UO‘K 574.16

CHUCHUK SUV AMFIPODALARIDAN GENOM DNK AJRATISH UCHUN TAKOMILLASHGAN CTAB PROTOKOLI

F.U. Umarov, X.X. Solijonov, F.G‘. Fazliddinov, A.O. Abdukarimov, A. Pazilov

Maqolada Chiqchiq havzasi va Farg‘ona vodiysi buloqlaridan olingan amfipodalardan genom DNK ekstraksiyasi uchun takomillashgan CTAB usuli ishlab chiqish yoritilgan. Natijalar 16 ta namunadan olingan DNK yuqori sifatli va toza ekanini ko‘rsatdi. Gel-elektroforez va NanoDrop tahlillari DNKning yaxlitligini tasdiqladi. Takomillashgan protokol arzon, ishonchli va molekulyar tadqiqotlar uchun yaroqli usul sifatida tavsiya etiladi.

Kalit so‘zlar: *CTAB protokoli, amfipoda, genomik DNK, DNK ekstraksiyasi, gel-elektroforez, NanoDrop, Proteinaza K, RNKaza*.

В статье разработан усовершенствованный метод CTAB для экстракции геномной ДНК из амфипод, собранных в родниках бассейна Чирчика и Ферганской долины. ДНК, полученная из 16 образцов, характеризуется высоким качеством и степенью очистки. Результаты гель-электрофореза и анализа на NanoDrop подтвердили целостность ДНК. Предложенный протокол рекомендован как доступный, надёжный и эффективный метод для молекулярных исследований.

Ключевые слова: *CTAB-протокол, амфиподы, геномная ДНК, экстракция ДНК, гель-электрофорез, NanoDrop, протеиназа К, РНКаза*.

KIRISH

Amfipodalar suv ekotizimlarida muhim o‘rin tutadigan yuksak qisqichbaqasimonlar turkumidir. Ular detrit organizmlar sifatida organik qoldiqlarni parchalash va oziq moddalarning aylanishida katta ahamiyatga ega, shuningdek, ko‘plab suv hayvonlari (masalan, baliqlar) uchun ozuqa zanjirining muhim bo‘g‘ini hisoblanadi [14. B. 4; 15. B. 3; 17. B. 37]. Bundan tashqari, amfipodalar ekologik sezgir organizmlar bo‘lib, atrof-muhit o‘zgarishlariga juda ta’sirchan reaksiyasi tufayli suv havzalari holatini baholashda bioindikator sifatida qo‘llaniladi [13. B. 255, 16. B. 5].

Amfipodalar Shimoliy yarimsharning chuchuk suv ekotizimlarida keng tarqalgan bo‘lib, ular ekologik, toksikologik va molekulyar tadqiqotlarda model organizmlar sifatida tez-tez qo‘llaniladi. Biroq turlarni morfologik aniqlash ularning yuqori darajadagi ichki tur o‘zgaruvchanligi hamda kriptik turlar mavjudligi sababli qiyinchilik tug‘diradi. Shu sababli mitoxondrial DNK (masalan, COI geni) tahliliga asoslangan molekulyar yondashuvlar taksonomik verifikatsiya va bioxilmaxillikni baholash uchun muhim ahamiyat kasb etadi [12. B. 71].

Hozirgi vaqtda O‘zbekistonda amfipodalar faunasini o‘rganish yangi bosqichda rivojlanmoqda. Masalan, Chirchiq havzasi va unga yondosh hududlardagi amfipodalar tarqalishi va morfologik xilmaxilligi haqida tarixiy manbalarga tayangan sharh e’lon qilindi [7. B. 80]. Biroq amfipodalarning molekulyar-biologik tadqiqotlari mamlakatimizda deyarli yo‘lga qo‘yilmagan, shu bois genetik ma’lumotlarni olish va tahlil qilish usullarini joriy etish dolzarbdir. Molekulyar tadqiqotlar uchun muhim bosqichlardan biri bu yuqori sifatli genom DNK ni ajratib olishdir. Klassik fenol-xloroform usullari yoki zamonaviy tijorat DNK ajratish kitlari yordamida amalga oshiriladigan turli usullar mavjud. Kitlar oddiy va samarali bo‘lsa-da, ularning baland narxi ko‘p sonli namunalar bilan ishlaganda cheklov tug‘diradi [9]. Shu sababli arzon va ishonchli an’anaviy usullar hali ham dolzarb bo‘lib qolmoqda.

Setiltrimetilammoniy bromid (Cetyltrimethylammonium bromide – CTAB) asosidagi usul o‘simlik genomik DNK sini ajratishda yuqori sifat va chiqim beruvchi standart protokollardan biri sifatida 1980-yillardan beri keng qo‘llanilib kelinmoqda [4. B. 11-15; 5. B. 715-722; 6. B. 15-18; 10. B. 4321-4326]. CTAB yordami bilan hujayra membranalari yorilib, DNK ni ifloslanish keltiruvchi polisaxarid, polifenol kabi moddalar bilan kompleksga kirib cho‘ktirib, tiniq va toza DNK ajratib olish imkoniyati yaratiladi. So‘nggi

yillarda CTAB protokoli turli to‘qimalar xususiyatlariga mos ravishda takomillashtirilib, unda qo‘shimcha reagent va bosqichlar joriy qilinmoqda. Xususan, hayvon to‘qimalaridan DNK ajratishda CTAB usulining modifikatsiyalari yaxshi samara bergani haqida ma’lumotlar mavjud. Sudralib yuruvchilar va mollyuskalarda CTAB usuli bilan olingan DNK namunalarining keyingi polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) samaradorligi tijorat to‘qima-kitlariga qaraganda yuqori bo‘lgani, buni CTAB buferiga PVP (polivinilpirollidon) qo‘shilishi natijasida polifenol kabi ingibitorlar olib tashlangani bilan izohlashgan. Shu tariqa CTAB usuli hayvon namunalari uchun ham yuqori sifatli (A_{260/280} ≥ 1,8) genom DNK berishi va u yillar davomida barqaror saqlanishi mumkinligi ko‘rsatilgan [1].

