

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА-ТАЪЛИМ
ВАЗИРЛИГИ**

**МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ**

Кўлийозма ҳуқуқида

УДК:577218

ЭРГАШЕВ ШАХЗОД ДИЛМУРОД ЎҒЛИ

**Nigella Sativa L (седана) уруғидан ажратилган дефензин пептидининг
рекомбинант формасини олиш ва унинг физик-кимёвий хоссаларини
ўрганиш**

5A140106 – Биокимё мутахассислиги

Магистр

академик даражасини олиш учун ёзилган

диссертация

Илмий раҳбар:

б.ф.д. проф Абдуллаева М.М.

Ташкент 2018

Мундарижа

Кириш.....	3
1-БОБ. Адабиётлар таҳлили	10
1.1. Ўсимликларнинг антимикроб пептиidlари ва уларнинг таснифи	10
1.1.1. Дефензин пептидининг тавсифи, структураси ва олиниши.....	13
1.1.2. Ўсимлик дефензинларининг классификацияси.....	15
1.1.3. Ўсимлик дефензинларининг фазовий структураси	17
1.1.4. Ўсимлик дефензинларининг таъсир механизмлари	19
1.1.5. Дефенсин пептидининг қўлланилиш соҳалари	23
1.2. Ўсимлик дефензинларини ишлаб чиқариш учун гетерологик тизимлар.....	29
1.2.1. Ўсимлик дефензинларини қидириш	30
1.2.2. Рекомбинант ўсимлик дефензинларини олиниши.....	32
2- БОБ. Тадқиқотларда қўлланилган услуб ва ашёлар.....	45
2.1. Фойдаланилган ускуна, жиҳоз ва реактивлар.....	45
2.2. Экспрессия қилувчи <i>E.coli</i> бактериясининг C43 штамм компетент ҳужайраларини олиш.....	46
2.3. pRSET_A вектор конструкцияни экспрессияловчи компетент <i>E.coli</i> бактериясининг C43 штаммига трансформация қилиш.....	47
2.4. Трансформация қилинган <i>E.coli</i> бактериясининг C43 штаммини индукция қилиш.....	48
2.5. Ултратовуш ёрдамида индукцияланган <i>E.coli</i> бактериясининг C43 штамми ҳужайраларини бузиш.....	49
2.6. Ултратовуш ёрдамида бузилган бактерия ҳужайраларининг лизат-супернатантларини полиакриламид гель (ПААГ) -электрофорез усулида текшириш.....	49
2.7. Трансфер - гелдаги оқсилларни нитроцеллилоза мемранага ўтказиш.....	50
2.8. His-Tag антителлалари билан Дот-блот анализини ўтказиш.....	51
2.9. His-Tag антителлалари билан Вестерн-блот анализини ўтказиш....	52
2.10. Талон методи бўйича оқсилни металл-аффин (хелат) хроматография усули бўйича тозалаш.....	53
2.11. Тозаланган пептидни полиакриламид гель (ПААГ) -электрофорез усулида текшириш.....	54
2.12. Олинган рекомбинант дефензин пептидинининг 6 та гистидин His-Tag (дум қисм) кетма-кетлигини энтерокиназа ферменти билан қирқиши.....	55
2.13. Олинган рекомбинант дефензин пептидинининг антибактериал ва замбуруғга қарши биологик активлигини “икки қаватли агардаги доғ” усули билан баҳолаш.....	55
2.14. Рекомбинант дефензин пептидининг физик-кимёвий хоссаларини	

ўрганиш (дефензин пептидининг нуклеотидлар кетма-кетлиги, аминокислоталар кетма-кетлиги, молекуляр оғирлиги, изоэлектрик нүктаси, таркибидаги ди-сулфид боғлар сони).....	56
3- БОБ. Тадқиқот натижалари ва уларнинг таҳлили.....	60
3.1. <i>E.coli</i> бактериясининг С43 штамми ва pRSET_A- Дефензин вектор конструкцияси асосида дефензин пептидининг продуцентини олиш.....	60
3.2. Рекомбинант дефензин экспрессияловчи <i>E.coli</i> С43 штамм хужайрасида экспрессия шароитини оптималлаштириш ва His-Tag антителлалари билан Вестерн-блот ва Дот-блот усулида дефензин пептидини сифат анализ қилиш.....	62
3.3. Талон методи бўйича Со 2+ иони таркибли сефароза шарикларда металл-аффин (хелат) хроматография усули билан рекомбинант дефензинни тозалаш ва полиакриламид гель (ПААГ) – электрофорез усулида текшириш.....	65
3.4. Олинган рекомбинант дефензин пептиди молекуласидаги полигистидин His-Tag кетма-кетликдан иборат дум қисмни энтерокиназа ферменти билан олиб ташлаш.....	68
3.5. “Икки қаватли агардаги доғ” усули билан олинган рекомбинант дефензин пептидинининг антибактериал ва замбуруғга қарши минимал ингибирлаш концентратсиясини аниқлаш	69
3.6. Рекомбинант дефензин пептидининг физик-кимёвий хоссаларини ўрганиш (дефензин пептидининг нуклеотидлар кетма-кетлиги, аминокислоталар кетма-кетлиги, молекуляр оғирлиги, изоэлектрик нүктаси, таркибидаги ди-сулфид боғлар сони).....	71
Холосалар.....	76
Адабиётлар рўйхати	78
Илова.....	86

ҚИСҚАРТМА СҮЗЛАР РҮЙХАТИ

Праймер F – (Forward) 5'-томондан ишлайдиган нуклеотидлар кетма-кетлиги

Праймер R - (Reverse) 3'-томондан ишлайдиган нуклеотидлар кетма-кетлиги

ПЗР – полимераза занжир реакцияси.

ЭДТА – этилен диамин тетраацетат

bp – (ж.н) жуфт нуклеотид

dNTP – эркин нуклеотидлар (аденин – А, гуанин -G, тимин – Т, цитозин- С)

10 x PCR buffer – ПЗР реакциясини оптимал ўтишида мухим ўрин тутади.

