



GENLARNI HUYAYRAGA KIRITISH TEXNALOGIYASI, HO`JAYIN ORGANIZM HUYAYRASIGA DNKNI KIRITISH USULLARI

Sobirova Muqaddas Botirovna¹

Dehqonboyev Abduxoliq Xolbo'ta o'g'li²

¹*O'zbekiston Milliy Universteti Jizzax filiali, biologiya fanlari nomzodi (PhD)*

²*O'zbekiston Milliy Universteti Jizzax filiali 4-bosqich talabasi*

Annotatsiya: Transfektsiya - bu DNK va ikki zanjirli RNK kabi genetik materialni sutemizuvchilar hujayralariga kiritish jarayoni. Hujayraga DNKning kiritilishi hujayraning o'z mexanizmlari yordamida oqsillarni ifodalash yoki ishlab chiqarish imkonini beradi, RNKni hujayra ichiga kiritish esa jarayonni biroz to'xtatib, ma'lum bir protein ishlab chiqarishni kamaytirish uchun ishlatiladi.

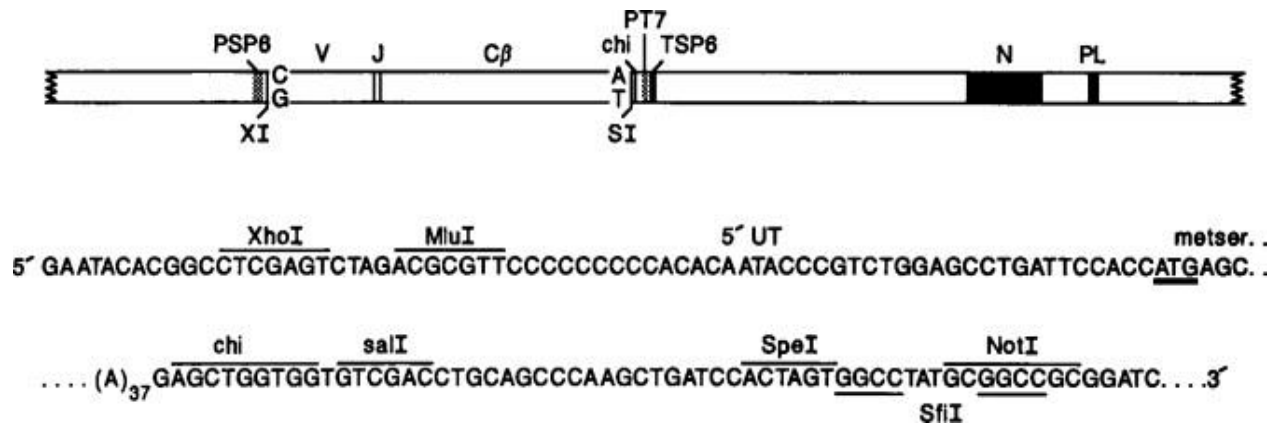
Kalit so'zlar: Transfektsiya, DNK, RNK, Integratsiya, vector, polimeraza, "Dual integrase kassetali almashinuvi" (DICE), Gibridoma.

Genni kiritish - bu DNK ketma-ketligiga bir yoki bir nechta gen qo'shilishi, bu usul an'anaviy ravishda plazmid DNK yoki virusli vektorlarni birlashtirish bilan amalga oshiriladi. An'anaviy genlarni kiritish usulida, kiritish joyini nazorat qilib bo'lmaydi. Transgen yoki uning tartibga soluvchi ketma-ketligini istalmagan joylarga nazoratsiz integratsiyalashuvi muhim genlarni faollashtirishi yoki proto-onkogenlarni faollashtirishi mumkin[1]. Istalgan genni kiritish joyida yoki uning yaqinida dasturlashtiriladigan nukleaz-induktsiyali DSB hosil bo'lishi homologiyaga yo'naltirilgan tuzatish (HDR) orqali genlarni kiritish samaradorligini keskin oshiradi. Inson genomidagi bir nechta saytlar genomik xavfsiz portlar bo'lishi taklif qilingan, bu yerda transgenlar kiritilishi va boshqa genetik elementlarning ifodalanishida sezilarli o'zgarishlarga olib kelmasdan ifodalanishi mumkin.

Vektor molekulalariga cDNKni kiritish cDNKni kiritish bir naychali, ikki bosqichli reaksiya. Birinchi bosqichda cDNK ning 5' uchi CDNK 5' terminalini tashkil etuvchi PRE adapter (i) ketma-ketligini sherik adapter (ii) bilan gibridlash orqali qisman dupleks holga keltiriladi, so'ngra DNKning Sall uchiga kovalent tarzda biriktiriladi. vektor. Shu bilan birga, cDNKning 3' oligo (dG) dumi boshqa, oligo (dC) vektor terminali cDNA ga gibridlanadi va shu bilan chap va o'ng qo'l l qo'llarini bog'laydigan bir ipli ko'priq hosil qiladi. Ikkinchi bosqichda, cDNK DNK polimerazasining bo'shliqni to'ldirish reaksiyasida nihoyat ikki zanjirli bo'ladi va qolganlari muhrlanadi, pastdagi rasmda 2 ng cDNK dan tayyorlangan 5000 ga yaqin



klonlardan iborat kichik kutubxonadan olingan tipik Ijac rekombinantining tuzilishi tasvirlangan. Ushbu klon tez-tez T hujayra gibridomasining ota-onasi sifatida ishlatiladigan AKR sichqoncha timoma liniyasi BW5147 tomonidan ifodalangan T hujayra retseptorlari b zanjirini kodlaydi[2].