Mazkur ishda O‘zbekistonning Chiqchiq havzasi va Farg‘ona vodiysi buloqlarida uchrovchi amfipodalardan genom DNK ekstraksiyasi uchun CTAB usuli takomillashtirildi. Maqsad – amfipoda namunalaridan laboratoriya sharoitida tez, arzon va ishonchli usulda yuqori toza hamda yaxlit DNK olish protokolini ishlab chiqish. Quyida ushbu yangi protokoldagi bosqichlar, qo‘llangan reagentlar va sharoitlar, sentrifugalyatsiya va ekstraksiya parametrlari, RNK dan tozalash, DNK ni cho‘ktirish va yuvish metodikasi batafsil bayon qilinadi. Olingan DNK namunalari konsentratsiyasi va tozaligi NanoDrop mikrospektrofotometrida baholandi, 0,9 % agaroz gel-elektroforez orqali esa DNK ning yaxlitligi tasdiqlandi. Natijalar boshqa usullar va adabiyot ma’lumotlari bilan solishtirilib, ushbu takomillashgan usulning afzalliklari muhokama qilinadi.

MATERIAL VA USULLAR

Namuna va reagentlar: Amfipodalar 2024–2025-yillar bahorida Toshkent viloyatidagi Chiqchiq daryosi havzasi buloqlari hamda Farg‘ona vodiysi buloqlaridan to‘plandi. Har bir joydan 15–20 individ, jami 16 namuna yig‘ilib, etanol (96%) ga solingan holda −20 °C da saqlandi. DNK ekstraksiyasi uchun CTAB bufer tarkibi quyidagicha tayyorlandi: Tris-HCl (pH 8,0) – 100 mM, EDTA (pH 8,0) – 20 mM, NaCl – 1,4 M, CTAB – 2% (massa/hajm). Ishlatishdan oldin +65 °C da suv hammomida qizdirildi. Hujayra va to‘qima tarkibidagi oqsillarni parchalash uchun Proteinaza K (20 mg/ml) ferment hamda RNK molekulalarini parchalash uchun RNKaza A (10 mg/ml) fermenti ishlatildi. Organik ekstraksiya qilishda xloroform : izoamil spirt (24:1) aralashmasi hamda DNK ni cho‘ktirish uchun 96% va 70%li etanol qo‘llandi. Yakuniy DNK ni eritish uchun TE buferi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)dan foydalanildi.

Tadqiqot ishlari Guliston davlat universiteti huzuridagi Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot institutining Molekulyar biologiya laboratoriyasida amalga oshirildi.

Amfipoda namunalaridan DNK ekstraksiyasi uchun takomillashgan CTAB protokoli quyidagi bosqichlarda amalga oshirildi.

1. Har bir namunaning ~30 mg (1-2 individ) butun tanasi tortilib olindi. Namunalardagi etanol qoldiqlarini to‘liq yo‘qotish maqsadida ular 1–2 daqiqa davomida TE buferida yuvildi va so‘ngra xona haroratida bir oz quritildi.

2. Namunalar suyuq azotda muzlatilib, steril xovoncha yordamida mayda holga keltirildi. So‘ngra ustiga 65°C haroratgacha qizdirilgan CTAB lizis buferi qo‘shildi – ya’ni har 10 mg to‘qima uchun taxminan 50 µl bufer miqdorida. Aralashma buferda to‘liq gomogenizatsiya qilinib, so‘ng 1,5 ml hajmdagi Eppendorf probirkasiga o‘tkazildi va unga 5–10 µl Proteinaza K eritmasi qo‘shildi.

3. Probirkalar +65 °C li suv hammomida 45 daqiqadan 1 soatgacha inkubatsiya qilindi (har 15 daqiqada sekinlik bilan chayqatib turilib, to‘qimalarning to‘liq parchalanishi ta’minlandi). Bu davrda issiqlik, CTAB va Proteinaza K hujayra membranalarini eritib, DNK ni kompleks tarzda chiqara boshlaydi.

4. Probirkalarni 65 °C dan olingach, 12000 ayl./daq. tezlikda 5 daqiqa +4°C haroratda sentrifuga qilindi. Bu bosqich erimagan katta qoldiqlarni cho‘ktirib, lizatni tiniqlashtirishga xizmat qiladi. So‘ng quyi qavatdagi qattiq cho‘kma qoldirilib, hosil bo‘lgan lizat ehtiyotkorlik bilan yangi probirkalarga ko‘chirib olindi.

5. Ajratib olingan lizatga 5–10 µl RNKaza A eritmasi qo‘shildi va probirka yengil chayqatilib aralashtirildi. Aralashma +37°C haroratda ~20 daqiqa davomida termosheykerda inkubatsiya qilindi. Ushbu bosqichda RNK molekulalari parchalanib, yakuniy namunada ularning aralashuvi minimal darajaga kamaytirildi.

6. Har bir probirkaga teng hajmda xloroform : izoamil spirt (24 : 1) aralashmasi qo‘shildi. Probirkalar 2 daqiqa davomida qo‘lda ehtiyotkorlik bilan ag‘darilib aralashtirildi. Kuchli vortex qilmaslik tavsiya etiladi, aks holda DNK parchalanishi mumkin, biroq probirkani yaxshilab aralashtirish juda muhim – aralashma sutdek oq va gomogen tusga kirishi kerak.

7. So‘ngra 5 daqiqa davomida 12000 ayl./daq. tezlikda +4°C da sentrifugaga qo‘yildi. Natijada probirkada yuqori qatlam – suvli faza (unda DNK), pastki qatlam – organik hal qiluvchi (unda oqsil va boshqa aralashmalar) hosil bo‘ldi. Sentrifugadan so‘ng darhol probirkani olib, pipetka yordamida yu-



1-rasm. Sovuq etanolda DNKning "bulutlanishi".

qori suvli faza ehtiyotkorlik bilan yangi probirkaga ko'chirib olindi. Pastki organik qatlamga tegilmaslik va aralashtirib yubormaslik uchun maxsus e'tibor berildi.

