



<https://doi.org/10.70728/a.series.tab.v08.i04.059>

WU USULIDA BUG‘DOY BARGLARIDAN UMUMIY RNK AJRATIB OLISH

Abdulkarimov Abdulaziz Olim o‘g‘li

*Guliston davlat universiteti Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot instituti
tayanch doktoranti*

abdulazizabdukarimov002@gmail.com

Azzamkulova Dilduza Umarqul qizi

*Guliston davlat universiteti Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot instituti
tayanch doktoranti*

Ablakulova Nodira Abduvaxobovna

*Guliston davlat universiteti Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot instituti
yetakchi ilmiy xodimi*

Qo‘shiyev Habibjon Hojiboboyevich

*Guliston davlat universiteti Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot instituti
direktori*

Annotatsiya. Hozirda RNK ajratib olishda dunyo olimlari ko‘plab usullardan foydalanishadi. Bulardan, tijorat firmalari tomonidan ishlab chiqilgan RNK ajratish to‘plamlari hamda zarur lizis bufferlarini personal tomonidan qo‘lda tayyorlanidan usullar dominantlik qiladi. Tijorat to‘plamlari sodda va samarali hisoblansada, tan narxi qimmatligi sababli ko‘plab laboratoriyalar uchun kundalik amaliyotda qo‘llashda cheklovlarni keltirib chiqaradi. Mazkur ishda, o‘simlik barglaridan umumiy RNK ekstraksiya qilishni arzon va samarali usuli hisoblanuvchi Wu usulini modifikatsiyalangan versiyasi yoritilgan.

Kalit so‘zlar: RNK, RNK ajratish, Wu bufferi, gel-elektroforez, spektrofotometr

Аннотация. В настоящее время ученые во всем мире используют множество методов выделения РНК. Среди них преобладают наборы для выделения РНК, разработанные коммерческими компаниями, и методы, в которых необходимые лизирующие буферы готовятся вручную персоналом. Хотя коммерческие наборы считаются простыми и эффективными, их высокая стоимость ограничивает их использование в повседневной практике во многих лабораториях. В данной работе описана модифицированная версия метода Бу, который считается недорогим и эффективным методом выделения общей РНК из листьев растений.

Ключевые слова: РНК, выделение РНК, буфер Бу, гель-электрофорез, спектрофотометр

Abstract: Currently, scientists around the world use many methods for RNA extraction. Among them, RNA isolation kits developed by commercial companies and methods in which the necessary lysis buffers are prepared manually by personnel dominate. Although commercial kits are considered simple and effective, their high cost limits their use in daily practice for many laboratories. In this work, a modified version of the Wu method, which is considered an inexpensive and effective method for extracting total RNA from plant leaves, is described.

Keywords: RNA, RNA isolation, Wu buffer, gel electrophoresis, spectrophotometer.

KIRISH. RNK ekstraksiya qilish molekulyar biologiya laboratoriyasida kundalik usul hisoblanadi. O‘simliklardan ajratib olingan RNKning yuqori sifati keyingi tajribalarda, masalan, teskari transkripsiya polimeraza zanjiri reaksiyasi, Shimoliy gibridizatsiya, kDNK sintezi va mikroarray tahlili kabi analizlarda muvaffaqiyatga erishish uchun zaruriy shartdir. Biroq, RNK molekulalarini ajratib olishda bir qator muammolar mavjud bo‘lib, jumladan, RNK molekulalari RNKaza fermenti va boshqa muhit omillariga sezgir va ta’sirchan bo‘lishi ekstraksiya jarayoni samarasiz kechishiga sabab bo‘ladi.

Genetik ma’lumotlar DNK ketma-ketligidan RNKga, so’ngra oqsil ketma-ketligiga oqib o’tadi. RNK - bu gen ekspressiyasida DNKni oqsil bilan bog‘laydigan axborot ko‘prigi. RNK darajasini tahlil qilish gen ekspressiyasi va regulatsiyasi haqida muhim ma’lumotlarni beradi. RNKni ajratish va tozalash Shimoliy gibridizatsiya, teskari transkripsiya-polimeraza zanjiri reaksiyasi (RT-PCR), kDNK uchlarini tez amplifikatsiya qilish, in vitro tarjima va kDNKni klonlash kabi manipulyatsiyalar uchun odatiy molekulyar texnikalar bo‘lib kelgan. So‘nggi bir necha yil ichida o‘simlik to‘qimalaridan RNKni ajratishning osonligi va muvaffaqiyati borasida sezilarli yutuqlarga erishildi. Biroq, yangi tadqiqotchilar hali ham RNKni ajratib olish paytida RNKning parchalanishi bilan bog‘liq jiddiy muammoga duch kelmoqdalar, chunki bu faollikni ingibirlash qiyin. Bir qator usullar ishlab chiqilgan va biotexnologiya kompaniyalari tomonidan RNKni kichik va katta miqyosda ajratish uchun ko‘plab to‘plamlar mavjud [1-3].