TBE – (Tris-boric-Acid) Трис-Бор кислота

ПААГ- полиакриламид гели

WB – Вестерн блот анализ

АМП- анти микроб хусусиятга эга пептид

ГЭТ-гетерологик экспрессия тизимларидан

КИРИШ

Магистрлик диссертацияси мавзусининг асосланиши ва унинг долзарблиги. Ҳозирги даврда бутун жаҳон бўйича соғликни сақлаш соҳасида керакли препаратларни йетишмовчилиги асосий муаммо ҳисобланади. Қўлланиладиган препаратларнинг кўпчилиги оқсил ва пептид табиатлилиги сабабли одам организмига қўллаш учун специфик мос бўлиши, ҳеч қандай аллергик реакциялар келтириб чиқарилмаслиги муҳим саналади. Шу сабабдан ген мухандислиги фан соҳаси асосида олинаётган рекомбинант оқсил ва пептид препаратлари ушбу муаммоларни йешишга хизмат қилмоқда. Ўзбекистон Республикасида тиббиёт соҳасида асосан клиник ташхис лабораторияларда касалликларни аниқлаш ва турли касаллик қўзғатувчи микроорганизмларга қарши курашиш учун керакли препаратларнинг чет эл валютаси ҳисобига импорт қилиниши турли касалликларни даволаш хусусан турли микроорганизмларга қарши курашиш қимматга тушишига сабаб бўлмоқда. Биз татқиқ қилаётган дефензин пептиди *Nigella sativa L* қора седана уруғи таркибида бўлиб, табиий манбадан ажратиб олинган компонентлар аралашмасидан пептидни тоза ҳолда ажратиб олиш қийинчилик келтириб чиқаради. Масалан, *Nigella sativa L* қора седана уруғи ўз таркибида бошқа кўплаб компонентларни тутади, ушбу компонентлар турлича фаолликка ега бўлиб, улардан бирдек фойдаланиб бўлмайди. *Nigella sativa L* қора седана уруғи таркибидан дефензин пептидини тоза ва биологик актив ҳолда ажратиб олиш жараёни анча мураккаб ва кўп босқичли жараёнdir.

Бу муаммоларни дефензин пептидининг рекомбинант формасини олиш билан ҳал этиш мумкин. Рекомбинант дефензин пептидини ген инженерияси усули ёрдамида юқори тозалик даражасида ажратиб олиш мумкин. Рекомбинант оқсил ва пептидлар ген даражасида модификация қилинган бўлиб организм учун хавфсиз ва ҳеч қандай аллергик

реакциялар чақирмайды. Бундан ташқари тозалаш жараёни соддалашгани учун, пептиднинг тан-нархи арzonлашади бу еса турли препаратлар учун қулайдир.

Шу сабабдан Юқори технологиялар ўкув тажриба маркази биокимё лабораториясида ген мухандислиги асосида бир қатор, хусусан глюкооксидаза, лактатдегидрогеназа ферментлари ва дефензин пептидининг рекомбинант формаларини олинди. Шу билан биргаликда улар устида тадқиқотлар ўтказиш давом етмоқда. Ушбу дефензин пептидининг рекомбинант формасини юртимизда ишлаб чиқарилишини йулга қуйилиши, бизнинг ген инженерияси усули билан оксиллар олиш технологияси бўйича малака ва тажрибаларимизни янада оширишга ва шу билан бирга турли касаллик кўзгатувчи микроорганизмларга осонгина қарши курашишимизга имконият беради. Олинган рекомбинант пептид препарати алтернатив антибиотик сифатида ҳизмат қилиши мумкин. Микробларни анъанавий антибиотикларга чидамлилиги ошганлилигини инобатга олганда, ҳозирги замонда пептидларга асосланган антимикроб препаратлар дунё фармосевтик бозори талабидадир.

Тадқиқот обьекти: Nigella Sativa L (седана) уруғи, дефензин пептиди гени, *E.coli* бактериясининг C43 штамми, *E.coli* бактериясининг C43-деф продуценти.

Тадқиқот предмети: pRSET_A-Дефензин рекомбинант вектор конструкцияси.

Тадқиқот мақсади: Nigella Sativa L (қора седана) уруғидан ажратилган дефензин пептиди генини тутувчи *pRSET_A-дефензин* рекомбинант вектор конструкцияси асосида *E.coli* бактериясининг C43 штаммидаги экспрессияни амалга ошириб, рекомбинант дефензин пептидини олиш ва унинг физик-химёвий хоссаларини ўрганиш.

Тадқиқот вазифалари:

Тадқиқод мақсадини амалга ошириш учун қуйидаги вазифаларни олдимизга қўйдик:

1. Экспрессия қилувчи *E.coli* бактериясининг С43 штамми компетент ҳужайраларини олиш ва pRSET_A вектор конструкцияни трансформация қилиб, дефензин пептиди продуцентини яратиш;
2. Трансформация қилинган *E.coli* бактериясининг С43 штаммида экспрессия бўлаётган дефензин пептидини индукциялаш ва ултратовуш ёрдамида индуксияланган С43 штамми ҳужайраларини бузиш;
3. Олинган супернатант таркибидаги умумий оқсиллар учун полиакриламид гель (ПААГ) - электрофорезини ўtkазиш ва гелдаги оқсилларни нитроцеллиоза мемранага трансфер қилиш;
4. Рекомбинант дефензин пептидини специфик аниқлаш учун His-Tag антителлалари билан Дот-блот ва Вестерн-блот анализини ўtkазиш;
5. Талон методи бўйича металл-аффин (хелат) хроматография усулида супернатант таркибидаги рекомбинант дефензин пептидини бошқа оқсиллардан тозалаш ва тозаланган пептид учун полиакриламид гель (ПААГ) электрофорезини ўtkазиш;
6. Олинган рекомбинант дефензин пептиди молекуласидаги 6 та His-Tag (гистидин) кетма-кетлигидан иборат дум қисмни энтерокиназа ферменти билан қирқиши.
7. “Икки қаватли агардаги доғ” усули билан олинган рекомбинант дефензин пептидинининг антибактериал ва замбурургга қарши минимал ингибиращ концентратсиясини аниқлаш
8. Рекомбинант дефензин пептидининг физик-кимёвий хоссаларини ўрганиш (дефензин пептидининг нуклеотидлар кетма-кетлиги, аминокислоталар кетма-кетлиги, молекуляр оғирлиги, изоэлектрик нуқтаси, таркибидаги ди-сулфид боғлар сони)

Илмий янгилиги: Ўзбекистон Республикасида биринчилардан бўлиб, Нс-Д2 дефензин пептиди *E.coli* бактериясининг С43 штамми ҳужайрасида экспрессияланди, ажратиб олиб тозаланди ва физик-кимёвий хоссалари ўрганилди.

Тадқиқотнинг асосий масалалари ва фаразлари:

Юртимизда шу вақтгача *Nigella sativa L* қора седана уруғи таркибидаги антимикроб ва замбуруғга қарши биологик активликка эга бўлган дефензин пептидини рекомбинант формаси генетик инженерия усулида экспрессия қилинмаган эди. Шунингдек, дефензин пептидини ишлаб чиқарувчи технологиялар тўлиқ жорий қилинмаган: лабораторияларда дефензин пептидининг рекомбинант формалари ажратиб олинмаган эди. Шу қунгача фақатгина дефензин пептиди бўйича *Nigella Sativa L* нинг антимикроб пептиidlари структураси, биологик фаоллиги ва улар асосида фармасевтик композитсиялар яратиш (Ошепкова Ю, 2016) бўйича ишлар олиб борилган бўлса. Ҳозирги кунга келиб рекомбинант дефензин пептиди pRSET_A-дефензин вектор конструкцияси ва *E.coli* C43 бактерия штамми асосида лаборатория шароитида экспрессия қилинди.