8. DNK ni cho'ktirish maqsadida, probirkaga 2 baravar hajmda sovutilgan (−20 °C) 96% etanol qo'shildi. Probirkani muloyimlik bilan bir necha marta ag'darib, etanol suyuqlik bilan aralashishi ta'minlandi. Agar DNK konsentratsiyasi juda yuqori bo'lsa, shu bosqichdayoq oq iplar yoki "bulutlanish" ko'rinishi mumkin (1-rasm). Cho'ktirish jarayonini kuchaytirish maqsadida probirkalar −20°C haroratda 15–30 daqiqa davomida saqlandi. Sovuq muhitda DNK molekulalarining cho'kishi samaraliroq kechadi.

9. Muzlatgichdan olingan probirkalar 12000 ayl./daq. tezlikda 10 daqiqa davomida sentrifugaga qo'yildi. Sentrifugadan so'ng probirkaning tubida ko'zga bir oz ko'rinadigan DNK cho'kmasi (pellet) hosil bo'ldi. Ehtiyotkorlik bilan probirkadagi shaffof suyuqlik (supernatant) to'kib tashlandi, buning uchun probirka sekin ag'darilib, suyuqlik oqizildi, pellet chiqib ketmasligiga alohida e'tibor berildi.

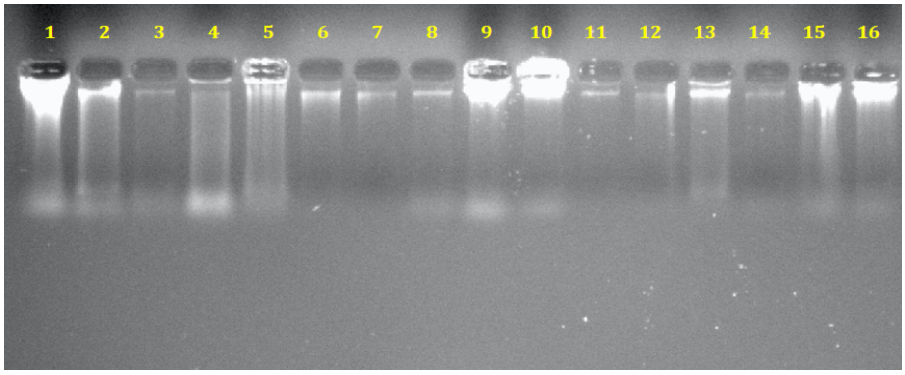
10. Cho'kma yuzasida qolgan tuz va reagent qoldiqlarini tozalash maqsadida pellet ustiga 500 µl sovutilgan (0°C) 70% li etanol qo'shildi. Probirka ehtiyotkorlik bilan chayqatilib, pellet siljimasligi uchun sekin harakat bilan etanol probirka devorlariga tekkizilib yuvildi. So'ng namunalar 12000 ayl./daq. tezlikda 5 daqiqa davomida sentrifugaga qo'yildi. Sentrifugadan keyin supernatant ehtiyotkorlik bilan to'kib tashlandi.

11. Probirkada qolgan so'nggi etanol tomchilarini yo'qotish uchun uning og'zi ochiq holda +37°C haroratda 5–6 daqiqa davomida termosheykerda saqlandi. Shu bilan birga, pelletni haddan tashqari quritib yubormaslik zarur, chunki ortiqcha qurigan holatda uni keyinchalik eritish qiyin bo'ladi.

12. Quruq pellet ustiga 50 µl TE buferi qo'shilib, DNK eritmaga tushishi uchun 1 daqiqa qisqa sentrifuga qilindi. DNK to'liq eriganidan so'ng, namunani +4°C da bir necha soatga qoldirib, yopishqoqligi pasaytirildi. Shundan so'ng DNK eritmasini yaxshilab aralashtirib −20°C da saqlash mumkin.

NATIJALAR VA MUHOKAMA

Olingan jami 16 namuna tarkibida DNK mavjudligini aniqlash maqsadida DNK namunalaridan 5 µl miqdor olib, 0,9% agaroz geliga BFK (Brom fenol ko'k) bo'yoq bilan birga yuklandi va elektroforez (Helicon SE-1) usuli yordamida tahlil qilindi (2-rasm). Gel-elektroforez tasviridan ko'rinib turibdiki, takomillashgan CTAB usuli yordamida amfipodalardan olingan DNK namunalarining aksariyatida DNK ning yuqori molekulyar massali, yaxlit holati saqlangan. Barcha 16 ta namunada genom DNK uchun xos bo'lgan yirik fragmentlar aniq ko'rinadi va ular gelning yuqori qismida, quduq yaqinida to'plangan. Bu esa olingan DNK asosan butun holda ekanini, ya'ni katakliz va mexanik ta'sirlardan jiddiy parchalanmagani va usulning DNKni saqlab qolish samaradorligi yuqori ekanini ko'rsatadi. Faqat ayrim namunalar yo'laklarida yengil yoyilish mavjud bo'lib, bu, ehtimol, namunalarni tayyorlash paytida yuzaga kelgan qisman parchalanish belgisi bo'lishi mumkin. Masalan, 6-yo'lak va 7-yo'laklardagi DNK chiziqlari nisbatan xira va kengroq bo'lib, ularda DNK ning bir qismi mayda bo'laklarga bo'linib ketgani seziladi. Shu o'rinda ta'kidlash joizki, gel-elektroforezda ko'ringan yengil parchalanish darajasi nisbatan past bo'lib, barcha namunalar bo'yicha olinayotgan DNK keyingi molekulyar tahlillar (PCR, sekvenslash) uchun yetarlicha uzun fragmentlardan iborat ekanini ko'rsatadi.



2-rasm. DNKning sifatini aniqlash uchun o'tkazilgan gel-elektroforez natijalari.

Olingan DNK namunalarining konsentratsiyasi va optik tozaligi NanoDrop 2000c (“Thermo Fisher Scientific”, AQSh) mikrospektrofotometri yordamida baholandi. Har bir namunadan 2 µl olib, NanoDrop qurilmasining UV spektrofotometriya rejimida A₂₆₀, A₂₈₀ va A₂₃₀ da yutilish ko‘rsatkichlari o‘lchandi (1-jadval).