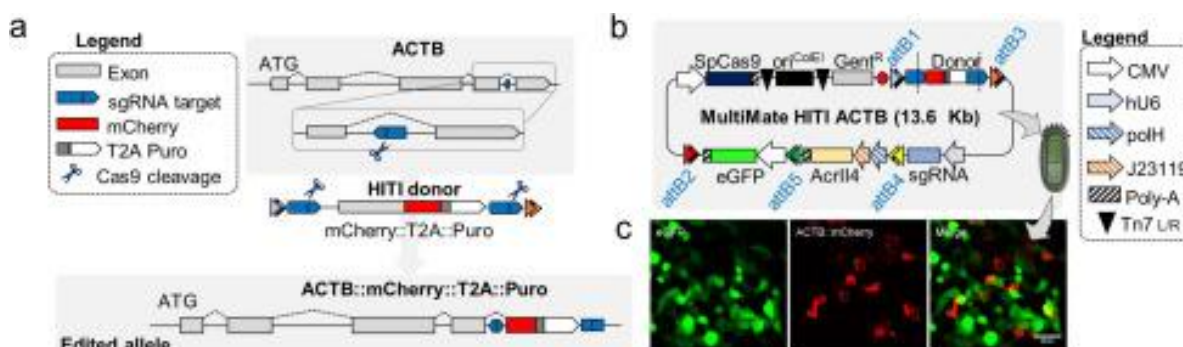
T hujayra retseptorlari b zanjirining kodlanishini ko'rsatuvchi Ijac rekombinantining tuzilishi; V, J va C hududlari ko'rsatilgan. Quyida vektor-cDNK sintez nuqtalari atrofidagi ketma-ketliklar ko'rsatilgan, chunki ular SP6 RNK polimeraza tomonidan ishlab chiqarilgan transkriptlarda ko'rinadi.

Sutemizuvchilarning transduksiyasi va DNKni etkazib berish. Sutemizuvchilar hujayralariga bir nechta gen kiritish tirik hujayradagi turli parametrlarni bir vaqtda tahlil qilish yoki hujayrani qayta dasturlash uchun bir nechta oqsillarni birgalikda ifodalash uchun zaruriy shartdir. Rekombinant bakuloviruslarning sutemizuvchilar hujayralarini transduksiyalashi va sutemizuvchilar hujayralari faol promoterlaridan geterologik protein ifodasini qo'zg'atishi mumkinligi haqidagi kashfiyot usulning ko'lamini sezilarli darajada kengaytirdi[2]. MultiBac baculovirusning o'zgartirilgan versiyasi MultiBacMam sutemizuvchilar hujayralari va to'qimalariga bir nechta genlarni etkazib berish uchun ishlab chiqilgan, shu jumladan an'anaviy, plazmidga asoslangan yondashuvlar bilan transfeksiyaga chidamli keng tarqalgan hujayra turlaridir[3]. Sutemizuvchilar hujayralarida, shu jumladan birlamchi neyronlarda CRISPR-Cas9 tomonidan muvaffaqiyatli gen tahrirlash tizimi tomonidan qo'shimcha ravishda erishildi.

Yaqinda ular yana katta DNK yuklarini inson hujayralariga bakulovirus-vektorli aniqlik bilan etkazib berishni namoyish etdi. CRISPR-Cas9 texnologiyasi bo'yicha genom muhandisligi bir vaqtning o'zida bir nechta DNK-kodlangan komponentlarni tirik hujayralarga etkazib berishga tayanadi. Adeno bilan bog'liq virus va lentivirus kabi hozirda foydalanilayotgan virusli vektor tizimlarining yuk



tashish hajmi cheklangan. Loyiha mualliflari bu muammoni bakulovirusning katta DNK yuk tashish qobiliyatidan foydalanish va gibrid DNK yig'ish texnologiyasidan (MultiMate) foydalanish orqali hal qildilar. Texnologiya yuqori samarali CRISPR asosidagi genom aralashuvlari uchun bitta bakuloviral vektorda etkazib berilishi mumkin bo'lgan 25 tagacha funktsional DNK modullarini pastdan yuqoriga yondashuv orqali xatosiz yig'ishga qodir. Natijada 30% gacha to'g'ri genom muhandisligiga erishildi, shuningdek, homologiya bog'liq bo'lmagan maqsadli integratsiya orqali ACTB lokusidagi katta DNK yuklarini aniq joylashtirildi. Bundan tashqari, asosiy tahrirlash uchun bitta vektorli bakulovirus yetkazib berishdan foydalanildi, bu esa hech qanday izlarsiz bo'linishsiz trinukleotidlarni kiritishning ajoyib samaradorligini ko'rsatdi. MultiBac vektorlari orqali bir vaqtning o'zida etkazib berish yondashuvi in vivo dasturlarning bir qatorini, jumladan, inson hujayrasi genomlarida genlarni aniq tahrirlashni ochib beradi deb umid qilinadi[4].



