substrat orqali yorug'lik hosil qilinadi. Bu esa radiatsionidlariga o'xshash tarzda fotografik plyonka yordamida aniqlanadi.

Agar mo'ljalidagi molekula RNK bo'lsa (masalan, Northern blotlari), gibrizatsiya reaksiyalarida RNK zondlari afzal ko'riladi. Bu zondlar in situ diametrida fag RNK polimerazasi yordamida sintez qilinadi. Jarayon quyidagicha analoga oshiriladi:

Maqsadli ketma-ketlikni yoki uning bir qismini kodlovchi DNK fragmenti mos fag promotorining orqasida klonlanadi.

Plazmid ajratib olinadi.

Fag RNK polimerazasi yordamida mo'ljalidagi nuklein kislotaga komplementar RNK transkripti sintez qilinadi.

Sintez reaksiyasi davomida, DNKni belgilashda bo'lgani kabi, radioaktiv nukleotidlar yoki nukleotid analoglari qo'llanadi.

4.4.8 DNKning massiv texnologiyasi

Mikrofabrikatsiya texnikalari yordamida yuqori zichlikda maxsus DNK zondlari shisha yoki kremniy substratiga biriktiriladi. Zondlar ikki turda bo'ladi:

- PCR mahsulotlari: mo'ljalidagi genning to'liq yoki bir qismini o'z ichiga oluvchi (ORFmer);

- oligonukleotidlar: 20 dan 70 nukleotid uzunlikka ega.

Odatda zondlar mustaqil ravishda sintez qilinadi va robot printeri yordamida massivga joylashtiriladi. Zamonaviy tizimlarda esa fotolitografiya yordamida zondlar joyida (in situ) sintez qilinadi. Zondlar zichligi texnologiyaga qarab o'zgaradi: 10 000 dan 500 000 gacha nuqta bir massivda joylashtiriladi. Mo'ljalidagi nuklein kislotaga markalash:

1. Mo'ljalidagi nuklein kislotaga odatda *fluorescent* bo'yoq bilan markalanadi.

2. Messenjer RNK (mRNK) teskari transkripsiya reaksiyasi davomida bo'yoq bilan markalanib, nusxa DNK (cDNA) hosil qilinadi.

3. Komplementar bo'yoqlar:

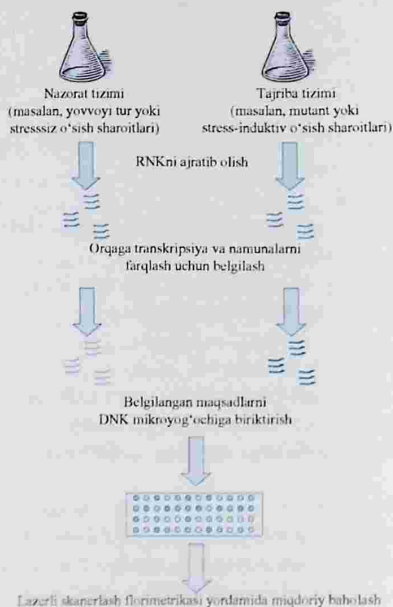
- Cy3 (yashil): 532 nm da qo'zg'atiladi, 557–592 nm oralig'ida aniqlanadi.

- Cy5 (qizil): 635 nm da qo'zg'atiladi, 650–690 nm oralig'ida aniqlanadi.

Laser-skanning florimetr yordamida signalni aniqlash va miqdorini baholash amalga oshiriladi. Bu ikki mustaqil manbadan olingan ma'lumotlarni bir massivda bevosita taqqoslash imkonini beradi.

4.4.9 DNK ketma-ketligini aniqlash

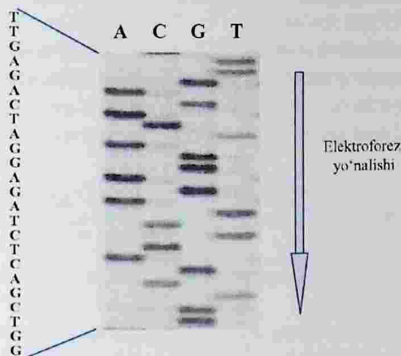
DNK ketma-ketligini aniqlash DNKni tahlil qilish va manipulyatsiya qilish uchun eng qudratli texnikalardan biridir. Mo'ljaldagi DNK molekullari va klonlash vektorlari ketma-ketliklarini bilish murakkab bakterial oqsil ishlab chiqarish tizimlarini yaratishning asosi hisoblanadi. Bu, shuningdek, maxsus zondlar yoki primerlarni loyihalash va kompyuter tomonidan yaratilgan transkripsiya va restriksiya xaritalarini yaratishni osonlashtiradi.



4.9-rasm. DNK massivlari yordamida tajriba tizimi va nazorat tizimi ifoda profilari solishtirish prinsipi

Maxam va Gilbert usuli DNK ketma-ketligini aniqlash uchun kimyoviy reagentlardan foydalanib, DNKni asosga xos ravishda kesib tashlashni amalga oshiradi. Garchi mazkur kimyoviy usul hali ham cheklangan dasturlarda qo'llanilsa-da, u odatda Sanger va uning hamkasblari tomonidan ishlab chiqilgan nozik zanjirni to'xtatuvchi usul bilan almashtirilgan. Sanger usuli *E. coli* DNK polimerazasi-

ning (Klenov fragmenti deb ataladigan varianti) yakkaolangan DNK andozasidan foydalanib, tabiiy dezoksinukleotidlar va 2', 3'-dideoksinukleotid analoglarini inkorporatsiya qilib, DNKning qo'shimcha zanjirini sintez qilish qobiliyatidan foydalanadi. Dideoksinukleotidlar 3'-pozitsiyada gidroksil guruhiga ega emas va shuning uchun zanjirning keyingi uzayishi uchun substrat sifatida ishlatilishi mumkin emas. Shu sababli, ularning inkorporatsiyasi DNK zanjiri sintezini to'xtatadi.



4.10-rasm. Sanger zanjirini to'xtatish usuli yordamida hosil qilingan DNK ketma-ketlik gelining bir qismi autoradiografiyasi

Yo'laklar to'xtatilgan nukleotidlarga muvofiq belgilangan: A – adenin, C – sitozin, G – guanin, T – timin. Gel tomonidan aniqlangan ketma-ketlik gelning chap tomonida ko'rsatilgan. Elektroforez yo'nalishi.

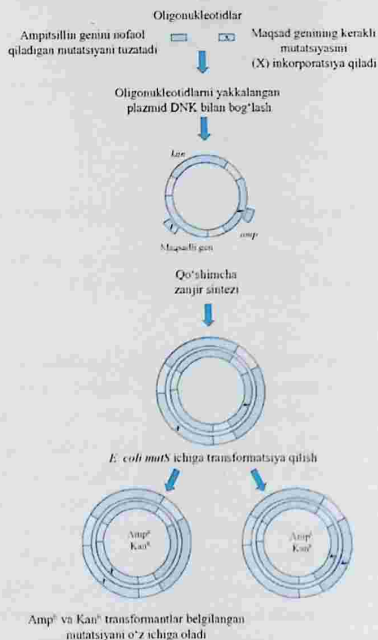
Zanjirni uzaytirish jarayonini boshlash uchun foydalaniladigan maxsus oligonukleotid primer yangi sintez qilingan DNK molekularining boshlang'ich nuqtasini belgilaydi. DNK polimeraza barcha to'rt dezoksinukleotid trifosfat substratlar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ishtirokida yakkaolangan DNK andozasidan DNK sintez qiladi, ulardan biri radioaktiv belgilanadi (masalan, (α -35S)-dATP). To'rtta alohida probirkada bir xil reaksiyalar amalga oshiriladi, ammo har bir probirkada to'rt dideoksinukleotid trifosfat analoglaridan biri (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) past konsentratsiyada mavjud bo'ladi. Tegishli nisbatdagi oddiy va dideoksinukleotidlar ishlatilganda, yangi sintez qilingan DNK zanjirlari har bir mumkin bo'lgan asos pozitsiyasida to'xtatiladi va barcha mumkin bo'lgan uzunlikdagi fragmentlar hosil bo'ladi. To'rtta reaksiya aralashmasining mahsulotlari denaturlovchi poliakrilamid gel elektroforezi orqali ajratiladi va autoradiografiya yordamida tahlil qilinadi. Hosil bo'lgan tasma naqshlari DNK ketma-ketligini to'g'ridan to'g'ri o'qishga imkon beradi (4.10-rasm).

Katta hajmdagi ketma-ketlik loyihalari talablarini qondirish uchun DNKni ketma-ketlik bo'yicha aniqlash texnologiyasi avtomatlashtirilgan. Bunga zanjir-

ni to'xtatish usulining formatini o'zgartirish orqali erishildi, bu DNK tasmlarini kapillyar poliakrilamid jellar ichida real vaqt rejimida aniqlashga imkon beradi va bunda fluorokrom bilan belgilangani substratlardan foydalaniladi. Mazkur texnologiya yordamida bir reaksiyadan 1000 tagacha asos o'qilishi mumkin va ma'lumotlar bevosita elektron formatda qayd etiladi.

4.4.10 Maxsus yo'naltirilgan mutagenez (Site-directed mutagenesis)

Maxsus yo'naltirilgan mutagenez – bu DNK ketma-ketligida nukleotidlarni maxsus o'rni almashtirish texnikasi bo'lib, genlar yoki gen mahsulotlarining faoliyatini tahlil qilish yoki o'zgartirish uchun ishlatiladi. Masalan, sanoat fermentlarining ko'p xususiyatlarini yaxshilash uchun maxsus aminokislotalarni o'rni almashtirishdan foydalanilgan.



4.11-rasm. Yo'naltirilgan mutagenez

Maxsus mutatsion o'zgarishlar oligonukleotid primerlarga kiritiladi, ular maqsad geni mavjud bo'lgan yakkalangan andozadan ikki zanjirli plazmid molekulasini tiklaydi. *E. coli* ichiga transformatsiya qilingandan so'ng, mutatsiyaga uchragan va yovvoyi turdagi plazmidlar avlodlar orasida ajralib chiqadi. Talab qilingan mutatsiyaga ega plazmidlar yangi olingan ampitsillin qarshiligiga asoslanib tanlab olinadi.

Mutatsion o'zgarishlar *in vitro* usullari yordamida DNKga kiritiladi va so'ng-
ra bakteriyaga qayta kiritiladi, bu yerda hosil bo'lgan fenotiplar kuzatiladi. Oligo-
nukleotid orqali nukleotidlarni maxsus o'zgartirish (site-directed mutagenesis) bu
maqsadga erishish uchun muhim vositadir, chunki u maqsadli DNK ketma-ketli-
giga juda aniq o'zgarishlarni kiritish imkonini beradi. Ko'plab metodologiyalar
ishlab chiqilgan bo'lsa-da, bunday mutagenezning prinsiplari odatda o'xshashdir.
Quyidagi jarayon bunga misol bo'la oladi (4.11-rasmga qarang):

Jarayon:

1. Maqsadli DNK plazmid vektoriga klonlanadi, bu vektor bir zanjirli DNKni
shakllantirish uchun replikasiya qilinadi (4.5.4-bo'limga qarang).

2. Vektor:

a) Maqsadli DNKdan tashqari, ikki xil antibiotikka qarshilik marker genlarini
o'z ichiga oladi.

b) Ampitsillinga qarshilik geni kiritilgan bir bazaviy o'zgarish tufayli faol emas.

3. Bir zanjirli plazmid DNK ikkita oligonukleotid primer bilan anneallangan
(birikkan):

a) Birinchi primer: maqsadli genning ketma-ketligiga komplementar, ammo
kerakli bazaviy o'zgarishni o'z ichiga olgan.

b) Ikkinchi primer: ampitsillinga qarshilik genining mutatsiyalangan qismiga
komplementar, ammo yovvoyi tipdagi (wild-type) gen ketma-ketligini tiklaydigan
o'zgarishni o'z ichiga olgan.

4. DNK polimeraza va DNK ligaza yordamida komplementar DNK zanjiri
sintez qilinadi.

Natijadan quyidgilardan iborat:

1. Ikki zanjirli plazmid ikkita maxsus o'zgartirilgan joyni o'z ichiga oladi:

- Ampitsillinga qarshilik genidagi mutatsiyani tiklash;
- Maqsadli genni kerakli o'zgarish bilan o'zgartirish.

2. Bu plazmid *E. coli* ga transformatsiya qilinadi.

• Mismatch repair tizimi buzilgan (masalan, mutS mutant) bakteriyadan foyda-
laniladi, bu esa xost tomonidan mos kelmagan bazalarning tuzatilishini oldini oladi.

3. Replikatsiyadan so'ng har bir zanjir yangi ikki zanjirli molekulani hosil qiladi:

- Bittasi oligonukleotidlar tomonidan kiritilgan o'zgarishlarni o'z ichiga oladi;
- Boshqasi asl plazmidga identik bo'ladi.

Ampitsillinga qarshilik fenotipi orqali kerakli mutatsiyani o'z ichiga olgan
plazmidga ega hujayralar tanlab olinadi.

4.5 Klonlash vektorlari va kutubxonalar

Klonlash vektori – bu bakteriya mezbon hujayrasida replikasiya qilinishi
uchun yo'lovchi DNK klonlanadigan DNK molekulasidir. Vektor va yo'lovchi
DNK ligatsiya orqali kovalent bog'lanadi (4.4.3-bo'lim). Klonlash vektorlarining
to'rtta asosiy xususiyati mavjud:

1. U mezbzon bakteriyaga transformatsiya yoki *in vitro* qadoqlash orqali fag infeksiyasi orqali oson kiritilishi kerak;

2. Mezbzon bakteriyada replikatsiya qila olishi kerak, imkonni boricha vek-torning nusxalari (nusxa soni) mezbzon xromosomaga nisbatan 50 dan 200 gacha bo'lishi kerak;

3. Har xil restriksiya endonukleazalari uchun unikal joylarni o'z ichiga olishi kerak;

4. Mezbzon hujayralarda vektor nusxasi borligini tanlash yoki ko'rish uchun vosita kodlashi kerak.

Klonlash vektorlar tabiiy ravishda mavjud DNK molekulalaridan, masalan, plazmidlar va faglardan olingan bo'lib, ular mezbzon xromosomadan mustaqil ra-vishda replikatsiya qilishga qodir. Ma'lum bir ilovalar uchun turli xil klonlash vektorlari ishlab chiqilgan va ularning qisqacha tavsifi quyida keltirilgan.

4.5.1 Umumiy mo'ljaldagi plazmid vektorlari

Umumiy maqsadli plazmid vektorlar odatda kichik DNK fragmentlarini (<10 kbp) klonlash uchun mo'ljallangan bo'lib, odatda *E. coli*ga kiritiladi. Bu vektorlar bakterial xostga transformatsiya orqali kiritiladi va transformantlar vektorga asos-langan antibiotikga qarshilik geni yordamida tanlab olinadi. Zamonaviy umumiy maqsadli vektorlarda maxsus mo'ljallangan ko'p klonlash joylari (MCS) mavjud bo'lib, ular turli unikal cheklovchi joylarni o'z ichiga oladi. Klonlangan DNK fragmentlarini aniqlash tizimlari: Umumiy maqsadli vektorlar klonlangan DNK fragmentining mavjudligini aniqlash uchun oson kuzatiladigan fenotip yo'qotili-shiga asoslangan tizimlarni o'z ichiga oladi.

Umumiy maqsadli vektorlar odatda klonlangan DNK fragmentining mavjud-ligini aniqlash uchun osongina kuzatiladigan fenotipning yo'qolishiga asoslangan tizimni o'z ichiga oladi. Eng ko'p ishlatiladigan tizim lacZ geniga asoslangan bo'lib, u *E. coli* β -galaktozidaz fermentining N-terminusidagi α -peptidni kodlaydi. Vektor tarkibidagi bu gen tomonidan α -peptid sintez qilinadi va mezbzon xromo-somasi tomonidan kodlangan, faol bo'lmagan ferment bilan birlashadi (komple-mentatsiya qiladi). Natijada faol β -galaktozidaz fermenti hosil bo'ladi. Bu ferment rangsiz xromogen substrat 5-bromo-4-xloro-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal) dan ko'k rangli xromofor ajratib olish qobiliyati bilan aniqlanadi. Agar DNK frag-menti α -peptidni kodlaydigan genning vektor ichidagi qismiga klonlansa, faol β -galaktozidaz fermenti hosil bo'lmaydi. Agar selektiv agar plastinkalariga X-gal qo'shilsa, transformatsiyalangan koloniyalar quyidagicha bo'ladi:

- vektorda klonlangan DNK yo'q bo'lsa: koloniyalar ko'k rangda bo'ladi;
- vektorda klonlangan DNK mavjud bo'lsa: koloniyalar oq rangda bo'ladi.

Bu aniqlash tizimi zamonaviy vektorlarning bir necha turlarida, jumladan, fag vektorlari tarkibida ham ishlatiladi. Fag vektorlari natijasida ko'k yoki oq plakatl-ar hosil bo'ladi. Eng keng qo'llaniladigan umumiy maqsadli plazmid vektorlar pUC seriyasi vektorlaridir (qarang: 4.12-rasm).

4.5.2 Bakteriofag va kosmid vektorlari

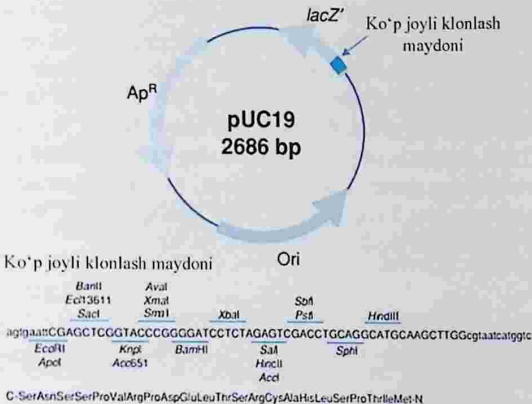
E. coli ni yuqtiruvchi bakteriofag lambda (λ) klonlash uchun eng ko'p ishlatiladigan fag vektorlariga asos bo'lib xizmat qilgan. Lambda, odatda, umumiy maqsadli plazmid vektorlari yordamida osongina klonlanmaydigan katta DNK fragmentlarini (>10 kbp) klonlashda eng qimmatli hisoblanadi. Lambdaning genomini tashkil etuvchi chiziqli ikki zanjirli DNK (dsDNA) taxminan 48,5 kbp hajmda bo'lib, har ikki uchida 12 ta nukleotidli bir zanjirli 5' proyeksiyalari mavjud. Bu proyeksiyalar *E. coli* da lambdaning halqasimon shaklga o'tishini osonlashtiradi. Bu halqasimon shaklni hosil qiluvchi joy (cos) – joy (cohesive ends) deb ataladi. Lambdaning klonlash vektorlari sifatida rivojlantirilishida:

1. Muhim bo'lmagan genlar olib tashlangan, bu esa 23 kbp gacha bo'lgan DNK fragmentlarini joylashtirish uchun joy yaratgan.

2. Fag genomining faqat mezonni yuqtirgandan keyin halqasimonlanishi tufayli, lambda vektorlarini «chap» va «o'ng» qo'llar sifatida alohida taqdim etish mumkin.

- Har bir qo'lning bir uchida mos cheklovchi endonukleaza joyi mavjud bo'ladi.
- Rekombinant DNK bu qo'llar orasiga klonlanadi (4.13-rasm).

Lambda molekularining *E. coli* ga transformatsiyasi: Lambda molekularini *E. coli* ga transformatsiya qilish nisbatan samarasiz bo'lib, bu esa *in vitro* fag qadoqlash tizimlarining rivojlanishiga olib keldi. Bu tizimlar lambda rekombinant genomlarini bakterial xostlarga samarali yetkazib berish imkonini beradi.



4.12-rasm.

Umumiy mo'ljaldagi pUC19 plazmid klonlash vektori pUC plazmid vektorlar seriyasiga kiradi. pUC vektorlari juftlikda yaratilgan bo'lib, ular faqat ko'p joyli klonlash maydonining (MCS) joylashuv yo'nalishi bilan farq qiladi. Bu yo'nalish DNK fragmentining *lacZ* genining transkripsiyasi bilan bir xil yo'nalishda yoki qarama-qarshi yo'nalishda joylashishini ta'minlaydi.

lacZ, ampitsillin-qarshilik (**Ap^R**) va replikatsiya oqsili (**Ori**) genlaridagi strelkalar transkripsiya yo'nalishini ko'rsatadi. Ko'p joyli klonlash maydonining nukleotid ketma-ketligi (katta harflar bilan yozilgan) va qo'shni ketma-ketliklar (kichik harflar bilan yozilgan) ko'rsatilgan bo'lib, ular restriksiya endonukleazalari mo'ljaldagi joylarini va tarjima qilingan aminokislotalarni o'z ichiga oladi.

Mazkur xususiyatlar pUC vektorlarini DNK klonlashda yuqori moslashuvchanlik va samardorlikni ta'minlovchi qulay vositaga aylantiradi.

Diagramma:

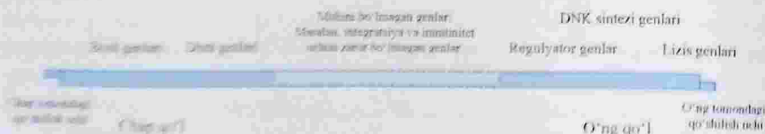
- pUC19 – 2686 bp uzunlikdagi plazmid vektori.
- lacZ' – β -galaktosidaza genining α -peptid qismi, klonlangan DNK mavjudligini aniqlash uchun ishlatiladi.
- Polylinker multiple cloning site (MCS) – ko'p joyli klonlash maydoni, restriksiya fermentlari uchun turli xil joylarni o'z ichiga oladi.
- Ap^R (Ampicillin resistance) – ampicillinga qarshilik geni, antibiotik seleksiyasi uchun ishlatiladi.
- Ori (Origin of replication) – replikasiya boshlanish joyi, plazmidning bakteriya ichida ko'payishini ta'minlaydi.

Ko'p joyli klonlash maydoni: Restriksiya fermentlari tomonidan tanib olinadigan saytlar ketma-ketligi (masalan, *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* va boshqalar). Bu joylar klonlanadigan DNK fragmentlari uchun ishlatiladi.

Nüfuzlülük ve aminokislotlar kesme-kediliği:

- Nukleotid ketma-ketligi: Ko'p joyli klonlash maydoni ichidagi DNK ketma-ketligi.
- Aminokislota ketma-ketligi: Nuklar ketma-ketlikka mos keluvchi oqsil kodlash.
- Nuklar o'zligi: asosan, kichik DNK fragmentlarini klonlash uchun ishlatiladi.

Kosmid vektorlar plazmid klonlash vektorining afzalliklarini (masalan, klonlash va ko'paytirishning qulayligi) fag vektorining yuqori samaradorlikdagi yetkazib berish va katta hajmdagi DNK klonlash qobiliyati bilan birlashtiradi. Kosmidlar plazmid va fag alarida lambda genomida odatda uchraydigan cos joyining nusxasi mavjud. Cos joyining mavjudligi mazkur plazmidlardan lambda *in vitro* qadoqlash tizimi bilan birgalikda foydalanishga imkon beradi. Bu shuni anglatadiki, kosmid DNK molekullari yo'lovchi DNKning katta fragmentlari bilan birga mos *E. coli* mezoniga samarali tarzda kiritilishi mumkin. Kosmid vektorining o'z ichida atigi taxminan 5 kbp hajmga ega bo'lganligi sababli, taxminan 32-47 kbp hajmdagi fragmentlar fagda joylashtirilishi mumkin.



4.13-rasm. Lambda fagi soddalashtirilgan xaritasi, unda chap va o'ng «qo'llar hamda λ asosidagi klonlash vektorlari uchun olib tashlangan muhim bo'lmagan markaziy qism ko'rsatilgan

Diagramma mazmuni:

- Chap tomondagi qo'shilish uchi: Fag DNKning chap uchi.
- Chap qo'l
- Bosh genlari: Fag boshining shakllanishi uchun mas'ul genlar.
- Dum genlari: Fag dumining shakllanishi uchun mas'ul genlar.
- Muhim bo'lmagan genlar: Masalan, integratsiya va immunitet uchun zarur bo'lmagan genlar.
- O'ng qo'l
- DNK sintezi genlari: DNK sintezi uchun mas'ul genlar.
- Regulyator genlar: Gen ifodasini boshqaruvchi genlar.
- Lizis genlari: Hujayra lizisi (bakteriyaning yorilishi) uchun mas'ul genlar.
- O'ng qo'shilish uchi: Fag DNKning o'ng uchi.

Bu diagramma lambda fagi DNK strukturasi va undagi genlarning funksional taqsimlanishini tasvirlaydi. Chap va o'ng «qo'llar» fagning klonlash uchun foydalaniladigan qismlaridir, o'rtadagi muhim bo'lmagan genlar esa DNK fragmentlarini joylashtirish uchun olib tashlanishi mumkin.

Qadoqlangan kosmid DNK bakteriya hujayrasiga lambda DNKsi kabi yuboriladi, bu yerda u aylana shakliga kirib, plazmidning replikasiya funksiyalaridan foydalanib replikasiya qilishni boshlaydi.

4.5.3 Bakterial sun'iy xromosomalar

Bakterial sun'iy xromosomalar (*Bacterial Artificial Chromosomes*) yoki pBAClar, bu yerda «p» «plazmid» degan ma'noni anglatadi) juda katta (>50 kbp) DNK ketma-ketliklarini klonlash uchun ishlab chiqilgan. BAC vektorlaridan *E. coli* ning F plazmidiga asoslangan bo'lib, 300 kbp gacha bo'lgan DNK fragmentlarini qabul qila oladi. pBAClar *E. coli* da bitta nusxali plazmid sifatida saqlanadi, bu bir xil mezbon hujayrada bir nechta pBAClarning replikasiyasi mumkin bo'ladi. Bakterial genomlarning tartibli pBAC kutubxonalari yaratilish maqsadida, bunda butun genom ketma-ketligi qisman bir-birini qoplovchi kiritmalar bilan klonlar seriyasi orqali ifodalanadi.

