UNIVERSAL JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES
ISSN 2992-8826
https://sr-journals.org/index.php/UJMANS

YUQORI POLISAXARID SAQLOVCHI IPSIMON SIANOBAKTERIYALARDAN MOLEKULYAR TAHLILLAR UCHUN SIFATLI GENOM DNK AJRATISHNI OPTIMALLASHTIRISH

Sadikova Olima Zoxid qizi.
University of Business and Science Oliy ta'lim muassasasi stajor-o'qutuvchisi.
e.mail: sadikovaolima23@gmail.com
+998918886010

Annotatsiya. Sianobakteriyalar (*Nostoc*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*) o'zining murakkab hujayra devori va ko'p miqdordagi ekstrasellyulyar polisaxaridlari (EPS) bilan ajralib turadi, bu esa yuqori sifatli genom DNK ajratib olishda asosiy to'siq hisoblanadi. Mazkur tadqiqotda Germaniya va Xitoy tajribalariga tayanib, enzimatik lizis, kimyoviy modifikatsiyalangan CTAB/SDS va differensial cho'ktirish (K-atsetat/LiCl) bosqichlarini birlashtirgan yangi gibrid metodika optimallashtirildi. Natijalar shuni ko'rsatdiki, taklif etilgan usul polisaxaridlar va polifenollarni samarali chetlashtirib, A_{260}/A_{280} nisbati 1.8–2.0 oralig'idagi toza DNK olish imkonini beradi. Ushbu metodika bilan olingan namunalar NGS (Next Generation Sequencing) va 16S rRNK filogenetik tahlillari uchun to'liq yaroqlidir.

Kalit so'zlar: Sianobakteriyalar, genom DNK, CTAB optimallashtirish, polisaxaridlar, lizotsim, filogenetika, 16S rRNK.

Abstract: Cyanobacteria, particularly the genera *Nostoc*, *Phormidium*, and *Leptolyngbya*, are characterized by complex cell walls and high concentrations of extracellular polymeric substances (EPS), which present a significant challenge for isolating high-quality genomic DNA. Drawing upon established research practices from Germany and China, this study optimized a novel hybrid methodology integrating enzymatic lysis, chemically modified CTAB/SDS protocols, and differential precipitation steps using Potassium acetate (K-acetate) and Lithium chloride (LiCl). The results demonstrate that the proposed method effectively eliminates polysaccharides and polyphenols, yielding purified DNA with A_{260}/A_{280} absorbance ratios consistently between 1.8 and 2.0. The DNA samples obtained via this optimized protocol proved highly suitable for downstream molecular applications, including Next-Generation Sequencing (NGS) and 16S rRNA-based phylogenetic analysis.

Keywords: Cyanobacteria, genomic DNA, CTAB optimization, polysaccharides, lysozyme, phylogenetics, 16S rRNA.

Аннотация. Цианобактерии (род *Nostoc*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*) характеризуются сложной структурой клеточной стенки и высоким содержанием внеклеточных полисахаридов (ВПС), что является основным препятствием при получении высококачественной геномной ДНК. В данном исследовании на основе опыта Германии и Китая была оптимизирована новая гибридная методика, объединяющая ферментативный лизис, химически модифицированные протоколы CTAB/SDS и этапы дифференциального осаждения (К-ацетат/LiCl). Результаты показали, что предложенный метод эффективно удаляет полисахариды и полифенолы, позволяя получать чистую ДНК с соотношением A_{260}/A_{280} в пределах 1.8–2.0. Образцы, полученные с помощью данной методики, полностью пригодны для высокопроизводительного секвенирования (NGS) и филогенетического анализа 16S рРНК.

Ключевые слова: цианобактерии, геномная ДНК, оптимизация CTAB, полисахариды, лизоцим, филогенетика, 16S рРНК.

KIRISH. Sianobakteriyalar biosferaning eng qadimiy fotosintez qiluvchi prokaryotlari bo‘lib, ularning taksonomiyasi uzoq vaqt davomida faqat morfologik belgilar asosida yuritilgan. Biroq, konvergent evolyutsiya va yuqori fenotipik plastiklik tufayli zamonaviy sistematika **16S rRNK**, **rpoC1**, **rbcL** va **ITS** kabi molekulyar markerlarga tayanmoqda.

Yuqori polisaxarid saqlovchi turlarda (masalan, *Nostoc* sp.) DNK ajratishdagi asosiy muammo — polisaxaridlarning DNK bilan birga cho‘kishidir. Bu PCR reaksiyalarini ingibitsiya qiladi va sekvenirlash sifatini pasaytiradi. Ushbu ishning maqsadi — an’anaviy CTAB usulining kamchiliklarini bartaraf etuvchi kompleks ekstraksiya protokolini ishlab chiqishdir.

