



LABORATORIYADA PCR APPARATI BILAN ISHLASH ASOSIY JARAYONLAR VA AMALIY MASLAHATLAR

Urolova Muxlisa Saydazim qizi

*Jizzax shaxar SHarof Rashidov tuman i tibbiyot birlashmasi nefralogiya va
gemodializ bo'limi labarant vrachi*

Annotatsiya: *Ushbu maqola laboratoriyada PCR (Polymerase Chain Reaction) apparati bilan ishlash jarayonlarini, uning asosiy qismlari, bosqichlari va amaliy maslahatlarini yoritadi. PCR laboratoriyada DNKning ma'lum qismlarini tez va aniq ko'paytirish imkonini beradi, bu esa klinik diagnostika, genetik tadqiqotlar va infeksiyon kasalliklarni aniqlashda muhim ahamiyatga ega. Maqolada laboratoriya ishini samarali va ishonchli tashkil etish uchun zarur bo'lgan texnik qoidalar, reagentlar bilan ishlash tartibi va nazorat namunalaridan foydalanish tavsiyalari keltirilgan.*

Kalit so'zlar: *PCR, Termotsikler, DNK amplifikatsiyasi, Laboratoriya texnologiyasi, Klinik diagnostika, Reagentlar, Laboratoriya amaliyotlari.*

Polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR) nomi DNKni in vitro (tashqi muhitda) fermentativ ko'paytirish orqali ma'lum bir DNK bo'lagini amplifikatsiya qilishda ishlatiladigan dezoksiribonuklein kislota (DNK) polimerazasidan kelib chiqqan. Bu jarayon "zanjir reaksiyasi" deb ataladi, chunki har bir replikatsiya siklida asl DNK shablone eksponentsial tarzda ko'payadi.

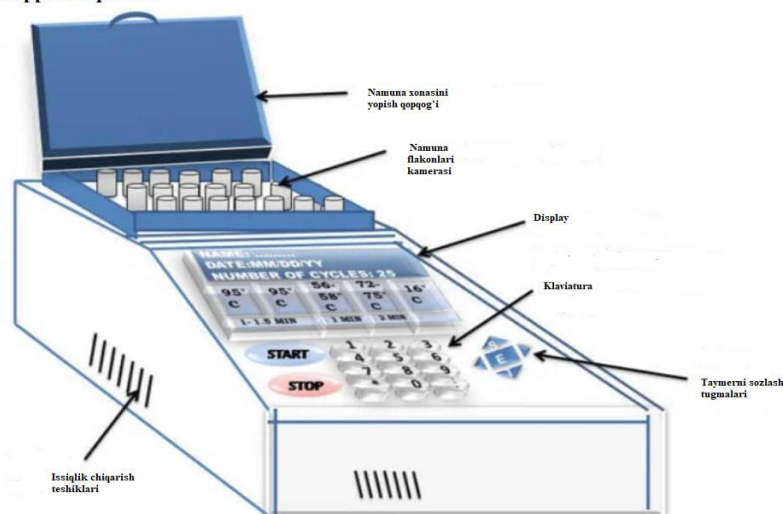
Kari Mullis 1985 yilda PCRni joriy qildi va keyinchalik bu hissi uchun kimyo bo'yicha Nobel mukofotiga sazovor bo'ldi. PCR kuchaytirilgan DNKni aniq aniqlash va tahlil qilish imkonini beradi va biomolekulyar tadqiqotlarning asosiga aylandi [1].

PCR usuli keng miqyosda o'zgartirilgan bo'lib, molekulyar biologiya, mikrobiologiya, genetika, diagnostika, klinik, sud-tibbiyot, ekologiya laboratoriyalari va boshqa ko'plab sohalarda keng qo'llaniladi. Polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR) — bu laboratoriyada juda oz miqdordagi DNK yoki RNK mavjud bo'lgan namunalar ichidan ham ma'lum DNK fragmentlarining ko'p nusxalarini olishga imkon beruvchi oddiy usul hisoblanadi.

Polimeraza zanjiri reaksiyasi (PCR) tez-tez ishlatiladigan laboratoriya nuklein kislotasini ko'paytirish usuli bo'lib, termal denaturatsiya va praymer tanlashdan so'ng DNKni sintez qilish uchun *Thermus aquaticus* dan ajratilgan termostabil DNK polimerazasi Taq polimerazadan foydalanadi [2].



PCR apparati qismlari



Polimeraza zanjir reaksiyasining asosiy komponentlari

1. Shablon DNK (Template DNA) – PCR jarayonida amplifikatsiya qilinishi kerak bo'lgan maqsadli ketma-ketlikni o'z ichiga olgan DNK.