Тадқиқот мавзуси бўйича адабиётлар шарҳи.

Ҳозирги кунда биотехнология фан соҳалари доирасида шиддат билан ривожланиб бораётган асосий йўналишлардан бири бу ген муҳандислиги саналади. Ген муҳандислиги асосида олиб борилаётган изланишлар ва эришилаётган натижалар асосида олинган рекомбинант оқсил (ферментлар) ва пептиidlар инсониятнинг тиббиёт, фармацевтика, диагностика, ишлаб чиқариш ҳамда кўпгина бошқа соҳаларидаги эҳтиёжларини қондирибгина қолмай, балки асосий хомашё манбаи бўлиб ҳизмат қилмоқда.

Биотехнология ва молекуляр биология фанининг ёрқин тарзда ифодаланган замонавий ривожланиш даври ген муҳандислиги микроорганизмларидан биотехнологик объект сифатида кенг миқиёсида фойдалана бошланишидир. Рекомбинант штамм продуцентларининг маҳсулдорлиги, анъанавий селекция усулида олинган продуцентларга нисбатан бир қанча юқори самарадорликка эга, яъни бунда микроорганизмлар култивацияси масштабининг юқори даражада

камайиши, озуқа муҳити ва реагентлар тан-нархининг пасайиши, мақсадли маҳсулотларни, шу билан бирга доривор моддаларни ажратиб олишда энергия ва кўп меҳнат талаб қилиниши каби муаммолар ўз ечимини топади.

Рекомбинант оқсил ва пептидларни олиш ва уларни қўлланилиши орқали бир қанча муаммолар – препаратларнинг катта миқдорда олишни, қийин олинадиган ёки умуман ажратиб бўлмайдиган ферментларнинг (одам организмидан олинадиган препаратлар – гормонлар, ферментлар ва бошқалар) табиий аналогларини олишни, препаратларни тозалашнинг маҳсус нишонларини қўллаш туфайли анча соддалашиши, препаратларнинг вектор конструкция орқали керакли генларининг сунъий мутагенезини амалга ошириш кабилар ҳал қилиб берилди.

Рекомбинант ферментлар ва препаратларни ишлаб чиқариш дунё бўйича биологик хомашё саноатида юқори улушни эгаллади. Ушбу доирадаги фаолиятнинг ўзига хос хусусияти шундаки, услублар ишлаб чиқишида нисбатан юқори нарҳдаги тадқиқот олиб боришни талаб қиласди ва шунинг эвазига керакли препаратни ишлаб чиқаришнинг арzonга тушишини таъминлайди. Ҳозирги кунда кўп миқдорда рекомбинант оқсил ва пептидлар ишлаб чиқариш билан дунёда олдинги ўринларни *Novozyme, Danisco A/S, Alltech Ltd, NEB* компаниялари эгаллаб турибди. *Novozyme* компанияси айни даврда фермент ишлаб чиқариш борасида дунёда етакчи ҳисобланади, у 700 турдаги ферментларни ишлаб чиқариб, умумий сотиш ҳажми 9 млрд АҚШ долларини ташкил этади.

Ўзбекистонда продуцентларни танлаш ва уларни хусусиятларини ўрганиш, ҳамда табиий манбалардан ажратиш ва тозалаш орқали ишлаб чиқарилган оқсил (фермент) ва пептидлар турли соҳаларда, турли мақсадларда қўллаш борасида тажрибаларга эга, лекин Республикаизда рекомбинант ҳолатдаги саноат оқсил ва пептидлари ишлаб чиқариш тўлиқ йўлга қўйилмаган.

Юқори технологиялар ўқув тажриба маркази биокимё лабораториясида генларни клонлаш ва оқсил, пептидлар экспрессиялаш борасида бактериал система – *E.coli* устида тадқиқотлар олиб борилмоқда. Бу лабораторияда генларни клонлаш ва оқсил экспрессиясини амалга ошириш учун керакли замонавий ускуна ва жихозлар мавжуд. *E.coli* хужайраларининг иккита клонловчи – TOP10 ва XL1blue, ҳамда иккита оқсил экспрессияловчи – C43 ва BL21 штаммлари бор. *Nigella sativa L* (қора седана) уруғи - Марказий Осиё ва Хитой халқларининг анъанавий зиравори сифатида, даволаш ва тиббиётнинг кўпгина соҳаларида кенг қўлланилиб келинган. Унинг ёғи ва бошқа таркиби қисмларида юқори антимикроб ва ўスマларга қарши фаолликка ега моддалар бор еканлиги кўрсатилади. Қора седана уруғининг компонентларидан бири бўлган дефензин пептиди ҳам – антимикроб ва замбуруғга қарши фаолликка егадир. Ҳозирги кунда антимикроб пептид – дефензинлар янги авлод антибиотиклари вазифасини бажармоқда.

Ўсимлик дефензинлари ўсимликнинг ҳимоя системасидаги асосий компонент бўлиб, ўсимлик тўқима ва органларининг ҳимоя тўсифини шунингдек уруғниниг ҳимояя вазифасини ҳам бажаради.

Бу пептидлар қишлоқ хўжалиги ва медицина соҳасида ҳам аҳамиятли бўлган активликларга эга. Мисол учун: замбуруғга қарши активлик, бактериал активлик, оқсиллар ингибиторларига қарши активлик, ҳашарот амиазаси ингбиторига қарши активликлардир. Ҳар хил ўсимликлардан ажратилган кўпгина пептидлар орасида қора седана *Nigella sativa L.* (Ranunculaceae) (ендемик тур сифатида Ўзбекистон ва Хитойда ўсуви) дан ажратилган дефензинлар перспектив хусусиятига кўра ажralиб туради. *Nigella sativa L* қора седана уруғидаги икки Нс-Д1 ва Нс-Д2 номли янги дефензинлар ажратиб олинди ва бирламчи структура таркиби ўрганилди.

Нс-Д1 ва Нс-Д2 пептидлар бир биридан битта амино кислота қолдиғи билан фарқланади ва шунингдек *Raphanus Sativus L* дан

ажратилган RS-AFP1 ва RS-AFP2 дефензинлар билан юқори даражадаги ўхшашликка егадир.

Нс-Д1 ва Нс-Д2 дефензинлар хилма-хил кучли бактерия, замбуруғларга қарши ва шу билан бирга фитопатоген замбуруғларга қарши активликка эга. *Nigella sativa L* таркибида бактерия ва замбуруғларга қарши юқори активликка эга бўлган дефензинлар бор бўлгани учун, бу ўсимлик ген инженериясида ишлатишга тавсия қилинади.

Тадқиқотда қўлланилган методиканинг тавсифи.