4.5.4 Maxsus mo'ljaldagi vektorlar

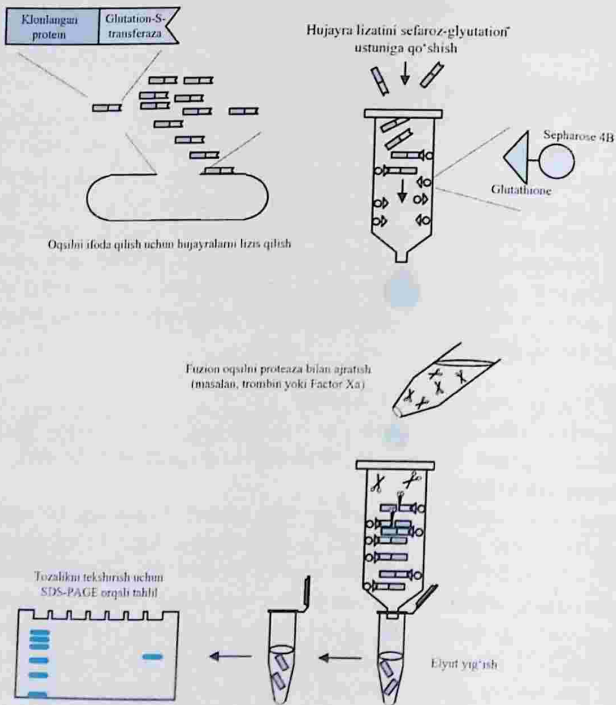
Yuqorida ta'riflangan vektorlardan tashqari, turli xil maxsus mo'ljaldagi vektorlar ishlab chiqilgan. Ularning ba'zilari quyida qisqacha tasvirlangan.

Ekspressiya vektorlari

Ekspressiya vektorlari maqsad genning yuqori darajadagi, boshqariladigan ifodasi uchun ishlab chiqilgan bo'lib, oqsil mahsuloti hujayraning umumiy oqsilining 40% gacha bo'lgan konsentratsiyasida hosil bo'ladi. Ekspressiya vektorlari ko'pincha oqsilni affinitetli xromatografiya yordamida ajratib olishni osonlashtiruvchi affinitet tegi tizimini o'z ichiga oladi. Ekspressiya vektorlari asosan plazmid asosida bo'ladi va ko'pincha qattiq boshqariladigan va yuqori samarali fag T7 RNK polimeraza genini ifodalash tizimidan foydalanadi. Mo'ljaldagi gen T7 tomonidan olingan transkripsiya (promotor) va translyatsiya (ribosoma bog'lanish

joyi) boshqaruv signallari pastida klonlanadi. Vektor *E. coli* mezboniga transformatsiya qilinadi, unda T7 RNK polimerazasini kodlaydigan gen xromosomada joylashgan. Polimeraza genini yoqish mo'ljaldagi genning yuqori darajada sintez qilinishiga olib keladi.

Agar mo'ljaldagi gen affinitet tegi bilan biriktirilmagan bo'lsa, oqsilni ajratib olish qimmat metodologiyalardan foydalanishni talab qiladi. Ammo so'nggi yillarda yuqori o'ziga xos tozalash protokollarini ta'minlaydigan bir qator affinitet teglari tizimlari ishlab chiqilgan. Turli xil teglar ishlatilgan, jumladan, nikellarga bog'lanadigan oltita ketma-ket gistidin qoldiqlari (6×His) tegi va glyutation-S-transferaza, glyutationga bog'lanadigan teg. Ligand erimaydigan qatron bilan biriktiriladi va biriktirilgan fuzion oqsil qatron bilan bog'langan ligandni o'z ichiga olgan xromatografiya ustuni orqali o'tkazish orqali ajratib olinadi (4.14-rasm). Bog'langan fuzion oqsil deyarli toza oqsil sifatida elyutsiya qilinadi va affinitet tegi kimyoviy ishlov berish yoki proteaza yordamida ajratib tashlanadi.



4.14-rasm.

1. Oqsillarni tozalashda affinitet tegi sifatida glyutation-S-transferaza (GST) dan foydalanish. Mo'ljalldagi oqsil GST bilan N-terminal fuzion shaklida sintezlanadi. Ishlab chiqaruvchi hujayralar lizis qilinadi va mo'ljalldagi oqsil/GST fuzioni sefarozy-glyutation ustunida ushlanadi. Keng ko'lamlı yuvish jarayonidan so'ng, mo'ljalldagi oqsil GST qismidan proteaza yordamida ajralib chiqadi va ustundan chiqariladi. Klonlangan oqsil:

- a) Glutation-S-transferaza (GST) bilan bog'langan mo'ljalldagi oqsil;
 - b) Oqsilni ifoda qilish uchun hujayralar lizis qilinadi.
 2. Hujayra lizatini sefarozy-glyutation ustuniga qo'shish:
 - a) Hujayra lizati ustunga qo'shiladi;
 - b) Sepharose 4B ustunida glyutation joylashgan bo'lib, u GST bilan bog'lanadi.
 3. Fuzion oqsilni proteaza bilan ajratish: Mo'ljalldagi oqsil GSTdan saytga xos proteaza (masalan, trombin yoki Factor Xa) yordamida ajratiladi.
 4. Elyutni yig'ish: Oqsil ajratilgandan so'ng, ustundan chiqarib olinadi.
 5. SDS-PAGE yordamida tahlil: Oqsilning tozaligi SDS-PAGE yordamida tekshiriladi.
- Diagramma oqsillarni glutation-S-transferaza yordamida tozalash va tahlil qilish jarayonini ko'rsatadi.

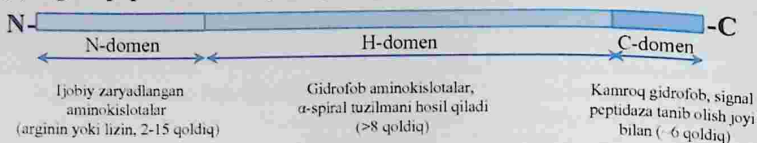
Sekretsıya vektorlari

Hozirgi kunda rekombinant oqsillarni ishlab chiqarish tizimlarining aksariyati mahsulotning hujayra ichida to'planishiga olib keladi. Ammo hujayra ichida to'planish ishlab chiqarish darajalarining pasayishi, oqsil agregatsiyasi, proteoliz va biologik faollikning doimiy yo'qolishiga olib kelishi mumkin (4.9.4-bo'lim). Buni ba'zan mo'ljalldagi oqsilni to'g'ridan to'g'ri o'suv muhitiga sekretsıya qilish orqali bartaraf etish mumkin, chunki sekretsıya qilingan oqsillar odatda yuqori konsentratsiyalarda to'planishi va to'g'ri yig'ilishi mumkin. Oqsilning o'suv muhitiga sekretsıya qilinishi uchun u sitoplazmatik membranada joylashgan sekretsıya apparatiga yo'naltirilishi kerak. Buning uchun sekretsıya vektori ishlatiladi (4.15-rasm), bunda mo'ljalldagi oqsil N-terminal signal peptid bilan fuzion oqsil sifatida sintez qilinadi. Signal peptid oqsilni membranada joylashgan sekretsıya transloziga yo'naltiradi. Translokatsiyadan so'ng, signal peptid hujayra membranasining tashqi yuzasida joylashgan signal peptidaza tomonidan kesilib tashlanadi. Mazkur yondashuv oqsilning samarali sekretsıyasini va to'g'ri yig'ilishini ta'minlaydi, bu esa oqsilning sifatini va ishlab chiqarish hajmini oshirishga yordam beradi.

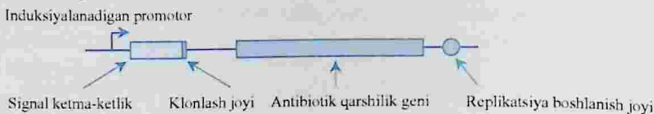
Shuttle yoki bifunksional vektorlar

Mikrobial genetika sohasidagi tezkor rivojlanishlar va klonlash vektorlarini ishlab chiqish orqali hozirda turli xil mikroorganizmlar genomlarini manipulyatsiya qilish imkoniyati mavjud bo'ldi.

(a) Signal peptid tuzilishi (~25 qoldiq):



(b) Sekretsia vektori:



(c) Kiritma bilan sekretsia vektori:



4.15-rasm. Sekretsia vektorining xususiyatlari

(a) Signal peptid tuzilishi (~25 qoldiq):

E. coli signal (yoki lider) peptidining tipik tuzilishi, oqsilni sitoplazmatik membrana orqali yo'naltirish uchun zarur.

- N-domen: Ijbiy zaryadlangan aminokislotalar (arginin yoki lizin, 2-15 qoldiq).
- H-domen: Gidrofob aminokislotalar, α -spiral tuzilmani hosil qiladi (>8 qoldiq).
- C-domen: Kamroq gidrofob, signal peptidaza tanib olish joyi bilan (~6 qoldiq).

(b) Sekretsia vektori:

Signal ketma-ketligidan darhol keyin joylashgan klonlash joyi bilan sekretsia vektori tuzilishi.

- Induksiyanadigan promotor: gen ifodasini boshqaradi.
- Signal ketma-ketlik: oqsilni sekretsia apparatiga yo'naltiradi.
- Klonlash joyi: DNK kiritilishi uchun mo'ljallangan.
- Antibiotik qarshilik geni: seleksiya uchun ishlatiladi.
- Replikatsiya boshlanish joyi (Replication origin): vektor replikatsiyasini boshqaradi.

(c) Kiritma bilan sekretsia vektori:

Sekretsia vektori, bunda mo'ljaldagi oqsilning DNK ketma-ketligi signal ketma-ketlikdan keyin bir xil ramkada biriktirilgan.

- Mo'ljaldagi gen ketma-ketligi: Signal ketma-ketlik bilan birga ramkada biriktirilgan.

Diagramma mo'ljaldagi genni ifodalash va sekretsia qilish uchun signal peptid va sekretsia vektori tuzilishini ko'rsatadi.

Biroq ko'pgina hollarda transformatsiya samaradorligi juda past bo'lib qoladi va ko'pincha *E. coli* ni oraliq klonlash mezboni sifatida ishlatish maqsadga muvofiq bo'ladi. Buni *E. coli* va mo'ljaldagi mikroorganizmdagi replikatsiya uchun mos bo'lgan replikatsiya boshlanish joylariga ega shuttle yoki bifunksional vektor

yordamida amalga oshirish mumkin. Yaqinda ayrim plazmidlarning keng mezbon diapazonli replikasiya funksiyalariga ega ekanligi aniqlangan va ular yangi avlod shuttle plazmidlarini ishlab chiqishda ishlatilgan.

Bir zanjirli fag va fagmid vektorlar

Ba'zan bir zanjirli DNKni yaratish zarur bo'ladi, ayniqsa, DNK ketma-ketligini aniqlash va oligonukleotid yo'naltirilgan mutagenез uchun. Messing *E. coli* ning bir zanjirli DNK filamentli fagi M13 asosida vektorlar seriyasini ishlab chiqdi. M13 vektorlarining mp seriyasi β -galaktozidazaning α -peptid fragmentini kodlaydigan gen ichida ko'p joyli klonlash maydonini o'z ichiga oladi. Shuning uchun, ular klonlangan kiritmalarni aniqlash uchun ko'k/oq blyashka selektsiyasiga mos keladi (4.5.1-bo'lim).

M13 asosidagi vektorlar *E. coli* ning F+ shtammlariga F pilus orqali yuqadi. Klonlash maqsadlari uchun faganing ikki zanjirli replikativ shakli ishlatiladi.

Fagmidlar – bu bir zanjirli DNK fagi (*ssDNA phage*) uchun replikasiya boshlanish joyini o'z ichiga olgan plazmidlardir (4.16-rasm), odatda M13 bilan yaqin aloqador bo'lgan fl fagi replikasiya boshlanish joyiga ega. *Escherichia coli* fagmidni plazmid replikasiya boshlanish joyi orqali ikki zanjirli DNK sifatida saqlashi mumkin. Ammo agar hujayra yordamchi fl fag bilan yuqtirilsa, fl replikasiya boshlanish joyi faollashadi va vektor bir zanjirli DNKni ishlab chiqarish rejimiga o'tadi. Mazkur bir zanjirli DNK mezbon hujayradan chiqarilganda faganing zarachalariga qadoqlanadi.

Integratsiya vektorlari

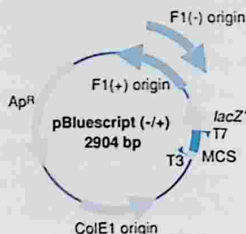
Integratsiya vektorlari o'zlarining to'liq yoki qisman qismini mezbon bakteriya xromosomasiga integratsiya qilish uchun mo'ljallangan. Ular genlarni past nusxa sonlarida klonlash, kiritish mutatsiyalarini hosil qilish, genlarni almashtirish va gen birikmalarini yaratish kabi turli xil aniq maqsadlar uchun ishlatiladi. Integratsiya vektorlari odatda mo'ljaldagi mezbonda replikasiya qila olmaydigan yoki haroratga sezgir replikasiya funksiyalariga ega plazmidlarga asoslanadi.

Integratsiya plazmid va mezbon xromosomasidagi homologik DNK ketma-ketliklari yordamida bir yoki ikki marta kross-over rekombinatsiyasi orqali amalga oshadi. Bir marta kross-over rekombinatsiyasi, «Kembell-tip integratsiyasi» deb ham ataladi, unda vektor butunlay mezbon xromosomasiga integratsiya qilinadi. Integratsiya mezbon va vektordagi homologik hududlar orasidagi kross-over orqali amalga oshadi. Integratsiya chastotasi mezbonga bog'liq bo'lib, mezbonni vektor bilan birga bir necha avlod davomida o'stirish kerak bo'lishi mumkin. Bu transformantlarni vektor replikasiyasiga ruxsat beruvchi haroratda bir necha avlod davomida o'stirish orqali amalga oshiriladi. Integratsiya qilingan holatlarni tanlash haroratni ruxsat berilmaydigan darajaga ko'ta-

rish va vektor tomonidan kodlangan antibiotikka qarshilik fenotipi orqali amalga oshiriladi.

Integratsiya hodisasi aniqligini maxsus diagnostik PCR orqali tasdiqlash mumkin, bunda primer juftlar qo'llaniladi: biri xromosomal DNKga xos bo'lib, kiritmaga qarama-qarshi yo'nalishda, ikkinchisi kiritmaga xos bo'lib, qo'shni DNKga qarama-qarshi yo'nalishda joylashadi.

Bir marta kross-over natijasi mo'ljaldagi genning homologik fragmenti vektorga klonlanganiga bog'liq. Agar fragment to'liq genni o'z ichiga olsa, xromosomada ikki funksional nusxa mavjud bo'ladi (4.17a-rasm). Agar fragment genning bir yoki boshqa qismi bilan chegaralangan bo'lsa, xromosomada bir funksional nusxa va bir o'chirilgan nusxa mavjud bo'ladi (4.17b-rasm). Agar fragment genning ichki ketma-ketliklarini o'z ichiga olsa, integratsiyadan keyin xromosomada funksional nusxa qolmaydi (4.17c-rasm).



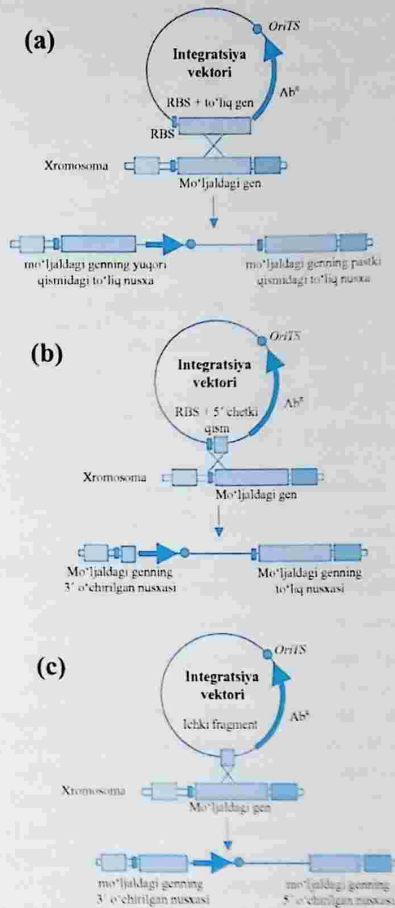
4.16-rasm.

- pBluescript (-/+) 2904 bp
- Ap^R: Ampitsillin-qarshilik geni
- F1(+) boshlanish joyi: Ijobiy zanjir uchun replikasiya boshlanish joyi
- F1(-) boshlanish joyi: Salbiy zanjir uchun replikasiya boshlanish joyi
- lacZ': β -galaktozidaza genining bir qismi
- T7: T7 promotori
- T3: T3 promotori
- MCS: Ko'p joyli klonlash maydoni
- ColE1 boshlanish joyi: Plazmidning replikasiya boshlanish joyi

Fagmid pBluescript – bir zanjirli DNK molekularini ishlab chiqarish uchun ishlatiladigan plazmid vektori. Fagmidni o'z ichiga olgan hujayralar fl yordamchi fagi bilan yuqtiriladi, bu esa fl replikasiya boshlanish joyini faollashtiradi va bir zanjirli DNKni hosil qiladi. Mazkur DNK fag zarraçhalariga yig'iladi va bakteriyadan chiqariladi.

pBluescript ning ikki versiyasi mavjud: (+) yoki (-) hosilalari, bu talabga qarab ijobiy yoki salbiy zanjirning replikasiyasini ta'minlaydi. Ko'p joyli klonlash maydoni ikki tomonida joylashgan T3 va T7 promotorlari bir zanjirli DNKni kognat RNK polimeraza va NTP substratlari yordamida in vitro RNK sintezi uchun substrat sifatida ishlatishga imkon beradi.

Ampitsillin-qarshilik geni (Ap^R) fagmidni *E. colida* tanlash va saqlash uchun ishlatiladi.



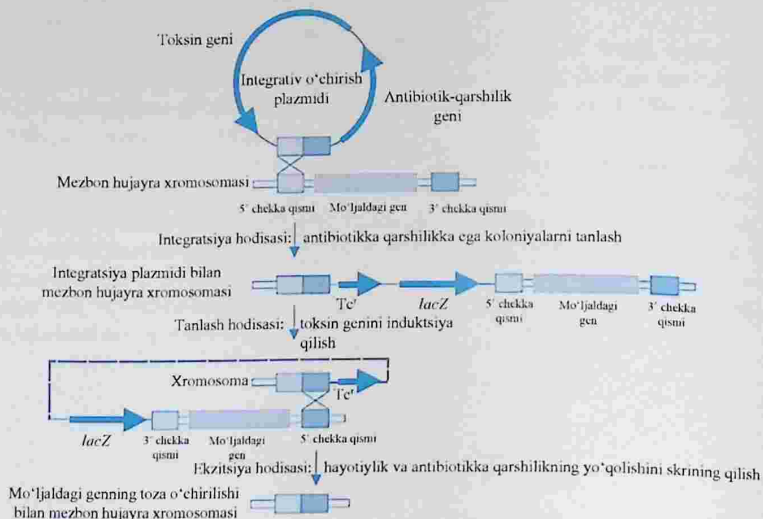
4.17-rasm.

Bir marta kross-over rekombinatsiyasi natijalari integratsiya vektori va turli gen fragmentlaridan foydalangan holda:

- (a) Ribosoma bog'lanish joyini o'z ichiga olgan butun gen fragmenti.
- (b) 5' flanking (chetki) hudud va bog'liq ribosoma bog'lanish joyi.
- (c) Ichki gen fragmenti.

Izohlar:

- Ab^R: Antibiotik-qarshilik geni.
- OriTS: Haroratga sezgir replikatsiya boshlanish joyi.
- RBS: Ribosoma bog'lanish joyi.

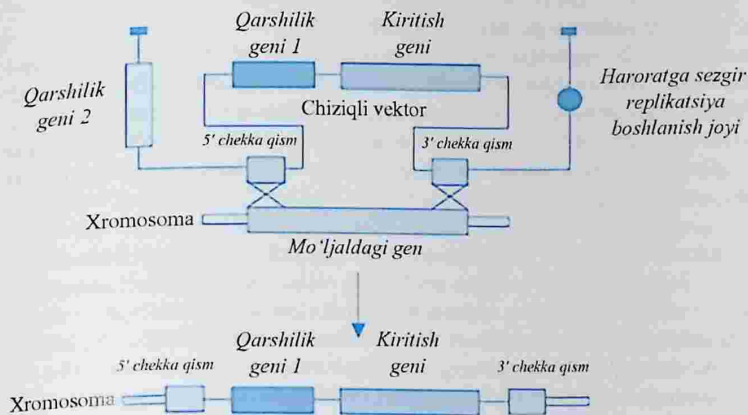


4.18-rasm. Induksiyalanadigan manfiy seleksiya tizimini kodlaydigan integratsiya vektori yordamida «toza» xromosoma o'chirishlarini yaratish.

Birlamchi yoki ikkilamchi kross-over rekombinatsiyadan foydalanish: «Toza» o'chirish va allelni almashtirish sanaladi. «Toza» o'chirish – bu maqsadli ketma-ketliklarni xromosomadan olib tashlash uchun ishlatiladigan usul bo'lib, bunda ketma-ketliklar marker gen bilan almashtirilmaydi (4.18-rasm). Flanklashuvchi ketma-ketliklarning klonlanishi: Maqsadli genning flanklashuvchi ketma-ketliklari integratsiya vektoriga klonlanadi. Kross-over rekombinatsiya: Transformatsiyadan so'ng, bitta kross-over rekombinatsiya natijasida hosil bo'lgan integrantlar tanlab olinadi. 4.18-rasmda kross-over 5' flanklashuvchi uchlari orasida amalga oshgan. Ammo bu jarayon 3' flanklashuvchi uchlari orasida ham teng ehtimol bilan sodir bo'lishi mumkin. O'z-o'zidan ajralib chiqish (ekstsiz): Yakuniy bosqichda, dastlabki kross-over rekombinatsiyada ishtirok etmagan flanklashuvchi uchlari orasida (masalan, 4.18-rasmda 3' uchlari) o'z-o'zidan ajralib chiqish hodisasi uchun skrining o'tkaziladi. Zarur o'chirish hodisasi quyidagicha tanlanadi: Agar vektor induksiyanuvchi toksin gen mahsulotini kodlasa, bu hali ham vektor ketma-ketliklarini saqlab qolgan hujayralarni yo'q qiladi.

Birlamchi kross-over nuqtasidagi rekombinatsiyadan farqli o'laroq, ikkilamchi kross-over nuqtasidagi rekombinatsiya (shuningdek, allelni almashtirish deb ham ataladi) maqsadli DNK fragmentning faqat bitta nusxasini hosil qiladi. Odat-

da, xromosoma DNKsi sohasidagi ketma-ketliklar mutatsion tarzda o'zgartirilgan homolog DNK yoki geterolog DNK tarkibidagi ketma-ketliklarga almashtiriladi. Xromosomadagi maqsadli sohadan ikki tomonlama joylashgan ketma-ketliklar integratsiya vektoriga kiritiladi va maqsadli genning barchasi yoki bir qismi tanlanadigan marker geni va kerak bo'lsa, qo'shimcha gen ketma-ketliklari bilan almashtiriladi.



4.19-rasm. Ikki marta kross-over rekombinatsiyasi yordamida allelni almashtirish rekombinatsiyasi

Xromosomadagi maqsadli ketma-ketlik va vektor o'rtasida ikki kross-over nuqtasidagi rekombinatsiya faqat chekka hududlar (flanking regions) o'rtasidagi ketma-ketliklarning integratsiyasiga olib keladi (4.19-rasm). Vektorni transformatsiyadan oldin chiziqlashtirish (linearizatsiya qilish) bitta kross-over nuqtasidagi rekombinatsiyadan ko'ra ikki kesish nuqtasidagi rekombinatsiya natijasida paydo bo'lgan integrantlarni tanlashni ta'minlaydi, chunki birinchi holat xost uchun halokatli bo'lar edi. Integratsiya fragmenti tashqarisida joylashgan qarshilik genining antibiotiklarga chidamlilik fenotipining yo'qligini tasdiqlash orqali dastlabki vektor yo'qligini tekshirish mumkin.

4.5.5 Genom va gen kutubxonalari

Genom kutubxonasi – bu muayyan organizm genomida kodlangan barcha genlarning nazariy darajada vakillarini o'z ichiga olgan rekombinant klonlar to'plamidir. Amalda, erishilishi mumkin bo'lgan eng yaxshi natija ma'lum bir gen kutubxonada mavjud bo'lish ehtimoli yuqori (odatda > 95%) bo'lgan kutubxonani yaratishdir. Kutubxonalar tasodifiy ravishda hosil qilingan DNK

fragmentlarini mos klonlash vektoriga kiritish orqali «shotgun klonlash» usulida ishlab chiqariladi. Bu fragmentlar mexanik ajratish yoki fermentativ parchalanish yordamida yaratilishi mumkin. Shuningdek, kutubxonalar ma'lum bir to'qima yoki organizmning mRNK-sidan teskari transkriptaza fermentidan foydalangan holda sintez qilingan nusxa DNK (cDNA) yordamida hosil qilinishi mumkin.

4.6 Genomlar va proteomlarni tahlil qilish

Bakterial hujayraning genetik ma'lumotlari uning xromosomasida (yoki xromosomalarida) joylashgan. Bakterial xromosomalarining fizikaviy tuzilishi avval o'ylanganidan ancha o'zgaruvchan ekanligi aniqlangan, va fizikaviy xaritalash usullari, masalan, pulsli maydonli gel elektroforezi (PFGE) va DNK ketma-ketligini aniqlash (sekvenirlash) natijasida lineyaviy va halqasimon xromosomalar mavjudligi aniqlangan.

4.6.1 DNK barmoq izi, fizik xaritalash va pulsli maydon gel elektroforezi

To'liq genom ketma-ketligini aniqlashdan oldin, bakterial genomlarning fizikaviy tuzilishini aniqlash va individual bakterial shtammlar o'rtasidagi o'xshashlikni aniqlash uchun turli fizikaviy xaritalash usullari ishlab chiqilgan. Bu usullar ayniqsa shtammlarni aniqlash va epidemiologik tadqiqotlar uchun foydalidir.