MATERIALLAR

Kerakli asbob-uskunalar: Autoblott (+80, +65° C), Xovoncha, Muz, Probirka (2000 mkl), Pastavka, Sentrifuga, Muzlatgich, Rezina qo‘lqop, Konchiklar (100, 200 va 1000 mkl), Salfetka, Maxsus boks (tyaga), Vorteks.

Kerakli reagentlar: Suyuq azot, Wu bufferi, Proteinaza K (25 mg/ml), 1.5 M Natriy atsetat pH-4.5, Suv ostidagi fenol (water saturated phenol) pH-4,5, Xloroform:izoamil (24:1), 1.2 M NaCl, 0.8 M Na citrate pH= 7, 96 % etanol, 70% etanol, DEPC suvi.

Wu bufferi tarkibi: 200 mM-Sodium borate decahydrate (Borax) pH-9.0, 30 mM Ethilenglicol bis-N,N-tetraacetic acid (EGTA), 1% SDS, 1% Sodium deoxycholate, 2%, PVP (Mr 40 000), 1% TritonX100, 10 mM DTT (Sterilizatsiyadan keyin qo‘shiladi), 0,1 % DEPC suvi.

METODLAR

Wu usulida o‘simlik barglaridan umumiy RNK ajratib olish

Muhim: RNK ajratiladigan xona stoli RNA free bo‘lishi kerak!!!

1. Barra barglar yig‘ilib 15 ml li falkonlarda shu zahoti suyuq azotga solinadi.
2. Wu bufferi +80°C suv vannasi (yoki Autoblott) da isitiladi.
3. Barg gomogenizatsiya qilinadi va unga 4 ml Wu bufferi qo‘shiladi. 2 ta 2 ml probirkalarga 1 ml dan olinadi. Shu zahoti simpllar (probirkalar) muzga qo‘yiladi. (Wu bufferi +80°C suv vannasida saqlanadi).
4. 60 mkl proteinaza K (25 mg/ml) solinib, xona haroratida 15 minut inkubatsiya qilinadi.
5. 20 minut/14000 oborot sentrifuga qilinadi. (4°Cli sentrifugada).
6. 800 mkl dan yangi probirkalarga olinadi. Cho‘kmasi tashlanadi.
7. 100 mkl 1.5 M Natriy atsetat H-4.5 qo‘shiladi. (Jarayon muz ustida bajariladi).
8. 900 mkl suv ostidagi fenol qo‘shiladi. (water saturated phenol).
9. Ustiga 200 mkl maxsus xloroform:izoamil (24:1) solib aralashtiriladi.
10. 20 minut/14000 oborot sentrifuga qilinadi. (4°Cli sentrifugada). Ustki qismidan 800 mkl yangi probirkaga olinadi.
11. 150 mkl 1.2 M NaCl + 150 mkl 0.8 M Na citrate pH 7 solinadi.
12. 900/1000 mkl 96 % spirt (1:1 hajm) qo‘lda sekin aralashtiriladi. Quyuq oq kraxmal cho‘kmasi hosil bo‘ladi va bu cho‘kmani konchik bilan olib tashlanadi.
13. 20 minut/14000 oborot sentrifuga qilinadi. (4°Cli sentrifugada).
14. Cho‘kma 70% li spirtida 5 minut/14000 oborot sentrifuga qilib 2 marta yuviladi.
15. Maxsus boks ichida probirka quriguncha salfetkaga teskari qilib qo‘yiladi
16. 100mkl DEPC suvi solib - 40°C da saqlanadi.

Ajratilgan umumiy RNKlar 1,2 % li MOPS gelida ko‘rildi. Gel va bufferlar quyidagi tartibda tayyorlandi;

- MOPS 3-(N-morpholino) proponsulfonic acid 209.3 g/mol
- Sodium acetate 82.03 g/mol
- Formaldehyde (37%)

100ml 10X MOPS bufferini tayyorlash

- 4,419 g MOPS(200 mM)
- 0,82 g Sodium acetate (50 mM)
- 0,37 g EDTA (10mM)

80 ml (0,1% steril DEPC) eritildi va NaOH(10M) bilan pH 7 ga to‘g‘irlandi. Keyin idish hajmi 100 mlga yetguncha ddH₂O quyilib, sterilizatsiya qilindi.