Bitta bakulovirus vektoridan foydalgan holda samarali homologiyan mustaqil maqsadli integratsiya (HITI). (A) CRISPR-HITI strategiyasidan so'ng inson Actin (ACTB) C-terminal eksonini almashtirishning sxematik tasviri. Cas9 bir vaqtning o'zida intronik mintaqani va sintetik donorni maqsad qilib qo'yadi, natijada homologiya bog'liq bo'lmagan maqsadli integratsiya orqali donorning kesilishi va genomik saytga kiritilishi. Olingan tahrirlangan allel C-terminal bilan belgilangan ACTB bo'lib, o'z-o'zidan ajraladigan peptid (T2A) va undan keyin tahrirlash voqealarini boyitishni osonlashtirish uchun Puromitsinga qarshilik kassetasi bilan jihozlangan[5]. MultiMate SpCas9, HITI donori, sgRNA ifoda kassetasi va eGFP lyuminestsent marker yordamida osongina all-in-one vektoriga yig'ilishi va bitta bakulovirus yordamida sutemizuvchilar hujayralariga etkazilishi mumkin. . Bakteriyalar va hasharotlar hujayralari promouteri nazorati ostidagi Cas9 inhibitori (AcrII4) kuchaytirish va qadoqlash paytida vektor barqarorligini ta'minlaydi. (C) MultiMate HITI ACTB bilan transduksiya dan 48 soat keyin jonli HEK239T ning



konfokal mikroskopiya tasviri. Transduksiya qilingan hujayralar eGFP +, tahrirlangan hujayralar mCherry + bo'lib, aniq Aktinga o'xshash subhujayrali lokalizatsiyaga ega.

Integratsiyalash ilgari genlarni kiritish odatda qattiq antibiotik tanlash bilan plazmid integratsiyasi yoki lentiviral vektorlar bilan infektsiya orqali erishilgan. Qo'shishlar tasodifiy sodir bo'ldi va nusxa raqami, joylashuvi va kiritish yo'nalishini nazorat qilish qiyin edi. Maqsadli nukleaz bilan yoki bo'lmagan gomologik rekombinatsiya yo'nalish muammosini hal qildi, ammo kiritilgan genning hajmi cheklangan edi va integratsiya samaradorligi hali ham yo'q edi, ayniqsa birlamchi hujayralarda[6].

"Dual integrase kassetali almashinuvi" (DICE) deb nomlangan texnologiya muqobil marshrutni taqdim etadi, bunda nusxa ko'chirish soni, joylashuvi va yo'nalishi gen integratsiyasi nazorat qilinadi va yuqori samaradorlik bilan. DICE bir yo'nalishli rekombinatsiya orqali o'z tanib olish joylariga genni kiritish qobiliyatiga ega bo'lgan phiC31 va Bxb1 fag integratsiyalarini qabul qiladi. Biroq, bu tanib olish joylari sutemizuvchilar hujayrasi genomida mavjud emas. Ushbu muammoni hal qilish uchun sutemizuvchilar genomining xavfsiz hududiga TALEN yordamida gomologik rekombinatsiya orqali tanib olish joylarini birlashtirish orqali "qo'nish maydonchasi" kiritildi. Natijada, ikkita integratsiya va donor shablonini kodlash orqali kerakli genlarni qo'nish maydonchasiga samarali tarzda joylashtirish mumkin edi. Kiritilgan gen uchun o'lcham cheklovi yo'qligi da'vo qilinadi[1].

Xulosa: Ushbu maqolada siz ushbu sohaga chuqurroq sho'ng'ishni istasangiz, tushunishingiz kerak bo'lgan genlarni tahrirlash bo'yicha barcha murakkab atamalar ko'rib chiqiladi. Intronlar, DNK regulyatsiyasi va plazmidlardan tortib, transfeksiya, transkripsiya qadar.

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. (Dave, Jenkins, & Copeland, 2004; Hacein-Bey-Abina va boshqalar, 2003; McCormack & Rabbitts, 204).
2. (Boyce & Bucher, 1996; Carbonell, Klowden va Miller, 1985; Hofmann va boshqalar, 1995).
3. (Pelosse, va boshq. 2017).
4. (Aulicino, Pelosse va boshq., 2020).
5. Давранов К. Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. Т.: “Патент - Пресс”, 2008.
6. Sobirova M., Murodova S. Effects of biopraparites on cynara scolymus L., micro and macroelements, and quantity of flavonoids // In E3S Web of Conferences//. 2021. Vol. 258.