Xromosomaning fizikaviy xaritalari PFGE (pulsli maydonli gel elektroforezi) usulidan foydalanib tuzilishi mumkin, bu juda katta (30–2000 kbp) DNK fragmentlarini ajratish uchun maxsus ishlab chiqilgan usuldur. Mexanik parchalanishning oldini olish uchun DNK bakterial hujayralardan to'g'ridan to'g'ri agaroz bloklarda ajratib olinadi va kerak bo'lganda, genom ketma-ketliklarini kamdan kam hollarda (masalan, 10–30 marta) kesuvchi restriksiya endonukleazalar bilan in situ parchalash amalga oshiriladi. Keyin agaroz bloki agaroz plastinkasiga joylashtiriladi va o'zgaruvchan elektr maydoniga duchor qilinadi.

Ajratish DNK molekulalarining o'zgaruvchan elektr maydonida qayta yo'nalishini o'zgartirishga sarflagan vaqti asosida amalga oshiriladi; yirik molekulalar kichik molekulalarga qaraganda ko'proq vaqt talab qiladi. Har xil fragmentlar bir nechta strategiyalar yordamida muvofiqlashtiriladi, bular quyidagilarni o'z ichiga oladi:

- DNKni ikkita kamdan kam kesuvchi ferment bilan parchalanishi;
- alohida parchalanishdan ajratilgan fragmentlar o'rtasida gibridizatsiya;
- aniq shikastlanishlarga ega mutantlarga tozalangan fragmentlarni transformatsiya qilish.

4.6.2 Proteom tahlili

Proteom atamasi organizmning genomida kodlangan oqsillarni ifodalaydi. Proteomning xususiyatlarini aniqlash organizmning genetikasi va fiziologiyasi o'rtasidagi bog'liqlikni ta'minlaydi. Bu genom ketma-ketligini tasdiqlashga yordam beradi, regulyonlar (bir xil regulyator oqsillar tomonidan boshqariladigan genlar yoki operonlar) va stimulonlarni (bir xil induktor signallari tomonidan boshqariladigan genlar yoki operonlar) aniqlashni osonlashtiradi hamda organizmning o'z muhitiga javobini baholashga imkon beradi. Masalan, *Escherichia coli* 4,6 Mbp hajmdagi genomga ega bo'lib, taxminan 4400 ta oqsilni kodlaydi. Eksperimental dalillar va boshqa organizmlardagi oqsillar bilan homologik o'xshashliklar orqali mazkur oqsillarning taxminan 60% funksiyasi aniqlangan. Qolgan taxminan 1800 ta oqsilning biologik roli noma'lum, lekin faol o'rganilmoqda. Antisera mavjud bo'lgan individual oqsillarni Western blotlash orqali aniqlash mumkin. Hujayradan chiqarilgan oqsillar SDS-PAGE yordamida ajratiladi va nitrotsellyuloza yoki neylon membranaga o'tkaziladi. Maxsus oqsillar antiserum bilan reaksiyaga kirishish orqali aniqlanadi, bu keyinchalik ikkilamchi antikor yoki prob yordamida aniqlanadi.

Hozirda proteomni tahlil qilish uchun tanlangan tizim ikki o'lhovli poliakrilamid gel (2-DPAG) elektroforezisi va massa-spektrometriyadan foydalanishni o'z ichiga oladi. 2-DPAG elektroforezisi hujayralardan chiqarilgan yuzlab polipeptidlarni ajratishni osonlashtiradi. Polipeptidlar dastlab pH gradientlari asosida ajratiladi va keyin SDS-PAGE orqali o'lchamlari asosida ajratiladi. Polipeptidlar dog'lari gel bo'yicha chiqarilib, tripsin bilan hazm qilingandan so'ng yuqori aniqlikdagi massa-spektrometriya orqali aniqlanishi mumkin (masalan, MALDI-TOF yoki elektrospreyi massa-spektrometriyasi yordamida). Polipeptidlar dastlab birinchi o'lhovda pH gradienti gelida ularning izoelektrik nuqtasi (pI) asosida ajratiladi. Keyin bu jellar SDS-PAGE yordamida ikkinchi yo'nalishda ajratiladi, bunda migratsiya tezligi asosan polipeptidlarning o'lchamiga bog'liq bo'ladi.

Ikki o'lhovdagi har bir polipeptidning migratsiyasi yuqori darajada takrorlanadi. Polipeptidlarni aniqlash bo'yoq usullari yoki radioaktiv aminokislotalar yordamida radiografiya orqali amalga oshiriladi. Mustaqil jellar moslashtirish dasturlari (warping software) yordamida ustma-ust tushirilishi va o'zaro taqqoslanishi mumkin. Bu, masalan, o'sishning ma'lum bosqichiga, stressga yoki substrat o'zgarishiga javoban induktsiyalangan polipeptidlarni aniqlash imkonini beradi.

Bundan tashqari, individual oqsil dog'lari geladan kesib olinib, tripsin bilan hazm qilinganidan so'ng, yuqori aniqlikdagi massa-spektrometriya yordamida aniqlanishi mumkin (masalan, MALDI-TOF – matritsaga yordam bergan lazer desorbsiya/ionizatsiyasi va vaqt-o'tish massa-spektrometriyasi yoki elektrospreyi massa-spektrometriyasi).

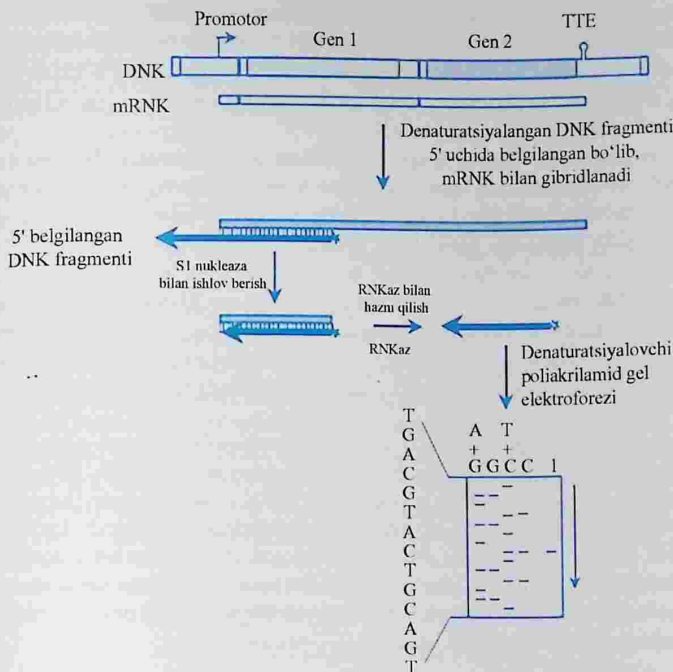
4.7 Gen ifodasini tahlil qilish

Promotorlar transkripsiyaning boshlanish chastotasiga ta'sir qiladi, lekin transkripsiya tezligiga emas. Kuchli promotorlar RNK polimeraza bilan bog'lanishda yuqori affinitetga ega. *E. coli* promotorlarini taqqoslash orqali konsensus promotor ketma-ketligi aniqlangan: 5'-TATAAT-3' (transkripsiya boshlanish joyidan 10 nukleotid yuqorida, -10 hudud) va 5'-TTGACA-3' (taxminan 35 nukleotid yuqorida, -35 hudud). Eng kuchli promotorlar mazkur ketma-ketlikka eng yaqin bo'lgan identifikatsiyaga ega. Shuningdek, -10 va -35 hududlar orasidagi masofa ham muhim, eng optimal masofa 17 nukleotid hisoblanadi. Gen ifodasini tahlil qilish bakteriyalarning biotexnologik salohiyatini optimalashtirish uchun muhim bo'lib, mazkur maqsadda juda nozik va aniq texnikalar ishlab chiqilgan.

4.7.1 Messenjer RNK (mRNK) transkriptlarini tahlil qilish

mRNK transkriptlarini tahlil qilish uchun uch usul qo'llaniladi: Northern blotlash, S1-nukleaza xaritasi va primer kengaytirish tahlili. Oxirgi ikki usul transkripsiya boshlanish joylarini aniqlash imkoniyatiga ega.

Northern blotlash mRNK turlarini agaroz yoki poliakrilamid orqali elektroforez yordamida ajratishni o'z ichiga oladi. Ikkinchi darajali tuzilmalarni (masalan, dublekslar, halqalar) hosil bo'lishining oldini olish uchun formamid, mochevina yoki boshqa denaturantlar qo'shiladi. Ajratilgan mRNK turlari blotlash orqali faollashtirilgan neylon membranalariga o'tkaziladi va kovalent bog'lanadi. Maxsus mRNK turlari belgilangan oligonukleotid, DNK yoki RNK probdan foydalanib aniqlanadi. Turli molekulyar o'lchamlarga ega markerlardan foydalanish maxsus transkriptlarning o'lchamlarini baholash imkonini beradi, bu transkript ishlab chiqarilgan transkripsiya birligining tuzilishini tushunishga yordam beradi.



4.20-rasm. S1 nukleaza yordamida transkripsiya boshlanish nuqtalarini xaritalash Diagramma izohlari:

1. DNK va mRNK: Promotor: transkripsiya boshlanishini boshqaradi. Gen 1 va Gen 2: DNK-da joylashgan kodlovchi hududlar. TTE (Terminator): Transkripsiya yakunlanish joyi. mRNK transkript DNK fragmenti orqali gibridlanadi.

2. 5' belgilangan DNK fragmenti: Denaturatsiyalangan DNK fragmenti 5' uchida belgilangan bo'lib, mRNK bilan gibridlanadi.

3. S1 nukleaza bilan ishlav berish: S1 nukleaza RNK/DNK gibriddan tashqarida joylashgan bir zanjirli cho'zilmalarni degradatsiyalaydi.

4. RNKaz bilan hazm qilish: RNKaz bilan hazm qilish qoldiq RNK molekullarini olib tashlaydi.

5. Denaturatsiyalovchi poliakrilamid gel elektroforezi: hosil bo'lgan DNK fragmentlari denaturatsiyalovchi gelda elektroforez yordamida ajratiladi va DNK ketma-ketligi natijalariga qarab, mRNK boshlanish nuqtasi aniqlanadi.

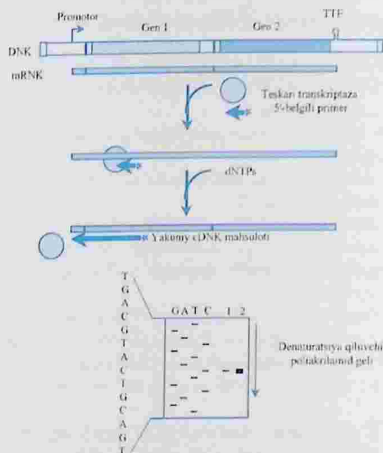
RNK denaturatsiya qilingan va 5' uchi belgilangan DNK fragmentiga gibridlanadi. DNK fragmenti shunday tanlanadiki, uning 5' uchi mo'ljaldagi mRNK ichki qismida joylashgan, 3' uchi esa taxminiy mRNK boshlanish nuqtasidan tashqariga cho'zilgan. RNK/DNK gibrid molekulasida hosil bo'lgan bir zanjirli cho'zilmalar S1 nukleazaning bir zanjirga xos faolligi orqali degradatsiyalanadi.

DNK fragmentining 3' uchi denaturatsiyalovchi gel orqali asl DNK fragmentining Maxam va Gilbertning kimyoviy kesish usuli yordamida olingan DNK ketma-ketligi bilan taqqoslanib aniqlanadi.

Maxsus mRNK turlari belgilangan oligonukleotidlar, DNK yoki RNK prob-lar yordamida gibridlanish orqali aniqlanadi (4.4.7-bo'lim). Turli molekulyar o'l-chamlarga ega markerlardan foydalanish maxsus transkriptlarning o'lchamlarini baholash imkonini beradi, bu esa transkript hosil bo'lgan transkripsiya birligining tashkilotini tushunishga yordam beradi.

S1-nukleaza va primer kengaytirish tahlillari mRNA transkriptlarining yoki birlamchi transkriptlarning qayta ishlangan mahsulotlarining 5'-bosh uchlari-ni aniqlashni osonlashtiradi. S1 xaritalash holatida (4.20-rasm), mRNA maqsad transkriptining boshlanish qismi bilan qisman mos keladigan bir zanjirli DNK (ssDNA) turi bilan gibridlanadi. Hosil bo'lgan RNK/DNK gibrid molekulasida 3'-uchda DNK cho'zilishi bo'ladi, bu esa bir zanjirga xos S1 nukleaza tomonidan degradatsiyalanadi. Modifikatsiyalanmagan 5'-uchida belgilangan ssDNA mo-lekulasining o'lchami denaturatsiyalovchi poliakrilamid gel elektroforezi orqali aniqlanadi, bunda DNK ketma-ketlik zinapoyasi molekulyar o'lcham markeri si-fatida ishlatiladi.

Primer kengaytirish tahlilida (4.21-rasm), 5'-uchida belgilangan oligonukle-otid, taxmin qilingan transkripsiya boshlanish joyidan taxminan 60-100 nukleo-tid pastroqda joylashgan mRNA transkriptining DNK nusxasini sintezlash uchun asos sifatida ishlatiladi. Enzim sifatida orqaga transkriptaza ishlatiladi. Qo'shim-cha DNK zanjiri sintezi transkriptning 5'-uchida yakunlanadi, bu esa aniqlangan uzunlikdagi mahsulotni hosil qiladi. Bu mahsulot yana DNK ketma-ketlik zinapo-yasi yordamida o'lchanishi mumkin, bunda bir xil oligonukleotid primer molekul-yar o'lcham markeri sifatida ishlatiladi.



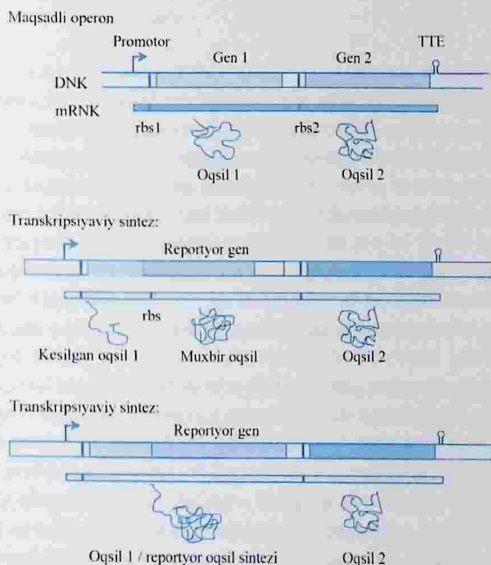
4.21-rasm. Maxsus mRNA transkriptning primer kengaytirish tahlili

Oligonukleotid primer, uning 5'-uchi radioaktiv belgilanadi, mRNK transkriptining taxmiy boshlanish nuqtasidan taxminan 60–100 nukleotid pastroqda mRNK bilan bog'lanadi. RNKga bog'liq DNK polimeraza (orqaga transkriptaza) va dezoksiribonukleotid trifosfat (dNTP) substratlari qo'shiladi va nusxa DNK (cDNK) sintezi boshlanadi. cDNK sintezi mRNK transkriptining 5'-uchida to'xtaydi va sintezlangan cDNK mahsulotining o'lchami ketma-ketlik geli orqali aniqlanadi (gelning 1 va 2 yo'laklari).

Molekulyar o'lcham markeri sifatida bir xil primer yordamida yaratilgan DNK ketma-ketlik zinapoyasi ishlatiladi. Bu transkriptning aniq boshlanish nuqtasi aniqlanishiga imkon beradi. Primer kengaytirish tahlili yarim miqdoriy (semi-kvantitativ) bo'lib, har bir primer kengaytirish reaksiyasidan kelib chiqqan signalning kuchi mo'ljaldagi mRNKning miqdorini aks ettiradi. Mazkur reaksiyalar qo'shni promotorlarning kuchini taqqoslash uchun ham ishlatilishi mumkin.

4.7.2 Gen birlashtirish texnologiyasi

Gen ekspressiyasini tahlil qilish uchun eng samarali va keng qo'llaniladigan usullardan biri bu reporter gen texnologiyasidir. Reporter genlar, odatda, o'rganilayotgan gen yoki operon oson aniqlanadigan mahsulotni kodlamagan hollarda ishlatiladi. Reporter gen bilan birlashtirish gen ekspressiyasini boshqaruvchi omillarni aniqlash imkonini beradi. So'nggi yillarda, gen birlashtirish texnologiyasi maqsadli gen ekspressiyasini bitta hujayra darajasida o'rganishni osonlashtirish uchun ishlab chiqilgan. Bu usul yordamida populyatsiyadagi heterojenlikni vizualashtirish va hujayra ichidagi maxsus oqsillarning joylashuvini aniqlash mumkin.



4.22-rasm. Hisobotchi gen birikmalarini yaratish

1. Transkripsiyaviy birikma: hisobotchi gen mo'ljaldagi genning promotoridan transkripsiya qilinadi, lekin o'zining ribosoma bog'lanish joyidan tarjima qilinadi.

2. Translyatsion birikma: hisobotchi gen o'zining ribosoma bog'lanish joyiga ega emas va mo'ljaldagi gen (gen1) bilan bir xil ramkada birikadi. Birikish natijasida hosil bo'lgan mahsulot qisqartirilgan protein1 va hisobotchi gen oqsilining to'liq nusxasidan tashkil topadi.

TTE: Transkripsiya tugatish elementi.

Reporter gen texnologiyasidan foydalanish uchta asosiy o'zgaruvchiga bog'liq:

1. Birlashtirish turi: transkripsion birlashtirish: reporter gen maqsadli genning promotoriga ulanadi, bu esa genning transkripsion faolligini o'lchash imkonini beradi.

2. Foydalaniladigan reporter gen turi: reporter genlar turli xil bo'lib, maqsadli gen ekspressiyasini aniqlash uchun o'ziga xos xususiyatlarga ega (masalan, luciferaza, beta-galaktosidaza, yoki yashil fluoressans oqsil (GFP) kabi genlar).

3. Aniqlash usuli: reporter gen ekspressiyasini aniqlashda turli usullar qo'llaniladi, jumladan:

- * fermentativ assay (masalan, reporter ferment faoliyatini o'lchash);
- * immunokimyoviy assay (antitanachalar yordamida);
- * sitokimyoviy assay (hujayra darajasida rangli yoki fluoressan signal).

Bu uch o'zgaruvchi kombinatsiyasi tadqiqot maqsadlariga qarab moslashtiriladi.

Gen birlashtirish turlari

Reporter genlar ikki xil birlashtirish turi sifatida ishlatilishi mumkin: transkripsion yoki translyatsion birlashtirishdan iborat (4.22-rasm).

Transkripsion birlashtirish: reporter gen maqsadli gen yoki operonning transkripsiyasini boshqaruvchi promotorning pastki qismiga klonlanadi. Reporter gen translyatsiya boshlanishi uchun funksional bo'lgan ribosoma birikish joyini (RBS) o'z ichiga olishi kerak, bu esa mezbon bakteriyada ishlaydi. Bu turdagi birlashtirish faqat promotor faoliyati va unga bog'liq boshqaruvchi ketma-ketliklarni kuzatish uchun ishlatiladi. Post-transkripsion nazorat (masalan, mRNKning barqarorligi yoki translyatsiya samaradorligi) bu usul yordamida aniqlanmaydi. Bu usul gen ekspressiyasini boshqaruvchi elementlarni o'rganish uchun foydali, ammo oqsil darajasidagi jarayonlarni tahlil qilish uchun mos emas.

Translyatsion birlashtirishda (4.22-rasm), reporter gen maqsadli gen bilan bir xil kodon o'qish ramkasida birlashtiriladi. Bu shuni anglatadiki, maqsadli gen transkripsiya va translyatsiya qilinganda, hosil bo'ladigan mahsulot – gibril oqsil bo'ladi. Masalan, N-terminusda maqsadli oqsilning bir qismi yoki C-terminusda esa to'liq reporter oqsil joylashadi. Birlashtiriladigan maqsadli oqsilning uzunligi tahlil turiga bog'liq: Agar maqsad faqat sintezni boshqaruvchi mexanizmlarni tushunish bo'lsa, maqsadli oqsilning 10 ta aminokislotagacha bo'lgan qisqa qis-

mi yetarli. Mabodo maqsad maqsadli oqsilning hujayradagi joylashuvini aniqlash bo'lsa, deyarli butun maqsadli oqsilni reporter oqsilga birlashtirish talab qilinadi. Bu turdagi birlashtirish oqsil darajasidagi jarayonlarni, jumladan oqsilning hujayradagi joylashuvini va harakatlarini aniqlash uchun samarali vosita hisoblanadi.

Reporter genlar

Turli maqsadlar uchun bir qator reporter genlar ishlab chiqilgan va ularning aksariyati bakteriyalarning keng turkumida qo'llanishga moslashtirilishi mumkin. Quyida turli reporter gen turlari va ularning aniqlash usullari keltirilgan:

Xromogen reporterlar. Masalan, *E. coli lacZ* (β -galaktozidaza kodlaydi). Aniqlash usullari: rang o'zgarishi (xromogen substrat bilan), ferment assay, immunodeteksiya texnikasidan.

Antibiotikga chidamli genlar. Masalan, cat (xloramfenikol atsetil transferaza kodlaydi, bu xloramfenikolga chidamlilikni ta'minlaydi). Aniqlash usullari: selektiv usullar (masalan, antibiotik qarshiligi asosida tanlash), ferment assay.

Fluoresan va luminesan reporterlar. Masalan, luxAB (luciferaza kodlaydi, bu nur chiqaruvchi reaksiya katalizlaydi), gfp (yashil fluoresans oqsil kodlaydi). Aniqlash usullari: spektrometriya, luminometriya, video/fotomikroskopiya. Bu reporter genlar gen ekspressiyasi, hujayra faolligi va oqsil joylashuvini o'zgaritishda keng qo'llaniladi. Har bir reporterning afzalliklari va cheklolari maqsadiga va aniqlash usuliga qarab tanlanadi.

Genom bo'yicha keng profil yaratish

Bakteriya tomonidan ma'lum bir vaqtda transkripsiya qilingan genlar transkriptom deb ataladi. DNK massivlari (4-5-ha'lim) hozirgi genomidagi barcha genlarning ekspressiyasini bitta tajribada kuzatish uchun keng qo'llaniladi. Bu usullar quyidagilar uchun ishlatilishi mumkin:

- stresslarga (masalan, oksidlovchi stress, oziq moddalar yetishmasligi) javoban ekspressiya profilidagi o'zgarishlarni taqqoslash;
- makrofag tomonidan yutilish yoki aniq mutatsiyalarga javoban ekspressiya o'zgarishlarini o'rganish;
- fermentatsiya jarayonida gen ekspressiyasini kuzatish.

4.8 Genlarni modifikatsiya qilish va mahsulotlarni optimallashtirish

Ko'pgina tijorat ahamiyatiga ega biotexnologik jarayonlar atrof-muhitda uchraydigan mikroorganizmlardan foydalanib ishlab chiqilgan. Bularga quyidagilar kiradi: an'anaviy jarayonlar (sut mahsulotlarini ishlab chiqarish *Lactococcus casei* tomonidan yogurt ishlab chiqarish), organik erituvchilar sintezi (*clostridium acetobutylicum* tomonidan atsetonda ishlab chiqarish), uy va sanoat katalizi uchun fermentlar ishlab chiqarish (α -amilazalar, proteazalar va penitsillin atsilazalar *Bacillus* turlaridan).

Bu jarayonlar odatda tabiatda uchraydigan jarayonlardan farq qiladi va tabiiy muhitda uchramaydigan maxsus talablarga ega bo'lishi mumkin. Shu sababli, jarayonni optimallashtirishning bir qismi sifatida mikroorganizm yoki ferment modifikatsiya qilinishi (muvoqlashtirilishi) kerak bo'lishi mumkin.

4.8.1 Oqsil va yo'lni modifikatsiya qilish

Fermentni optimallashtirishning yaxshi o'rganilgan misollaridan biri subtilizin bo'lib, bu *Bacillus subtilis* va unga yaqin turlardan (masalan, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*) ajratib olingan ishqoriy proteaza hisoblanadi. Subtilizin kir yuvish vositalari sanoatida dog⁺ ketkazuvchi vosita sifatida qo'llanadi. Subtilizin 95% kir yuvish vositalari tarkibiga kiritiladi va oqsil dog'larini oddiy kir yuvishdan ko'ra samaraliroq va past haroratda olib tashlash imkonini beradi. Bunday ferment uchun ideal talablar quyidagilardan iborat:

- 70°C gacha barqarorlik va 8–11 pH diapazonida faoliyat ko'rsatish;
- noyonlovchi yuvish vositalari va vodorod peroksid kabi oksidlovchi reagentlarga chidamlilik;
- metall ionlariga ehtiyojning yo'qligi.

Subtilizinning katalitik faolligi va uch o'lovli tuzilishi haqida keng bilimlar ga asoslanib, uni saytga yo'naltirilgan mutageniz (4.4.10-bo'lim) yordamida muhandislik yo'li bilan takomillashtirildi. Natijada bu yaxshilangan xususiyatlarning kombinatsiyasiga ega bo'lgan ferment variantlari ishlab chiqildi.

Keyingi qismda transkripsiya va tarjima jarayonlari hamda ular ifoda qilishdagi omillar haqida batafsil ma'lumot keltiriladi. *Bacillus* α -amilazalarining ferment xususiyatlarini yaxshilash uchun alternativ yondashuv ishlatilgan. Bu holatda, tabiiy rekombinatsiya usuli yordamida *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* va *B. stearothermophilus* turlaridan olingan, yaqin bog'liq fermentlarni kodlovchi genlardan funksional gibril amilazalar hosil qilingan. Mazkur jarayon quyidagicha amalga oshirilgan: mazkur fermentlarni kodlovchi genlar bir juftan klonlanib, o'zaro rekombinatsiyaning bir nechta sikllarini o'tishi ta'minlandi. Natijada, katta miqdordagi gibril α -amilazalar ishlab chiqaruvchi hujayralar populyatsiyasi hosil bo'ldi. So'ngra, yaxshilangan katalitik yoki struktural xususiyatlarga ega α -amilaza ishlab chiqaruvchi hujayralar saralab olindi. So'nggi yillarda, bu amilazalarning uch o'lovli tuzilishi va termobarqarorlik kabi funksional xususiyatlar bilan tuzilma o'rtasidagi bog'liqlik haqidagi bilimlar yanada yo'naltirilgan yondashuvlarni qo'llash imkonini berdi. Bular qatoriga PZR yordamida gen birikish texnikasi yordamida maxsus gibril α -amilazalar yaratish kiradi.