RNK gel elektroforezi uchun 500 ml hajmli 1x MOPS bufferini tayyorlash

- 50 ml 10X MOPS bufferi
- 10 ml 375 formaldehyde
- 440 ml ddH₂O

100 ml 1,2 % li MOPS gel tayyorlash

- 1,2 g Agarose (Molecular biology grade)

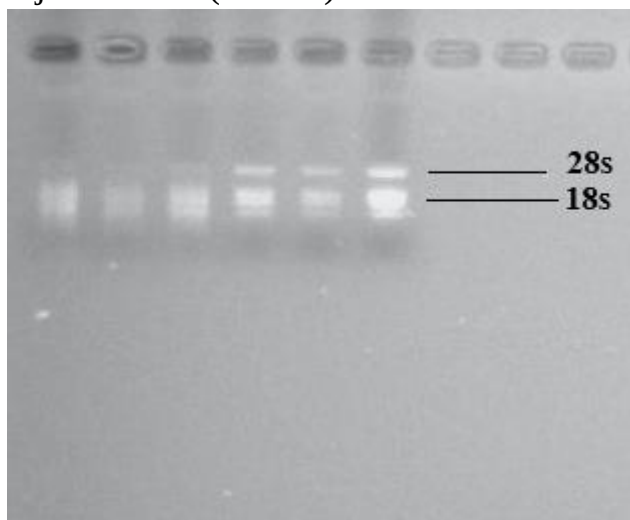
- 10 ml 10X MOPS
- 100 mlgacha ddH₂O solinadi va mikroto‘lqinli pechga joylanadi. Harorati 65°C gacha sovutiladi.

- 1,8 ml 37% formaldehyde (12,3 M) solindi
- 1 mkl 10 mg/ml etidium bromid qo‘shib aralashtirildi

Tayyor bo‘lgan suyuq holdagi gelni elektroforrez apparatiga quyildi. 10 mkldan total RNA namunalari steril 0,2 ml PCR tube larga solindi ustiga + 5 mkl RNK yuklovchi bo‘yoq quyildi. Jarayon muz ustida bajarildi. So‘ng 1 daqiqa 95°C da denaturatsiya qilindi va darhol muzda saqlandi.

NATIJALAR VA MUHOKAMA

RNK namunalari 70 volt kuchlanishda 45 daqiqa davomida elektroforez qilindi. Geldagi umumiy RNKlarni tekshirish uchun Transluminator Kvant C (Helicon) uskunasi foydalanildi. Quyidagicha natijalar olindi (1-rasm).



1-rasm. Ajratib olingan total RNK namunalarini 1,2% agarozaga gelidagi elektroforegrammasi

Ajratib olingan umumiy RNK molekulalarini miqdor va sifat ko‘rsatkichlari Nanodrop one C (Thermofisher) qurilmasida tekshirildi (1-jadval).

Jadval 1.

Ajratib olingan Umumiy RNK namunalarini spektrofotometrik tahlili

#	ng/mkl	A260/A280	A260/A230
1	616.1	1.99	2.30
2	431.5	2.04	2.02
3	688.5	1.95	2.19
4	677.9	1.95	2.16

5	519.3	1.88	2.31
6	981.6	2.02	2.18

Nuklein kislotalar, shu jumladan RNK 260 nm to‘lqin uzunligida yutilish beradi. Oqsillarni yutilish spektri 280 nmga teng bo‘lib, Nuklein kislotalar ekstraksiyasida qo‘llaniladigan organik moddalar (guanidine thiosyanat, guanidine gidrokslorid, phenol) 230 nm da yutilish beradi. Mazkur to‘lqin uzunliklari qiymatlari ko‘rsatkichlaridan kelib chiqqan holda ekstraksiya jarayonida ajratib olingan nuklein kislotalarni soflik ko‘rsatkichlari baholanadi. Shundan kelib chiqqan holda, sof RNK uchun A260/A280 nisbati ~2.0 qiymatda, A260/A230 nisbati 2.0-2.2 oraliqda bo‘lishi belgilangan.

Bizning tajribada RNKni miqdor va sifat ko‘rsatkichlari bo‘yicha olingan natijalar optimal ekanligi mavjud adabiyot natijalariga mos kelishini takrorladi [4].

XULOSA. Biz modifikatsiyalangan Wu usulida samarali tarzda sof RNK ajratib oldik. Modifikatsiyalangan Wu usulida o‘simlikdan umumiy ekstraksiya qilish protokoli asosida bajarish uchun taxminan 4 soat vaqt sarfladik. Bu usul sodda, arzon va yuqori samaradorligi sababli molekulyar biologiya laboratoriyalarida o‘simliklardan kundalik RNK ekstraksiyasi jarayonlarida keng miqyosda qo‘llanishi mumkin. Olingan bug‘doy umumiy RNK namunalari Real-time PCR usulida genlar ekspressiyalanishi tekshirishda asos bo‘lib xizmat qiladi.

ADABIYOTLAR RO‘YXATI

1. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
2. Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532–535.
3. Davis, L. G., Kuehl, W. M., and Battey, J. F. (1994) *Basic Methods in molecular biology* (2nd ed). Appleton & Lange, Norwalk, CT. Chapter 11, sections 1–5.
4. William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski, Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques* 22:474-481 (March 1997)