Трансформация, ПААГ – электрофорез, Трансфер, Вестерн-блот анализи, металл-аффин (хелат) хроматография усули, икки қаватли агардаги доғ усули.

Тадқиқот натижаларининг назарий ва амалий аҳамияти.

E.coli C43-деф ҳужайраларининг олиниши мунтазам равища дефензин пептидининг рекомбинант формаларини қўп миқдорда экспрессиялаш имкониятини беради. Бундан ташқари, қайта ишлаб чиқилган ва жорий қилинган технологияни магистр ва бакалаврлар учун амалиёт ўтиш вақтида услугубий қўлланма сифатида фойдаланиш мумкин.

Иш тузилмасининг тавсифи:

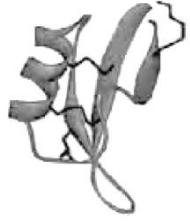
Магистрлик диссертацияси иш 86 бетдан иборат бўлиб, 3 та жадвал, 13 та расмдан иборат. Магистрлик диссертацияси иш қуйидаги боблардан иборат: Кириш, Адабиётлар шарҳи, Татқиқотларда қўлланиладиган услугуб ва ашёлар, Тадқиқот натижалари ва уларнинг таҳлили, Хуроса, Адабиётлар рўйхати. Магистрлик диссертацияси ишида 69 та адабиётлардан фойдаланилди. Магистрлик диссертацияси иш охирида илова қисми мавжуд.

1-БОБ. АДАБИЁТЛАР ТАҲЛИЛИ

1.1. Ўсимликларнинг антимикроб пептидлари ва уларнинг таснифи

Ўсимликларнинг антимикроб бирикмалари - ўсимликларнинг уруғлари ва гуллари иммунитетни рағбатлантирадиган кўплаб моддаларни ўз ичига олади. Улар орасида антимикроб хусусиятларга эга бўлган оқсил табиатли моддалар мавжуд. Антимикроб оқсил ва пептидлар кўп ҳужайрали организмларда патогенлар билан курашиш учун асосли мудофаа тизимларининг қадимий ва кенг тарқалган таркибий қисмлари ҳисобланади. Айни пайтда ҳар хил тузилишга, аминокислота таркибиغا ва таъсир механизмига эга бўлган 800 дан ортиқ бундай бирикмалар мавжуд. Уларнинг аксарияти кенг спектрли антимикроб фаоллигига эгадир. Бу оқсил ва пептидларнинг умумий хусусиятлари шуки липид қаватининг бузилишига ва ҳужум қилинаётган ҳужайранинг лизисига таъсир этувчи факторларни цитоплазма мембранаси билан ўзига хос бўлмаган ўзаро таъсири ҳисобига бартараф қилиши ҳисобланади. Баъзи антимикроб оқсиллар ва пептидлар патогенларга нисбатан юқори рецепторга боғлиқ бўлмаган ўзига хосликни намоён этади, бошқалари эса ҳужайра ичидаги нишонлар ёки патоген ҳужайралари мембраналари сиртидаги маълум рецепторлар билан ўзаро таъсирлашади. Антимикроб пептидлар анъанавий антибиотиклар билан солиштирганда патоген микроорганизмларга нисбатан юқори эффективликни кўрсатади ва аксарият холларда ҳайвонлар ва одамларга токсик таъсир этмайди. Касал қўзғатадиган микроблар доимо ўзгариб туради, уларга қарши ишлатиладиган антибиотикларга қарши чидамлилик ортади. Охирги ўтказилган илмий тадқиқотлар шуни кўрсатдики, кўпчилик патогенлар антимикроб пептидларга қарши ҳимоя қилиш механизмларни ишлаб чиқишига қодир эмас. Ҳайвонлардан фарқли ўлароқ, ўсимликлар ўзига хос иммунитет тизимига эга эмас, шунинг учун ўсимликларда антимикроб пептидлар патогенлардан ҳимоя қилишининг асосини ташкил қиласи. Шундай қилиб, ушбу бирикмаларни комплекс ўрганиш трансген ўсимликларни яратишда истиқболли йўналишлардан

хисобланади. Ҳозирги вақтда бундай тадқиқотлар генетик мухандислик усулларининг юксак даражада ривожланиши билан боғлиқdir. Бундан ташқари, трансген ҳайвонларни яратиш учун антимикроб пептидлардан фойдаланиш холлари маълум.

			
α -спирал	Trp-га бой	β -шпилкалар (2 цистеин қолдиги)	<i>Bacteriocin</i> (русск.) (тип II)
			
β -шпилькалар (4 цистеин қолдиги)		α -дефензинлар	β -дефензинлар
			
θ -дефензинлар	ҳашарот дефензинлари	ўсимлик дефензинлари	Тугунсимон

			
гивеинсимон	циклотидлар	Лизинга бой	Tachycitin

1-расм. Антимикроб пептидларнинг алоҳида учламчи структураси

Барча ҳайвонат организмларида (шу жумладан, прокариотлар, қуи ва юқори эукариотлар) бактериаялар, замбуруғлар, паразитлар ва вирусларнинг кўпайишини тўхтатувчи антимикроб пептидлар (АМП) деб номланувчи кичик оқсилларани секрециясига асосланган қадимий ҳимоя механизмига мавжуд. Бошқа ҳимоя механизми билан биргаликда улар хўжайин ҳужайраларини микроблар ҳужумидан ҳимояловчи туғма иммун тизимини шакллантиради. АМП генлар томонидан кодланади ва улар конститутив равишда ёки инвазив микроблар ва уларнинг маҳсулотлари иштирокида индукцияланганда тезда транцкрибланади. АМП оқсилнинг бирламчи кетма-кетлигидаги аминокислота қолдиқлари билан (глицин, цистein, гистидин, пролин, тирозин, аргинин, лизин ва серин) белгиланадиган функциялари ва таркиби бўйича таснифланади. Ушбу соҳада иш олиб бораётган олимлар сони тобора ошиб бормоқда, аммо бу мавзу ҳали ҳам яхши ўрганилмаган.

Шу авқтгача ҳимоя пептидларнинг структураси ва антимикроб хусусиятлари орасидаги ўзаро боғлиқлик тўғри аниқланмаган. Уларнинг таъсир механизмлари ҳақида ҳам кўп нарса маълум эмас. Антимикроб пептидларни табиий объектлардан ажратиш учун универсал усул йўқ, шунинг учун кўп холларда муайян муаммоларни хал қилиш учун янги ёндашувларни ишлаб чиқиш керак бўлади. Кўплаб лабораторияларда бир ўсимлик ёки ҳайвонларнинг бир нечта антимикроб пептидларни қидириш,

ажратиш ва тавсифлаш учун бир неча йиллар сарфланади. Шундай қилиб, янги антимимкроб пептидларни топиш ва тоза ҳолда ажратиш муаммосини долбзарблиги шубҳасиздир.