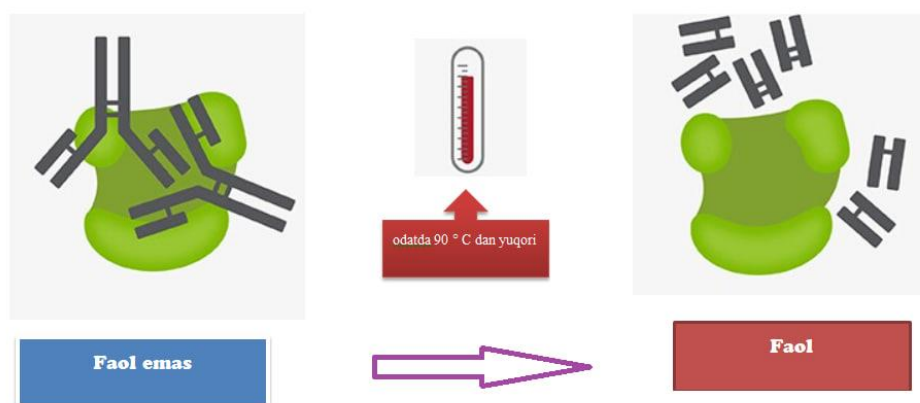
2. Praymerlar – ikkita sintetik oligonukleotid jufti bo'lib, ular maqsadli DNKning ikki zanjiridagi 3'-oxirlariga komplementar bo'ladi.

3. Termostabil DNK polimeraza fermenti – masalan, Taq polimeraza (dastlab *Thermus aquaticus* nomli termofil bakteriyadan ajratib olingan). Bu ferment PCR jarayonida shablon asosida yangi DNK zanjirini sintez qilish uchun zarur bo'lgan asosiy komponentdir.

4. Ikki valentli kationlar, odatda Mg^{2+} – ko'pchilik termostabil DNK polimerazalari faoliyati va PCRning boshqa bir qator bosqichlari uchun optimal konsentratsiyada zarur bo'ladi.

5. Deoksinukleozid trifosfatlar (dNTPs) – har bir dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) teng miqdorda bo'lishi kerak. Ular DNK polimeraza tomonidan yangi DNK zanjirini sintez qilish uchun qurilish bloklari sifatida ishlatiladi.

6. Buffer eritmasi – DNK polimerazining optimal faolligi va barqarorligi uchun zarur bo'lgan mos ion muhitini ta'minlaydi[3].

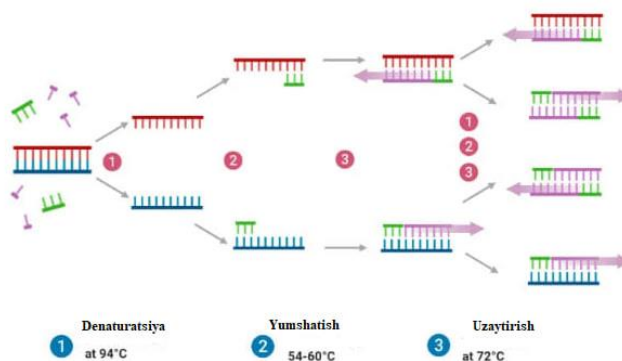


Reaksiyalarda asosan DNK polimeraza boshlang'ich isitish bosqichida yoki "issiq start" da faollashadi, unda ferment modifikatori yuqori haroratda (odatda 90°C dan



yuqori) chiqariladi. Faollashtirish vaqti va harorati DNK polimeraza va hot-start modifikatorining tabiatiga qarab o'zgaradi. Ba'zi DNK polimerazalari uchun aktivatsiya va boshlang'ich denaturatsiya bosqichlari bir bosqichda birlashtirilishi mumkin.

PCR bosqichlari



1. Denaturatsiya (94°C): DNK zanjirlarini denaturatsiya qilish yoki ajratish uchun reaksiyaga yuqori harorat beriladi. Natijada keyingi bosqich uchun kerakli bir zanjirli andoza hosil bo'ladi.

2. Yumshatish (54 - 60°C): Praymerlar andoza DNKdagi komplementar qismlarga bog'lanishi uchun reaksiyada harorat pasaytiriladi.

3. Uzaytirish (72°C): Taq polimeraza praymerlarni uzaytirib, yangi DNK zanjirlarini sintezlashi uchun reaksiyada harorat ko'tariladi.⁷⁵

PCR mashinasining ishlash tartibi

Dastlab, namuna PCR apparati yordamida isitiladi, bu DNKning denaturatsiyasi va ajralishiga olib keladi, bu bitta zanjirli DNKning ikkita bo'lagiga bo'linadi.

Shundan so'ng, "Taq polimeraza" deb nomlanuvchi ferment eski iplarni shablon sifatida ishlatib, ikkita yangi DNK zanjirini yaratadi yoki yaratadi.

Ushbu protsedura tufayli asl DNK takrorlanadi, har bir yangi molekulada bitta eski va bitta yangi DNK zanjiri mavjud.

Shundan so'ng, ushbu iplarning har biri boshqa ikkita nusxani yaratish uchun ishlatilishi mumkin va hokazo.

Denaturatsiya va yangi DNKni yaratish tsikli 30 yoki 40 martagacha takrorlanganda, dastlabki DNK segmentining bir milliarddan ortiq aniq nusxalari mavjud.