DNK va oqsil ketma-ketliklari bo'yicha o'tkazilgan tadqiqotlar oqsil tuzilmasi evolyutsiyasida nuqtaviy mutatsiyalardan ko'ra ketma-ketlik bloklarining rekombinatsiyasi muhimroq ekanligini ko'rsatgan. Bu tadqiqotlar oqsillarni tez evolyutsiya qilishni osonlashtiruvchi molekulyar texnikalar, masalan, DNK aralashtirish (shuffling) yoki PZR kabi usullarni rivojlantirishga olib keldi. Asosiy

tamoyillar: bir-biriga yaqin bog'liq genlarni kodlovchi tasodifan parchalanib ketgan DNKni aralashtirish, keyin bu DNK parchalarini PZR (4.4.4-bo'lim) yordamida to'liq uzunlikdagi fragmentlarga qayta yig'ish, bunda individual fragmentlar primer sifatida ishlaydi. Olingan PZR mahsulotlari ximerik genlar kutubxonasini (4.4.5-bo'lim) yaratish uchun ishlatiladi. Bu kutubxona modifikatsiyalangan yoki yaxshilangan xususiyatlarga ega oqsillarni tanlab olish imkonini beradi. Mazkur tizim *E. coli* β -galaktozidaza fermentining variantini ishlab chiqarish uchun qo'llanilgan, natijada bu ferment uchun odatda yomon substrat bo'lgan shakar bilan o'ziga xos faollikni 60 barobar oshirishga erishilgan. Yashil fluoresans oqsil (GFP) ning varianti ishlab chiqilgan bo'lib, uning fluoresans signali 45 barobar oshgan. Bunday usullar oqsillarni muhandislik qilish va ularning funksiyalarini yaxshilash uchun innovatsion yondashuvdir.

Bakteriyalar bir qator birikmalarni ishlab chiqaradi, agar ular mos konsentratsiyalarda sintez qilinsa, tijorat uchun maqsadga muvofiq mahsulot sifatida ahamiyat kasb etadi. An'anaviy yondashuvga ko'ra, tijorat qiymatiga ega bo'lishi mumkin bo'lgan birikmani sezilarli miqdorda ishlab chiqaruvchi bakteriyalarni ko'proq miqdorda sintez qilishga yo'naltirish mumkin. Mazkur maqsadga erishish usullari: tasodifiy mutagenез va saralashdir. Maqsadli organizm populyatsiyasini tasodifiy mutagenезga uchratish va mahsulotni yuqori konsentratsiyada ishlab chiqaruvchi mutantlarni aniqlashdan iborat. Genlarni klonlash va boshqarish: Sintezi genlarini birlashtirish hamda ularni samarali transkripsiya va translyatsiya signallari nazorati ostida joylashtirish kiradi. Antibiotiklarni ishlab chiqarish va aminokislotalarni sintez qilish kabi misollarni o'z ichiga oladi. So'nggi yillarda, an'anaviy usullardan farqli o'laroq, metabolik yo'llarni muhandislik qilish orqali mahsuldorlikni oshirish yoki sintezni ma'lum bir mahsulotga yo'naltirish bo'yicha rational yondashuvlar ishlab chiqildi. Mazkur yondashuvlar tijorat maqsadlarida yanada samarali va aniq natijalarga olib keladi.

4.9 Geterolog mahsulotlarni ishlab chiqarish

An'anaviy ravishda, genetik texnikalar sanoatda fermentlar, antibiotiklar va vitaminlar kabi tabiiy mahsulotlarning ishlab chiqarilishini oshirish uchun qo'llanilgan. Tijorat maqsadida faqat cheklangan miqdordagi oqsil mahsulotlari ishlab chiqarilgan va ular mavjud texnologiyalar yordamida o'zining tabiiy dominantlaridan (masalan, *Bacillus* turlaridan proteazalar) ishlab chiqarilgan. Endi deyarli har qanday biologik materialdan aniq genlarni ajratib olish va bakteriya yoki boshqa dominant tizimiga klonlash mumkin. Biroq genni klonlashning o'zi uning ekspressiyasini ta'minlamaydi va ekspressiya amalga oshgan taqdirda ham mahsulotning biologik faolligini kafolatlamaydi. Tijoratga yaroqli darajadagi ishlab chiqarish va biologik faollikni ta'minlash uchun ko'plab omillarni hisobga olish kerak. Masalan, dominant/vektor tizimining tanlovi klonlash va ekspressiya strategiyasini belgilaydi va bu o'z navbatida mahsulotning miqdori va aniqligiga ta'sir

qilishi mumkin. Ba'zi hollarda, bakterial tizimni ishlatish biologik faol mahsulotni yoki farmatsevtika maqsadlari uchun maqbul mahsulotni ishlab chiqarish imkonini bermaydi. Bunday hollarda organizmlarga asoslangan dominant/vektor tizimlari, masalan, sutemizuvchi hujayra madaniyati yoki hasharot hujayra tizimlari ishlatiladi. Bu tizimlar farmatsevtika maqsadlari uchun zarur bo'lgan mahsulotlarni ishlab chiqarishda muhim ahamiyat kasb etadi.

4.9.1 Dominant tizimlar va ularning nisbiy afzalliklari

1970-yillarga qadar oqsillar yoki polipeptidlarni tahlil yoki terapevtik maqsadlarda olishning yagona usullari ularni tabiiy manbalardan ajratib olish yoki cheklangan hollarda (masalan, biofaol peptidlar) kimyoviy sintez qilish edi. Rekombinant DNK texnologiyasi muayyan mahsulot uchun javobgar bo'lgan genni klonlash va uni *E. coli* kabi bakteriyada cheksiz miqdorda ishlab chiqarish imkoniyatini ochdi. Dastlabki imkoniyatlar: faqat nisbatan katta miqdorda mavjud bo'lgan va juda sezgir analizlarga ega bo'lgan mahsulotlarni kodlovchi eukariot genlar klonlashi mumkin edi. Masalan: insulin, inson o'sish gormoni, interferon. Buning sababi shundaki, bu oqsillarning aminokislota ketma-ketligi haqida keng ma'lumot bo'lishi kerak edi. O'sha vaqtda mavjud bo'lgan oqsil sekvensiyalash texnikalari katta miqdorda tozalangan oqsil talab qilardi. Hozirgi texnologik taraqqiyot – hozirda deyarli har qanday tavsiflangan oqsilni klonlash mumkin:

- To'g'ridan to'g'ri usulda: biologik materialdan ajratib olingan mRNKdan nusxa DNK (cDNA) sintezi orqali.

- Bilvosita usulda: gen sintezi orqali.

Mazkur texnologik taraqqiyot oqsillarni ishlab chiqarishning yangi imkoniyatlarini taqdim etadi va ilmiy hamda farmatsevtik sohalarida keng qo'llanilmoqda. Rekombinant texnologiya dastlab bakterial tizimlarda ishlab chiqilgan bo'lsa-da, u tobora kengayib, qator eukariot organizmlarda ham qo'llanila boshladi. Bu jarayonda turli xil yangi va qiziqarli texnologiyalar ishlatilmoqda (5-bobga qarang). Bakterial tizimlarning iqtisodiy ustunliklari: genetik manipulyatsiyaning osonligi, tez o'sish sur'ati va nisbatan oddiy oziqlanish talablari. Shu sababli, iqtisodiy jihatdan bakteriyalar hali ham afzal tanlovdir. Rekombinant texnologiya yordamida ishlab chiqarilgan oqsillar an'anaviy dori vositalarining qat'iy standartlariga javob berishi kutiladi, jumladan, faollik, tozaligi va identifikatsiyadir. Maxsus e'tibor olish biologik faoliyatga, masalan, immunogenlik va allergik reaksiyalar kabi salbiy ta'sirlarga qaratiladi.

AGSNI Chiqarish va dori-darmon boshqarmasi (FDA) kabi reguliyator tashkilotlar tomonidan qo'yilgan qat'iy talablar farmakologik mahsulotlarning ishonchligini (va taxminiy xavfsizligini) oshirishga yo'naltirilgan. Bu talablar oqsil mahsulotlarini ishlab chiqarishda ba'zi hollarda bakterial tizimlardan eukariot tizimlarga o'tishga olib kelgan. Texnik taraqqiyot: analitik texnikalar-

ning sezgirligi oshgani sababli, tabiiy va rekombinant oqsillarning tuzilmasidagi nozik farqlarni aniqlash imkoniyati paydo bo'ldi. Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC), mass-spektrometriya, yadro-magnit rezonansi (NMR) va aylana dixroizm kabi usullar bu jarayonda muhim ahamiyatga ega. Bu rivojlantirish farmatsevtika mahsulotlarining xavfsizligi va ishonchiligi ta'minlashga yordam beradi.

Rekombinant texnologiya yordamida olingan oqsillar an'anaviy usulda ishlab chiqarilgan dori vositalari bilan bir xil qat'iy standartlarga javob berishi kutiladi, ayniqsa: mahsulotning faolligi, tozaligi va identifikatsiyasi bo'yicha qo'yilgan talablar birinchi o'rinda turadi. Bu mahsulotlarni tavsiflash uchun sezgir analitik texnikalardan foydalaniladi, bu esa: nojo'ya biologik faoliyatlar, masalan, immunitetlik va allergik reaksiyalar kabi salbiy ta'sirlarga alohida e'tibor qaratishni talab qiladi.

Regulyator talablar va o'zgarishlar:

Turli regulyator tashkilotlar (masalan, AQSH Oziq-ovqat va dori-darmon boshqarmasi (FDA) tomonidan farmakologik mahsulotlarning haqiqiyliigi (va taxminiy xavfsizligi)ni oshirish maqsadida belgilangan bu qat'iy talablar ayrim mahsulotlarni ishlab chiqarishda bakterial tizimlardan eukariot tizimlarga o'tishga olib kelgan. Bu talablar analitik texnikalarning sezgirliigi oshgani sababli paydo bo'ldi. Mazkur texnologiyalar tabiiy va rekombinant oqsillar tuzilmasidagi nozik farqlarni aniqlash imkonini beradi. Bular qatoriga:

- yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC);
- mass-spektrometriya;
- yadro-magnit rezonansi (NMR);
- aylana dixroizm kabi usullar kiradi.

Bu talablar va texnologiyalar farmatsevtik mahsulotlarning xavfsizligi va samaradorligini oshirishga xizmat qiladi. Ko'p hollarda klonlash strategiyasini ishlab chiqishda katta kuch sarflanadi, lekin ma'lum bo'ladiki, muayyan oqsilni ishlab chiqarish darajasi kutilganidan ancha past. Aksariyatda bu muvaffaqiyatsizliklar sabablarini aniqlash oson emas. Quyida rekombinant oqsilning past mahsuladorligiga olib keladigan ba'zi sabablar keltirilgan:

1. Transkripsiya samaradorligi pastligi – promotorning faolligi yoki noto'g'ri transkripsion signallar.
2. Translyatsiya samaradorligi pastligi – ribosoma birikish jarayonining noto'g'ri dizayni yoki mRNK tuzilishidagi muammolar.
3. Mahsulot barqarorligining pastligi – rekombinant oqsilning proteazalar tomonidan tez parchalanishi.
4. Zaharli ta'sir – oqsilning muayyan hajaym uchun toksik bo'lishi, bu esa hajaymning o'lishi yoki yashovchanligini pasaytiradi.
5. Post-translyatsion modifikatsiya yoki yig'ilishdagi muammolar – muayyan tizim maqsadli oqsil uchun zarur bo'lgan post-translyatsion modifikatsiyalarni

amalga oshirilmaligi va oqsilning noto'g'ri yig'ilishi (misfolding) va inaktiv holatga o'tishidir.

6. Mezbon hujayra mos kelmasligi – maqsadli oqsilni ishlab chiqarish uchun mezbon hujayraning mos emasligi.

Bu muammolarni bartaraf etish uchun mezbon tizimni optimallashtirish, transkripsiya va translyatsiya signallarini qayta dizayn qilish yoki alternativ klonlash strategiyalarini sinab ko'rish kerak bo'ladi.

4.9.2 Transkripsiya

Qiziqish uyg'otuvchi oqsilni kodlovchi DNK fragmentini klonlash uning ekspressiyasini ta'minlash uchun yetarli emas. Buning o'rniga, klonlash strategiyasi mezbon bakteriyada DNKni tegishli vaqtda va darajada ifodalashga mo'ljallangan ketma-ketliklarni o'z ichiga olishi kerak. Transkripsiya maqsadli genni promotor ketma-ketligi va unga bog'liq translyatsiya signallari pastki qismiga klonlash orqali amalga oshiriladi. Promotor kuchi klonlangan genning ekspressiya darajasiga ta'sir qiluvchi asosiy omildir va hozirda turli xil promotorlar mavjud, jumladan, qat'iy tartibga solinadigan promotorlar va doimiy ekspressiya (konstitutiv) promotorlar. *E. coli* da kuchli promotordan ekspressiya rekombinant oqsil ishlab chiqarishga olib kelishi mumkin bo'lib, bu oqsilning darajasi hujayraning umumiy oqsil miqdorining taxminan 50% ga teng bo'ladi. Bu yondashuv maqsadli genning samarali ekspressiyasi uchun muhim omil hisoblanadi.

Rekombinant genlarning yuqori darajada ekspressiyasini boshqarish uchun bir qator tabiiy promotordan foydalanilgan. Biroq kuchli promotorlarni hosil qilish uchun zarur bo'lgan omillar haqida bilimlar oshgani sayin, gibrid va hattoki to'liq sintetik promotorlar yaratildi. Qimmat va potensial toksik kimyoviy moddalardan foydalanishni talab qiladigan promotorlar yirik fermentatsiya jarayonlari uchun mos emas. Shu sababli, induksiya madaniyat muhitining haroratini oshirish orqali amalga oshiriladigan promotorlar ishlab chiqildi. Shuningdek, past kislorod kuchlanishida yoki arzon va osongina mavjud bo'lgan shakarlar yordamida induksiya qilinadigan promotorlar ham ishlab chiqilgan.

Kuchli promotordan ekspressiya mezbon hujayraga katta metabolik yuk yuklaydi, shuning uchun ularning transkripsion faolligi qat'iy nazorat qilinishi kerak. Bu nazoratning muhim jihatlaridan biri samarali transkripsiyani tugatish elementlari (TTE) ni kiritishdir. Bunday TTElar yo'qligi maqsadli genning ekspressiya darajasining pasayishiga olib kelishi mumkin, chunki energiya keraksiz mRNK turlarini sintez qilishga behuda sarflanadi. Bu, ayniqsa, ko'p nusxali plazmid vektor yordamida maqsadli gen ifodalanadigan hollarda muhim ahamiyatga ega. Chunki yuqori faollikka ega transkripsiya plazmidning replikatsiyasi va/yoki segregatsiyasi uchun zarur bo'lgan hududlarni ham qamrab olishi mumkin, bu esa vektorning barqarorligini sezilarli darajada pasaytiradi.

4.9.3 Translyatsiya

mRNK transkriptlarining samarali translyatsiyasi uchun ribosoma birikish joyi (RBS) ni kiritish talab qilinadi. Bu joy translyatsiya boshlanish kodonidan taxminan 5 bp yuqorida (oldin) joylashgan bo'ladi. RBS tuzilishi bakteriyadan bakteriyaga o'zgaradi. Chunki u 16S ribosomal RNK ning 3'OH uchidagi ketma-ketliklar bilan o'zaro ta'sir qiladi va mRNK bilan bog'lanadi. Genetik kod degeneratsiyaga ega, ya'ni ko'plab aminokislotalar bir nechta kodon (nukleotid uchligi) orqali kodlanadi. Xuddi shu aminokislotani kodlovchi kodonlar sinonim kodonlar deb ataladi, lekin ular har doim ham bir xil chastotada qo'llanilmaydi. Kodonlardan foydalanishdagi o'zgarishlar qisman organizmning DNK tarkibidagi GC foizi bilan bog'liq. afzal kodonlar organizmning eng ko'p uchraydigan transfer RNK (tRNK) turlari bilan mos keladi. Har bir kodon maxsus aminoatsil-tRNK molekulalari tomonidan tan olinadi. Afzal bo'lmagan kodonlar qo'llanilishi translyatsiya tezligining pasayishiga va aminokislotalarning noto'g'ri kiritilishiga olib keladi. Bu noto'g'ri kiritilish darajasi normal xato darajasi ($\sim 1/3000$ aminokislotada) dan yuqori bo'ladi. Kodon og'ishlarini aniqlash uchun nisbiy sinonim kodon ishlatilishi (RSCU) hisoblanadi. Bu omillar translyatsiya jarayonini samarali va aniqligini ta'minlash uchun hisobga olinishi kerak.

$$RSCU = \frac{\text{ma'lum bir kodonning qo'llanilgan kuzatilgan soni}}{\text{agar barcha kodonlar bir xil chastotada ishlatilgan bo'lsa kutilgan soni}}$$

Shunday qilib:

- Agar $RSCU = 1$ bo'lsa, kodon afzalliksiz ishlatiladi (*bias yo'q*).
- Agar $RSCU < 1$ bo'lsa, kodon «noqulay» (*non-favoured*) deb hisoblanadi.
- Agar $RSCU > 1$ bo'lsa, kodon «afzal» (*favoured*) deb hisoblanadi.

Bu ko'rsatkich kodonning genetik tizimda ishlatilishidagi tendensiyalarni aniqlashga yordam beradi, bu esa gen ifodasini optimallashtirish yoki muayyan bakteriyalar uchun mo'ljaldagi genlarni kodlashda muhim bo'lishi mumkin.

Gen sintez texnologiyasi yordamida ishlab chiqaruvchi shtamming kodon ishlatishini optimallashtiradigan genlar yaratish mumkin. Kodondan foydalanishning ahamiyati *E. coli* tomonidan interleykin-2 (IL-2) ishlab chiqarish bo'yicha o'tkazilgan tadqiqotlarda namoyish etilgan. Tabiiy IL-2 geni (399 bp) kodondan foydalanish uchun tahlil qilinganda, faqat 43% kodonlar *E. coli* uchun «afzal» bo'lgan. Gen sintez orqali IL-2 genining alternativ nusxasi yaratilganda, kodondan foydalanish darajasi *E. coli* tomonidan afzal ko'rilgan kodonlarga mos ravishda 85% ga yetkazildi. Ikkala versiya bir xil vektorlarga klonlanib, *E. coli*da ifoda etilganda, biologik faol IL-2 sintezi sintetik gen orqali tabiiy genga nisbatan 8 marta ko'p bo'lgan.

4.9.4 Inklusiyalar hosil bo'lishi

Ko'plab rekombinant oqsillar, ayniqsa, yuqori konsentratsiyalarda ishlab chiqarilganda, hujayra ichida to'g'ri yig'ila olmaydi va o'zaro bog'lanib, yirik oqsil agregatlarini hosil qiladi. Bu agregatlar inkluziyalar (inclusion bodies) deb ataladi. Inklusiyalar, ayniqsa, sutemizuvchilarning oqsillarini bakteriyada ifodalaganda keng tarqalgan. Inklusiyalardagi oqsillar: tabiiyga yaqin holatda bo'lishi mumkin, bu esa oson dissotsiatsiya qilinadi. To'liq noto'g'ri yig'ilgan (misfolded) molekulalar bo'lishi mumkin, bularni faqat kuchli denaturatsiyalovchi sharoitlarda dissotsiatsiya qilish mumkin. Inklusiyalar xususiyatlariga ta'sir qiluvchi omillar: rekombinant oqsilning o'ziga xos xususiyatlari va hujayra fiziologiyasiga ta'sir qiluvchi omillar. Masalan: o'sish sur'ati, harorat va madaniyat muhiti. Agregatsiyaning oldini olish: ba'zi hollarda, fermentatsiya sharoitlarini modulyatsiya qilish orqali oqsilning agregatsiya qilishi oldini olish yoki kamaytirish mumkin. Bu yondashuv oqsilning biologik faol shaklda hosil bo'lishiga yordam beradi.

Inklusiyalar hosil bo'lishi quyidagi muammolarga olib kelishi mumkin:

1. Biologik faol bo'lmagan oqsillar ishlab chiqarilishi;
2. Optimal bo'lmagan hosildorlik;
3. Ajratib olish va tozalashdagi qiyinchiliklar.

Biroq ba'zi hollarda inklusiyalar hosil bo'lishi foydali bo'lishi mumkin, chunki inklusiya nisbatan toza oqsildan tashkil topgan bo'lib, yumshoq ajratish sharoitida erimaydigan holatda bo'ladi.

Ijoiy yondashuvlar: maxsus protokollar ishlab chiqish orqali maqsadli oqsilni bu erimaydigan holatda qayta tiklash mumkin. Keyin oqsilni biologik faol konformatsiyani qo'llab-quvvatlaydigan sharoitlarda qayta yig'ish (re-folding) amalga oshiriladi.

Alternativ yondashuv: inklusiyalar bilan bog'liq muammolarni ba'zan sekretsia vektori tizimi (4.5.4-bo'lim) yordamida hal qilish mumkin. Bu tizimda maqsadli oqsil periplazmaga yoki madaniyat muhitiga yo'naltiriladi. Bu oqsilning to'g'ri yig'ilishi va ajratib olinishi imkoniyatini oshiradi. Bu usullar oqsillarning biologik faol shaklda ishlab chiqarilishini va keyingi tozalash jarayonlarining samaradorligini oshirishga yordam beradi.

4.10 Bakteriya genomlarini in silico⁹ tahlil qilish

Bir qator mikroorganizmlarning to'liq genom ketma-ketliklari mavjudligi bakteriyalarni tahlil qilish uchun yangi yondashuvlarni ochib beradi. Bioinformatika sohasining jadal rivojlanishi bakteriyalar evolyutsiyasi va gen funksiyasi bo'yicha yangi va dolzarb tushunchalarni kashf qilish imkoniyatiga ega. Bu evol-

⁹ In silico – bu ibora in vivo (tirik organizmda) so'z birikmalariga o'xshatish orqali yaratilgan.

yutsiya mexanizmlari va genlar tartibi va funksiyalari o'rtasidagi munosabatlarga oid uzoq vaqt davomida ochiq qolgan savollarga javob berishi mumkin.

Bioinformatika va zamonaviy texnologiyalar: shaxsiy kompyuterlarning kuchayishi, internet, grid va parallel ishlov berish texnologiyalarining rivojlanishi tadqiqotchilarga juda kuchli bioinformatika vositalariga kirish imkonini berdi. Bioinformatika, shuningdek, *in vivo* va *in vitro* metodologiyalar bilan birlashib, tizimli biologiyaning paydo bo'lishiga olib keldi, bu esa yuqori samarali texnologiyalardan olingan ma'lumotlarni integratsiyalashga harakat qiladi.

Yakuniy maqsad – butun organizmlarning xatti-harakatlarini, shu jumladan ularning evolyutsiyasi jihatlarini modellashtirishdir. Garchi hozirda bunday modellar *in vivo* va *in vitro* eksperimentlarni to'liq almashtira olmasa-da, ular an'anaviy yondashuvlarning yo'nalishini belgilashda o'z potensialini ko'rsata boshladi. Bu modellar biologik jarayonlarni chuqurroq tushunish va tadqiqotlar uchun samarali strategiyalarni aniqlashda yordam berishi mumkin. Bakterial genom ketma-ketliklarini tahlil qilish uchun bir nechta turdagi kompyuter dasturlari mavjud. Bu dasturlar quyidagilarni aniqlashga yordam beradi:

- *Oqsil kodlovchi genlarni aniqlash*: DNK ketma-ketligi barcha olti o'qish ramkasida (ya'ni har ikki ipdagi uchta mumkin bo'lgan o'qish ramkalarida) tarjima qilinadi. Keyin olingan ma'lumotlar uzoq aminokislota-kodonlar zanjirlarini aniqlash uchun tahlil qilinadi, bunda uzilishsiz (to'xtash kodonisiz) davom etadigan zanjirlar kuzatiladi. Mazkur zanjirlar ochiq o'qish ramkalari (ORF) deb ataladi va ular uzunligi bir necha o'n aminokislotalardan minglab aminokislotalargacha bo'lishi mumkin.

- *Ketma-ketlik signallari*: ribosoma birikish joylari, promotorlar, oqsil bog'lanish joylari kabi ketma-ketlik signallarini aniqlash.

- *Avvalgi DNK ketma-ketliklari bilan bog'liqlikni tahlil qilish*: bu har qanday manbadan kelib chiqqan ketma-ketliklarni aniqlash va ularga bog'liqlikni o'rganishga yordam beradi.

- *Rivojlangan dasturlar xususiyatlari*: start kodonining yuqorisida joylashgan ribosomaning birikish joylarini qidirish; ramka siljishi mutatsiyalarini hosil qiladigan potensial DNK sekvensiyalash xatolarini aniqlash.

Bu turdagi dasturlar genlarni aniqlashni avtomatlashtirishga yordam beradi va biologik ma'lumotlarni tahlil qilishda juda muhim vosita hisoblanadi.

Aniq deb hisoblangan oqsillarni (putativ oqsillarni) aniqlagandan so'ng, ularning avval aniqlangan oqsillar yoki putativ oqsillar bilan bog'liqligini o'rganish uchun boshqa bioinformatik vositalardan foydalanish mumkin.

Hozirda DNK va oqsil ketma-ketliklarini saqlovchi ma'lumotlar kutubxonalari bor. Bu ma'lumotlar bazalari internet orqali muntazam ravishda foydalanish uchun mavjud. Mazkur tahlil vositalari va dasturlari: FASTA va BLAST dir. FASTA: DNK ketma-ketliklari uchun moslikni tahlil qiladi. BLAST: oqsil ket-

ma-ketiliklari uchun mos keladigan yoki qisman o'xshashlikni ko'rsatadigan oqsillar ro'yxatini taqdim etadi. Unga ko'ra, molekulyar biologik vositalar, potensial transmembran domenlarini aniqlash, ikkinchi darajali tuzilishlarni tahlil qilish va sekretsiya oqsillarning signal peptidlarini aniqlashlar kiradi. Grafik yondashuvlar: regulyator tarmoqlar, oqsil-oqsil o'zaro ta'sir tarmoqlari, metabolik yo'llarni modeltashtirish uchun qo'llaniladi. Bu vositalar genom va oqsil funksiyalarini chuqurroq tushunish uchun qulaylik yaratadi va yangi biologik tushunchalarni kashf qilish imkonini beradi.