1.1.1. Дефензин пептидининг тавсифи, структураси ва олиниши

Ўтган асрнинг 90- йиллари бошида тадқиқотчилар ўсимликларнинг крестгуллилар оиласида ҳимоя таъсирига эга кичик пептидларни аниқлашди. Ушбу бирикмалар олдин маълум бўлган хашоратлар, мева кичик пашласи дрозомицинқ, шунингдек, сут эмизувчилар ва амфибиялар дефензинлари билан гомологияга эгадир. Дефензинлар АМП оиласи аъзолари ҳисобланиб, улар умуртқалилар, умуртқасизлар, ўсимлик ва замбуруғларда аниқланган, бу эса улар эукариотларнинг эволюцион тарқалишидан олдин пайдо бўлганидан далолат беради. Дефензинлар кетма-кетлигининг кам даражада ўхшашлигига қарамасдан, улар юқори α/γ ядро бирламчи кетма-кетлик мотивлари ва цистеин барқарорлаштирилган α/β ($CS\alpha/\beta$) учламчи структурани ўз ичига олади. Дефензиннинг барқарорлигини таъминловчи тўртта дисульфид боғини ҳосил қилувчи саккизта цистеин қолдиқлари мавжуддир. Биринчи ўсимлик дефензинлари 1990 йилларда буғдой ва арпа уруғларида бўлиб, дастлаб дельта тионин деб номланган, бу ном альфа-тионин ва бета-тионинлардаги дисульфид боғларининг сони ва ўхаш ҳажмига асосан берилган. Асосан, дефензинлар ўзида учтадан бештагача дисульфид боғларини тутади, улар альфа-спираль атрофидаги антипараллел бета-варақни барқарорлаштиради, бу эса рН ва хароратнинг экстремал қийматларига қаршилик кўрсатади. Дефензинлар катта бўлмаган (<10 кДа, 45-54 аминокислота), кўпинча юқори асосли, катион табиатли, цистеинга бой пептидлар бўлиб, улар ўсимликлар туғма иммун системасида микроорганизмлар таъсиридан ҳимоя қилиш учун оқсил секрециясиснинг қадимий стратегияси ҳисобланади. Дефензинлар турли биологик фаолликлар, айниқса, замбуруғ ва бактерияга қарши фаоллик кўрсатади, бу эса минимал ингитор концентрациясини талаб қилади. Уруғлар энергетик

моддаларни сақлаш органлари бўлиб, улар турли хил гетеротрофик организмлар, айниқса замбуруғлар учун нишонга айланади. Шу сабабли, цистеинга бой антимикроб пептидларга асосланган ҳимоя механизmlари уруғларда кенг тарқалган.

Охирги тадқиқотларда ўсимлик дефензинлари учун *in vivo* шароитда янги белгилари топиляпти булар: уруғлар атрофидаги замбуруғларни ўсишини тўхтатиш учун микромуҳит яратиш орқали уруғлар униб чиқишидаги ҳимоя роли [14]; чангланишдан сўнг эмбрионларнинг ҳосил бўлишида маҳаллий экспрессиянинг эмбрионлар ҳосил бўлишидаги ҳимоя роли [15] замбуруғлар [16], бактериялар [17], ўтхўр хашоратлар [18], нематодалар [19] ва паразит ўсимликлар [20] таъсиридаги биотик стрессга қарши ҳимоя роли; шунингдек, симбиотик ўзаро таъсирлардаги (масалан, азот фиксацияловчи бактериялар борлигига илдизда регуляциянинг камайган холатида) роли [21]).

Яқинда *Prunus persica* (шафтоли) дефензини *PpDFN1* билан ўтказилган тадқиқотлар тухум фосфатидилхолини липид монослоийга нейтрал сфинголипид β -D-галактозидни қўшиш дефензинни сунъий мемранага яқинлигини анча оширди. Шунга қарамай, худди шу тажриба фитопатоген замбуруғлардан ажратиб олинган липидлар билан ўтказилганда келтирилган яқинлик янада юқори бўлди, бу эса ўсимлик дефензиннинг нишон патоген мемранага боғланиши унинг концентрацияси ва таркибига боғлиқлигини кўрсатди. Худди шу тадқиқотда, инсон эритроцитларига қарши *PpDFN1* дефензинининг фаоллиги кўрсатилмади. Бундан ташқари, Goncalves ва бошқалар [23] *Pisum sativum* нинг дефензини *Psd1* холестерин билан бойитилган липид бислоийга ва сут эмизувчи ҳужайраларида аниқланган мемраналарга яқинлик кўрсатмади. Дефензиннинг ўсимликлардаги замбуруғга қарши фаоллигига оид сўнгги кашфиётлар шуни кўрсатдики, бундай фаоллик замбуруғ мемраналарининг анион липид таркибий қисмлари билан электростатик ўзаро таъсир ўтказиш орқали оширилиши мумкин.

[24]. Дефензин кашф этилганидан кейин активация йўналишлари, таъсир услуби ва фитопатогенларга ўсимлик бардошлигини яхшилаш учун имкониятлар бўйича тадқиқотлар ўтказилди [27]. Шунинг учун сут эмизувчилар хужайраларига нисбатан ўсимлик дефензинларининг токсиклигини йўқлиги янги тадқиқот базасининг пайдо бўлишига, яъни инсон юқумли касалликларига қарши потенциал тиббий қўллашга олиб келди [22, 28, 29]. Ўзида олти ёки саккизта цистеин дисульфид қолдиқдарини тутган антимикроб пептидлар юқори эукариотларга хосдир. Бу молекуларда дисульфид бирикмаларнинг асосий роли учламчи структурани барқарорлаштиришdir: альфа-спираль, бета-лист ёки альфа-спираль бета-лист билан биргаликда. Антимикроб пептидларнинг бу кенжасинфи дефензин деб атала бошланди. Умуртқалилар дефензинлари орасида учта, ҳашоратларда бешта, ўсимликларда эса тўртта пептид гурухлари ажратилади.

1.1.2. Ўсимлик дефензинларининг классификацияси

Брокар ва бошқалар замбуруғлар гифлари дефензинлар билан ишлов берилгандан сўнг морфорлогик таъсирлар асосида икки гурух антимикроб ўсимлик дефензинларини ажратдилар. Морфогенетик дефензинлар гифларнинг бир вактда тармоқланиб ўсишини камайишига олиб келади, бу гурух крестгуллилар уруғи [81], марва оиласи [82,83] дефензинларидан ташкил топган. Астровых, бобовых ва конскокаштановых [84] оиласида бўлган морфогенетик бўлмаган дефензинлар гифлар узилишини камайтиради, аммо юқоридаги морфологик ўзгаришларга олиб келмайди.

