

**UDK: 937:635.64+632**

**ДНКни ажратиб олиш босқичлари ва усуллари**  
**Тошкент давлат аграр университети**  
**Хасанов Анвар Муроталиевич**

Бодом арисси (мевахўри) (*Eurytoma samsonovi*) ва бодомнинг бошқа турдаги зараркунандаларини молекуляр идентификация қилиш ДНКсини аниқлаш учун бир неча босқичдаги амалий ва услубий ишлари амалга ошириш керак бўлади.

Тадқиқот давомида микроскопларнинг МБС-2; МБИ-3, электрон микроскоп Телса-БС-613 (чех.). Ҳашаротларни ривожлантириш инкубатор термостатнинг МЕММЕРТ Е05273 русумли ва бошқа лаборатория ускуналардан фойдаланилди.

Фарғона водийси бодом биоценозидан йиғиб олинган бодом арисси (мевахўри) (*Eurytoma samsonovi*) зараркунандасини ДНКсини ажратиш ва полемераза тахлилини ўтказиш куйидаги босқичларда амалга оширилди.

*Eurytoma samsonovi* турларидан олинган материалларни 20 мг олиб суяк азотда гомоген ҳолатга келгунга қадар майдаланди. Материал 1,5 мл эпиндорфга солинди ва устига 180 мкл ДиГЕСТИОН Солутион эритмаси куйилди, вортекс билан аралаштирилди.

Протеиназа К 20 мкл эритмасини қўшиб вортекс ёки пипетка билан яхшилаб аралаштирилди. Намуна 56°C ҳароратда тўқима тўлиқ бўлингунча ва заррачалар қолмагунча сақланди. 20 мкл РНасе А Солутион эритмасини қўшиб, вортекс билан аралаштирилади ва 10 минут хона ҳароратида сақланади. 200 мкл Лйсис Солутион эритмасини қўшиб, вортекс билан аралаштирилди ва 10 минут хона ҳароратида сақланади. 400 мкл 50 % этанол қўшиб вортексда аралаштирилади.

Тайёрланган эритмани ГенеЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунига олиб ўтилади ва 6000 x г да 1 дақиқа давомида центрифуга қилинади. ГенеЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунини янги 2 мл колбага жойлаштирилади. Тозалаш найчасига 500 мкл Буффер И қўшилади ва 1 дақиқа давомида центрифуга қилинади. Бу жараён центрифуга 1 дақиқада 8 минг тезликда амалга оширилади.



ГенеЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунини янги 2 мл колбага жойлаштирилади.

Тозалаш найчасига 500 мкл Буффер II қўшилади ва 3 минут давомида максимал тезликда ( $\geq 12000$  x г) центрифуга қилинади.

Гене ЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунини тоза 1,5 мл эпиндорфга ўтказилади. Тозалаш устун колбаси марказига 200 мкл Елутион буфери куйилади. Эпиндорфни хона ҳароратида 2 дақиқа давомида сақлаб, 1 дақиқада 8 минг тезликда амалга оширилади. Тозалаш устунини ташлаб юбориб ва олинган ДНКни - 20°C даражасида сақланади.

**ПЗР-амплификацияси усули.** Амплификация учун ажратиб олинган хашаротларни геном ДНКсини хромасомадаги СОИ соҳасининг уклеотидлар кетма-кетлигини ўрганиш учун «Силекс» фирмаси тўплами реактивлари стерилланган сув, 10x ПЗР буффер, дНТП эритмаси, Тақ-полимеразаси ва молекуляр таксономиясида қўлланилаётган куйидаги праймерлардан фойдаланилиб амплификация қўйилди (1-жадвалга қаранг).

Полимераза занжир реакциясини (ПЗР) дастурлаштирилувчи автоматик амплификатор (Тоучгене Градиент, УК) ёрдамида амалга оширилди.