4.11 Qo'shimcha adabiyotlar

1. Davies, J.E. and Demain, A.L. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, second edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999.
2. Glazer, A.N. and Nikaido, H. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W. H. Freeman & Company, 1995.
3. Lewin, B. *Genes VIII*. Oxford: Oxford University Press, 2004.
4. Primrose, S. B., Twyman, R. M. and Old, R. W. *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, sixth edition. Oxford: Blackwell, 2001.
5. Snyder, L. and Champness, W. *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1997.
6. Streips, U. N. and Yasbin, R. E. *Modern Microbial Genetics*, second edition. New York: Wiley-Liss, 2002.
7. Wren, B. and Dorrell, N. *Functional Microbial Genomics*. London: Academic Press, 2002.
8. Zhou, J., Thompson, D. K., Xu, Y. and Tiedje, J. M. *Microbial Functional Genomics*. New York: Wiley-Liss, 2004.

V BOB. GENETIKA MUHANDISLIGI: XAMIRTURUSH VA FILAMENTLI ZAMBURUG'LAR

Auxotrofik mutatsiya

Bu gen mutatsiyasi bo'lib, organizmning o'zi sintez qilish o'rniga, tashqi muhitdan o'sish omillari bilan ta'minlanishini talab qiladi. Mazkur auxotrofik mutatsiyani komplementlash (to'ldirish) qobiliyatiga ega bo'lgan gen organizmni normal fenotipga (ya'ni o'sish faktori talab qilmaydigan holatga) qaytarishi mumkin.

- **cDNK (komplementar DNK)** – messenger RNK (mRNK)ga komplementar ketma-ketlikka ega bo'lgan bir zanjirli DNK bo'lib, in vitro sharoitida sintezlanadi. Keyinchalik ikki zanjirli cDNK hosil qilinadi. cDNK kutubxonalari ikki zanjirli cDNK molekularini o'z ichiga oladi, har biri vektorda (qarang) joylashgan. Har xil vektorlarda joylashgan mazkur cDNK molekularining yig'indisi cDNK kutubxonasini hosil qiladi.

- **Shaperon** – oqsillar yig'ilishida boshqa oqsilning to'g'ri yig'ilishini (folding) ta'minlaydigan oqsil.

- **Xromatin** – oqsil va DNKning yuqori darajada tartiblangan kompleksi.

- **Xromosoma** – ko'plab genlarni o'z ichiga olgan DNK va oqsillarning alohida birligi. Har xil turlarda xromosoma soni turlicha bo'ladi (qarang: 5.1-jadval).

- **Aylana shaklidagi DNK molekulas** – plazmidga nazar tashlang.

- **Komplementatsiya** – genning mutatsiyaga uchragan fenotipni (qarang) yovvoyi tur fenotipiga o'zgartirish qobiliyati.

- **Kozmid** – plazmid bo'lib, unda lambda fazning cos saytlarini o'z ichiga olgan ketma-ketliklar mavjud. Bu saytlar plazmidni oqsildan iborat faz qoplamasiga joylashtirishga imkon beradi.

- **Kross-over** – homologik rekombinatsiyaga qarang.

- **Dimorfizm** – ikki xil strukturaviy shaklda mavjud bo'lish qobiliyati.

- **Endoplazmatik retikulum (ER)** – eukariotlarda hujayra ichidagi membrana tuzilmasi bo'lib, u oqsil sekretor yo'lining boshlang'ich qismini hosil qiladi.

- **Ekzonlar** – genning kodlovchi qismlari (intronsiz).

- **Ifodalangan ketma-ketlik teg (EST)** – cDNKning bir qismi bo'lib, odatda genning to'liq uzunlikdagi nusxasini aniqlash yoki klonlash uchun foydali ketma-ketlik ma'lumotlarini taqdim etish uchun yetarli uzunlikda bo'ladi.

- **Klonlashni ifodalash** – gen orqali oqsil sintezlash jarayonini ifodalovchi atama.

- **Kasseta ifodasi** – DNKning joylashuvi bo'lib, oqsil ishlab chiqarish uchun genning transkripsiyasini amalga oshirishga imkon beradi. Bu promotor, ochiq o'qish ramkasi va transkripsiyani tugatish elementini o'z ichiga oladi.

- **Gen** – RNKga transkripsiya qilinadigan DNKning bir qismi.
- **Genom** – organizmning barcha DNKsi.
- **Genotip/genotipik** – organizmning DNKdagi ma'lumotlari.
- **Geterologik** – tadqiq qilinayotgan tizimga nisbatan begona hisoblangan gen yoki oqsilga tegishli.

- **Homologik rekombinatsiya** – ikki juft DNK zanjirining o'zaro uzilishi va qayta birikishi jarayoni bo'lib, ular o'xshash ketma-ketliklarga ega. Bu jarayon (shuningdek, «kross-over» deb ham ataladi) genlarni maxsus genom joylariga integratsiya qilishga imkon beradi (qarang: 5.4-rasm). Bu jarayon genetik materialning meyoz paytida xromosomalar o'rtasida almashinuvini yoki transformatsiyalar paytida doira shaklidagi plazmidning xromosomaga to'liq integratsiyasini o'z ichiga oladi. Ikki kross-over esa xromosomadagi genni o'xshash ketma-ketlikdagi gen bilan almashtiradi.

- **Intron** – RNKning bir qismi bo'lib, mRNK oqsilga tarjima qilinishidan oldin ajratiladi. Intronslar eukariot genlarida keng tarqalgan, ammo prokariotlarda juda kam uchraydi.

- **Kutubxona** – klonlangan genomik DNK fragmentlari yoki cDNK molekullari to'plami.

- **Bog'lanish** (linkage) – jismonan bir-biriga yaqin joylashgan genlarning birga meros bo'lishga moyilligi.

- **Bog'lanish guruhi** (Linkage group) – birlik sifatida meros bo'ladigan yoki ko'chiriladigan genlar guruhi bo'lib, butun xromosomani ifodalaydi.

- **Metabolom** – organizm tomonidan bir vaqtning o'zida ishlab chiqarilgan metabolitlar yig'indisi.

- **Mikrochip** – miniatyura qilingan qattiq sirt (odatda shisha plastinka) bo'lib, u organizmdagi barcha yoki ba'zi genlarning bir zanjirli DNK fragmentlarining panjarasini o'z ichiga oladi.

- **Mitseliy** – iplamonsimon zamburug'larning odatdagi vegetativ o'sish shakli bo'lib, shoxlangan iplar to'plamidan iborat.

- **Nukleotid** – DNK va RNK uchun qurilish bloki, asos-(dezoksi)riboz-fosfat molekulasidan iborat. Nukleotidlar asosga qarab nomlanadi: Purinalar: A (adenin), G (guanin). Pirimidinalar: C (sitozin), T (timin), U (uratsil). DNKda: AGCT, RNKda: AGCU mavjud.

- **Ochiq o'qish ramkasi (ORF)** – stop-kodonlar tomonidan to'xtatilmagan kodonlar ketma-ketligi bo'lib, funksional oqsil kodlash ehtimoli bor deb hisoblanadi.

- **Manba (ori)** – DNK replikasiyasining boshlanish nuqtasi.

- **Fenotip** – organizmning genotip tomonidan aniqlanadigan xususiyatlari (masalan, biokimyoviy yoki fiziologik).

- **Plazmid** – xromosomadan mustaqil ravishda replikasiya qilinadigan DNK molekulasini.

• **Ploidiya** – hujayradagi to'liq xromosoma to'plamlari soni, masalan, Haploid (1), Diploid (2), va Poliploid (>2).

• **Polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR)** – DNK fragmentlarini eksponensial kuchaytirish uchun ishlatiladigan usul (qarang: 4.8-rasm).

• **Promotor** – genning yuqori qismidagi (5'-boshida joylashgan) DNK hududi bo'lib, transkripsiyani boshlash va boshqarish signallarini o'z ichiga oladi.

• **Proteom** – organizm tomonidan ma'lum bir vaqtda ishlab chiqarilgan oqsillar yig'indisi.

• **Protoplastlar** – hujayra devori karbonaza fermentlari ta'sirida olib tashlangan hujayralar. Bu hujayralar plazmatik membrana bilan o'ralgan va osmotik jihatdan mo'rt.

• **Rekombinatsiya** – ikki DNK molekulasida DNK almashinuvi yoki bitta DNK molekulasining boshqasiga qo'shilishi. Masalan, xromosoma va kiritilgan DNK o'rtasida.

• **Restriksiya fermenti** – DNKdagi ma'lum qisqa ketma-ketlikni (restriksiya joyi) kesuvchi ferment.

• **Shuttle vektori** – bir nechta organizm turida mustaqil replikasiya qiladigan vektor. Masalan, bakteriya va xamirturush o'rtasida «shuttle» qilishi mumkin.

• **Southern blotting** – DNK fragmentlarini elektroforez orqali o'lchamiga qarab ajratish, membranaga ko'chirish va mos keluvchi ketma-ketliklarni aniqlash uchun belgilangan DNK segmenti bilan sinash jarayoni (*Ed Southern* nomi bilan atalgan).

• **Splicing (splaysing)** – RNK molekularidan intronlarni ajratish va ekzonlarni qayta birlashtirish jarayoni. Bu jarayon odatda yadroning ichida amalga oshadi.

• **Sinteniya** – turli organizmlarda xromosomadagi genlar tartibi bir xil bo'lishi.

• **Transkripsiya** – DNK ketma-ketligi asosida RNK sintez qilish jarayoni.

• **Transkripsiya faktori** – promotor hududida DNKga yoki boshqa oqsil faktorlarga bog'lanib, bir yoki bir nechta genlarning transkripsiyasini boshqaruvchi oqsil.

• **Transkripsiya tugatuvchisi** – RNK polimeraza RNK sintezini to'xtatadigan DNK ketma-ketligi.

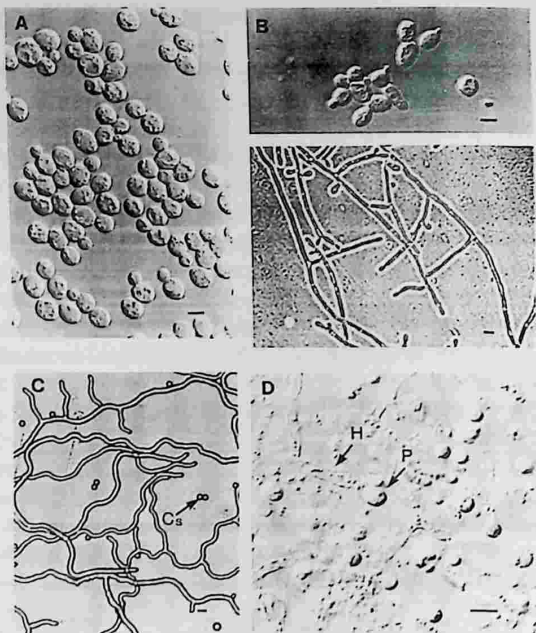
• **Transkripsiya boshlanish nuqtasi (tsp)** – RNK sintezi boshlanadigan nuqta.

• **Transkriptom** – organizm tomonidan ma'lum bir vaqtda ishlab chiqarilgan mRNK molekularining yig'indisi.

• **Transformatsiya (genetik)** – ekzogen DNKni hujayraga qabul qilish va barqaror integratsiyalash jarayoni.

• **Vektor** – DNKni organizmga ko'chirish uchun ishlatiladigan DNK molekulasida (odatda plazmid).

• **Yovvoyi tur (Wild-type)** – genetik manipulyatsiya yoki mutatsiyaga uchramagan organizm shtammi. Bu atama mazkur shtamning fenotipini ham tasvirlash uchun ishlatiladi.



5.1-rasm.

- (a) *Saccharomyces cerevisiae* xamirturushining faza-kontrastli mikrografi;
 (b) yuqorida o'ngda xamirturush shakli va pastda o'ngda gifa shakli bo'lgan *Yarrowia lipolytica*;
 (c) hujayraofanda o'stirilgan filamentli zamburug' *Aspergillus niger* ning yorug'lik maydoni mikrografi;
 (d) *Aspergillus nidulans* dan protoplast hosil bo'lishining differensial interferentsiya-kontrastli mikrografi. Gifalarning shoxlanishiga e'tibor bering;

O'lchov belgilari = 10 μ m.

Cs: konidiosporlar (jinsiy bo'lmagan); H: gifa; P: protoplast.

Mikrograflar (a)–(c) Linda va Jeyms Barnett tomonidan taqdim etilgan.

Kirish

Zamburug'lar yadroga ega bo'lgan eukariot organizmlar bo'lib, asosan mada-niyatda o'sish shakli bilan xamirturush yoki filamentli zamburug'lar sifatida tas-niflanadi. Odatda bir hujayrali bo'lgan turlari xamirturushlar deb ataladi va tashqi ko'rinishda filamentli qarindoshlaridan farqlanadi. Ammo bu farqlash har doim ham qat'iy emas, chunki ba'zi zamburug'lar ikkala shaklda ham o'sa oladi va bun-day organizmlar dimorfik deb ataladi (5.1-rasm). Hozirgi kunda yanada nozik ge-notipik usullar zamburug'larning yanada asosli tasniflanishiga imkon bermoqda,

ammo xamirturushlar va filamentli zamburug'lar orasidagi sezilarli o'xshashliklar ularni bir bobda birgalikda ko'rib chiqishimizga imkon beradi. O'xshashliklarga qaramay, ularning farqlari biotexnologik qo'llanmalarning keng xilma-xilligiga olib kelgan. Bu xilma-xillik o'rganilgan turli xil turlar soni oshgani sari va ular genetik muhandislik orqali qo'llanilishi kengaygani sayin ortib bormoqda.

Bu bobda biz zamburug'larni genetik muhandislikda qo'llash bilan bog'liq molekulyar biologiyani o'rganamiz va kiritilgan begona genlar kodlagan oqsillarni ishlab chiqarishda zamburug'lardan xost sifatida foydalanish qo'llanmalari haqida ma'lumot beramiz.

5.1-jadval.

Zamburug'lar genom ma'lumotlari

Zamburug' turi	Xromosomalar soni	Genom hajmi (Mb)a	Veb-sayt b
Ashbya gossypii	7	9.2	http://agd.unibas.ch/
Saccharomyces cerevisiae	16	12.0	http://genome-www.stanford.edu/saccharomyces/
Schizosaccharomyces pombe	3	14.0	http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/
Candida albicans	8	16.0	http://sequence-www.stanford.edu/group/candida/
Neurospora crassa	7	40.0	http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/
Aspergillus nidulans	8	30.0	http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/

a. Mitoxondriya genomidan tashqari taxminiy haploid genom hajmi.

b. Genom ma'lumotlari uchun tavsiya etilgan veb-saytlar. E'tibor bering, veb-saytlar o'zgarishi mumkin va mavjud bo'lgan zamburug' genamlari soni ortib bormoqda. Shuningdek, boshqa tegishli saytlar bilan havolalarni taqdim etuvchi umumiy zamburug' saytlar ham mavjud:

- <http://www.fgsc.net>
- <http://www.eurofung.net/frameset.php>
- <http://www.aspergillus.man.ac.uk/>

Bu ishning ko'p qismida qo'llanilgan eksperimental yondashuvlar oldingi bobda (4-bob) prokaryotlar bilan ta'riflangan va aslida zamburug'lar bilan ham o'xshashligi berilgan. Ularning ta'rifi bu yerda faqat bakteriyalar va zamburug'lar

o'rtasidagi farqlar protokollarda o'zgartirishlarni talab qilgan hollarda takrorlanadi. Farqlar asosan zamburug'larning hajmi va genomining kattaroq bo'lishi, shuningdek, ko'plab hujayra funksiyalarining murakkab yuqori organizmlarga xos tashkilotchilik tamoyillariga bog'liq.

Zamburug'lar bir nechta xromosomalarni o'z ichiga olgan aniqlangan membrana ega yadrolar, shuningdek, membrana bilan o'ralgan boshqa organoidlar, shu jumladan oqsillarni tashqariga yoki boshqa subhujayraviy organoidlarga yo'naltirish uchun tashiladigan membranaviy ichki tizim bo'lgan endoplazmatik retikulum (ER) ga ega. Zamburug' hujayra devorlari peptidoglikanni o'z ichiga olmaydi, bu faqat bakteriyalarda mavjud. Aksincha, ularning devorlari asosan turiga qarab, turli polisaxaridlar (masalan, glukanlar, mannanlar, kitin, xitozan) va glikoproteinlardan iborat.

Zamburug'lar murakkab hayot sikliga ega bo'lib, odatda mitseliy sifatida normal (vegetativ) hujayra o'sishidan boshlanadi va keyin morfogenez (shakl o'zgarishi) orqali jinsiy (ikki xil zotning juftlashuvi natijasida) yoki nojo'ya sporalar hosil bo'lishiga olib keladi. Ko'pgina biotexnologik maqsadlar uchun zamburug'lar mitotik yadroviiy bo'linish bilan birga vegetativ ravishda o'stiriladi. Bu yerda meoz haqida gapirilmaydi. Zamburug'larning hujayra sikli xususida qo'shimcha ma'lumotni bilishni istagan o'quvchilar mazkur bobning oxirida keltirilgan umumiy matnlarga murojaat qilishlari mumkin.

Zamburug'lar genlari xromosomalar ichida tartiblangan bo'lib, ular elektrofores orqali ajratilishi mumkin. Xromosomalar soni turga bog'liq va genetik markerlarning bog'lanishi o'rganilgan joylarda bog'lanish guruhlariga soniga teng. Ba'zi misollar 5.1-jadvalda zamburug'larning genom hajmlari bilan birga keltirilgan. Zamburug'larda DNK miqdori prokaryotlarga qaraganda ancha katta (*Escherichia coli* ning 4,7 million nukleotid uzunlikdagi 4,7 Mb genomiga nisbatan). Bunga sabab, zamburug'larda ko'proq genlar va oqsillarni kodlamaydigan ko'proq DNK bo'lishidir. Bu kodlamaydigan DNK genlar ichida (intronlar sifatida) yoki genlar orasida «bo'sh joy» DNK shaklida mavjud bo'ladi.

Bakteriyalar, zamburug'larga nisbatan, kodlamaydigan DNK bo'yicha iqtisod qiladilar. Masalan, ayrim bakteriya genlari jismoniy jihatdan bir-biriga yaqin joylashgan bo'lib, ularning transkripsiyasi yagona promotor tomonidan boshqariladi va operon deb ataladi (4.1-rasmga qarang). Operonlar zamburug'larda mavjud emas va hatto bir xil funksiyaga ega fermentlarni kodlovchi genlar guruhlangan hollarda ham, har bir genning transkripsiyasi mustaqil promotor tomonidan boshqariladi.

Organizmning kerakli fenotipini olish uchun genetik modifikatsiya yondashuvlarini ishlab chiqishda transkripsiya mexanizmlarini boshqarish haqida bilimlarga ega bo'lish zarur. Shu sababli, bu bobda keng doirali (ko'p yo'nalishli) va yo'nalishga xos transkripsiyaning boshqarish mexanizmlarining misollarini muhokama qilamiz.

Eukariotlarning xromosomalari xromatin deb ataladigan tuzilmalardan tashkil topgan bo'lib, ular taxminan teng miqdordagi DNK va oqsildan (asosan gistondan) iborat. Gistonlar DNKga bog'lanib, uni murakkab tuzilmalarga yig'ishga yordam beradi. Masalan, DNK ma'lum gistonlar bilan bog'lanib nukleosomalarni hosil qiladi, ular elektron mikroskopda «ipdagi marjonlar» ko'rinishida namoyon bo'ladi. Nukleosomalar tartiboti promotor darajasida transkripsiyani boshlash uchun zarur bo'lgan oqsillarning (transkripsiya omillari) kirishini boshqarishi mumkin, bu prokaryotlarda uchramaydigan boshqaruv darajasidir.

Xromatin darajasida transkripsiyani boshqarish muhokamasi bu bobning doirasidan tashqarida, ammo bu eukariotlarning murakkablik darajasini eslatish uchun keltirilgan. Yaxshiyamki, ko'plab muhim zamburug'lar molekulyar darajada ularning biologiyasini o'rganish uchun qulaydir, va biz bu turlarni genetik jihatdan modifikatsiya qilish orqali hosil bo'lgan mahsulotlarning turini yoki miqdorini o'zgartira olamiz.

5.2 Zamburug'larga DNK kiritish (zamburug'larni transformatsiya qilish)

5.2.1 Asoslar

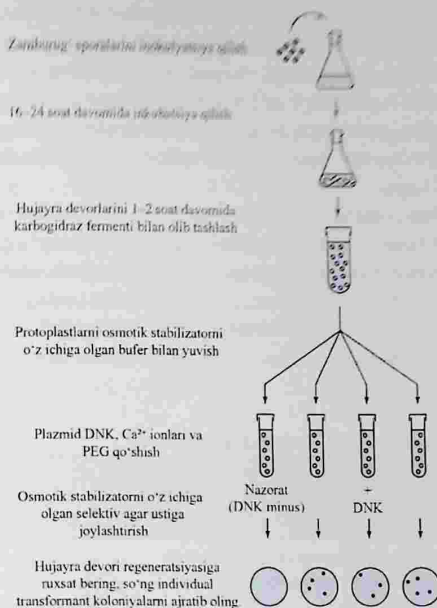
1970-yillar boshlarida o'tkazilgan birinchi zamburug' transformatsiyasi tajribalari yovvoyi tur DNK xromosomal fragmentlarini aminokislota yoki nukleotid asoslariga maxsus o'sish ehtiyoji bo'lgan mutant xostlarga o'tkazish orqali amalga oshirildi (auxotrof mutantlarning misollari). Muvaffaqiyatli transformatsiya uchun zamburug' hujayralarini protoplastlarga aylantirish zarur edi. Bu DNK qabul qilishga to'sqinlik qiluvchi asosiy to'siq bo'lgan hujayra devorini karbogidraza fermentlari aralashmasi yordamida eritib, transformatsion DNKni kiritishdan oldin amalga oshirildi (5.1d-rasm). Transformantlarni yovvoyi tur genining faolligi tufayli auxotrof ehtiyoj uchun qo'shimchalarsiz o'sish qobiliyatiga ko'ra tanlash mumkin edi. Bu jarayon genetik to'ldirish (*genetic complementation*) deb ataladi. Transformatsiya qilingan DNKning hujayradagi taqdiri 1970-yillar oxiri va 1980-yillar boshlarida rivojlangan yanada ilg'or molekulyar texnikalar paydo bo'lguniga qadar batafsil o'rganilmagan. Keyinchalik, bu ilk tajribalardagi DNK zamburug' xromosomalarga genetik rekombinatsiya orqali integratsiya qilinganligi aniqlandi. Keyinchalik, *Saccharomyces cerevisiae* xamirturushini transformatsiya qilish uchun shuttle vektorlardan foydalanadigan usullar ishlab chiqildi. Bu vektorlar xromosomal integratsiyasiz, ham *E. coli*, ham xamirturushda butun plazmidlar sifatida ko'paytirilishi mumkin edi. Bu plazmidlarni manipulyatsiya qilish va vektor DNK miqdorini «ko'paytirish» jarayoni ularni xamirturushga kiritishdan oldin *E. coli* da samaraliroq bajarildi. Filamentli zamburug'larni transformatsiya qilish uchun ham o'xshash vektorlar ishlab chiqilgan, ammo ko'pgina hollarda kiritilgan DNK plazmid sifatida replikatsiya qilish o'rniga zamburug' xromosomalarga integratsiya qiladi.

Transformatsiya dastlab genetik jihatdan yaxshi o'rganilgan *S. cerevisiae*, *Neurospora crassa* va *Aspergillus nidulans* kabi organizmlarda amalga oshirildi. Bu zamburug'lar laboratoriyada kong miqyosda o'rganilgan va mos auxotrof mutantlar hamda ularning yovvoyi tur genlari mavjud edi. Hozirda genetika tizimlari yaxshi aniqlanmagan bo'lishi mumkin bo'lgan ko'proq biotexnologik jihatdan muhim zamburug'lar uchun usullar doimiy ravishda o'zgartirilmoqda yoki moslashtirilmoqda. Sanoat shtamlari uchun auxotrof to'ldirishni amalga oshirish imkonini bo'lmagan hollarda transformatsiyada antibiotiklarga qarshilik kabi boshqa seleksiya markerlaridan foydalanish mumkin.

5.2.2 Transformatsiya protokollari

Ko'pgina filamentli zamburug'larni transformatsiya qilishda asosiy tanlov usuli sifatida zamburug' mitseliyasini protoplastlarga aylantirish usuli qo'llaniladi. Protoplastlar hujayralarning yorilishining oldini olish uchun osmotik stabilizatorni o'z ichiga olgan tamponda tayyorlanadi (5.2-rasm). Keyin protoplast suspenziyaga vektor DNK qo'shiladi va DNKni qabul qilish kalsiy ionlari (Ca^{2+}) mavjudligida polietilen glikol (PEG) qo'shish orqali rag'batlantiriladi. Biroq barcha protoplastlar yangi hujayra devorlarini ishlab chiqarish orqali hayotga qodir zamburug' hujayralariga qayta tiklana olmaydi va faqat ularning bir qismi transformatsion DNKni o'z ichiga oladi. Shu sababli kiritilgan DNKni o'z ichiga olgan hujayralarni olish uchun samarali tanlash usullari zarur.

Transformatsiya chastotalari, ya'ni qo'shilgan vektor DNK har mikroqrammasiga olingan transformantlar soni organizm va ishlatilgan transformatsiya protokoliga qarab sezilarli darajada farq qilishi mumkin. Zamburug'larni transformatsiya qilish bo'yicha dastlabki hisobotlardan beri bu asosiy usulni sezilarli darajada yaxshilaydigan turli modifikatsiyalar kiritilgan. Protoplastlarni hosil qilish zaruratini bartaraf etadigan alternativ usullar, masalan, litiy atsetat/xamirturush butun hujayra usuli, o'sayotgan sporalarni elektroporatsiyasi yoki zamburug' mitseliyasini biolistik transformatsiyasi, turli darajadagi muvaffaqiyatlarga ega bo'lgan. Biroq bu usullar mos xost diapazonining cheklanishi va ayrim hollarda maxsus jihozlarga ehtiyoj tufayli cheklovlariga duch keladi. Transformatsiya usullari ro'yxati 5.2-jadvalda keltirilgan.