1-jadval

Olingan DNK namunalarining konsentratsiyasi va optik tozaligi

Namunalar t/r	Konsentratsiya (ng/µL) (≥50 ng/µL)	A260/A280 (1,8-2,0)	A260/A230 (1,8–2,2)
1	2486,1	1,91	1,86
2	213,8	1,99	2,20
3	79,7	2,09	2,35
4	181,3	2,07	2,19
5	57,6	1,82	2,56
6	59,7	1,88	1,82
7	10,5	2,00	4,84
8	149,5	2,00	2,90
9	734,6	1,92	2,51
10	246,9	1,95	2,11
11	66,3	1,90	1,85
12	83,9	2,30	2,71
13	200,4	1,88	2,06
14	103,4	1,97	1,43
15	205,2	2,01	1,54
16	262,5	1,92	1,95

NanoDrop mikrospektrofotometri orqali o‘lchangan DNK miqdori va optik tozalik ko‘rsatkichlari ham CTAB usuli samaradorligini tasdiqladi. 16 ta namunadan olingan DNK konsentratsiyalari 10,5 ng/µL dan 262,5 ng/µL gacha oraliqda o‘zgarib, namunalar bo‘yicha o‘rtacha ≈321,3 ng/µL ni tashkil qildi. Bu amfipoda kabi mayda organizmlar uchun ancha yuqori natija bo‘lib, ko‘plab molekulyar tahlillar uchun yetarli DNK miqdorini anglatadi. Masalan, eng ko‘p DNK chiqqan namunalar (10-, 13-, 15- va 16-namuna) konsentratsiyasi 200–260 ng/µL atrofida bo‘lib, A260/A280 ko‘rsatkichi ~1,9-2,0 ga teng va A260/A230 ko‘rsatkichi ~1,9-2,1 atrofida bo‘ldi. Bunday qiymatlar DNK yuqori sifatli ekanini, ya’ni unda oqsil va boshqa moddalar aralashmasi juda kamligini bildiradi. Xususan, 13-namunada 205,2 ng/µL DNK aniqlanib, A260/A280 = 2,01 va A260/A230 = 1,54 bo‘ldi; 16-namunada 262,5 ng/µL DNK konsentratsiyasi, A260/A280 = 1,92 va A260/A230 = 1,95 ko‘rsatkichlari qayd etildi. Boshqa ko‘plab namunalar ham shu kabi 1,8–2,0 (A260/A280) va 2,0 ±0,3 (A260/A230) diapazondagi qiymatlarni ko‘rsatdi. Ushbu optik tozalik indekslari klassik mezonlarga to‘la mos keladi: sof DNK uchun A260/A280 odatda ~1,8–1,9 va A260/A230 ~1,8–2,2 bo‘lishi kutiladi. Demak, biz qo‘llagan takomillashgan CTAB protokoli orqali aksar hollarda amfipoda to‘qimalaridan yuqori miqdorda va sifatli DNK ajratib olishga erishilgan.

Shunga qaramay, ayrim namunalar uchun NanoDrop ko‘rsatkichlarida e’tiborga molik og‘ishlar kuzatildi. Masalan, 6-namunada DNK konsentratsiyasi 59,7 ng/µL bo‘lib, A260/A280 = 1,38 va A260/A230 = 1,32 chiqdi. A260/A280 ning 1,4 ga yaqin bo‘lishi DNK tarkibida oqsil aralashmalari yoki qoldiqlar qolganligidan dalolat beradi, A260/A230 ning <1,5 ga tushishi esa uglevodlar, tuzlar yoki boshqa organik moddalar (masalan, CTAB reagentining izi) borligini ko‘rsatadi. 6-namuna holatida bu ko‘rsatkichlarning past chiqishiga sabab sifatida quyidagilarni taxmin qilish mumkin: (i) bu namuna uchun lizis jarayonida Proteinaza K yetarlicha samarali bo‘lmagan yoki xloroform bilan ekstraksiya to‘liq amalga oshmagan, natijada oqsil qoldiqlari DNK eritmasida saqlanib qolgan; (ii) yoki namuna tarkibida gidrofil polisaxaridlar ko‘p bo‘lib, ular CTAB bilan birga cho‘kmagan va eritmada qolib, 230 nm da yutilishni oshirgan (bu A260/A230 ni tushiradi). Xuddi shunday, 14- va 15-namunalarda ham A260/A230 mos ravishda 1,43 va 1,54

ni, ya'ni biroz past qiymatlarni tashkil etdi. Bu holat, ehtimol, tuz qoldiqlari (masalan, NaCl yoki izopropanol/etanolning to'liq bug'lanmasligi) yoki CTAB reagenti izlari namunada qolib ketgani bilan bog'liq bo'lishi mumkin. Bunday namunalarda DNK ni qayta 70% li etanol bilan yuvib, quritib qayta eritishda A260/A230 ko'rsatkichi yaxshilanishi kutiladi.

7-namunada DNK konsentratsiyasi juda past, atigi 10,5 ng/μL bo'lgani holda A260/A280 ≈ 2,00 va A260/A230 ≈ 4,34 ga teng chiqqan. NanoDrop usulida odatda A260/A230 nisbati 4 dan yuqori bo'lishi anomaliya hisoblanib, bu asosan o'lchangan spektrda 230 nm dagi absorbsiya qiymati nihoyatda kichik (deyarli nol) chiqqanini bildiradi. Past konsentratsiyali (>20 ng/μL dan past) DNK namunalari uchun bunday optik nisbatlar ishonchsiz bo'lishi ma'lum, chunki qurilma o'lchash chegarasiga yaqin bo'lganida fon signal ta'sirini to'g'ri ajrata olmaydi. Shunday ekan, 7-namuna uchun A260/A230 ning 4,34 ko'rsatkichi real ifloslanish darajasini aks ettirmaydi, balki juda kam miqdordagi DNK sababli hisoblangan nisbat noto'g'ri ekanini ko'rsatadi.