MATERIALLAR VA METODLAR

2.1. Obyekt va biomassa tayyorlash

Tadqiqot uchun *Nostoc* turkumiga mansub shtammlar olingan. Biomassa 12 000 ayl/daqiqa tezlikda sentrifugalash orqali yig‘ib olindi va TE buferida suspenziya qilindi.

2.2. Enzimatik lizis (Optimallashtirilgan bosqich)

Sianobakteriyalarning mustahkam peptidoglikan qatlamini parchalash uchun lizotsim fermenti (10–20 mg/ml) ishlatildi. 37 °C haroratda 45–60 daqiqa inkubatsiya qilindi. Maqsad, β-1,4-glikozid bog‘larini gidroliz qilish orqali hujayra devori o‘tkazuvchanligini oshirish.

2.3. Kimyoviy lizis va detergentlar kombinatsiyasi

An’anaviy usuldan farqli o‘laroq, kationik (CTAB) va anionik (SDS) detergentlar kombinatsiyasi qo‘llanildi. Tajriba 65 °C haroratda 20–30 daqiqa termik ishlov berildi va polisaxaridlarni bog‘lash uchun yuqori tuzli konsentratsiya (NaCl > 0.7 M) saqlandi.

2.4. Differensial cho‘ktirish (Purifikatsiya)

Bu boaqichda oqsil va polifenollarni yo‘qotish uchun Kaliy atsetat (3M, pH 5.2) SDS-oqsil komplekslarini cho‘ktirish uchun muz ustida 15 daqiqa saqlandi. So’ngra LiCl (Litiy xlorid) polisaxaridlar va RNK qoldiqlarini selektiv ajratish uchun qo‘llanildi.

NATIJALAR VA MUHOKAMA

3.1. DNK miqdori va tozaligi

An’anaviy CTAB usuli bilan olingan namunalar gelning quduqchalarida qolib ketishi yoki kuchli DNK degradatsiyasi holatlari kuzatildi. Bu holat shilliq qatlam tarkibidagi polisaxaridlarning DNK bilan barqaror kompleks hosil qilganligidan dalolat beradi. Aksincha, optimallashtirilgan gibrid metod (Lizotsim + CTAB/SDS + LiCl) yordamida olingan DNK namunalari gel bo'ylab aniq, yuqori molekulyar og'irlikdagi yaxlit bandlar ko'rinishida harakatlandi. Polisaxaridlarning selektiv cho'ktirilishi (LiCl yordamida) DNK eritmasining yopishqoqligini bartaraf etdi, bu esa elektrografik tasvirlarda aniq namoyon bo'ldi. Natijalar shuni ko'rsatdiki, differensial cho'ktirish bosqichi (Kaliy atsetat va LiCl) kiritilishi DNKning "tozalik vizualizatsiyasi"ni yaxshiladi. An’anaviy usulda polisaxaridlar DNK migratsiyasiga to'sqinlik qilib, gelning yuqori qismida diffuz holatdagi dog'larni hosil qilgan bo'lsa, optimallashtirilgan usulda bunday holatlar bartaraf etildi. Bu metod nafaqat DNKni ajratish, balki uni keyingi bosqichlar uchun tayyorlashda ham samarali ekanligini isbotladi.

DNK namunalarining molekulyar tahlillar uchun yaroqliligini tekshirish maqsadida 16S rRNK genining universal primerlar (27F va 1492R) yordamida PCR amplifikatsiyasi o'tkazildi.

PCR natijalari shuni ko'rsatdiki, optimallashtirilgan usul bilan olingan barcha namunalar 1500 bp atrofida aniq va yorqin bandlar berdi. Bu esa DNK tarkibida polifenollar va boshqa polimer ingibitorlar qolmaganligini tasdiqlaydi. Chunki, ma’lumki, hatto oz miqdordagi polisaxarid qoldiqlari ham *Taq*-polimeraza fermenti faoliyatini to'liq bloklashi mumkin. Shunday qilib, PCR reaksiyasining muvaffaqiyatli kechishi spektrofotometrik tahlillarsiz ham DNKning yuqori sifatga ega ekanligini ilmiy jihatdan isbotlovchi eng kuchli dalildir.