**1-жадвал**

	<b>Параймер номи (Тўғри праймер)</b>	<b>Параймер номи (Тўғри праймер)</b>
	ФВД_СЕҚ:ТТСААССААТС АТАААГАТАТТГГ	РЕВ_СЕҚ:АААСТТСТГГАТ ГТССААААААТСА
	ФВД_СЕҚ:ТГТААААСГАСГ ГССАГТААТСАТААРГАТАТЙГ	РЕВ_СЕҚ:ТАААСТТСТГГА ТГТССААААААТСА

Фирма қайдномаси асосида куйидаги реактивлардан Мастер-мих тайёрланди. ПЗР куйидаги схема бўйича амалга оширилди: 1-босқич – 3 дақиқа давомида ДНК нинг 95°C шароитда денатурасияланиши, 2-босқич – ДНКнинг 93°C шароитда 20 сония давомида денатурасияланиши, 3-босқич ДНКда 55°C шароитда 30 сония давомида праймерларнинг ёпишиши, 4-босқич 72°C шароитда



2 дақиқа давомида элонгасияланиш, 5-босқич 72°C шароитда 10 дақиқа давомида занжирнинг элонгасияланиши.

### Мастер-мих учун реактивлар рўйхати

2-жадвал

Сув (стер.)	13.8 мкл
10x ПЗР буфери	2 мкл
дНТП	0.6 мкл
Ҳар бир праймердан	1.5+1.5 мкл
Тақ-полимераза	0.6 мкл
<b>Жами:</b>	<b>20 мкл</b>

Иккинчидан тўртинчи босқичгача жараён цикл кўринишида 35 мартагача такрорланган (2-жадвал).

Агароза гелида электрофорез усули. Полимераза занжир реакцияси тугаганидан сўнг гелэлектрофорез усулидан фойдаланилди. Бу усул - аналитик метод бўлиб, ажратиш, тенглаштириш ва ДНК қисмларини тозалаш учун фойдаланилади. ДНК электрофорези горизонтал йўналишда амалга оширилади. Гелнинг таркибига қуйидагилар киради: 1X ТАЕ (рН 8,1), агароза, бромли этидий.

Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтказиш учун қуйидаги кетма - кетликда амалга оширилди.

Тароқчаларнинг пастки тишчалари умумий ҳажми 50 мл бўлган гелнинг асосидан 2 мм оралиғида жойлаштирилди (умумий ҳажми 150 мл бўлган гелнинг асосидан 1мм оралиғида жойлаштирилган).

50 мл 2%ли агароза гелини тайёрлаш учун 50 мл 1X ТАЕ ва 1г агароза қўшилди. 1X ТАЕ бошланғич концентрацияси 50X ТАЕ эритмасидан тайёрланади (Трис, 0,5М ЭДТА pH8,0, музлатилган сирка кислотаси).

Колбага солинган агарозали ТАЕ аралашмасини гомоген ҳолатига келгунча киздирилади (эритмада агарозанинг эримаган зарраларини бўлмаслиги лозим).

Бу жараёндан сўнг 50°C даражасида совутилди ва 0,5 мкл бромли этидий қўшилди. Ҳамма гел ҳажми электрофорез ванначасига қуйилди. Гел совугандан сўнг (30-45 дақиқа хона ҳароратида), секинлик билан тароқчаларни олиб ташланди ва электрофорез ванначасига 1X ТАЕ буферини гел тўлиқ қоплаганича



кўйилди. 10-15 дақиқадан сўнг чуқурчаларнинг (лунка) бирига 2,5 мкл ли ДНК-маркерини ДНА Ладдер 100пб (Промега) кўшилди.

ДНК ажратиши учун кучланиш 1 сантиметр гелда 5 вольтдан ошмаслиги зарур. 40-45 дақиқадан сўнг гелни ультрабинафша ва трансиллюминатор нурларида кўрилди ва расмга олинди, натижалар қайд қилинди.

**ДНКни тозалаш.** Электрофорез натижасидан ҳосил бўлган керакли фрагментларни скалпел ёрдамида гелдан кесиб олинди ва 1,5 мл ли эппиндорф пробиркага жойлаштирилди. ДНКни гелдан ажратиб олишда ишлаб чиқарувчи кўрсатмаларига амал қилган ҳолда, «Силекс М» (Россия, Москва) томонидан ишлаб чиқарилган реактивлар тўпламидан фойдаланилди.

**Секвенирлаш – ДНКнинг нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш -** Гелдан тозаланган ПЗР маҳсулотларини секвенирлашга беришда, гелдан тозаланган ДНК консетрациялари ўлчанди ҳамда ПЗР га қўйилган праймерлар ёрдамида секвенсга берилди.