Natijalarni ilmiy adabiyotlar ma'lumotlari bilan solishtirish shuni ko'rsatadiki, ushbu takomillashgan CTAB protokoli amfipoda kabi hayvonlardan DNK ekstraksiyasida yuqori samaradorlik beradi va ko'rsatkichlari boshqa tadqiqotlar bilan uyg'un yoki ulardan ustun bo'lishi mumkin. Masalan, hasharot to'qimalaridagi DNK ekstraksiyasi usullari solishtirilgan tadqiqotda an'anaviy CTAB usuli va unga yaqin SDS-li fenol-xloroform usullari tijoriy to'qima to'plamlaridan 2–3 barobar ko'p DNK berishi, shu bilan birga DNK parchalanishi kamroq ekanligi qayd etilgan. Ushbu mualliflar G'arbiy makkajo'xori ildiz qurtlari *(Diabrotica virgifera virgifera)* organizmiga nisbatan CTAB usuli eng yuqori hosildorlik ko'rsatganini hamda agaroz gelda CTAB usulida olingan DNK fragmentlari boshqa usullarga qaraganda kamroq degradatsiyalanganini bildiradilar. Biroq ayni tadqiqotda CTAB usuli bilan ajratilgan DNK ning A260/A280 ko'rsatkichi biroz pastroq (ya'ni oqsil aralashmasi nisbatan ko'proq) bo'lgani, masalan, "Puregene®" reagentidan foydalangan holatdagiga qaraganda oqsil qoldiqlari yuqoriroq ekani aytiladi [2]. Bizning amfipoda namunalarimizda ham bir nechta namunada (masalan, 6-namuna) A260/A280 < 1,5 bo'lib, oqsil aralashmasi muammosi kuzatilgan bo'lsa-da, namunalarning aksariyatida bu ko'rsatkich me'yorda bo'lgan. Bu farq biz qo'llagan takomillashtirilgan protokol tarkibiga qo'shimcha tozalash bosqichlari kiritilgani (masalan, xloroform yoki proteinaza K fermentatsiyasi) natijasi bo'lishi mumkin.

Qorinoyoqlik mollyuskalar to'qimalarida o'tkazilgan tajribalar shuni ko'rsatadiki, CTAB eritmasiga 1–2% PVP qo'shilishi va boshqa ba'zi o'zgartirishlar kiritilishi DNKni nafaqat yuqori miqdorda, balki yuqori sifatda olish imkonini beradi. O'tkazilgan tadqiqotlar natijasida modifikatsiyalangan CTAB protokoli bilan A260/A280 ≥ 1,8 ga ega bo'lgan sof DNK olingan va ularni 2 yil davomida barqaror saqlash mumkinligi qayd etilgan [1].

Har bir sub-natija bo'yicha tahlil shuni ko'rsatadiki, CTAB usulining muvaffaqiyati ko'p jihatdan namunadagi biokimyoviy xususiyatlarga bog'liq. Masalan, yuqorida qayd etilganidek, ayrim namunalarda DNK chiqishi past va ifloslanish yuqori bo'ldi (5–8 namunalar orasida eng past qiymatlar kuzatildi). Bu tur amfipodalari tarkibida melanin yoki gipertrofik polisaxaridlar ko'proq bo'lishi mumkin yoki ekstraksiya paytida DNK ning bir qismi yo'qolgan bo'lishi ehtimoli bor. Aksincha, boshqa bir tur (13–16 namunalar) yirikroq individlarni o'z ichiga olgan va ulardan DNK samarali ajratilgan, bu yerda DNK chiqimi yuqori, tozalik ko'rsatkichlari ham deyarli ideal. Adabiyotlarda CTAB usulining ko'plab modifikatsiyalari aynan turli organizmlardagi ingibitorlarni bartaraf etishga qaratilgan. Misol uchun, qo'ziqorinlarda CTAB usuli bilan DNK ajratishda ham shunga o'xshash yondashuvlar qo'llangan. CTAB tarkibini oshirilgan NaCl va CTAB konsentratsiyasi bilan tayyorlab, sporali to'qimalardan yuqori molekulali DNK olingan va oqsil ifloslanishini minimal darajaga tushirishga erishilgan [3]. Bunday misollar CTAB yondashuvi moslashuvchan bo'lib, har xil biologik materiallarga mos ravishda takomillashtirilishi mumkinligini ko'rsatadi.

Metodologik mulohaza sifatida aytish mumkinki, CTAB usuli, ayniqsa, o'simliklar va ba'zi umurtqasizlar DNK si ekstraksiyasida tanlov usuli bo'lib kelgan. Uning asosiy prinsipi – katta miqdordagi CTAB detegenti va yuqori tuz (NaCl) ishtirokida hujayra lizati tarkibidagi polisaxarid va polianionlarni cho'ktirib, DNK ni supernatantda saqlab qolishdir [8]. Shuningdek, xloroform bilan ekstraktsiya oqsillarni samarali ajratib olish imkonini beradi. Ammo bu usulning kamchiliklari ham bor, masalan, ko'p bosqichli sanitar amaliyot, zaharli kimyoviy moddalardan foydalanish (xloroform) va ba'zan DNK ning bir qismi yo'qotilishi kabi. Bizning tadqiqotimizda ba'zi namunalar (masalan, 7-namuna) juda kam DNK berishi, ehtimol, shuning natijasi, ya'ni bosqichlarda yo'qotishlar bo'lgan yoki cho'ktirish bosqichida DNK ham birga cho'kib qolgan bo'lishi mumkin. Shu nuqtayi nazardan, metodni yanada yaxshilash uchun bir nechta takliflar berish mumkin:

1) kam konsentratsiyali namunalar uchun eritmani glikogen yoki cho'ktirgich qo'shib DNK cho'ktirish – bu DNK ning butkul yo'qolib ketmasligini ta'minlaydi.

2) CTAB lizis buferiga 2% PVP va 0,1% β-merkaptoetanol qo'shish – bu ayniqsa tabiiy muhitdan

olingan amfipodalarda bo‘lishi mumkin bo‘lgan gumin moddalar yoki fenollarning ta’sirini kamaytiradi (o‘xshash yondashuvlar o‘simliklar va ba’zi hayvon to‘qimalarida muvaffaqiyatli qo‘llangan [1].