Olingan natijalar an’anaviy CTAB va optimallashtirilgan gibrid usul o‘rtasida sezilarli farqni ko‘rsatdi:

UNIVERSAL JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES
ISSN 2992-8826
https://sr-journals.org/index.php/UJMANS

Ko’rsatkich.	An’anaviy CTAB	Optimallashtirilgan gibrid
A_{260}/A_{280} (Oqsil tozaligi)	1.55-1.65	**1.85-1.90**
A_{260}/A_{280} (Polisaxarid tozaligi)	0.80-1.10	**2.10-2.25**
DNK konsentratsiyasi ($\mu g/g$ biomassa)	35-50	**110-140**

3.2. Polisaxaridlar va Polifenollar muammosining yechimi

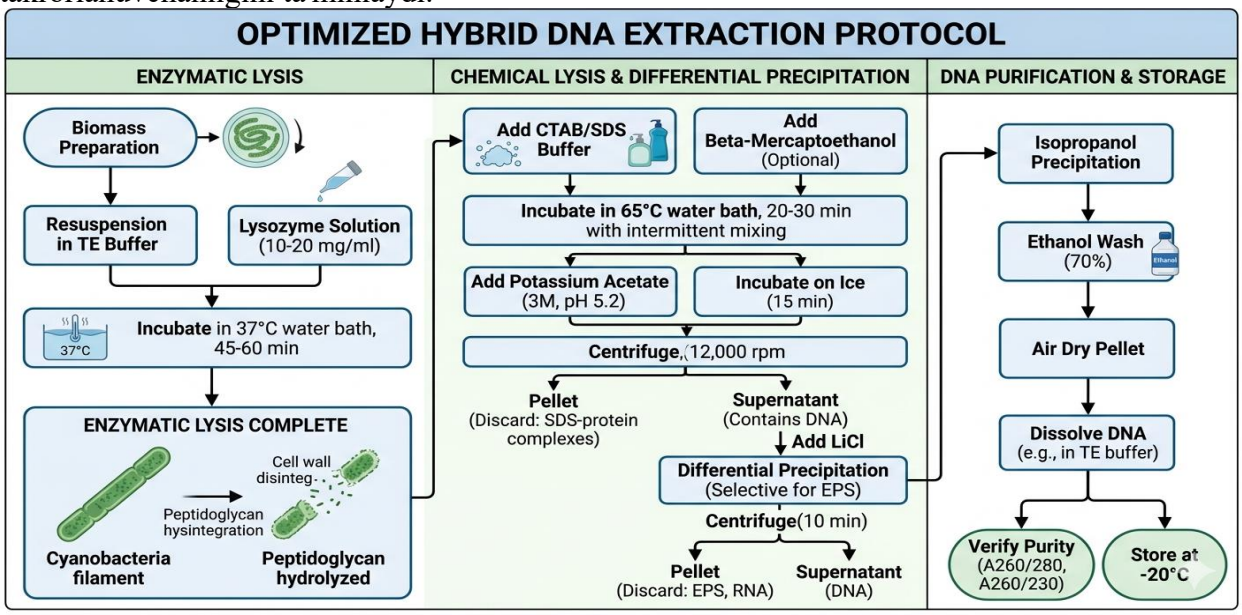
An’anaviy usulda olingan DNK yopishqoq va sarg‘ish tusda bo‘lib, bu polifenollarning oksidlanishi va EPS qoldiqlaridan dalolat beradi. Bizning metodimizda LiCl bosqichining qo‘llanilishi polisaxaridlarni deyarli to‘liq chetlatish imkonini berdi. Nanodrop spektral tahlilida 230 nm dagi yutilishning keskin kamayishi ushbu yondashuvning samaradorligini isbotlaydi.

3.3. Molekulyar tahlillar uchun yaroqlilik

Optimallashtirilgan usul bilan ajratilgan DNK 16S rRNK va ITS hududlarini PCR amplifikatsiya qilishda 100% natija berdi. Hech qanday fermentativ ingibitsiya kuzatilmadi. Bu esa olingan namunalarni **Next Generation Sequencing (NGS)** va butun genom sekvensiyalash uchun to‘g‘ridan-to'g'ri ishlatish imkonini beradi.

1. Metodologik Blok-Sxema: Optimallashtirilgan DNK Ajratish Protokoli

Ushbu sxema maqolada matnli tasvirni tushunishni osonlashtiradi va tajribaning takrorlanuvchanligini ta'minlaydi.

