

PLAZMID DNKSINI AJRATISH VA TOZALASH USHLUBLARI

Plazmid DNK sini ajratish va tozalash usullari.

1 – ish: Qaynatish usuli yordamida preparativ plazmid DNK sini ajratish.

Material va asbob uskunalari. 4 ta studentga 400 ml tungi rTi plazmidli *Agrobacterium tumefaciens* C58 va rRi plazmidli *Agrobacterium rizogenes* kulturasini.

2 ta studentga: 10 ml STET buferi; 0,9 ml TES – buferi; 50 ml li kolba; 1 ml lizotsim eritmasi (20 mg/ml); sekundomer va 1 ml li avtomat pipetkalar.

Guruhga: 0,65 g agaroz, 0,5 l elektroforez buferi, 12-21 V “Bekman” sentrifugasi, 18-80 M “Bekman” ultratsentrifugasi, -20° S haroratli muzlatgich kamera yoki -18° S haroratli muzlatgich, 100° S haroratli suv hammomi, muz hammomi, elektroforez apparati, doimiy tok manbai va xemiskop.

SHtamm va oziqa muhitlar: *Agrobacterium tumefaciens* S 58 va *Agrobacterium rizogenes* Ri A₄ shtammlari, biomassa o‘stirish uchun (agarli) Xottikler yoki LD buloni.

Tushuntirish. Hozirgi vaqtda plazmid DNK olishning ko‘pgina usullari mavjud. Barcha usullar muolajalarida asosiy 3 ta jarayon amalga oshiriladi: bakterial hujayralarni o‘stirish (iloji boricha plazmid DNK amplifikatsiyasini kuchaytirish), bakterial hujayralar lizisi va plazmid DNK ni tozalash. Plazmid DNK ni ajratish va tozalashning barcha usullari xromosoma va plazmid DNK larning fizik-kimyoviy xususiyatlarining farqiga asoslangan. Ikkinchidan plazmidlar hujayralardan kovalent yopiq shaklda ham ajratilishi mumkin, bunda xromosoma DNK si ajratish jarayonida bir zanjirli bo‘laklarga bo‘linib ketadi. Bu DNK bo‘laklari odatda katta molekulyar og‘irlikka ega bo‘lib, ular ajratish jarayonida denaturatsiyaga uchragan oqsillar va hujayra qobiqlari bilan birga cho‘kmaga tushadi, plazmid DNK si esa suyuqlik qismida qoladi (tiniq hujayra lizatida). Agar hujayralar lizisi xromosoma DNK sini tanlab denaturatsiya qiluvchi sharoitda olib borilsa plazmid DNK sining ko‘p miqdorda chiqishi ta‘minlanadi. Buning uchun bakterial hujayralarga ishqor va issiqlik bilan ishlov beriladi. So‘ng denaturatsiyalangan mahsulotlar differensial sentrifugalash usuli yordamida cho‘ktiriladi. Bir qancha usullar orqali hujayra lizatini tiniqlashtirib, so‘ng kerakli miqdorda plazmid DNK ning toza preparatlari olinadi va ularni transformatsiyalash va restriksiyalash tajribalarida ishlatish mumkin.

Gen muhandisligi maqsadlari uchun yuqori tozalikka ega plazmid DNK kerak. Buning uchun plazmid DNKsini preparati etidium bromidli CsCl ning zichligi gradientida ultratsentrifugalanadi. Etidium bromid DNK ga o‘rnashib olib, seziy xlorid zichligi gradientida DNK ning suzish zichligini kamaytiradi. Etidiy bromididning DNK bilan bog‘lanishi DNK ning qaysi shakldaligiga bog‘liq. DNK ning to‘g‘ri shaklli molekulalari ko‘p miqdordagi, kovalent yopiq shakllari esa kamroq miqdordagi etidiy bromidid bilan birikadi. SHuning uchun etidiy bromididli CsCl gradientida DNK ning to‘g‘ri shaklli va ochiq xalqali shakllarining suzish zichligi kamyadi, aksincha esa xalqali kovalent yopiq DNK molekulalari zichligi

kam miqdorda o'zgaradi. SHunday qilib, etidiy bromididli CsCl gradientida ultratsentrifugalash DNK molekulalarini shakliga qarab ajralishiga olib keladi va shu bilan plazmada DNK sining tozaligini ta'minlaydi.

Ishdan maqsad – Agrobakteriyalar Ti va Ri plazmid DNK larini ajratish.

Tajriba rejasi. Bakterial hujayralar sentrifugada cho'ktirilib, STET – buferida suspendirlanadi. Hujayradagi xromasoma DNK si va oqsillarni cho'ktirish uchun suspenziyaga lizotsim solib qaynatiladi. Sentrifugalanib, denaturatsiyaga uchragan oqsillar va xromasoma DNK si cho'ktiriladi. Suyuq qismiga RNKaza fermenti bilan ishlov beriladi va plazmid DNK si etanolda cho'ktiriladi, so'ng TES – buferida eritiladi va agarozali gel elektroforezda tahlil qilinadi.

Ishning borishi. Bu tajribani bajarish uchun talabalar ikkitadan birlashadi. Har bir juft bitta shtammdan DNK ajratadi. Bir kun o'stirilgan kultura (400 ml) 3000 aylana/daq. tezlikda 30 daqiqa sentrifugalanadi. Har bir kultura cho'kmasi 10 ml STET – buferida suspendirlanadi va 50 ml li Erlenmeyer kolbasiga solinadi. Suspenziyaga 1 ml lizotsimning suvdagi eritmasi (20 mg/ml) qo'shiladi va tez aralashtirib aralashma isitgichga qo'yiladi. Birinchi qaynash alomatlari ko'rinishi bilan kolbani, 40 sekundga qaynab turgan suv hammomiga joylanadi, so'ng olib tezlik bilan muz hammomiga 5 daqiqa qo'yiladi. Hosil bo'lgan yopishqoq (shilimshiq) lizatni sentrifuga probirkalariga teng miqdorda solib 25000 ayl/daq. tezlikda 4⁰ S da 30 daqiqa sentrifugalanib, xromosoma DNK si va denaturatsiyalangan oqsillardan tozalanadi. So'ng tiniq suyuqlik shisha, sentrifuga probirkalariga solinadi va 10 mg/ml miqdordagi RNKaza bilan xona haroratida 1 soat inkubatsiyalanadi. Suyuqlikka teng miqdorda izopropanol qo'shib, muzlatgichga -20⁰ S ga 1 soat qo'yiladi. So'ng 3000 ay/daq. tezlikda 20 daqiqa sentrifugalanadi. Cho'kma havoda quritiladi va 0,9 ml TES – buferida eritiladi. shu eritmadan 20 mkl olib agarozali gelda elektroforez qo'yiladi va plazmidning borligi tekshiriladi.

DNK eritmasiga 1 g seziy xlorid solib eritiladi va -4⁰ S da saqlanadi.