3) lizisdan so‘ng eritmani ikki marta xloroform bilan tozalash – bu oqsil va RNK qoldiqlarini yaxshiroq ketkazadi.

4) DNK ni cho‘ktirgandan keyin 70% li etanol bilan ikki marta yuvish – bu tuz va CTAB izlarini maksimal darajada ketkazib, A260/A230 nisbatini yaxshilaydi.

Biroq oddiy PCR va barkodlash uchun bizning natijalarimizdagi CTAB usuli natijasida olingan DNK sifat jihatidan yetarli bo‘lib, hatto to‘g‘ridan-to‘g‘ri sekvenslash bazalarini tayyorlashga ham yaroqli ekanini ko‘rsatadi. Baykal ko‘li amfipodalari ustida olib borilgan tadqiqotlarda CTAB usuli bilan olingan DNK Illumina kutubxonasiga hech qanday qo‘shimcha tozalashsiz ishlatilgani va muvaffaqiyatli yakunlangani qayd etilgan [11].

Yuqoridagi natijalarni boshqa amfipodalar bo‘yicha adabiyotlar bilan solishtirsak, bizning topilmalarimiz ularga hamohangdir. Masalan, Baykal ko‘li amfipodalarida o‘tkazilgan mitogenom tadqiqotlarida Doyle (1987) usuli asosidagi CTAB protokoli qo‘llanilib, har bir namuna (hatto kichik o‘lchamli)dan butun genom DNK olingan va Illumina sekvenslashiga tayyorlab berilgan [4, 5]. Ushbu tadqiqotda hattoki ayrim mayda amfipodalarning faqat oyoqchalari (pereopod)dan DNK ajratilgan, shunga qaramay, CTAB usuli bilan yirik hajmli DNK olish va keyinchalik 11 kb uzunlikdagi fragmentlarni PCR orqali ko‘paytirish imkoni bo‘lganligi aytiladi [11]. Bu bizning natijalarimizga uyg‘un bo‘lib, CTAB usuli kichik hajmdagi to‘qimalardan ham sifatli DNK ajrata olishini tasdiqlaydi.

Takomillashgan CTAB protokoli amfipodalar genom DNK ekstraksiyasida yuqori samaradorlik ko‘rsatdi. Gel-elektroforez natijalari DNK ning asosan butunligi saqlanganini, NanoDrop o‘lchovlari esa ko‘plab namunalar yuqori konsentratsiyada va optik tozalikda ekanini tasdiqladi. Umuman olganda, bizning natijalarimiz avvalgi tadqiqotlar bilan solishtirilganda mos ravishda yuqori darajadagi DNK sifat va miqdorini ko‘rsatdi hamda CTAB usulining uyg‘unlashtirishga yaroqliligi va arzonligi tufayli amfipoda kabi umurtqasizlardan DNK ajratishda hamon dolzarb usul ekanini ko‘rsatdi.

XULOSA

Chiqchiq va Farg‘ona vodiysi suv havzalaridan to‘plangan amfipodalar namunalaridan genom DNK ekstraksiyasida takomillashgan CTAB protokoli qo‘llanildi. Natijalar shuni ko‘rsatdiki, ushbu usul yordamida olingan DNK namunalarining aksariyati yuqori molekulyar massali, yaxlit va parchalanmagan holda saqlangan. Gel-elektroforez natijalarida aniq DNK chiziqlari kuzatilib, DNK ning strukturaviy yaxlitligi saqlanganligi tasdiqlandi. NanoDrop spektrofotometr yordamida o‘lchangan natijalarda DNK konsentratsiyasi o‘rtacha 321,3 ng/μL (10,5 dan 2486,1 ng/μL gacha) oraliqda bo‘lib, A260/A280 nisbati 1,8–2,0 va A260/A230 nisbati 2,0 atrofida aniqlangan. Bu ko‘rsatkichlar ajratilgan DNK namunalarining yuqori sof ekanidan dalolat beradi. Ayrim individual namunalar tarkibida oqsil yoki tuz aralashmalari izlari kuzatilgan bo‘lsa-da, bu holatlar tahlil qilinib, ularning yuzaga kelish sabablari aniqlangan hamda metodni yanada takomillashtirish yo‘llari taklif etilgan.

Takomillashgan CTAB usuli orqali olingan DNK namunalarining sifati va miqdori boshqa ilmiy tadqiqotlar bilan taqqoslanganda yuqori raqobatbardosh ko‘rsatkichlarga ega bo‘lib, ular keyingi PCR-barcode, filogenetik va genomik tahlillar uchun to‘laqonli yaroqli ekanligi isbotlandi. Ushbu natijalar mollyuskalar, hasharot va boshqa umurtqasiz organizmlarda CTAB usuli asosida olingan yutuqlar bilan to‘liq hamohangdir. Shunday qilib, takomillashgan CTAB protokoli amfipodalardan genomik DNK ekstraksiyasida arzon, ishonchli va yuqori sifatli natijalarni ta’minlovchi samarali usul bo‘lib, u biologik xilmaxillikni o‘rganish, genetik pasportlash hamda populyatsiya genetikasi tadqiqotlarida qo‘llash uchun tavsiya etiladi.

Adabiyotlar:

1. *Chakraborty S., Saha A., Ananthram A.N*. Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? // 3 Biotech. – 2020. – Vol. 10 (69). – Pp. 1-6.

2. *Chen H., Rangasamy M., Tan S.Y., Wang H., Siegfried B.D*. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles // PLOS One. – 2010. – Vol. 5 (8): e11963.

3. *Dar G.J., Nazir R., Wani S.A., Farooq S., Aziz T., Albekairi T.H*. Optimizing a modified cetyltrimethylammonium bromide protocol for fungal DNA extraction: Insights from multilocus gene amplification // Open Life Sciences. – 2025. – Vol. 20 (1): 20221006.

4. *Doyle J.J., Doyle J.L*. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. – 1987. – Vol. 19. – Pp. 11-15.

5. *Doyle J.J., Dickson E*. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis // Taxon. – 1987. – Vol. 36. – Pp. 715–722.