Кейинги ишларда ўсимлик дефензинларининг структуравий ва функционал хусусиятларига қараб 4 гурух аниқланган. Юқорида қайд этилган дефензин гурухлари биринчи ва иккинчи гурухларга тегишли, чунки улар гиф тармоқланишининг индукцияси борлиги ёки йўқлиги билан *Fusarium culmorum* модел гифининг ўсишини ингибирлайди. Учинчи гурухни исмалоқ ва картошка дефензинлари ҳосил қилади. Бу

синф вакиллари замбуруғларга қарши фаол эмас, лекин грам-мусбат ва грам-манфий бактерияларга ингибирловчи таъсир күрсатади. Маълумки, фақат биринчи гурухнинг дефензинлари грам-мусбат бактерияларга нисбатан фаол бўлган. Яқинда тавсифланган тўртинчи гурух вакиллари вақтинча *F.cultorum* ни кўплаб куртак шакллантирилардан, гиф ва майсалар бўртишилиз, шунингдек, бактериялар ингибирлаш қобилияти билан таърифланади. Бу охирги гурух ўз фунгицид фаоллиги жиҳатдан иккинчи гурухга ва бактерицид фаоллиги билан учинчи гурухга ўхшашдир.

1-жадвал

Ўсимлик дефензинларининг асосий гуруҳлари

Гурух	Вакиллари	Фунгицидлиги	Бактериоцидлиги
1	Rs-AFPI-4, Hs-AFPI, Ac-AMPI – 2	Замбуруғларнинг гиф мор-фологик ўзгаришлари ва ўсишнинг ингибирланиши	Грам-мусбат бактериялар
2	Ah-AMPI, Dm- AMPI, Ct-AMPI	Ўсишнинг ингибирлаши	Йўқ
3	St-PTHI, So-DI	Йўқ	Грам-мусбат ва грам-манфий бактериялар
4	So-D2-7	Ўсишнинг ингибирлаши	Грам-мусбат бактериялар

Ўсимликлар дефинзинлари ҳайвон хужайралари учун токсик эмас.

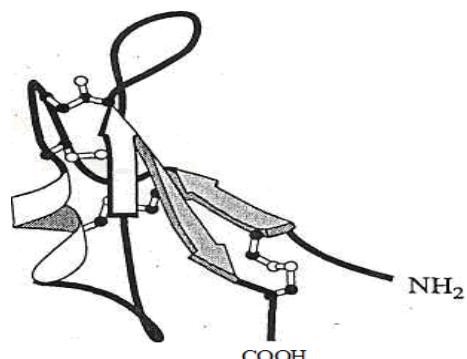
Уларнинг таъсир этиш механизми деярли ўрганилмаган. Дефензинлар цитоплазматик мембраннынг юзасидаги ўзига хос рецепторлар билан ўзаро таъсирлаша олади ва кичик тешикчалар пайдо бўлишини рағбатлантиради. Шундай қилиб, бу пептидлар ўсимликларни ҳимоя қилиш тизимишинг кенг тарқалган таркибий қисмлари ҳисобланади.

Ўсимлик дефензинларининг структураси учта антипаралел бета-бурмалар билан ифодаланади

1.1.3. Ўсимлик дефензинларининг фазовий структураси

Ўсимлик дефензинлари 45 дан 54 тагача аминокислота тутган, бир оз чекланган бўлсада, лекин аниқ консерватив кетма-кетликка эга мусбат зарядланган асосли пептидлар ҳисобланади.

Ўсимлик дефензинларининг структураси учта антипаралел бета-бурмалар билан ифодаланади (2-расм).



2-расм. Ўсимлик дефензинларининг фазовий структураси: альфа спиральсимон шаклда кўрсатилган, бета-бурамалар – стрелкалар билан.

Альфа спиральнинг Cis-X-X-cis фрагменти икки дисульфид кўприги билан учинчи бета-бураманинг цис-X-цис фрагменти боғланган, бу структуравий мотив цистеин ёрдамида стабиллашган альфа спираль деб аталади. Худди шу мотив хашоратлар дефензинларида ҳам учрайди.

Шундай қилиб, ўсимлик дефензинлари умуртқалилар, умуртқасизлар ва ўсимликлар супер оиласига киради. Ушбу ҳимоя молекулалари аллақачон замонавий организмларнинг эволюцион фарқларига олиб келган олдинги авлоднинг ҳимоя реакцияларида қўлланилган деган хulosага келиш мумкин.

Тўртинчи гурухга тегишли бўлган, маълум ўсимлик дефензинларини ўрганилганда пептидларнинг фаоллиги учун муҳим бўлган тахминий аминокислота қолдиқлари аниқланди. Саккизта цистеин қолдиқларининг ўрни муайян гурухга қарам бўлишидан қатъий назар, барча дефензинлар учун, шунингдек, 13 ва 34 ўринларда (Rs-AFP2 дефензин кетма-кетлигига нисбатан) глицин учун сақланади. Бу

қолдиқлар дефензин молекулаларини илгари айтиб ўтилган иккинчи даражали структурасини қуриш учун муҳимдир ва С-XXX-С, С-Х-С и G-Х-С (Х – ҳар қандай аминокислота) кетма-кетлигини таърифловчи цистеин билан стабиллаштирилган αβ-мотивнинг бир қисми хисобланади. Функцийд қобилиятига эга ўсимлик дефензинлари (биринчи ва иккинчи гурӯх) учун консерватив бўлган аминокислота қолдиқлари, лекин учинчи ва тўртинчи гурӯх дефензинлари (учинчи гурӯх дефензинларида функцийд фаоллик ўрнига бактерицид фаолларга эга) орасида ўзгаришга учраганлар, эҳтимол, функцийд таъсирга жавоб беради. Уларга треонин-10 (тўртинчи гурӯх дефензинларида учрайди), глицин-16 ва аланин-31 лар киради. Биринчи гурӯх дефензинлари учун хос бўлган, аммо иккинчи гурӯх учун эмас, замбуруғ гифининг морфологик бузилиши учун жавобгар аминокислота қолдиқлари – булар тирозин-38, фенилаланин-40 ва пролин-41 дир.Rs-AFP2 дефензинининг структурасида унинг фаоллиги учун зарур бўлган иккита қўшни участкани ажратиш мумкин. Биринчи сайт тирозин-38, фенилаланин-40, пролин-41, аланин-42, лизин-44 ва изолейцин-46 қолдиқларидан ташкил топган. 39-ўринга қўшимча мусбат зарядни қўшиш эритманинг юқори ион кучида функцийд фаолликни кучайишига олиб келди. Иккинчи сайт Rs-AFP2 кетма-кетлигининг тарқоқ ўринларда жойлашишига қарамасдан, бир-бирига боғлиқ бўлган треонин-10, серин-12, лейцин-28 ва фенилаланин-49 хосил бўлган. Функцийд фаоллиги учун муҳим бўлган бу икки қисм икки сайтни ташкил этиши мумкин, сайтлар кейин бир ёки икки рецептор молекулалари билан ўзаро таъсиралиши мумкин. Агар дефензин кетма-кетлигидаги баъзи аминокислоталар алмаштирилса, унда икки валентли катионларнинг ингибирловчи таъсирини камайтириш мумкин. Сайт-йўналтирилган мутагенез ёрдамида Rs-AFP2 мисолида пептид структураси ва фаоллиги орасидаги боғлиқлик ўрганилган. Турп уруғидан ажратилган Rs-AFP2 дефензин кетма-кетлигига 9-ўриндаги глицинни ёки 39-ўриндаги валинни асосли хусусиятига эга аргининга