Butun PCR sikli jarayoni avtomatlashtirilgan va bir necha soat ichida tugatilishi mumkin. Reaksiya DNK denaturatsiyasi va sintezini ta'minlash uchun har bir necha daqiqada reaksiya haroratini o'zgartirish uchun tuzilgan termosikl deb nomlanuvchi qurilma tomonidan boshqariladi.

Polimeraza zanjirli reaksiyasi usuli genom DNKsining alohida bo'laklarining o'ziga xos praymerlaridan foydalanish asosida diskret DNK amplifikatsiya mahsulotlarini olishni o'z ichiga oladi.⁷⁶

⁷⁵<https://uz.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>



Amplifikatsiya- lotincha —amplification - kuchaytirish, ko'payish, molekulyar biologiyada - xromosoma DNK qismlarining qo'shimcha nusxalarini shakllantirish jarayoni, odatda tarkibida ba'zi genlar yoki strukturaviy geteroxromatin segmentlarini ko'paytirish tushuniladi. Amplifikatsiya - bu o'sma hujayralarining rivojlanishi paytida onkogenlarning faollashuv mexanizmlaridan biri, masalan, neyroblastomaning rivojlanishi paytida N-myc onkogen bolalarda to'qima saratonining eng keng tarqalgan shaklini misol keltirish mumkin. Shuningdek, amplifikatsiya - PZR - polimeraza zanjiri reaksiyasi paytida ma'lum bir nukleotid ketma-ketligi nusxalarini ko'paytirish bosqichi hisoblanadi.

PCR mashinasidan foydalanishda ehtiyot choralari.

Faqat PCR mashinasi uchun mo'ljallangan naychalar va plitalardan foydalanish kerak. Ishlashdan oldin quvurlarni va xususan, plitalarni ikki marta tekshiring. Eritmaning to'kilgan joylarini tozalash kerak va utilizatsiya qilish uchun biologik xavfli konteynerlardan foydalanish kerak. PCR apparati qopqog'idan foydalanganda ehtiyot bo'ling. Qopqoqlarni tushirsangiz yoki ursangiz, bu sinishi mumkin. PCR mashinasidan foydalanish tugagach, uni o'chirish kerak. Ishni boshlashdan oldin, PCR isitish blokining toza ekanligiga ishonch hosil qiling. Boshlashdan oldin, har bir quvur ushlagichini tekshiring. Qopqoqni bir tekis isitish va muhrlash uchun quvurlarning yuqori qismiga tekis o'tirishini ta'minlash uchun ildizlarni blokga teng ravishda taqsimlang.

PCR apparati zamonaviy molekulyar biologiya va diagnostika sohasida ajralmas vosita sifatida keng qo'llaniladi. Uning yuqori sezgirliigi, aniq natijalar berishi va nisbatan tezkorligi PCRni klinik diagnostika, genetik tadqiqotlar, mikrobiologik identifikatsiya hamda sud-tibbiyot sohalarida muhim rolga ega qiladi.

Shu bilan birga, PCR jarayonining to'g'ri va samarali amalga oshirilishi uchun yuqori sifatli reagentslar, steril sharoit va tajribali mutaxassislarning ishi talab etiladi.

Ifloslanish xavfi, qimmat uskunarlar va molekulyar biologiya sohasidagi malaka talab qilinishi kabi cheklovlar mavjud bo'lsa-da, texnologiyaning rivojlanishi va arzonroq, qulayroq uskunarlar paydo bo'lishi bilan ushbu muammolar asta-sekin bartaraf qilinmoqda.

Shunday qilib, PCR laboratoriya ishlarini optimallashtirish, tashxis qo'yishda aniqlikni oshirish va yangi ilmiy tadqiqotlarga asos yaratishda juda samarali va istiqbolli usul hisoblanadi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR:

1. Lorenz TC. Polimeraza zanjiri reaksiyasi: asosiy protokol va muammolarni bartaraf etish va optimallashtirish strategiyalari. J Vis Exp. 2012 yil 22-may; (63):e3998. [PMC bepul maqola] [PubMed]



2. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polimeraza zanjiri reaksiyasi. Natl Med J Hindiston. 1992 yil may-iyun; 5 (3): 115-9. [PubMed]
3. Dieffenbach CW and Dveksler GS. Setting up a PCR laboratory. In PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Genome Research, 1993; 3 : S2-S7 <http://genome.cshlp.org/content/3/2/S2.refs.html>
4. Newton CR. 1995. Setting up a PCR laboratory. In PCR: Essential data. (ed. C.R. Newton), p. 216. Wiley, New York.
5. Mifflin TE. Setting up a PCR laboratory. www.biosupplynet.com/pdf/01
6. Roux KH. Optimization and trouble shooting in PCR. In PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Genome Research, 1995; 4 :S185-S194 <http://genome.cshlp.org/content/4/5/S185.refs.html>
7. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. 2006. The Real Time PCR. Mol Aspects Med; 27: 95-125
8. Millar BC, Xu J, Moore JE. 2007. Molecular diagnosis of medically important bacterial infections. Curr Issues Mol Biol; 9: 21-39
9. Xaydarali ro'ziboyev Nafisa Komilova Gulbahor Radjabova "BIOINFORMATIKA" Toshkent-2022 .174-bet