6. *Doyle J.J., Doyle J.L*. CATB isolation: The true story // Plant Science Bulletin. – 2019. – Vol. 65. – Pp. 15–18.

7. *Fazliddinov F., Umarov F., Özbek M*. A brief review of studies on the Amphipod (Malacostraca: Amphipoda) fauna of the Chirchik Basin and adjacent areas // "Zamonaviy biologiyaning dolzarb muammolari va rivojlanish istiqbollari" mavzusidagi xalqaro konferensiya materiallari to'plami. – Andijon, 2025. – B. 80–81.

8. *Kouakou J.-L., Gonedelé-Bi S., Assamoi J.-B., N'Guetta S.-P.A*. Optimization of the Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol using forest elephant dung samples // MethodsX. – 2022. – Vol. 9, 101867. – Pp. 1-12.

9. *Martínez-González C.R., Ramírez-Mendoza R., Jiménez-Ramírez J., Gallegos-Vázquez C., Luna-Vega I*. Improved method for genomic DNA extraction for Opuntia Mill. (Cactaceae) // Plant Methods. – 2017. – Vol. 13, 82.

10. *Murray M., Thompson W*. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research. – 1980. – Vol. 8. – Pp. 4321-4326.

11. *Romanova E.V., Aleoshin V.Y., Kamaltynov R.M., Mikhailov K.V., Logacheva M.D., Sirotinina E.A., Gornov A.Y., Anikin A.S., Sherbakov D.Y*. Evolution of mitochondrial genomes in Baikalian amphipods // BMC Genomics. –2016. – Vol. 17(Suppl 14), 1016. – Pp. 291-318.

12. Адильбекова К.Б., Пангергеев Б.С., Фефелов В.В., Исбеков К.Б. Оценка эффективности выделения и качества ДНК у гаммарусов Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda) из различных водоёмов Казахстана // Вестник науки Казахского агротехнического исследовательского университета. – 2025. – № 3 (127). – С. 71–80.

13. Березина Н.А. Причины, особенности и последствия распространения чужеродных видов амфипод в водных экосистемах Европы. // В кн.: Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах (под ред. Алимова А.Ф., Богуцкой Н.Г.). – Санкт-Петербург: Тов-во научных изданий КМК, 2004. – С. 254–268.

14. Буруковский *Р.Н., Судник С.А., Гусев А.А.* Определитель амфипод (Crustacea, Amphipoda) водоёмов Калининградской области. – Калининград: Бизнес Контакт, 2019. – 172 с.

15. Грезе И.К. Амфиподы Черного моря и их биология. – Киев: Наукова думка, 1977. – 156 с.

16. Любина О.С., Саяпин В.В. Амфиподы (Amphipoda, Gammaridea) из различных географических районов: видовой состав, распределение, экология. – Апатиты: Кольский научный центр РАН, 2008. – 182 с.

17. Островский И.С. Экология *Gammarus lacustris* Sars в озере Сев-Лич // В кн.: Вид в ареале, биология, экология и продуктивность водных беспозвоночных. – Минск: Наука и техника, 1990. – С. 37–42.

AN IMPROVED CTAB PROTOCOL FOR GENOMIC DNA EXTRACTION FROM FRESHWATER AMPHIPODS

Farrukh U. Umarov[1], Khayrulla Kh. Solijonov[1,2], Firdavs G. Fazliddinov[1], Abdulaziz O. Abdukarimov[3], Abduvaeit Pazilov[3]

Ilmiy xabarnoma. Seriya: Biologik tadqiqotlar – Scientific Bulletin. Series: Biological Research. 2025. 8(92). 48-56.

[1]Andijan State University, Andijan, 170100, str. University, 129 (Uzbekistan). E-mail: agsu_info@edu.uz

[2]Research Institute of Environment and Nature Protection Technologies, Tashkent, 100043, str. Bunyodkor, 7a (Uzbekistan). E-mail: ecoilm@umail.uz

[3]Gulistan State University, Gulistan, 120100, 4th Microdistrict (Uzbekistan). E-mail: glsu_info@edu.uz

Keywords: *CTAB-protocol, amphipoda, DNA, extraction, gel electrophoresis, NanoDrop, Proteinase K, RNase.*

This article is developed and tested an improved CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method for extracting genomic DNA from freshwater amphipods (Amphipoda) occurring in springs of the Chirchiq basin and the Fergana Valley in Uzbekistan. The primary objective is to establish a low-cost, rapid, and reliable laboratory protocol yielding high-quality DNA from small invertebrates such as amphipods, suitable for molecular identification, phylogenetic analysis, and genetic passporting of bioindicator species.

Amphipod samples were collected in spring 2024-2025 from springs of the Chirchiq River basin (Tashkent region) and the Fergana Valley. From each site, 15–20 individuals were taken and preserved in 96% ethanol at −20 °C. DNA extraction employed a CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, pH 8.0). Proteinase K and RNase A were used during cell lysis; organic extraction was performed with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). DNA was precipitated with 96% and washed with 70% ethanol, then resuspended in TE buffer (Tris-EDTA). Analyses were carried out at the Molecular Biology Laboratory of the Institute of Agrobiotechnologies and Biochemistry, Gulistan State University.

The improved CTAB protocol successfully yielded genomic DNA from 16 amphipod samples. Gel electrophoresis showed high-molecular-weight, intact DNA with bright bands near the wells, indicating minimal degradation. NanoDrop microspectrophotometry reported DNA concentrations ranging from 10.5 to 2486.1 ng/μL, with a mean of 321.3 ng/μL. A_{260/280} ratios were 1.8-2.0 and A_{260/230} values were around 2.0, demonstrating high optical purity. Although a few samples (e.g., nos. 6 and 7) displayed minor deviations due to residual proteins or reagents, the overall quality was sufficient for PCR, DNA barcoding, and sequencing.

These outcomes are consistent with reports on CTAB modifications for animal tissues. In particular, studies on Lake Baikal amphipods have shown that CTAB-based methods can recover large DNA fragments even from pereopod tissue. In our work, optimization of the CTAB buffer composition, RNase treatment, and a two-step ethanol wash further improved DNA quality. Taken together, the protocol proves highly effective and economically competitive as an alternative to commercial kits.