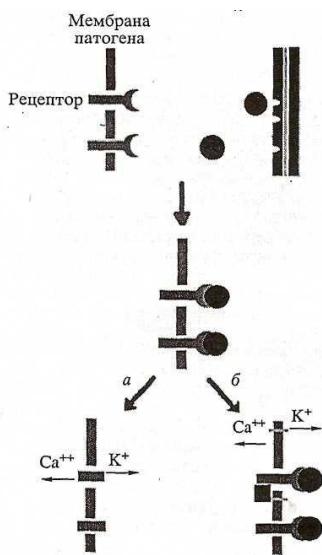
алмаштириш муҳитда катионлар иштирокида олинган дефензин формаларининг сезирлигини сезиларли камайишига олиб келган. Бу таъсир мембрана таркиблари билан ўзига хос бўлмаган боғланишга олинган формаларниң юқори рақобатдош қобилияти билан боғлиқ деб тахмин қилинади [92]. Турп дефензини Rs-AFP2 фаоллигини сезиларли камайишига олиб келувчи 11 аминокислота алмашинувларидан фақат икки аминокислота тўртинчи грухга тегишли исмалоқ So-D2 дефензинида мавжуддир. Ушбу фарқлар турли гурух дефензинларининг таъсир механизми биттадан ортиқ бўлиши мумкинлиги ҳақида тахмин қилган Брокар ва бошқалар гипотезасини тасдиқлайди. Шундай қилиб, биринчи гурух дефензинлари учун зарур бўлган қолдиқлар иккинчи ва тўртинчи гурух фаолияти учун кераксиз бўлиши мумкин.

1.1.4. Ўсимлик дефензинларининг таъсир механизми

Турп уруғи дефензини Rs-AFP2 апопластда жойлашганлиги кўрсатилган. Ушбу пептидларнинг ҳужайра ташқарисида жойлашуви шунингдек, турп дефензинининг қДНК си препептид кодлаштириши унинг етакчи қисмини мембрана орқали ташилишини ҳам таъкидлайди. Rs-AFP2 кўчатларнинг эндосперма, уруғпалласи ва гипокотилида жойлашган бўлса-да, у ташқи муҳит билан алоқа қилишда асосан ушбу органларнинг ташқи қатламида мавжуд бўлади. Шундай қилиб, ўсимлик ҳужайралари томонидан чиқарилган ҳимоя пептидлари замбуруғ гиф мембраналарида жойлашади ва ингибирловчи таъсирга эга бўлади. Маълумки, дефензинлар мембронадан Ca^{++} ва K^+ ионларининг чиқиши, апопластни ишқорлаштириш ва мембрана потенциалини ўзгартиришни ўзи ичига олган замбуруғлар гифларига ишлов берганда бир қатор жуда тез мембрана жавобларини индуцирлайди. Замбуруғ гифининг ўсишини ингибирланиши ва ион оқими индукцияси орасидаги боғлиқлик фойдасига иккита далил-исбот мавжуд. Биринчидан, 20 мМ дан юқори концентрацияларда икки томонлама катионлар мавжуд бўлганда, ўсимлик дефензинларида замбуруғларда фунгицид фаоллиги йўқолади

ва гифларнинг pH ўзгариши ва мембрана орқали ионлар оқими бўлмайди. Иккинчидан, ион оқимининг индукцияси ва гиф ўсишини ингибирлаш учун дефензинларнинг худди шундай дозалари керак бўлади [93-95]. Кartoшка дефензинлари St-PTH1 ва DL2 сунъий шароитларда липосомаларнинг ёпишишини индукциялади, лекин мембраннынг липид таркиблари билан ўзаро таъсирланадиган бошқа пептидлардан (буғдой альфа-тионини, арпа липид-ташувчи оқсили LTP2) фарқли ўлароқ, мембрана орқали ион оқимлари пайдо бўлмади. Ушбу натижалар мазкур пептидларнинг липид икки қавати билан ўзаро таъсирининг бошқа механизмини, яъни, мембрана липидлари билан бевосита таъсири йўқлигини кўрсатди [96-98]. Замбуруғлар мембраналарининг ўсимлик дефензинларига нисбатан бундай жавоблари фосфолипид мембраналарида ўзига хос боғланиш сайтлари бўлишини талаб этади. Хашорат ва сут эмизувчилар дефензинларининг таъсири мембрана липидларининг бевосита бузилиши орқали намоён бўлади. Турп Rs-AFP2 дефензини кетма-кетлигига 19 аминокислота қолдиғидан иборат ва фунгицид фаоллигига жавоб берувчи қисм топилган. Бу илмоқ билан боғланган дефензин фазовий структурасидаги иккинчи ва учинчи бета-бураларга тўғри келади [99]. Ажабланарли томони шундаки, дефензин молеклаларини йиғиша иштирок этган цистеин қолдиқлари дисульфид боғларини ҳосил қилишга қодир бўлмаган аналог билан алмаштирилиши мумкин. Бунда фунгицид фаоллиги йўқотилмайди. Шу билан бирга, узунлиги 15 аминокислотадан кам бўлган қисқа пептидларнинг фунгицид фаоллигини намойиш этиш учун цистеин қолдиқлари мавжудлиги талаб этилади. Муаллифлар қисқа пептидлар учун пептидларни табиий дефензин структурасини тақлид қилишга имкон берувчи дисульфидли бирикмалар туфайли комплексларга бирлаштирилганлигини таъкидлайди [100]. Шундай қилиб, патоген мембранасидаги ўзига хос сайтлар билан боғланишида қатнашадиган ҳимоя пептидининг қисмини аниқлашга имкон бўлди. Замбуруғ

патогенларга дефензинларининг таъсир механизмини тушунтирувчи иккита фараз мавжуд (3-расм). Биринчисига асосан, рецептор якорь пункти вазифасини бажариб, дефензин молекуласини мемранага жойлашишига ёрдам беради. Бошқа томондан, ўсимлик дефензинларининг рецепторлар билан боғланиши ион каналлар ёки ташувчилари фаолликларига таъсир этувчи аралашма бирикмаларнинг активлашишига олиб келиши мумкин. Замбуруғларни ўсимлик дефензинлари билан ишлов берганда индуциранадиган ион каналларидан бири Ca^{++} ионларининг кириши ҳисобланади. Маълумки, липосомаларнинг йўналтирилган ташилиши ва замбууруғ гифлари юқори қисмидаги хужайраларининг ўсиши учун Ca^{++} ионларининг бошқариладиган оқими талаб этилади. Бундай холда, дефензинлар билан ишлов бериш натижасида Ca^{++} ионларининг кириши, эҳтимол, гифлар ўсишининг ингибиrlашга олиб келади.