5.2-rasm. Iplamonsimon zamburug'dan olingan protoplastlardan foydalanilgan odatiy transformatsiya protokoli

Filtrlangan mitseliy yig'ib olingandan so'ng, protoplastlarning yorilishining oldini olish uchun sorbitol yoki KCl kabi osmotik stabilizatori o'z ichiga olgan buferda qayta suspenziya qilinadi. Seleksiyalash uchun ishlatiladigan agar minimal muhit bo'lishi mumkin (unda o'sish uchun zarur bo'lgan qo'shimcha moddalar yo'q va ular kiritilgan gen faoliyati orqali ta'minlanadi) yoki u antibiotikni o'z ichiga olishi mumkin.

Antibiotik seleksiyasi: Transformantlarga, odatda, hujayra devorini tiklash va antibiotikka qarshilik oqsilini ifodalash uchun vaqt beriladi, shundan keyin ular antibiotik bilan sinovdan o'tkaziladi.

PEG: Polietilenglikol (DNKni protoplastlarga kiritishda yordam beruvchi reagent).

5.2.3 Transformatsiya vektorlari

Transformatsiya vektorlari DNKni qabul qiluvchi organizm genomiga integratsiya qilish uchun (integrativ transformatsiya) yoki plazmid sifatida saqlash uchun mo'ljallangan bo'lishi mumkin. Integrativ transformatsiya DNKni xromosomadagi plazmid hududiga sezilarli darajada o'xshash ketma-ketlikka ega joyga (gomologik rekombinatsiya orqali integratsiya) yoki tasodifiy bir yoki bir nechta joylarga (ektopik integratsiya) kiritish uchun qo'llaniladi.

Xamirturush shuttle vektorlari bakteriya va xamirturush hujayralarida tanlash imkonini beruvchi genlarni o'z ichiga oladi. Shuningdek, ular bakteriya va

xamirturush replikasiyasining kelib chiqish nuqtalarini (ori) o'z ichiga oladi, bu har ikki organizmda plazmid DNK replikasiyasini boshlash uchun zarur bo'lgan ketma-ketliklardir. Xromosomalarga integratsiya qilmasdan xamirturush xromosomalari tashqarisida replikasiya qilishga qodir bo'lgan (xromosomadan tashqari vektor) yoki xromosoma hududining ma'lum bir joyiga integratsiya qilinishi mumkin bo'lgan (integrativ vektor) *stilize* qilingan xamirturush *shuttle* vektori 5.3-rasmda tasvirlangan.

Transformatsiya qilingan, ya'ni kiritilgan DNKni o'z ichiga olgan hujayralarni aniqlash uchun transformatsiya vektori transformatsiya qilingan hujayralarga tanlanadigan xususiyatni beradigan genni o'z ichiga oladi. Bu «tanlov markerlari» uchta asosiy guruhga bo'linadi. Birinchi guruh, yovvoyi turdagi zamburug'lardan klonlangan va auxotrofik o'sish talablarini (ilgari tushuntirilganidek) to'ldiradigan genlarni o'z ichiga oladi.

5.2-jadval.

Zamburug'larning transformatsiya usullari

Usul yoki davolash	Transformatsiya qilingan zamburug'lar misollari	Transformatsiya chastotasi	Izohlar
Protoplastlar PEG/CaCl ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>	10 ² –10 ⁵	Eng keng tarqalgan usul, ammo filamentli zamburug'larda chastota odatda pastroq
Protoplastlar (Eukaryotlar)	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Mucor circinellus</i>	10 ⁴ –10 ⁵	PEG/CaCl ₂ usuli bilan bir xil darajada samarali bo'lishi mumkin
Sporangiosporelar (Eukaryotlar)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>A. niger</i> , <i>T. reesei</i>	10 ⁴ –10 ⁵	Filamentli zamburug'lar uchun eng yaxshi natijalar zaiflashtirilgan hujayra devorli konidiosporalardan olinadi
Sporangiosporelar (Ascomycota)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Mucor</i> spp.	10 ⁵ –10 ⁷	Faqat bir nechta xamirturush turlari uchun qo'llaniladi va filamentli zamburug'lar bilan samarali emas
Konidiosporelar (Eukaryotlar)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	10 ⁴ –10 ⁵	Yog'li xamirturush hujayralari yoki konidiosporalarda eng samarali, ammo mitseliy ham ishlatilishi mumkin
Protoplastlar yoki sporangiosporelar (Ascomycota)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>T. reesei</i> , <i>M. circinellus</i>	10 ² –10 ⁴	Protoplastlar yoki konidiosporalarda bir xil samarali, ammo transformatsiya chastotasi turga bog'liq

a. Transformantlarning soni qo'shilgan vektor DNK ning har mikrogrammasiga ko'ra ifodalanadi. Qiymatlar organizm, vektor turi va qo'llanilgan usulga bog'liq.

b. Polietilen glikol.

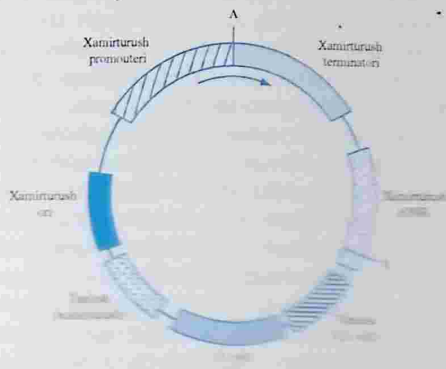
c. Hujayralarga DNK kiritish uchun qisqa impulslik, yuqori kuchlanishli elektr maydoni qo'llanilishi.

d. Litiy atsetat.

e. DNK bilan qoplangan metall zarrachalarni (odatda oltin yoki volfram) va kuumda yuqori tezlikda hujayralarga otish usuli.

f. DNK qo'ziqorinlarga bakteriya *A. tumefaciens* dan, o'simlik transformatsiyalariga o'xshash tarzda, o'tkaziladi.

g. Bu holda transformatsiya chastotasi 107 qabul qiluvchi hujayralar uchun olingan transformantlar soni sifatida ifodalanadi.



5.3-rasm.

Stilise qilingan xamirturush – *E. coli* shaklida oqimayotgan xamirturush (*S. cerevisiae*) kelib chiqish nuqtalari (ori) va xamirturush uchun antibiotik rezistentlik genlari va ifodalanadigan genlar kiritish uchun to'ldirilgan. Plazmidni transformatsiya qilish uchun integratsiya qilish uchun vektorga ribosomal DNA, induktiv mutatsiya, DNK ketma-ketligi kiritilishi mumkin. Bu rDNA kromosomaga qo'yilgan xamirturushdan kutundan chiqish shakliga o'xshash uchun. Bu xamirturush (*S. cerevisiae*) xamirturush xromosoma (DNA) hududiga genomik rekombinatsiya orqali integratsiya qilinadi.

Ko'pgina hollarda bir zamburug'ning geni boshqa bir zamburug'dagi gen mutatsiyalarni to'ldirishga qodir (xeterologik transformatsiya). Ammo ba'zi zamburug'larda faqat o'z genlari mutatsiyalarni to'ldirishi mumkin (genomik transformatsiya). Agar kerakli auxotrof mutatsiya mavjud bo'lmasa, amibiotiklarga qarshilikka asoslangan ikkinchi turdagi tindex markerlarni qo'llanish mumkin.

Bunga misol sifatida gigramitsin B, fleomitsin, kanamitsin yoki benomilga qarshilikni keltirish mumkin. Bu turdagi markerning bir kamchiligi shundaki, zamburug⁺ bu antibiotikka nisbatan yetarlicha sezgir bo'lishi kerak. Masalan, kanamisinga qarshilikni kodlaydigan bakterial gen xamirturushda o'z promotori orqali zaif ifodalanishi mumkin. Biroq agar xamirturush promotoridan foydalanilsa, dori-darmonlarga nisbatan yuqoriroq qarshilikka erishish mumkin. Filamentli zamburug⁺lar uchun ham antibiotik qarshilik tizimlarini optimallashtirish odatda zamburug⁺ promotoridan foydalanishni talab qiladi. Oxirgi guruh markerlar o'z egasi bo'lgan shtammlar odatda foydalana olmaydigan uglerod yoki azot manbalarida o'sish qobiliyatini beradigan genlarni ekspluatatsiya qiladi. Bunga yaxshi misol *Aspergillus nidulans* ning atsetamidaza geni (*amdS*) bo'lib, u qabul qiluvchi shtammlarga yagona azot manbasi sifatida atsetamid yoki akrilamiddan foydalanishga imkon beradi. Bu marker bir qator *Aspergillus* va *Trichoderma* turlariga kiritilgan va integratsiyalangan vektorning ko'p nusxasini o'z ichiga olgan transformantlarni yaratishda juda foydali.

Xamirturushda plazmid vektorlar transformantlar tanlov sharoitlarida, masalan, antibiotik mavjudligida o'stirilgan taqdiridagina hujayra ichida saqlanadi. Agar tanlov bosimi olib tashlansa, plazmidlar hujayralardan nisbatan tez yo'qolib ketishi mumkin, chunki hujayralar uchun plazmidni saqlashda hech qanday ustunlik yo'q. Barcha plazmidlar ori (replikatsiya kelib chiqish nuqtasi) o'z ichiga olishi kerak bo'lib, bu tabiiy plazmidlardan yoki xromosomal DNK ketma-ketliklaridan olinishi mumkin. Bir xamirturushdan olingan ori bo'lgan vektorlar odatda turli xamirturush xostlarida ishlashi mumkin, ammo samaradorlik darajasi har doim bir xil bo'lmashligi mumkin. Plazmid vektorlar har bir hujayrada 200 tagacha nusxada mavjud bo'lishi mumkin, bu esa kiritilgan gen nusxalarining sonini oshirish uchun oddiy tizimni taqdim etadi. Bu ko'pincha kiritilgan gen tomonidan kodlangan oqsilning yuqori hosiliga olib keladi. Biroq bunday tizimning kamchiligi shundaki, sezilarli plazmid yo'qolishining oldini olish uchun odatda tanlov bosimi talab qilinadi, ya'ni kerakli xususiyatni saqlab qolish muammoga aylanishi mumkin, ayniqsa, *Saccharomyces cerevisiae* da. Aksincha, boshqa xamirturushlarda, masalan, *Kluyveromyces lactis* da, ayrim xromosomadan tashqari vektorlar doimiy tanlovsiz nisbatan barqaror bo'ladi.

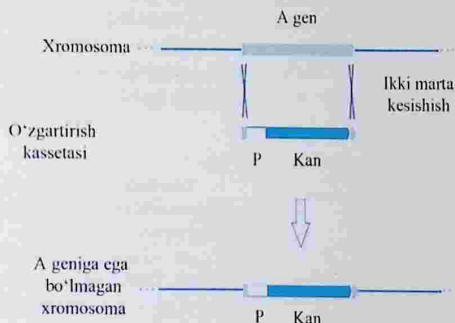
Plazmidni xamirturush genomiga integratsiya qilish genning kiritilgan nusxalarining kamroq bo'lishiga qaramay, barqarorlikni oshiradi. *Saccharomyces cerevisiae* da bu maqsadga plazmidni taxminan 150 tadan takroriy nusxalarda mavjud bo'lgan ribosomal DNK ketma-ketliklariga (rDNA) yo'naltirish orqali erishilgan. rDNA ketma-ketliklarini vektorga (5.3-rasm) kiritish, ayniqsa, vektor rDNA hududida chiziqlantirilgan bo'lsa, gomologik ketma-ketliklarning rekombinatsiyasi orqali bu plazmidning xromosomal rDNA hududiga integratsiyasini yaxshilaydi.

Gen nusxalarining sonini oshirish uchun tanlashda foydalaniladigan genni zaif yoki ataylab zaiflashtirilgan promotorlar ostida transkripsion boshqaruvga

qo'yish mumkin. Bu yondashuv gen mahsulotining muhim darajasini ta'minlash uchun tanlov bosimi orqali bir nechta gen nusxalarini tanlashni rag'batlantiradi. Bu usul rDNA maqsadga yo'naltirish bilan birga ishlatilib, integratsiyalangan gen nusxalarining yuqori sonini olish imkonini beradi.

Xromosomalarga integratsiya qiladigan vektorlar zamburug'larni molekulyar manipulyatsiya qilishda bir qator muhim maqsadlarda qo'llaniladi. Ma'lum bir genning xromosomadagi nusxalarini ko'paytirishdan tashqari, ular kerakli genni buzish yoki almashtirish uchun ham ishlatilishi mumkin. *S. cerevisiae* da «o'rmini bosuvchi kasseta» vektorlari yordamida Xamirturush Genomini Sekvenlash Loyihasi tomonidan aniqlangan taxminan 6000 genning har birini o'chirish va hujayrada har bir genning funksiyasini sinab ko'rish imkonini berdi. Har bir kasseta kanamisin (G418) tanlash genidan iborat bo'lib, uning har ikki uchida gen-spesifik ketma-ketlik qismlari joylashgan. Bu kassetalar vektordan cheklovchi ferment yordamida kesilib chiqariladi. Kasseta uchlari va xromosomadagi nishon gen o'rtasidagi gomologik rekombinatsiya bu genning aniq o'chirilishiga olib keladi (5.4-rasm).

Bu tadqiqotlarda xamirturushdan alohida genlar yoki genlar guruhlarini o'chirildi va natijada fenotipdagi o'zgarishlar kuzatildi. Bu yo'l orqali, ma'lum bir gen ma'lum bir funksiyaga bog'liq bo'lishi mumkinligi aniqlangan, ammo amaliyotda genni o'chirish har doim ham aniqlanadigan fenotip o'zgarishiga olib kelmaydi. *S. cerevisiae* genomidagi alohida genlarni tizimli ravishda o'chirish PCR orqali olingan ketma-ketliklarni kiritish va gomologik rekombinatsiyani ekspluatatsiya qilish orqali amalga oshirildi. Bu xamirturushda filamentli zamburug'larga qaraganda osonroq, chunki filamentli zamburug'larda gomologik rekombinatsiyaning samaradorligi pastroq ko'rinadi va ko'pincha uzoqroq gomologik DNK ketma-ketliklari talab qilinadi. Xamirturushda har bir o'chirish noyob DNK ketma-ketligi bilan belgilanib, bu mutant uchun shtrix-kod sifatida xizmat qiladi.



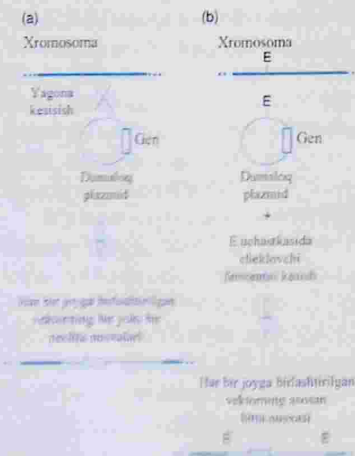
5.4-rasm. *S. cerevisiae* da genni kanamisin (G418) «o'rmini bosuvchi kasseta» yordamida o'chirish

Kasseta kanamisin (G418) ga qarshilik genidan (*Kan*), zamburug' promotorining boshqaruvdagi (*P*) va o'chiriladigan genning uchlariga mos keluvchi taxminan 40 bp uzunlikdagi qisqa flanking ketma-ketliklardan iborat. Gomologik rekombinatsiya orqali bu uchlar va xromosoma o'rtasida ikkita kross-over hosil bo'lib, genning o'chirilishiga olib keladi. Kross-over joylarida xromosomal DNK molekullari fermentativ ravishda uzilib, DNKning kelib tushayotgan kasseta DNKsi bilan almashinadi va DNK tuzatish mexanizmi orqali DNK molekullari qayta birlashtiriladi.

Ko'pgina genlar hayot uchun zarur bo'lganligi sababli, genni o'chirish dastlab diploid hujayralarda amalga oshiriladi, bunda genning ikkita nusxasidan faqat bittasi o'chiriladi. O'chirilgan genni o'z ichiga olgan xamirturushning diploid transformantlari G418 antibiotikini o'z ichiga olgan ozuqa muhitida tanlanadi. G418 xamirturush hujayralariga nisbatan kanamisinga qaraganda samaraliroq hisoblanadi. Shundan so'ng, bu transformantlar sporulyatsiya (meiozni o'z ichiga olgan jarayon) orqali haploid sporalarni hosil qilishga majbur qilinadi, ularning 50 foizi o'chirilgan genni o'z ichiga oladi.

Shundan keyin, genning zaruriyligini aniqlash va uning hujayradagi funksiyasini o'rganish uchun o'sish sinovlari o'tkazilishi mumkin.

Ko'pgina filamentli zamburug'larni transformatsiya qilish uchun ishlatiladigan vektorlar tasodifiy integratsiya hodisalariga tayanadi, bu hodisalar ko'pchilik hollarda nisbatan past chastotada yuz beradi. Transformatsiya chastotalarini oshirish uchun qo'llanilgan yondashuvlardan biri cheklovchi ferment yordamida integratsiyalash (REMI) usulidir. Bu usulda plazmid DNK hujayralarga cheklovchi ferment bilan birga qo'shiladi (4-bobga qarang), bu ferment vektorda faqat bir joyni kesib o'tadi. Bu sharoitlarda DNK genomdagi mos cheklovchi joylarga yo'naltiriladi. Filamentli zamburug'larda standart integrativ transformatsiya orqali vektor odatda genomning bir yoki bir nechta joylarida bir nechta nusxalar sifatida uchraydi. REMI usuli esa bir nechta turli joylarda bir nusxali vektorlarning ulushini oshiradi (5.5-rasm).



Kiritilgan genning xost genomida joylashgan joyi uning kodlagan oqsilni ishlab chiqarish qobiliyatiga ta'sir qiladi. Shu sababli, genlarni yaxshi ifodalanishini ta'minlaydigan ma'lum xromosomal joylarga yo'naltirish uchun usullar ishlab chiqilgan.

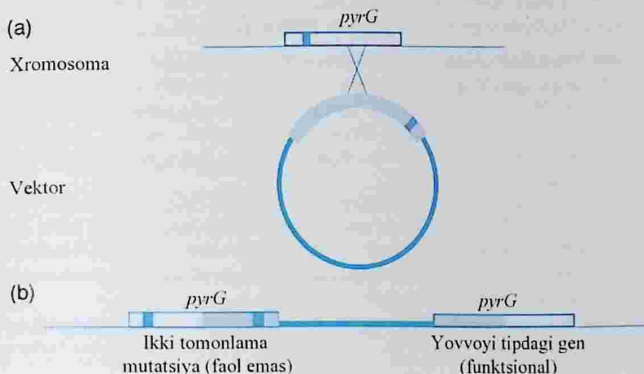
5.5-rasm. Filamentli zamburug'lar xromosomalariга plazmidning tasodifiy integratsiyasi

(a) Tasodifiy (ektopik) integratsiya, ehtimol, DNK ketma-ketliklari o'rtasida past darajadagi o'xshashlikka ega bo'lgan kross-over orqali yuzaga keladi va bu xromosomaning bir nechta joylarida integratsiyaga olib

keladi. Rekombinatsiya hodisasi tabiati tufayli, integratsiya ko'pincha vektorning butunligicha nusxalanishi yoki integratsiya joyida yana ham ko'payishiga olib keladi.

(b) Cheklovchi ferment yordamida modifikatsiyalangan integratsiya (REMI) transformatsiya jarayonida plazmid DNK bilan birga faqat bitta joyni (E) kesib o'tadigan maxsus cheklovchi fermentning katta miqdorda qo'shilishini o'z ichiga oladi. Taxmin qilinishicha, ferment hujayra yadrosiga kirib, xromosomalardagi bir nechta joylarda genomik DNKni tasodifiy ravishda kesadi. Xuddi shu cheklovchi joyda kesish orqali vektor molekulasining aylana shakldan chiziqli shaklga aylanishi plazmidning butunligicha bir nechta xromosomal joylarga integratsiyasiga imkon beradi.

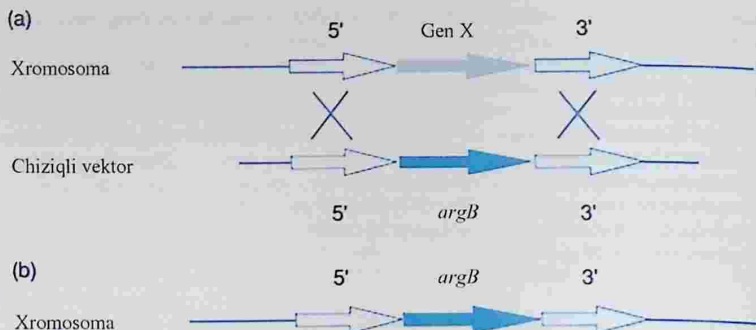
Bu jarayon zamburug' genomida bir nusxali vektor molekularining ko'plab joylarga integratsiya qilinish ulushini oshiradi, ammo uning tasodifiy xususiyati tufayli barcha xromosoma joylari vektorni o'z ichiga olmaydi.



5.6-rasmi. *Aspergillus awamori* da *pyrG* lokusiga yo'naltirilgan integratsiya

Aspergillus awamori ning xost shtammi uridin talab qiluvchi o'sish xususiyatini beradigan mutatsiyaga uchragan (faol bo'lmagan) *pyrG* genini o'z ichiga oladi. Transformatsiya vektori esa *pyrG* genining boshqa qismida mutatsiyaga uchragan faol bo'lmagan *pyrG* genini o'z ichiga oladi. Bitta gomologik rekombinatsiya (bitta kross-over) hodisasi orqali (a), vektorning butunligi *pyrG* lokusiga integratsiyalanadi va funksional *pyrG* geni yaratiladi (b).

Kross-over hodisasi DNKni tuzatish mexanizmi orqali vektor va xromosomadagi DNK molekularini uzish va qayta birlashtirishni o'z ichiga oladi (5.4-rasmda tasvirlangan mexanizmga o'xshash). Zamburug' transformantlari o'sish muhitida qo'shimcha uridin talab qilmasdan o'sish qobiliyati bo'yicha tanlab olinadi.



5.7-rasm. Filamentli zamburug'larda ma'lum bir genni o'chirish

Xromosomal gen (gen X) ning yuqori oqim (5') va pastki oqim (3') hududlari, har biri kamida 1 kb hajmda bo'lib, o'chirilishi kerak bo'lgan gen bilan bevosita yonma-yon joylashgan. Bu hududlar mos tanlov markerini o'z ichiga olgan vektorga kiritiladi. Masalan, *Aspergillus nidulans* ning *argB* geni, arginin biosintezida ishtirok etuvchi ornitin karbamoil transferaza fermentini kodlaydi, tanlov marker sifatida ishlatiladi.

Odatda aylana shakldagi DNK molekulasini bo'lgan plazmid cheklovchi ferment yordamida faqat bir joydan kesib o'tib chiziqli shaklga aylantiriladi. Bu chiziqlangan vektor keyin *argB* mutanti shtammiga transformatsiya qilinadi. 5' va 3' hududlarda ikkita gomologik rekombinatsiya hodisasi (ikki kross-over, 5.4-rasm) ko'rsatilganidek) sodir bo'ladi, natijada xromosomadagi gen X o'rniga *argB* tanlov markeri joylashtiriladi.

Transformatsiyalangan zamburug'lar arginin qo'shimchasini talab qilmasdan o'sish qobiliyatini orqali tanlab olinadi. Bu esa gen X o'rnini *argB* markeri bilan muvaffaqiyatli almashtirilganligini ko'rsatadi.

Genni yo'naltirilgan maqsadga integratsiya qilish usuli

Aspergillus turlarida ishlab chiqilgan genni maqsadga yo'naltirilgan integratsiya qilish usuli, muayyan genning bitta mutatsiyasiga ega shtammdan foydalanishni talab qiladi. Bu shtamm integrativ plazmid bilan transformatsiya qilinadi, plazmid esa o'sha genning boshqa mutatsiyaga ega nusxasini o'z ichiga oladi. Faol gen faqat vektor mo'ljaldagi gen joyida bitta kross-over hodisasi orqali integratsiyalangan taqdiridagina hosil bo'ladi (5.6-rasm). Transformantlarning 40% gacha bo'lgan qismi to'g'ri gen lokusida vektorning bitta nusxasi integratsiyalangan holda bo'lishi mumkin, ammo transformatsiya chastotalari odatda juda past.

Zamburug'larda mos marker bilan aylana plazmidlardan foydalanib genni maxsus buzish juda kam uchraydigan hodisa hisoblanadi. Filamentli zamburug'larda genni o'chirish yoki almashtirish uchun odatda 1 kilobazadan (kb) katta bo'lgan genning yaqinidagi hududlar vektorga kiritilishi kerak. Transformatsiyadan oldin vektor cheklovchi ferment yordamida chiziqlangan shaklga aylantiriladi. Ikki kross-over hodisasi orqali genni almashtirish chastotasi tur va gen turiga bog'liq holda 1% dan 50% gacha o'zgarishi mumkin (5.7-rasm).

5.3 Genlarni klonlash

Zamburug' genlarini izolyatsiya qilish va xususiyatlarini o'rganish muvaffaqiyati tadqiq etilayotgan turga juda bog'liq. Genetik jihatdan kam o'rganilgan, ammo biotexnologik jihatdan foydali zamburug'larda duch kelinadigan muammolarni yengib o'tish uchun bir nechta yondashuvlar qabul qilingan. Mutant shtamlardan foydalanish zamburug' genlarini klonlashda asosiy usul bo'lib kelgan. Bu yondashuvda, mutant shtamlar DNK kiritilishi orqali yovvoyi fenotipga transformatsiya qilinadi va bu DNK faqat bitta genni o'z ichiga olgan taqdirda, bu genning funksiyasini aniqlashga imkon beradi.

Endi gen ma'lumotlar bazalaridagi gen ketma-ketliklari haqida kengayib berayotgan ma'lumotlardan foydalanadigan boshqa variantlar ham mavjud, garchi klonlangan genning funksional bahosi har doim amalga oshirilishi kerak. Ba'zi genlar uchun «ifodali klonlash» qulay va samarali usul hisoblanadi, bu yangi metabolik faoliyatni aniqlash uchun xamirturushga oddiy plastinka sinovi yordamida DNK kiritishga asoslangan.