The improved CTAB method delivered high yields of clean, intact DNA from amphipod samples: A_{260/280} = 1,8-2,0; gel electrophoresis confirmed structural integrity; NanoDrop measurements verified sample purity. Advantages include inexpensive reagents, short turnaround time, and production of DNA fully suitable for downstream molecular analyses. The protocol is therefore recommended as an efficient, reliable, and practical approach for genetic studies of Uzbekistan's amphipods, including DNA barcoding, population genetics, and molecular identification of bioindicator taxa.

References:

1. Chakraborty, S., Saha, A., Ananthram, A.N. (2020). Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? *3 Biotech*. Vol. 10 (69). Pp. 1-6.

2. Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H., Siegfried, B.D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLOS One.* Vol. 5 (8): e11963.

3. Dar, G.J., Nazir, R., Wani, S.A., Farooq, S., Aziz, T., Albekairi, T.H. (2025). Optimizing a modified cetyltrimethylammonium bromide protocol for fungal DNA extraction: Insights from multilocus gene amplification. *Open Life Sciences*. Vol. 20 (1): 20221006.

4. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. Vol. 19. Pp. 11-15.

5. Doyle, J.J., Dickson, E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. Vol. 36. Pp. 715-722.

6. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (2019). CATB isolation: The true story. *Plant Science Bulletin*. Vol. 65. Pp. 15-18.

7. Fazliddinov, F., Umarov, F., Özbek, M. (2025) A brief review of studies on the Amphipod (Malacostraca: Amphipoda) fauna of the Chirchik Basin and adjacent areas In: *"Zamonaviy biologiyaning dolzarb muammolari va rivojlanish istiqbollari"* [Current Problems and Development Prospects of Modern Biology]. Materials of the international scientific and practical conference. Andijan. Pp. 80-81.

8. Kouakou, J.-L., Gonedelé-Bi, S., Assamoi, J.-B., N'Guetta, S.-P.A. (2022). Optimization of the Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol using forest elephant dung samples. *MethodsX.* Vol. 9, 101867. Pp. 1-12.

9. Martínez-González, C.R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C., Luna-Vega, I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for Opuntia Mill. (Cactaceae). *Plant Methods.* Vol. 13, 82.

10. Murray, M., Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 8. Pp. 4321-4326.

11. Romanova, E.V., Aleoshin, V.Y., Kamaltynov, R.M., Mikhailov, K.V., Logacheva, M.D., Sirotinina, E.A., Gornov, A.Y., Anikin, A.S., Sherbakov, D.Y. (2016). Evolution of mitochondrial genomes in Baikalian amphipods. *BMC Genomics*. Vol. 17(Suppl 14), 1016. Pp. 291-318.

12. Adilbekova, K.B., Pangergeev, B.S., Fefelov, V.V., Isbekov, K.B. (2025). Ocenka effektivnosti vydeleniya i kachestva DNK u gammarusov Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda) iz razlichnyh vodoyomov Kazahstana [Evaluation of the efficiency and quality of DNA extraction in amphipods Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda) from various water bodies of Kazakhstan]. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo issledovatelskogo universiteta*. No. 3 (127). Pp. 71–80.

13. Berezina, N.A. (2004). Prichiny, osobennosti i posledstviya rasprostraneniya chuzherodnykh vidov amfipod v vodnykh ekosistemakh Yevropy [Causes, features, and consequences of the spread of alien amphipod species in European aquatic ecosystems]. In: *Biologicheskie invazii v vodnykh i nazemnykh ekosistemakh* [Biological invasions in aquatic and terrestrial ecosystems]. Sankt-Peterburg: KMK Scientific Press Ltd. Pp. 254–268.

14. Burukovskii, R.N., Sudnik, S.A., Gusev, A.A. (2019). *Opredelitel amfipod (Crustacea, Amphipoda) vodoemov Kaliningradskoi oblasti* [Key to amphipods (Crustacea, Amphipoda) of the water bodies of the Kaliningrad Region]. Kaliningrad: Biznes Kontakt.

15. Greze, I.K. (1977). *Amfipody Chernogo morya i ikh biologiya* [Amphipods of the Black Sea and their biology]. Kiev: Naukova dumka.

16. Lyubina, O.S., Sayapin, V.V. (2008). *Amfipody (Amphipoda, Gammaridea) iz razlichnykh geograficheskikh raionov: vidovoi sostav, raspredelenie, ekologiya* [Amphipods (Amphipoda, Gammaridea) from various geographic regions: species composition, distribution, and ecology]. Monografiya. Apatity: Kolskii nauchnyi tsentr RAN.

17. Ostrovskii, I.S. (1990). Ekologiya Gammarus lacustris Sars v ozere Sev-Lich [Ecology of Gammarus lacustris Sars in Lake Sev-Lich]. In: *Vid v areale, biologiya, ekologiya i produktivnost' vodnykh bespozvonochnykh* [Species in range, biology, ecology and productivity of aquatic invertebrates]. Minsk: Nauka i tekhnika. Pp. 37-42.

Mualliflar haqida ma'lumot:

UMAROV Farrux Ulug'bekovich – biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori, Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi dotsenti. E-mail: eco_umarov@mail.ru

SOLIJONOV Xayrulla Habibulla o'g'li – biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori, Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi dotsenti; Atrof-muhit va tabiatni muhofaza qilish texnologiyalari ilmiy tadqiqot instituti doktoranti. E-mail: khsolijonov1991@gmail.com

FAZLIDDINOV Firdavs G'ayratjon o'g'li – Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi doktoranti. E-mail: firdavsbiologist@gmail.com

ABDUKARIMOV Abdulaziz Olim o'g'li – Guliston davlat universiteti Biologiya kafedrasi doktoranti. E-mail: abdulazizabdukarimov002@gmail.com

PAZILOV Abduvaiet – biologiya fanlari doktori, Guliston davlat universiteti Biologiya kafedrasi professori. E-mail: vahid_pazilov@mail.ru