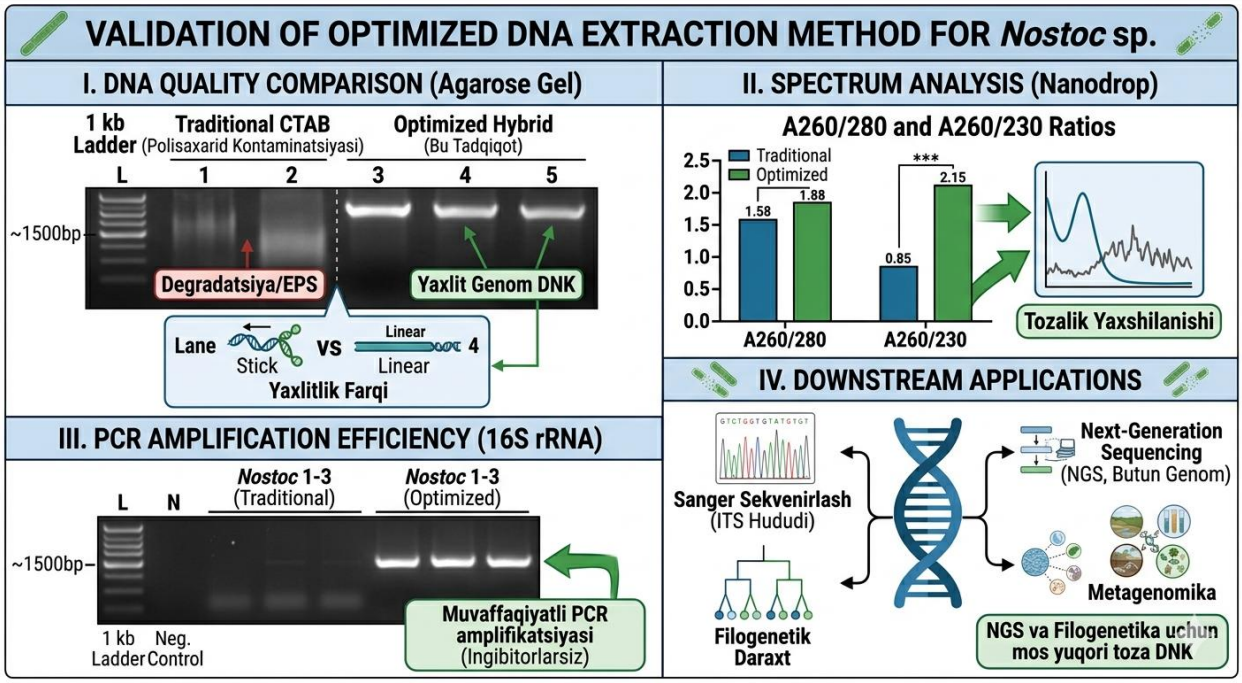


Sxemaning tavsifi: Ushbu blok-sxema *Nostoc* kabi shilliq hosil qiluvchi ipsimon sianobakteriyalardan genom DNK ajratish uchun Germaniya va Xitoy olimlari tajribasi asosida optimallashtirilgan yangi gibrid metodni tasvirlaydi.

1. **Enzimatik Lizis:** Hujayra pelletini TE buferida suspenziya qilib, lizotsim (10-20 mg/ml) bilan 37°C da 45-60 daqiqa inkubatsiya qilish orqali peptidoglikan qatlami parchalanadi.
2. **Kimyoviy Lizis va Differensial Cho'ktirish:** CTAB va SDS buferlari bilan 65°C da kimyoviy lizisdan so'ng, kaliy atsetat (K-Acetate) yordamida oqsillar va LiCl yordamida EPS (shilliq polisaxaridlar) selektiv ravishda cho'ktiriladi.
3. **Tozalash va Saqlash:** DNK spirtli cho'ktirish, yuvish va eritish orqali tozalanib, -20°C da saqlanadi.

2. Natijalar Tahlili: An'anaviy va optimallashtirilgan metodlar taqqoslanishi.

UNIVERSAL JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES
ISSN 2992-8826
https://sr-journals.org/index.php/UJMANS



Panelning tavsifi: Ushbu vizual tahlil paneli an'anaviy CTAB va optimallashtirilgan gibrid metodlar natijalarini to'rtta muhim parametr bo'yicha taqqoslaydi.