5.3.1 Mutantlarni izolyatsiya qilish

Aniqlangan mutantlarning genlarni to'ldirish orqali ma'lum funksiyalarga ega genlarni izolyatsiya qilish eng samarali usul bo'lib qolmoqda, garchi bunday mutantlarni hosil qilish ko'plab qiziqarli zamburug'lar uchun muammo bo'lib qolsa ham. Fizik-kimyoviy mutagenlar, masalan, ultrabinafsha nurlanish yoki nitrozo-guanidin, hali ham zamburug' mutantlarini hosil qilishning eng keng tarqalgan usuli hisoblanadi. Bunday mutantlarni ba'zan oddiy o'sish sinovlari mavjud bo'lganda tezda aniqlash mumkin. Biosintetik yo'lda boshqa genlardagi mutatsiyalar ham xuddi shunday o'sish talabini keltirib chiqarishi mumkin bo'lgani sababli, mutantni qanday bosqich ta'sirlanganligini aniqlash uchun turli substratlarni metabolizatsiya qilish qobiliyati sinovdan o'tkaziladi.

Fizik-kimyoviy mutagenizatsiya usullarining bir kamchiligi shundaki, bu jarayon ko'pincha har bir hujayrada bir nechta mutatsiyalarni keltirib chiqaradi. Bu esa kuzatilgan xususiyatning haqiqiy omillarini aniqlashni qiyinlashtirishi mumkin. Shu sababli, mutantlarni olish uchun muqobil usullar *S. cerevisiae*, *A. nidulans* va *N. crassa* kabi model organizmlarda ishlab chiqilgan. Bu model tizimlar genetik jihatdan kam o'rganilgan turlarga qo'llanilishi mumkin bo'lgan foydali usullarni taqdim etadi.

DNK parchasini gen ichiga kiritish orqali genning normal DNK ketma-ketligini o'zgartiruvchi (kiritma inaktivatsiya) yoki genni to'liq o'chirish orqali mutagenizatsiya usullari aniq genetik fon zarur bo'lganda afzalroq hisoblanadi. Xost genomida bir joydan ikkinchi joyga ko'chish qobiliyatiga ega bo'lgan DNK fragmentlari, ya'ni transpozonlar, ko'plab turlarda tabiiy ravishda uchraydi va bu maqsadda foydalanilishi mumkin. Masalan, *S. cerevisiae* da transpozon Ty bu usulda qo'llaniladi, shuningdek, shunga o'xshash elementlar *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* va boshqa xamirturushlarda aniqlangan.

Yuqorida muhokama qilinganidek, bir nechta zamburug' turlarining genom ketma-ketliklari aniqlangan, shuning uchun keyingi qadamlar genlarning genom ichidagi joylarini aniqlash va keyinchalik gen mahsulotlarini funksional xarakterlashdir. Bu xamirturush turlarida transpozon (masalan, bakterial transpozon *Tn7*) mutagenezi yordamida genom darajasida amalga oshirildi. Filamentli zamburug'larda bu usul kamroq rivojlangan bo'lsa-da, transpozonlardan foydalangan holda keng ko'lamli gen buzilishlari istiqbolli natijalarni ko'rsatmoqda.

Boshqa kiritma inaktivatsiya tizimlari ham mavjud bo'lib, ularga 5.2.3-bo'limda tasvirlangan cheklovchi ferment yordamida integratsiya (REMI) kiradi.

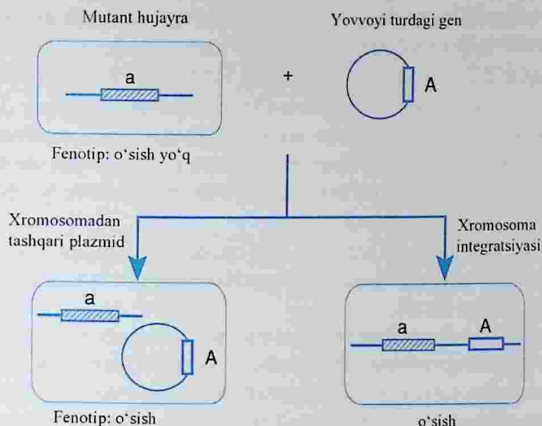
Mutantlar oson aniqlanadigan fenotipga ega bo'lishi kerak, shunda ko'plab koloniyalar tezda sinovdan o'tkazilishi mumkin. Ekstratsellyulyar mahsulotlarning ishlab chiqarilishini sinab ko'rish bunga oddiy va tezkor usulni taqdim etadi. Masalan, substratlarni o'z ichiga olgan agar plastinkalar, tozalash zonalar yoki rang o'zgarishini aniqlash imkonini beradi va ko'pincha ko'p sonli filamentli zamburug'larning saprofit hayot tarzi bilan bog'liq ekstratsellyulyar fermentlarni kodlovchi genlarni izolyatsiya qilishda qo'llaniladi.

Shu sababli, faqat uglerod manbasi sifatida kraxmalni o'z ichiga olgan agar plastinkalar amilazalarni ishlab chiqarishni sinash uchun ishlatilishi mumkin. Ko'pincha, ma'lum bir sinfga mansub mutantlarni izolyatsiya qilish uchun maxsus strategiyalarni qo'llash mumkin. Masalan, hujayra ichidagi oqsilning joylashuvi ustida ishlash: agar muhim oqsil odatda sitoplazmada joylashgan bo'lsa, lekin u genetik jihatdan sekretor yo'l orqali hujayra tashqarisiga yo'naltiriladigan signallarni o'z ichiga olish uchun modifikatsiya qilingan bo'lsa, unda bu jarayonni to'xtatadigan sekretor yo'lda mutatsiyaga ega mutantlar tanlanishi mumkin.

5.3.2 Mutantni to'ldirish (Komplementatsiya)

Organizmning butun genomini o'z ichiga olgan DNK fragmentlari vektorga klonlanishi va natijada «kutubxona» deb ataladigan DNK molekulalari populyatsiyasini hosil qilishi mumkin. Aniqlangan zamburug' mutantlarini zamburug' DNK kutubxonasi bilan transformatsiya qilish orqali to'ldirish yuqori transformatsiya chastotasiga ega bo'lgan *S. cerevisiae* va *A. nidulans* kabi zamburug'lar uchun yaxshi yo'lga qo'yilgan usuldir (5.8-rasm).

Bundan tashqari, ba'zi gen mahsulotlari tur chegaralaridan tashqarida yetarli-cha saqlanib qolgan bo'lib, ular bakterial fon sharoitida ham ishlashi mumkin. Bu, masalan, bakteriyalarda ishlatilishi mumkin bo'lgan saqlanib qolgan oqsil funksiyalarini tekshirish yoki mutantlarni komplementatsiya qilish uchun kengaytirilgan imkoniyatlar taqdim etadi. Bu yondashuv mutantlarni aniqlash va genlarning o'ziga xos funksiyalarini o'rganish uchun samarali vosita sifatida xizmat qiladi.



5.8-rasm. Mutant genni yovvoyi tur geni bilan to'ldirish (komplementatsiya)

Hujayradagi mutant gen (a) plazmididagi mos keluvchi yovvoyi tur gen (A) bilan to'ldiriladi. Bu yerda mutant gen a ni, esa yovvoyi tur gen A ni ifodalaydi.

Hujayra ichida gen A ning mavjudligi, u plazmid shaklida yoki xromosomaga integratsiyalangan holda bo'lishidan qat'i nazar, o'sishga imkon beradi. Bu jarayon mutant genning o'rnini to'ldirib, hujayraga kerakli fenotipni tiklaydi va genning funksiyasini o'rganishga yordam beradi.

Yuqoridagi rasm mutatsiyaga uchragan genni (a) mos keluvchi yovvoyi turdagi gen (A) bilan to'ldirish jarayonini ko'rsatadi:

1. Mutant hujayra (chapda): mutant gen (a) mavjud bo'lib, u fenotipda o'sishga imkon bermaydi (fenotip: o'sish yo'q).

2. Transformatsiya:

- yovvoyi turdagi gen (A) o'z ichiga olgan plazmid mutant hujayraga kiritiladi;
- gen A ikki xil shaklda mavjud bo'lishi mumkin: a) Xromosomadan tashqari plazmid sifatida (quyi chapda) va b) xromosomaga integratsiyalangan holda (quyi o'ngda).

3. Natija: har ikkala holatda ham gen A fenotipni to'ldiradi va hujayra o'sish qobiliyatini tiklaydi (fenotip: o'sish).

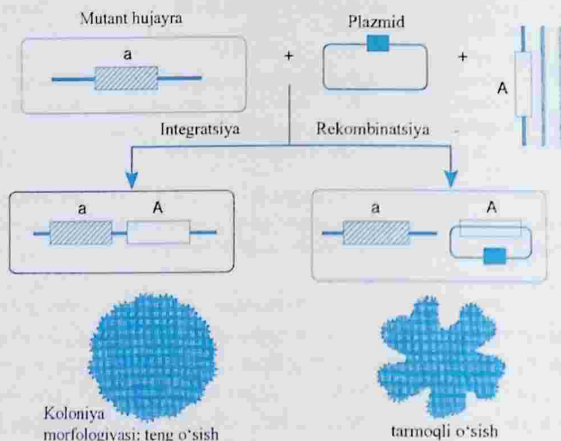
Bu jarayon yovvoyi turdagi genni plazmid yoki xromosomal integratsiya orqali to'ldirish orqali genning funksiyasini tiklash uchun ishlatiladi. Bu genning biologik rolini aniqlashda va mutatsiyaga uchragan organizmlarni o'rganishda samarali vositadir.

Ko'plab zamburug' genlari *E. coli* mutantlarini to'ldirish orqali izolyatsiya qilingan, garchi zamburug' xostlarini transformatsiya qilish odatiy hol bo'lib qolsa ham. Gen funksiyasini baholashning eng aniq yo'li, qiziqish uyg'otuvchi genning bitta nusxasini zamburug' xost DNK ga integratsiya qilishdan iborat. Ko'plab xamirturushlar, masalan, *S. cerevisiae*, va ba'zi filamentli zamburug'lar hujayrada bir nechta nusxalarda mavjud bo'lishi mumkin bo'lgan doira shaklidagi DNK molekulasiga (plazmidga) genni kiritishga imkon beradi. Ayrim hollarda, bu o'xshash (lekin identik bo'lmagan) genlarning mutatsiyani to'ldirishiga imkon beradi va bu gen funksiyasi haqida noto'g'ri tasavvur paydo bo'lishiga olib kelishi mumkin.

Filamentli zamburug'larida xromosomadan tashqarida replikasiya qiladigan plazmidlar xamirturushlarga qaraganda ancha kam uchraydi. Shunga qaramay, bunday vektorlar hali ham aniq mutatsiyalarni to'ldirishga qodir zamburug' genlarini aniqlash uchun ishlatilishi mumkin (5.9-rasm). Masalan, agar *Aspergillus nidulans* mutanti faqat bakterial tanlov markerini va zamburug' replikasiya kelib chiqish nuqtasini (ori) o'z ichiga olgan plazmid va o'rganilayotgan zamburug'dan ajratilgan chiziqli genomik DNK aralashmasi bilan transformatsiya qilinsa, ikki xil sinfdagi transformantlar olinadi:

1. Birinchi sinf: plitalarda barqaror, yovvoyi turdagi fenotipni ko'rsatadi, bu to'ldiruvchi DNKning *A. nidulans* xromosomalarga to'g'ridan to'g'ri integratsiyasi natijasida yuzaga keladi.

2. Ikkinchi sinf: koloniyalarda notekis o'sishni ko'rsatadi, bunda har bir koloniya ma'lum sektorlari yovvoyi turga o'xshash fenotipni ko'rsatadi, boshqa sektorlar esa mutant fenotipga ega. Bu «sektorli» morfologiya ikkita DNK manbalari o'rtasidagi rekombinatsiya natijasida hosil bo'lgan plazmidlarning mavjudligi bilan bog'liq bo'lib, ular hujayra bo'linishi jarayonida yo'qolishi mumkin. Bunday beqaror *A. nidulans* koloniyalaridan jami DNKni ajratib olish va uni *E. coli* ga transformatsiya qilish, dastlabki *A. nidulans* mutatsiyasini to'ldirgan zamburug' DNK fragmentini o'z ichiga olgan plazmidlarni izolyatsiya qilish imkonini beradi. Bu usul gen funksiyasini o'rganish va zamburug' DNK fragmentlarini aniqlash uchun qulaydir.



5.9-rasm. Filamentli zamburug' mutantini komplementatsiya qilish orqali genni izolyatsiya qilish

Bu rasm filamentli zamburug'da aniqlangan mutantni to'ldirish orqali genni izolyatsiya qilish jarayonini tasvirlaydi:

1. Mutant gen (*a*) va yovvoyi tur geni (*A*). Mutant gen (*a*) zamburug' genomida mavjud. Yovvoyi tur geni (*A*) genomik DNKda (–) joylashgan va yovvoyi tur fenotipni tiklash uchun zarur.

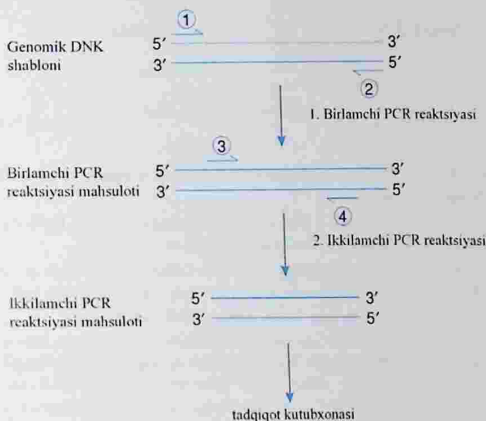
2. Plazmid va ori. Plazmid fungal replikasiya kelib chiqish nuqtasini (*ori*) o'z ichiga oladi. plazmid genomik DNK bilan rekombinatsiyaga kirishadi va yovvoyi tur geni (*A*) ni o'z ichiga olgan plazmid hosil qiladi.

3. Rekombinatsiya va beqaror o'rin olish. Plazmid va genomik DNK o'rtasidagi rekombinatsiya natijasida yovvoyi tur geni (*A*) ning beqaror irsiyati yuzaga keladi. Bu koloniyada «sektorli» morfologiyaga olib keladi: Plazmid mavjud bo'lgan joyda o'sish kuzatiladi. Plazmid yo'qolgan qismlarda o'sish to'xtaydi.

4. Plazmidni izolyatsiya qilish. Yovvoyi tur geni (*A*) ni o'z ichiga olgan plazmid koloniyalaridan ajratib olinadi va Bu genni aniqlash va uning funksiyasini o'rganishga imkon beradi.

Bu jarayon aniqlangan mutantni to'ldirish orqali genlarni izolyatsiya qilish uchun ishlatiladi va genetik tahlil uchun qulay vositadir.

Bu usulning afzalliklari shundaki, u tezkor va zamburug'ning jami DNK dan alohida genlar kutubxonasini yaratish zarur emas.

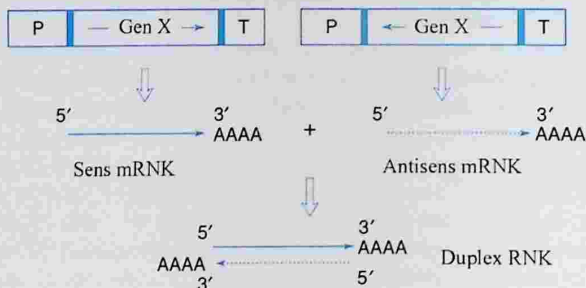


5.10-rasm "Interred primer" PCR. Dastlabki PCRda maqsadli genning saqlanib qolgan hududlariga qarshi ishlab chiqilgan ortiqcha primer aralashmalari (1 va 2) qo'llaniladi. Birinchi primer to'plamining ichki qismidagi qo'shimcha konservatsiyalangan hududlarga qarshi ishlab chiqilgan primer aralashmalari (3 va 4) shablon sifatida birinchi PCR mahsulotidan foydalangan holda ikkinchi PCRda qo'llaniladi. Bu maqsadli genga xos bo'lgan PCR bilan kuchaytirilgan mahsulotlarni boyitishi kerak.

Bu usul PCR mahsulotlari agaroz geli orqali elektroforez qilinganda birinchi reaksiyada xiralashgan ko'rinish (smeared) hosil qiladigan maxsus o'lchamdagi fragmentlarni ko'paytirishda muvaffaqiyatli bo'lishi mumkin. Bitta zanjirli primerning shablon DNKda uning komplementar ketma-ketligiga bog'lanadigan harorati annealing harorati deb ataladi va bu DNKning baza tarkibiga bog'liq. Shu

sababli, primerlar aralashmasi ishlatilganda mumkin bo'lgan annealing harorati diapazoni tor bo'lishi mumkin.

Shuningdek, amaliyotda bir nechta haroratlar va tampon komponentlarining konsentratsiyalari sinovdan o'tkazilishi kerak, faqat ikkala primerlar to'plamini o'z ichiga olgan reaksiyalarda o'ziga xos fragmentlar hosilini optimallashtirish uchun. Potensial nomzod fragmentlar, agar kerak bo'lsa, klonlanishi, so'ngra kerakli gen bilan bir xilligini tasdiqlash uchun sekvenslanishi kerak. Bu fragmentlar to'liq gen ketma-ketligini o'z ichiga olgan klonlarni kutubxonadan ajratib olish uchun zond sifatida ishlatilishi mumkin.



5.11-rasm. «Antisens» RNK transkriptlari orqali oqsil ishlab chiqarishni pasaytirishning mumkin bo'lgan mexanizmi

Ochiq qutilar gen X ni ifodalaydi, u ikki xil yo'nalishda klonlangan bo'lishi mumkin va promotor (P) va terminator (T) ketma-ketliklari bilan o'ralgan.

Transkripsiya natijasida, genning promotor bilan nisbatan yo'nalishiga qarab, ma'no (sense) yoki antisens mRNK molekulari (ikkalasi ham poliA dumiga ega) hosil bo'ladi. Bu ikki komplementar RNK molekulasini bir-biri bilan bog'lanib, duplex RNK hosil qiladi.

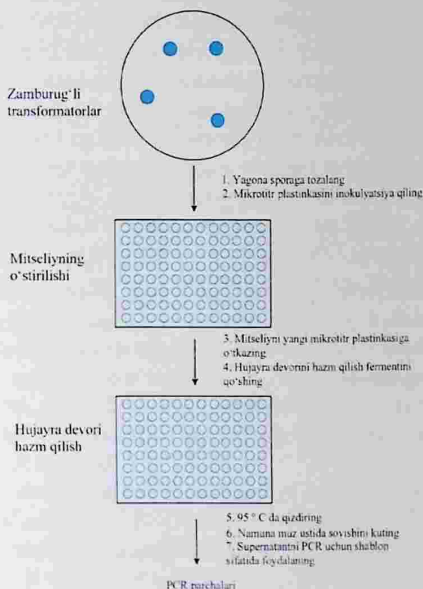
Yadroda duplex RNK hosil bo'lishi sitoplazmada tarjima qilish uchun mavjud bo'lgan yetuk mRNK miqdorini kamaytiradi. Bu jarayon oqsil ishlab chiqarishni kamaytirishga yordam beradi.

5.3.4 PCR va zamburug'lar

Genlarni izolyatsiya qilishda foydalanishdan tashqari, PCR ko'plab tizimlarda o'ziga xos DNK manipulyatsiyalari natijalarini tekshirishda ham keng qo'llaniladi. Biroq ayrim filamentli zamburug'larda hujayra devori DNKni yetarlicha miqdor va tozalikka ega holda olish uchun jiddiy to'siq bo'lib kelgan, bu esa PCR yordamida keng ko'lamli skriningni qiyinlashtiradi.

Endi shunday protokol ishlab chiqilganki, unda zamburug' koloniyalari mikroplastinalardagi suyuq muhitda o'stiriladi va fermentativ hazm qilish yordamida ularning hujayra devorlari olib tashlanadi, bu esa protoplastlarning hosil bo'lishiga olib keladi. PCR siklining «issiq» denaturatsiya bosqichi protoplastlarni lizis qiladi va natijada DNKni chiqaradi. Bu DNK o'ziga xos DNK fragmentlari mavjudligini tekshirish uchun ishlatilishi mumkin (5.12-rasm).

Shuningdek, mitseliyalar, sporalar yoki hujayralardan foydalanadigan va PCR amplifikatsiyasidan oldin hujayralarni yorish uchun qisqa isitish bosqichini o'z ichiga olgan boshqa protokollar ko'plab zamburug' turlari bilan yaxshi ishlaydi. Bu yondashuvlar PCR yordamida zamburug' genlarini o'rganishda samaradorlikni oshiradi.



5.12-rasm. Zamburug' transformantlarini PCR yordamida skrining qilish

1. Transformant koloniyalaridan sporalarining olinishi

• Agar plastinkalardagi tozalangan zamburug' transformant koloniyalaridan sporalar olinadi va mikroplastinalardagi ozuqa muhitiga inokulyatsiya qilinadi.

2. Mitseliyning o'stirilishi

• 16–24 soat davomida o'stirilgandan so'ng, zamburug' mitseliyalari dastlabki mikroplastinaga yangi mikroplastinaga ko'chiriladi.

3. Protoplastlarga aylantirish

• Yangi mikroplastinaga KCl/sitrat tamponi qo'shiladi va zamburug' hujayra devorini hazm qilish uchun ferment kiritiladi.

• Bu jarayon natijasida ba'zi hujayralar protoplastlarga aylantiriladi.

4. Protoplastlarni lizis qilish

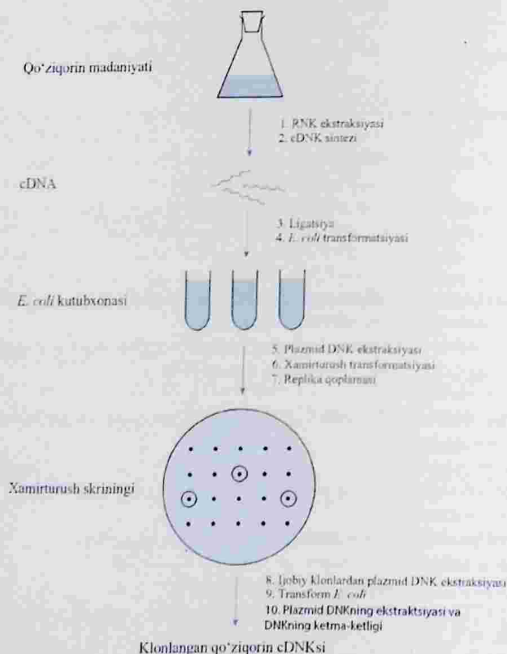
• 37 °C haroratda 1 soat davomida inkubatsiya qilinadi.

• So'ngra, 5–10 µl supernatant olinadi, undagi protoplastlar issiqlik yordamida lizis qilinadi va chiqarilgan DNK PCR uchun shablon sifatida ishlatiladi.

Bu usul zamburug' transformantlarini tez va samarali skrining qilish imkonini beradi, qoniqsa, o'ziga xos DNK fragmentlarining mavjudligini tekshirishda foydali.

5.3.5 Geterologik gen zondlari

Ma'lum bir genni izolyatsiya qilishning uchinchi strategiyasi boshqa organizmlardan olingan va kerakli zamburug' geni tomonidan kodlangan oqsilni kodlaydigan radioaktiv belgilangan DNK fragmentlari (zondlar) dan foydalanishni o'z ichiga oladi. Bular *geterologik gen zondlari* deb ataladi. Boshlang'ich tajribalarda bir zanjirli (denaturatsiyalangan) zamburug' genomik DNK agaroz geli elektroforezidan so'ng naylon membranaga ko'chiriladi (*Southern blotting* usuli). Bu yondashuvning samaradorligini aniqlash va gibridizatsiya uchun optimal sharoitlarni belgilash uchun ishlatiladi. Geterologik zondning ketma-ketligi turli kelib chiqishi tufayli zamburug' genining ketma-ketligidan sezilarli darajada farq qilishi mumkin. Shu sababli, radioaktiv zondning zamburug' DNKga bog'lanadigan harorati (*annealing* yoki gibridizatsiya harorati) muhim parametr hisoblanadi. Gibridizatsiyadan so'ng yuvish jarayonida tuz konsentratsiyasini o'zgartirish orqali xoslikni yaxshilash mumkin. Gibridizatsiya sharoitlari optimallashtirilgandan so'ng, o'rganilayotgan organizmning DNK kutubxonasi skriningdan o'tkazilishi mumkin. Bu yondashuv zamburug' genlarini aniqlash va izolyatsiya qilishda foydalidir.



5.13-rasm. Ekspressiya klonlash

1. cDNA'larni klonlash – turli oqsillarni sekretsiya qiladigan modaniyalardan olingan cDNAlar *E. coli* da replikasiya qilishga qodir bo'lgan xamirturush (*yeast*, *S. cerevisiae*) ekspressiya vektoriga klonlanadi.

2. DNK molekulalarini yig'ish – *E. coli* transformantlaridan olingan DNK molekulalarini yig'iladi va xamirturush hujayralarini transformatsiya qilish uchun ishlatiladi.

3. Xamirturush transformantlarini skrining qilish – xamirturush transformantlari plasmida asosida oddiy sinovlar yordamida muvofiq fermentativ faollik uchun skrining qilinadi.

Bu usul ma'lum bir fermentativ faollikka ega genlarni aniqlash va ifodalashda samarali bo'lib, genlarni identifikatsiya qilish va ularning funksiyalarini o'rganish uchun qulay vosita sifatida xizmat qiladi.

5.3.6 Gen izolyatsiyasi uchun ma'lumotlar bazasi va bog'lanishga asoslangan usullar

Ma'lumki, genlarni izolyatsiya qilish uchun ikkita qo'shimcha strategiya mavjud.