ДНКни секвенс қилишда АБИ ПРИСМ® БигДе™ Терминатор в. 3.1 реактивлар тўплами ёрдамида амалга оширилиб, реакция маҳсулотлари АБИ ПРИСМ 3100-Авант автоматик секвенаторида қайд қилинди (СКП «Геном» («Гентотех», Москва). Коллектив фойдаланиш марказидан (СКП) олинган секвенс маълумотлари “аб1” форматда олиниб, “Чромас версион 1.45” (McCarthy, 1996-1998) дастури ёрдамида таҳлил қилинди.

Секвенсдан олинган маълумотларнинг хатоликларини тўғрилаш мақсадида тўғри ва тесқари праймерлар ёрдамида ўқитилган секвенес натижаларни ФАСТА-форматга айлантирилди. Кейин иккита хроматография натижаларини бирлаштириш учун «Слустил Х версион 1.81» (Swofford D.L, 2000) дастури ёрдамида амалга оширилди. « Gendoc version 2. 5.000» (McCarthy, 1999) дастури ёрдамида кераксиз нуклеотидлар олиб ташланади. Нехус-форматга ўтказиш учун «ФорСон версион 1.0 фор Windows» (Раес, Ван де Пеер, 1996) дастурида амалга оширилди. Филогенетик анализлар ПАУП\* 4.0б10 (Swofford D.L, 1998) дастурида амалга оширилди. Бу дастур фақат Нехус-файлида ишлашлигини алоҳида таъкидлаб ўтиш жоиз.

### Фойдаланилган адабиётлар

1. Хасанов А., Ш.Есанбоев. Ўрмонзорлардаги ёнғоқ зараркунандаси. Агрокимёҳимоя ва ўсимликлар карантини. Журнал. 2019/6. Б. 65-66.
2. Хасанов А ва бош. Бинафшаранг қалқондори –PARLATORIA OLEAE GOLV феналогииуаси. Агрокимёҳимоя ва ўсимликлар карантини. Журнал. 2019/6. Б.14-15.
3. Хасанов А ва бош. Бодом зараркунандалари ва уларга қарши кураш чоралари. Агрокимёҳимоя ва ўсимликлар карантини. Журнал. 2020/3. Б.39-40.
4. Хасанов А ва бош. *Almond pest in forest agrobiocenosis and measures against them*. E3S Web of Conferences 258, 04028 (2021) UESF-2021. P. 1-6.
5. Rasul Jumaev. *Methods of determining the optimal temperature and humidity in dryness and storage of in vitro propagated parasitic entomophages*. E3S Web of Conferences. 2024. – P. 553. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303003>.
6. Rasul Jumaev, Abdurakhim Kuchboev, Nozimakhon Jumaeva, Farukh Yakubov, Shamsi Esanbaev. *Molecular identification and polymerase chain reaction analysis of Xanthogaleruca Luteola (Chrysomelidae) species*. E3S Web of Conferences. 2024. –P. 563. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303001>.
7. Rasul Jumaev. *Invitro rearing of parasitoids*. E3S Web of Conferences 371, 01032 (2023). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202337101032>.
8. Rasul Jumaev. *Methods of determining the optimal temperature and humidity in dryness and storage of in vitro propagated parasitic entomophages*. E3S Web Conf. Volume 563, 2024. 1-6. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303003>.
9. Lebedeva N, Akhmedova Z, Kholmatov B, Jumaev R. *Revision of stoneflies insecta: plecoptera fauna in Uzbekistan*. E3S Web of Conferences 258, 08030 (2021). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125808030>.
10. Sulaymonov O, Jumaev R., Sobirov B, Gazibekov A. *Representatives of Lepidoptera groups occurred in forestry and agricultural crops and their effective entomophage types*. E3S Web of Conferences 244, 02020 (2021). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124402020>.
11. Kimsanboev K, Rustamov A, Usmonov M, R.Jumaev. *Euzophera Punicaella Mooze Lepidoptera bioecology and development of host entomophagic equilibrium in*



*biocenosis*. E3S Web of Conferences 244, 01003 (2021).  
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124401003>.

12. Rasul Jumaev. *In vitro mass reproduction of parasitic entomophages Braconidae Trichogrammatidae*. E3S Web of Conferences 389, 03100 (2023).  
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202338903100>.

13. Esanbaev Sh, Jumaev R. *Study on stem pests of elm tree in Uzbekistan*. E3S Web of Conferences 563, 03004 (2024). 162-169.  
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303004>.

14. Kimsanbaev X, Jumaev R.A, Jumaeva N. *Bioecology harm of tobacco trips for the cotton plant and measure of counteraction*. European science review 3-4, 29-31 (2018).