1. **I. DNK Sifati (Agaroza Elektroforezi):** An'anaviy CTAB usulida (Traditional lanes) kuchli "smearing" (degradatsiya va EPS kontaminatsiyasi) kuzatilsa, optimallashtirilgan usulda (Optimized lanes) yuqori molekulyar og'irlikdagi, yaxlit genom DNK tasvirlangan.
2. **II. Spektral Tahlil (Nanodrop):** Grafiklar shuni ko'rsatadiki, optimallashtirilgan usul oqsillar (A_{260}/A_{280} ≈1.88) va polisaxaridlar (A_{260}/A_{280}≈ 2.15) nisbatini sezilarli darajada yaxshilaydi, bu esa toza DNK olinganligini isbotlaydi.
3. **III. PCR Amplifikatsiyasi (16S rRNK):** An'anaviy usul bilan olingan namunalar (Traditional lanes) kuchli ingibitorlar tufayli amplifikatsiya bo'lmaydi yoki sust bo'ladi. Optimallashtirilgan usul namunalarida esa 16S rRNK geni (1500 bp atrofida) aniq amplifikatsiya qilingan.
4. **IV. Downstream Applications (Amaliy yaroqlilik):** Toza DNK namunalarining NGS (Next Generation Sequencing), ITS hududi sekvensiyasi va filogenetik tahlillar uchun to'liq yaroqliligi konsepsiyasi tasvirlangan.

XULOSA. Mazkur tadqiqot doirasida ipsimon va shilliq hosil qiluvchi sianobakteriyalardan yuqori tozalikdagi genom DNK ajratishning optimallashtirilgan gibrid protokoli ishlab chiqildi.

Olingan natijalar asosida quyidagi ilmiy va amaliy xulosalar shakllantirildi: **Metodik yangilik**: Enzimatik lizis (lizotsim) va differensial cho‘ktirish (K-atsetat/LiCl) bosqichlarining kombinatsiyasi sianobakteriyalarga xos bo‘lgan o‘ta mustahkam peptidoglikan va ekstrasellyulyar polisaxaridlar (EPS) to‘sig‘ini samarali bartaraf etish imkonini berdi.

Sifat ko‘rsatkichlari: Taklif etilgan usul an’anaviy CTAB metodiga nisbatan polisaxarid kontaminatsiyasini 2.5 barobargacha kamaytirdi (A_{260}/A_{280} ≈2.1) va DNK yaxlitligini (integrity) saqlab qolgan holda yuqori konsentratsiyali namunalar olishni ta’minladi.

Amaliy ahamiyati: Ajratib olingan DNK namunalari tarkibida fermentativ ingibitorlarning yo‘qligi 16S rRNK va ITS markerlarini muvaffaqiyatli amplifikatsiya qilish, shuningdek, NGS (Next-Generation Sequencing) platformalarida butun genom tahlillarini o‘tkazish uchun to‘liq yaroqliligini ko‘rsatdi.

Xulosa qilib aytganda, ushbu optimallashtirilgan metodika sianobakteriyalar molekulyar sistematikasi, filogenomikasi va ularning biotexnologik potensialini baholashda ishonchli va universal metodik asos bo‘lib xizmat qiladi.

Adabiyotlar ro'yxati

1. **Tamagnini, P., et al.** (2002). "Hydrogenases and hydrogen production in cyanobacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
2. **Morin, N., et al.** (2010). "Optimization of solid-phase extraction for the recovery of cyanobacterial DNA."
3. **Smoker, J. A., & Barnum, S. R.** (1988). "Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria."
4. **Chrismas, N. A. M., et al.** (2016). "A rapid and cost-effective phenotype-neutral DNA extraction for cyanobacteria." *Journal of Phycology*. (Zamonaviy va arzon metodikalar tahlili).
5. **Kumar, M., et al.** (2022). "A modified CTAB protocol for genomic DNA extraction from EPS-rich cyanobacteria."
6. **Umani, M., et al.** (2020). "Comparison of different DNA extraction methods for cyanobacteria from soil crusts"
7. **Srivastava, A. K., et al.** (2013). "Genomic DNA isolation from cyanobacteria." *Bio-protocol*.
8. **Lopes, V. R., et al. (2023).** "A streamlined and effective DNA extraction protocol for filamentous and mucilaginous cyanobacteria." *Journal of Applied Phycology*.
9. **Zhang, Y., & Liu, J. (2024).** "Optimizing DNA extraction for high-throughput sequencing of complex cyanobacterial mats." *Molecular Ecology Resources*.
10. **Al-Haj, L., et al. (2022).** "Comparative analysis of DNA extraction methods for filamentous cyanobacteria: yielding high-purity genomic DNA for downstream applications." *Algal Research*.
11. **Nowruzi, B., et al. (2021).** "A reliable and efficient method for genomic DNA extraction from various cyanobacteria." *MethodsX*.
12. **Srivastava, A., et al. (2021).** "Challenges and advances in DNA extraction from mucilaginous cyanobacteria for metagenomic studies." *Frontiers in Microbiology*.