1. Sintentiyaга asoslangan yondashuv

Bu yondashuv turli turlardagi genlarning DNK ketma-ketliklari o'rtasida sezilarli farqlar mavjud bo'lsa ham, genlarning jismoniy bog'lanishlari saqlanib qolishini hisobga oladi. Masalan, agar X organizmida A va B genlari bir xil xromosomada qo'shni joylashgan bo'lsa, va bu holat zamburug' tizimida ham amal qilsa, unda B genini skrining qilish orqali A genini izolyatsiya qilish mumkin bo'ladi. Bu usul ishlashi uchun model organizm (X) ning batafsil genom xaritasi talab qilinadi. Bir nechta genomlar ketma-ketligi aniqlangan yoki hozirda sekvenlanmoqda, va xaritalar tuzilgan bo'lib, bu yondashuv uchun asos bo'lib xizmat qilishi mumkin (qarang: 5.1-jadval).

2. cDNA kutubxonalaridan foydalanishga asoslangan yondashuv

Muqobil yondashuv sifatida qisman to'ldiruvchi DNK (cDNA) kutubxonalari qo'llaniladi. Bu kutubxonalar quyidagi jarayon orqali yaratiladi:

a) Zamburug' RNK namunalaridan foydalanib, keng tarqalgan cDNA sintez to'plamlari yordamida cDNAlar ishlab chiqariladi.

b) Bu cDNAlar transkripsiya qilingan ketma-ketliklarning uchlaridan tashkil topgan bo'lib, ifodalangan ketma-ketlik belgilari (ESTs) deb ataladi.

Bu yondashuv avtomatlashtirilgan sekvenlash bilan birlashtirilganda, gen ketma-ketlik ma'lumotlar bazalarida transkripsiya qilingan genomik ketma-ketliklarni aniqlash uchun tezkor ma'lumotlarni taqdim etadi. Bu genlarni identifikatsiya qilish va ularning funksiyalarini o'rganish uchun muhim vositadir.

5.3.7 Ekspressiya klonlash

Ba'zi zamburug'lar hayot tarzi tufayli yuqori konsentratsiyada oqsillarni sekretsiya qiladi, ularning ko'pi turli sanoatlarda qo'llaniladi. Yaqinda *ekspressiya klonlash* deb ataluvchi tezkor va samarali usul ekstratsellyulyar fermentlarni kodlovchi genlarni ajratib olish uchun ishlab chiqilgan (5.13-rasm). Mazkur jarayon quyidagichadir:

1. Zamburug⁺ mo'ljalidagi gen(lar) ifodasini induksiya qilish kutiladigan sharoitlarda o'stiriladi.

2. Zamburug⁺dan mRNK ajratib olinadi va *E. coli* da klonlash uchun cDNA kutubxonasi yaratiladi.

3. Xamirturush transformatsiyasi: bu kutubxona *S. cerevisiae* ni transformatsiya qilishda qo'llaniladi. Ma'lumki, transformantlar oddiy assay orqali yangi fermentativ faollikni aniqlashga imkon beruvchi muhitda o'stiriladi.

4. Boshqa xamirturush xostlari: *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia angusta* (ilgari *Hansenula polymorpha*) va *Schizosaccharomyces pombe* kabi boshqa xamirturush xostlari ham transformatsiya bosqichida afzal ko'rilishi mumkin.

Bu tizim yordamida 150 dan ortiq zamburug⁺ fermentlari, jumladan, arabina-nazalar, endoglikanazalar, galaktanazalar, mannanazalar, pektinazalar, proteazalar va boshqa ko'plab fermentlarni klonlashda samaradorligi ko'rsatildi. Bu yondashuv cDNA bosqichida to'liq uzunlikdagi mahsulotlarning sintezini talab qiladi, chunki oqsil sekretsiya signali mavjud bo'lishi va xamirturush xostida funksional bo'lishi kerak. Fermentlarning xamirturush xostida ifodalanishi va osongina aniqlanadigan fenotip ham talab qilinadi.

5.4 Gen tuzilishi, tashkil etilishi va ifodasi

Umuman olganda, yuqori organizmlardagi genlarning transkripsion signallari bakterial tizimlarga qaraganda ancha murakkab. Zamburug⁺larda genlarning tashkil etilishi ko'plab tur va jinslarda umumiy xususiyatlarga ega. Zamburug⁺ genlarining asosiy tashkil etuvchi qismlari: promotorlar (gen transkripsiyasini yoqish yoki o'chirishni boshqaradi), terminatorlar (transkripsiyani to'xtatishni boshqaradi), intronlarni chiqarish signallari (mRNKdan intronlarni chiqarish jarayonini boshqaradi).

Fungal promotorlarning o'ziga xos xususiyatlari shundan iborat: uzunligi – zamburug⁺ promotorlari transkripsiya boshlanish nuqtasidan (*tsp*) yuqoriga qarab >1 kb masofani egallashi mumkin. Spesifikligi – *S. cerevisiae* ning erta klonlash tajribalari xorijiy genlarni ifodalash uchun mahalliy promotorlar talab qilinishini ko'rsatdi. Keyinchalik, boshqa xamirturushlardan, masalan, *K. lactis* dan olingan promotorlar ham *S. cerevisiae* da ishlashi aniqlangan.

Filamentli zamburug⁺larda promotorlar odatda o'z jinslarida yaxshi ishlaydi, lekin uzoqroq qarindosh turlarda kamroq barqaror. Promotorlarning turlari: doimiy (konstitutiv)¹⁰, ya'ni doimiy ravishda yoqilgan holda qoladi.

¹⁰ Doimiy promotorlarda transkripsiyaning bazal darajasi yadro promotoriga RNK polimeraza va umumiy yoki yuqori oqim omillarni o'z ichiga olgan oqsil majmuasining bog'lanishi orqali belgilanadi.

Induktiv¹¹: ma'lum elementlarga ega bo'lib, ular promotorni boshqariladigan tarzda yoqish yoki o'chirishga imkon beradi. Bu xususiyatlar zamburug' genlarining ifodasini o'rganishda va biotexnologik maqsadlarda samarali foydalanishda muhimdir.

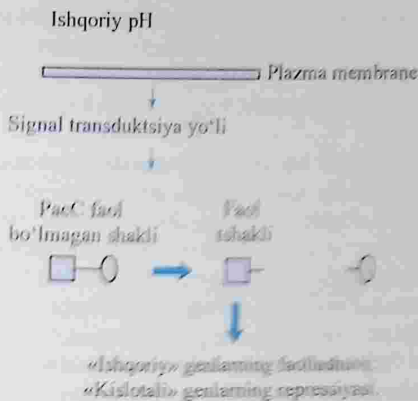
Ikkala turdagi promotorlarda bir yoki bir nechta transkripsiya boshlanish nuqtalari (*tsp*) bo'lishi mumkin. Promotor hududidagi ketma-ketliklar *tsp* va tartibga soluvchi oqsillar uchun bog'lanish joylarini belgilaydi. TA-boy hududlar, *TATA-qutilar* deb ataladi, ko'pincha *tsp* ni aniqlashda va transkripsiyaning bazal darajasini saqlashda ishtirok etadi. Ularning funksiyasiga misol sifatida *S. cerevisiae* ning *HIS4* promotorini ko'rsatish mumkin, bunda transkripsiya *TATA-qutisiz* yoki *TATA-qutisi* bilan sodir bo'lishi mumkin. (*HIS4* geni gistidinol degidrogenazani kodlaydi, u gistidin biosintezida ishtirok etadi). Ammo yuqori transkripsiya darajalari faqat *TATA-qutisi* bo'lgan *HIS4* promotorida kuzatiladi. Shunga qaramay, ba'zi kuchli xamirturush promotorlari *TATA-qutisi* ni o'z ichiga olmaydi. Ko'plab xamirturush va filamentli zamburug' promotorlarida bu ketma-ketlik mavjud emas, lekin boshqa motivlar, masalan, filamentli zamburug' promotorlarida uchraydigan pirimidin-boy traktlar (*CT-qutilar*), xuddi shunday funksiyani bajarishi mumkin. Bu ketma-ketliklar «yadro» promotorni ifodalash uchun qo'llaniladi. Uchinchi ketma-ketlik, *CCAAT*, ham ko'pincha yadro promotor funksiyasi bilan bog'liq. Ammo *S. cerevisiae* genlarining aksariyati (~95%) *CCAAT-qutisi* ga muhtoj emasdek tuyuladi, garchi bu motivning *A. nidulans* da ishlashi ma'lum. Shuni ta'kidlash kerakki, izolyatsiya qilingan zamburug' promotorlarining aksariyatida aniqlangan ketma-ketliklarning funksional ahamiyati hali aniqlanmagan va noma'lumligicha qolmoqda.

Konstruktiv promotor yordamida transkripsiyaning asosiy darajasi, asosiy promotor bilan RNA polimeraza va umumiy yoki yuqori qism faktorlarini o'z ichiga olgan oqsil kompleksining bog'lanishi orqali belgilanadi. Bundan farqli o'laroq, induktsiyalanadigan gen ifodalanishi o'nlab barobar o'zgarishi mumkin. Ushbu o'zgarishni boshqaruvchi elementlar odatda asosiy promotor ketma-ketliklarining yuqori qismida joylashgan bo'lib, yuqori qism aktivatsiya yoki yuqori qism repressiya ketma-ketliklari (*UAS* yoki *URS*) deb ataladi. Bu *UAS/URS* ketma-ketliklari regulyator oqsillarni bog'laydi, ular transkripsiya kompleksini bevosita yoki bilvosita barqarorlashtiradi (yoki beqarorlashtiradi). Bu jarayon asosiy promotorga bog'langan transkripsiya kompleksining barqarorligini oshirib yoki pasaytirib, transkripsiyaning boshlanish tezligini oshiradi yoki kamaytiradi.

¹¹ Induktiv genning ifodasi katta darajada o'zgarishi mumkin. Bu o'zgarishni tartibga soluvchi elementlar odatda yadro promotor ketma-ketliklaridan yuqoriroqda joylashgan bo'lib, yuqori oqim faollashtiruvchi yoki yuqori oqim repressiv ketma-ketliklar (*UAS* yoki *URS*) deb ataladi. *UAS/URS* ketma-ketliklari tartibga soluvchi oqsillarni bog'laydi, ular transkripsiya kompleksini bevosita yoki bilvosita barqarorlashtiradi (yoki beqarorlashtiradi) va shu orqali transkripsiyaning boshlanish tezligini oshiradi yoki kamaytiradi.

Induksiyalanadigan promotorni boshqaruvchi regulyator ketma-ketliklar ko'pincha bir nechta genlarning promotorlarida uchraydi. Ushbu genlar bir-biriga bog'liq bo'lmagan funksiyalarga ega oqsillarni kodlasa-da, ular bitta regulyator oqsil tomonidan boshqariladi. Ushbu ko'regulyatsiyalangan genlar tarmog'i hujayraning fiziologik holatlari, masalan, pH, uglerod yoki azot manbalari kabi omillarga javob berishi mumkin. Misol uchun, filamentli zamburug' *Aspergillus nidulans* da pHga javob beruvchi oqsillarni kodlovchi genlarning promotorlaridagi maxsus ketma-ketliklarga bog'lanadigan PacC deb nomlangan oqsil aniqlangan (S.14-rasm). Atrof-muhitning pH darajasi ishqoriy bo'lganda, PacC proteaza tomonidan faollashadi va ishqoriy sharoitda ifodalanadigan keng doiradagi genlarning (masalan, *isogenisillin N* sintaza) ekspressiyasiga ruxsat beradi, shuningdek, oddiy kislotali sharoitda ifodalanadigan ko'plab genlarni (masalan, kislotali *lipidlar*) repressiya qiladi. Xuddi shunday, *Saccharomyces cerevisiae* va ba'zi *Kluyveromyces* turlarida Mig1p DNK bilan bog'lanish oqsili glyukoza darajasiga bog'liq tarzda ko'plab promotorlarning GC-boy hududlariga (GC-qutilariga) bog'lanadi. Bu promotorlar uglerod manbalari utilizatsiyasida ishtirok etuvchi genlarni o'z ichiga oladi.

Mig1p oqsili boshqa oqsillar bilan kompleks hosil qiladi va bu kompleks glyukoza va unga o'xshash shakarlar kabi yuqori samaradorlikda energiya ishlab chiqaruvchi uglerod manbalaridan kam samarali bo'lgan uglerod manbalarining katabolizmi uchun zarur bo'lgan genlarning transkripsiyasini repressiya qiladi. Bu jarayon uglerod kataboliti repressiyasi deb ataladi. Filamentli zamburug'larda, masalan, *Aspergillus nidulans* va *Trichoderma reesei* da, xuddi shunday funktsiyani mos ravishda CreA va Cre-1 oqsillari bajaradi. Ushbu oqsillar uglerod katabolizmida ishtirok etuvchi genlarning promotorlaridagi GC-qutilariga bog'lanadi. Bundan tashqari, *Aspergillus nidulans* da AreA regulyator oqsili (yoki *Neurospora crassa* da Nit2) orqali boshqariladigan yana bir genlar tarmog'i mavjud. Bu tarmoq azot katabolizmi uchun fermentlarni sintez qilish bilan bog'liq. Oddiy azot manbalari, masalan, ammoniy va glutamin mavjud bo'lganda, murakkab azot manbalarini parchalash uchun javobgar bo'lgan genlar o'chiriladi.



5.14-rasm. Filamentli zamburug'larda pH orqali transkripsiyani boshqarish

Tashqi pH hujayralar tomonidan seziladi va gen ekspressiyasidagi o'zgarishlarga olib keladi. Zamburug'larda ishqoriy pHda omon qolish uchun zarur bo'lgan oqsillarni kodlovchi genlarning transkripsiyasi transkripsiya faktori PacC orqali boshqariladi. Ishqoriy pH seziladi va signal transduksiya yo'li orqali PacC ning faol bo'lmagan shaklini kesib, faol shaklini hosil qiladi.

Faollashtirilgan PacC transkripsiyani rag'batlantiradi va ishqoriy pHda faol bo'lgan fermentlar, masalan, ishqoriy fosfataza kabi fermentlarni kodlovchi genlarning (ya'ni «ishqoriy» genlar) transkripsiyasini kuchaytiradi. Shu bilan birga, «kislotali» genlar transkripsiyasini repressiya qiladi.

Qisqartirilgan PacC shakli o'zining nishon promotorlariga 5'-GCCARG-3' ketma-ketligida (bu yerda R = G yoki A) bog'lanib, genlarni faollashtiradi.

Ushbu mexanizm zamburug'larda pHga moslashish uchun genlarning ifodalanishini muvofiqlashtirishga yordam beradi.

Genlar tarmoqlarini qamrab oluvchi keng xususiyatli regulyator tizimlardan tashqari, ma'lum metabolik yo'llar bilan bog'liq boshqaruv mexanizmlari ham mavjud. Masalan, ijobiy regulyator oqsil AflR kamida 25 xil genning ekspressiyasini muvofiqlashtiradi, bu genlar zamburug' toksini aflatoksin sintezi uchun javobgardir. Shu vaqtgacha o'rganilgan barcha genlar promotorlarida AflR oqsili bog'lanadigan va transkripsiyani faollashtiradigan maxsus ketma-ketlikni o'z ichiga oladi. Garchi bu holatda genlar bir xromosomaning kichik hududida jamlangan bo'lsa-da, global yoki o'ziga xos boshqaruv kontekstida muvofiqlashtirilgan genlarning jismoniy yaqin joylashishi yoki hatto bir xil xromosomada bo'lishi talab qilinmaydi.

Zamburug'lardagi transkripsiyaning yakunlanishi haqidagi bilimlar asosan *Saccharomyces cerevisiae* bo'yicha tadqiqotlardan kelib chiqadi. Bu jarayon poliadenilatsiya deb ataluvchi jarayon bilan chambarchas bog'liq bo'lib, bunda mRNK poliA dumini shakllantirish uchun uzun adeninni o'z ichiga olgan nukleotidlar qo'shiladi. Poliadenilatsiyaning asosiy vazifasi mRNKning barqarorli-

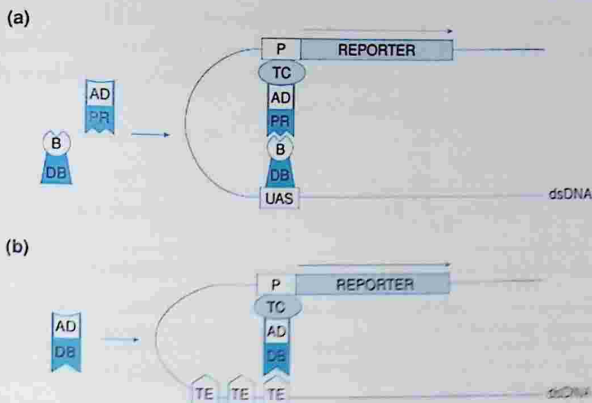
gini oshirishdir; *S. cerevisiae* mutantlarida, poliA olib tashlanish tezligi pasaytirilganda, mRNKning barqarorligi oshadi. Ko'pchilik xamirturush genlari yuqori eukariotlarda poliadenilatsiya bilan bog'liq bo'lgan AATAAA ketma-ketligini o'z ichiga olmaydi. Biroq yakunlovchi funksiya bilan bog'liq ikki boshqa motiv aniqlangan.

Oliy organizmlar genlari bakteriyalar genlaridan intronlarning mavjudligi bilan farq qiladi. Bu intronlar oqsilga tarjima qilinishidan oldin mRNKdan olib tashlanishi kerak bo'ladi, bu jarayon splicing deb ataladi. *Saccharomyces cerevisiae* va filamentli zamburug'lar genlarida intronlarning mavjudligi va tabiati bo'yicha sezilarli farqlar kuzatiladi. *Saccharomyces cerevisiae* genlarining aksariyatida intronlar umuman mavjud emas, mavjud bo'lgan genlarda esa odatda faqat bitta intron bo'ladi. Filamentli zamburug'larning va *Schizosaccharomyces pombe* genlarida esa ko'pincha bir nechta intronlar mavjud bo'lib, ularning o'lchami odatda 50 dan 100 juft asoslargacha bo'ladi. Filamentli zamburug' genlarini *Saccharomyces cerevisiae* ga kiritilganda noto'g'ri splicing jarayoni sodir bo'lishi, ayrim zamburug' turlari orasida splicing mexanizmlari sezilarli darajada farq qilishini ko'rsatadi. Ammo *Aspergillus nidulans* ning uchta intronga ega bo'lgan amdS geni bir nechta filamentli zamburug' turlarida to'g'ri splicing jarayonidan o'tadi. Filamentli turlar orasida intronlarning joylashuvi (ketma-ketligi emas) ko'pincha saqlanib qoladi. Intronlar kodlovchi hududda bo'lishi shart emas; ular transkripsiya boshlanish nuqtasi (tsp) va mRNK tarjima qilish boshlanadigan nuqta orasida joylashgan bo'lishi ham mumkin.

5.5 Boshqa metodologiyalar

5.5.1 Xamirturush ikki-gibrid tizimi

Mazkur genetik tahlil *Saccharomyces cerevisiae* da oqsillar hujayra ichida o'zaro ta'sir ko'rsatadimi yoki yo'qmi, buni aniqlash uchun ishlab chiqilgan (5.15a-rasm). Metod ikki xil usulda qo'llanilishi mumkin: birinchisi, allaqachon ajratib olingan ikkita oqsilning o'zaro ta'sirini o'rganish, ikkinchisi esa, «bait» oqsil deb ataluvchi ma'lum bir oqsil bilan o'zaro ta'sir qiluvchi gen mahsulotlarini aniqlash uchun cDNA kutubxonasidan genlarni topish. Ikki-gibrid tahlili eukaryotik transkripsiya faktorlarining aksariyati promotor DNKga bog'lanish yoki transkripsiyani boshlash bilan bog'liq hududlarni o'z ichiga olgan bitta oqsil ekanligiga asoslanadi. Odatda ishlatiladigan tizim *Saccharomyces cerevisiae* da galaktoza utilizatsiyasini boshqaruvchi Gal4p transkripsiya aktivator oqsiliga asoslangan. Tajribada o'chanadigan gen ekspressiyasi uchun ishlatiladigan «reporter» gen odatda lacZ geni bo'lib, u β -galaktozidaza kodlaydi. Bu fermentning faolligini o'lchash oson. O'rganilayotgan oqsillar orasida ijobiy o'zaro ta'sir kuzatilganda, β -galaktozidaza ishlab chiqarish salbiy nazoratga nisbatan ko'payadi. Bu metod oqsillarni o'zaro ta'siri orqali biologik jarayonlarni chuqurroq tushunish va yangi genlarni aniqlashda keng qo'llaniladi.



5.15-rasm.

(a) Xamirturush ikki-gibrid tizimi (Yeast Two-Hybrid System):

Ushbu tizim *GAL4p* transkripsiya faktoriga asoslangan bo'lib, u DNKga bog'lanish (DB) va transkripsiya faollashtirish (AD) uchun mo'ljallangan hududlarga ega va *Saccharomyces cerevisiae* da galaktoza utilizatsiyasini yoqishda ishtirok etadi.

Belgilar:

- P: *GAL4p* tomonidan faollashtiriladigan xamirturush promotori.
- TC: Transkripsiya kompleksi, RNA polimerazani o'z ichiga oladi.
- DB: *GAL4p* ning DNKga bog'lanish hududi, B (ma'lum funksiyaga ega «bait» oqsil) bilan birlashtirilgan.
- PR: Tadqiq qilinayotgan «prey» oqsil yoki cDNA kutubxonasining mahsulotlari, ular *GAL4p* ning aktivatsiya hududi (AD) bilan birlashtirilgan.
- UAS: Promotor darajasida transkripsiya boshlash uchun zarur bo'lgan yuqori aktivatsiya ketma-ketligi.
- dsDNA: Ikki zanjirli DNK.

Bu moslashuvchan tizim har qanday organizmdan olingan oqsillar o'rtasidagi o'zaro ta'sirni o'rganish uchun ishlatilishi mumkin. Ammo ijobiy natija olinganidan so'ng, muhokama qilinayotgan o'zaro ta'sir biokimyoviy usullar yordamida tasdiqlanishi kerak.

Bugungi kunda ikki-gibrid tizimning turli to'plamlari tijorat asosida mavjud bo'lib, ular ilmiy tadqiqotlarda qo'llaniladigan samarali vositalar sifatida tanilgan.

5.5.2 Xamirturush bir-gibrid tizimi (Yeast One-Hybrid System):

Bir-gibrid tizimi ikki-gibrid versiyasidan ishlab chiqilgan bo'lib, ma'lum spetsifik DNK ketma-ketliklarini, masalan, gen ekspressiyasini boshqaruvchi transkripsiya faktorlarini yoki DNK replikatsiyasining kelib chiqish nuqtalari kabi boshqa ketma-ketliklarga bog'lanadigan oqsillarni aniqlaydigan genlarni aniqlash uchun ishlatiladi (5.15b-rasm).

Ujibiy klonlar, ya'ni «reporter» gen faolligini oshiruvchi klonlar DNK ma'lumotlar bazalarida ma'lum DNKga bog'lanish oqsillari bilan ketma-ketlik o'xshashligini qidirish orqali tahlil qilinadi va ularning funksional faolligi oqsil-DNK bog'lanish tahlillari yordamida tasdiqlanadi.

Qo'shimcha izohlar

1	European Federation of Biotechnology (EFB)	Yevropa biotexnologiya federatsiyasi (1978)
2	Prokaryote	Hujayralari shakllangan yadroga ega bo'lmagan organizm
3	Genetically Modified Crops (GM)	Genetik modifikatsiyalangan ekinlar
4	The Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)	Iqtisodiy hamkorlik va taraqqiyot tashkiloti
5	Genetically modified organism (GMO)	Genetik modifikatsiyalangan organizm
6	the Health and Safety Executive (HSE)	Sog'liqni saqlash va xavfsizlikni ta'minlash bo'yicha ijrochi qo'mita
7	European Commission (EC)	Yevropa Komissiyasi
8	Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP)	Yangi oziq-ovqatlar va jarayonlarni boshqarish bo'yicha tavsiyalar berish qo'mitasi
9	World Health Organization (WHO)	Jahon sog'liqni saqlash tashkiloti
10	The US Food and Drug Administration (FDA)	AQSH oziq-ovqat va farmatsevtika idorasi
11	Tricarboxylic Cycle Acid (TCA)	Trikarboksilik kislota aylanishi

MUNDARIJA

Ikkinchi nashri uchun soʻzboshi	3
Uchinchi nashri uchun soʻzboshi	5

ASOSLAR VA TAMOIYILLAR

I bob. Biotexnologiya jamoatchilik nazarida	6
II bob. Oʻsish va metabolizm biyokimyosi va fiziologiyasi	29
III bob. Mikroorganizmlar oʻsishining termodinamik nuqtayi nazardan stoxiometriyasi va kinetikasi	70
IV bob. Genom boshqaruvi va tahlili: prokaryotlar	88
V bob. Genetika muhandisligi: xamirturush va filamentli zamburugʻlar	141

KOLIN RETLIJ, BYORN KRISTIANSO

BIOTEXNOLOGIYA ASOSLARI

O'simliklar to'qimalari madaniyati va genetik muhandislik

Muharrir
Badiiy muharrir
Texnik muharrir
Sahifalovchi

J. Matyoqubov
D. Mulla-Axunov
R. Ahmedov
G. Ahmedova

Noshirlik faoliyati to'g'risidagi xabarnoma
6.11.2023-yil qabul qilingan, tasdiqnoma № 156149.
Bosishga 2025-yil 27-fevralda ruxsat etildi.
Bichimi 70x100 $\frac{1}{16}$. Bosma tabog'i 11. Adadi 50.
Buyurtma № 006/O-25.

“Donishmand ziyosi” MChJ nashriyotida nashrga tayyorlandi.
Toshkent shahar, Navoiy ko'chasi, 30-uy.

“Kamalak-PRESS” MChJ bosmaxonasida chop etildi.
Toshkent shahar, Navoiy ko'chasi, 30-uy.

Ushbu xorijiy o'quv adabiyoti o'zbek tiliga ilk marotaba tarjima qilinganligi munosabati bilan nashriyot va tarjimonlar tomonidan ayrim kamchilik va xatoliklarga yo'l qo'yilgan bo'lishi mumkin. Kamchiliklarni bartaraf etish maqsadida fikr-mulohazalaringizni quyidagi manzil va telefon raqamlari orqali qabul qilamiz.

Manzil: Toshkent shahar, Navoiy ko'chasi, 30-uy.

Telefon raqami 71-244-15-53.

«Donishmand ziyosi»

ISBN 978-9910-715-44-0



9 789910 715440