3-расм. Ўсимлик дефензинларининг замбуруғ патогенларига таъсир этиш модели

Дефензин молекулалари қора кружкалар билан, оралиқ сигнал молекулалари қора квадратлар билан кўрсатилган.

Биринчи моделга (а) кўра, патоген мемранасининг юзасидааги рецептор якорга ўхшаган холда ишлаб, дефензин молекуласини мемранага

киритиб, тешикчалар ҳосил қиласи. Бошқа бир (б) моделга кўра, дефензинни рецепторларга боғланиши мавжуд ион тешикчаларини ишини ўзгартирувчи оралиқ сигнал молекулаларининг фаоллашига олиб келади. *S. cerevisiae* ачитқисида *iptl* гени аниқланган ва ажратилган. Бу ген ўсимлик дефензинларининг мембрана билан боғланиши, кейинги мембрана ўтказувчанлигини ўзгариши ва замбуруғ гифларининг ўсишини ингибирловчи аниқловчи ҳисобланади. Ушбу геннинг маҳсулоти IPTL эукариот мембрана сфинголипидаридан бир ҳисобланган маннозо-(инозитол-фосфат)-керамидни маннозо-(инозитол-фосфат)₂-керамидга айлантиради. У мембрана оқсилларининг процессингида ва етказиб беришда, шунингдек, эҳтимол, Ca^{++} гомеостазининг ёки кальций индуцирловчи сигнал йўллари таркибларининг бошқарилишида қатнашади. Эҳтимол, сфинголипидларининг дефензин билан тўғридан-тўғри боғланиши содир бўлади, бу эса пептиднинг мембранага ўрнашишига олиб келади. Бошқа томондан, ушбу бирикмалар дефензинларни мембраналарга киритиш учун бириктирадиган сайтлар билан хизмат қилувчи мембрана оқсилларини барқарорлаштириш ёки ушлаб туриш учун зарур бўлиши мумкин. Шу билан бирга, бу ўзаро таъсирлар, эҳтимол, лиганд-рецептор моделига асосланмаган, дефензиннинг мембрана билан катионга сезгир реакцияларига тегишилди. Ўсимлик дефензинлари пептид дозаларига қараб, *N. Crassa* модел замбуруғи мембранаси ўтказувчанлигига икки фазали таъсир ўтказади. Ўсимлик дефензинининг юқори дозаларида 30 – 60 минутдан сўнг мембрана ўтказувчанлигининг кучли ўзгариши кузатилди, эҳтимол, бу ўзига хос бўлмаган ўзаро таъсирлар туфайли бўлиши мумкин. Бу таъсир муҳитнинг ион таркибига боғлик бўлди: у сувда янада аниқроқ кузатилди ва 50 mM K^+ ёки 5 mM Mg^{++} ионлари иштирокида деярли синовдан ўтказилмаган. Шундай қилиб, катионлар мавжудлигига сезгир бўлган мембраналар ўтказувчанлигини ўзгариши, эҳтимол, ўсимлик дефензинлари билан ишлов берилган гифларнинг ўсишини

ингибирлашда мухим рол ўйнамайды. Ўсимлик дефензинларининг кичик концентрацияларида, ўтказувчанлик ўзгариши камроқ бўлди (камида, 2-4 соат инкубация) ва муҳитда ионларининг мавжудлиги бўйича камроқ боғлиқ бўлди.

S.cerevisiaeа ачитқиларида ҳам мембрана ўтказувчанлиги ўзгаришини икки типи: барча дефензинлар томонидан, истисносиз, индуцирловчи катионлар мавжудлигига сезгир ва катионлар мавжудлигига сезгир бўлмаган фақат георгин дефензинига хос бўлган типи кузатилди. Ўсимлик дефензинларининг ўзига хослиги ўсиш муҳитининг ион кучига боғлиқ бўлади. Агар кичик ион кучида дефензинлар кўпчилик замбуруғларни ингибирласа, юқори ион кучида уларнинг фаоллик спектри сезиларли даражада қисқаради. Шундай қилиб, юқори ионли муҳитда, эҳтимол, ўзига хос ўзааро таъсирлар кўпчиликни ташкил қиласи ва бу турли дефензинларнинг фунгицид спектри фаоллининг хусусиятларини аниқлайди [54].

1.1.5. Антимикроб пептидларнинг қўлланилиш соҳалари

Ҳозирги вақтда антимикроб пептидлари янги дори-дармон препаратлари, шунингдек, трансген ҳайвонлар ва ўсимликлар яратиш учун потенциал бирикмалар сифатида қаралади [103, 104].

Антимикроб пептидлар анъанавий дориларга нисбатан бир қатор афзалликларга эга:

- ❖ Максадли ҳужайраларни тезда йўқ қиласи;
- ❖ Кенг спектрда таъсирларга эга;
- ❖ Классик антибиотикларга чидамли бир қатор патогенларга таъсир этади;
- ❖ Ўсимликларга юқтирилганда тезда фаоллашади;
- ❖ Микроорганизмлар деярли бу бирикмаларга чидамлилик ҳосил қиласи.

Пептид анитибиотикларнинг биринчи клиник тадқиқотлари маҳаллий инфекцияларга эга bemорларда ўтказилган.

Maganin Pharmaceuticals компанияси MSI-78 асосида дори-дармонларни синовдан ўтказди, бу препарат диабет касаллиги билан касалланган 926 нафар bemорларда оёқ терисидаги яраларни даволади.

Натижада, янги препарат одатий равища бундай касалликларни даволашда ишлатиладиган оғлоксацин билан бир хил таъсирга эга, аммо сезиларли даражада кам қўшимча таъсирга эга бўлгани аниқланди.

IntraBiotics компанияси саратон касаллигига оғиз яраларини даволаш учун ўзгартирилган IB-367 дан фойдаланган. Applied Microbiology компанияси гастрит ошқозон ярасини даволашда ҳамда *Helicobacter pylori* га қарши антибактериал пептиднинг ишлатилиши бўйича тадқиқотларни ўтказди [57]. Ҳайвонларни даволаш учун АМП дан фойдаланишга уринишлар бўлмоқда. Қуёнларда кўз касалликларини келтириб чиқарадиган *Pseudomonas aeruginosa* га қарши курашда секронин ва меллитин гибриди муваффақиятли фойдаланиш мумкинligини исботланган. Айни вақтда, АМП ларидан фойланишни чеклашнинг асосий сабаби уларнинг юқори нархидир. Бунга қўшимча равища, синтетик пептидлар кўп холларда уларнинг табиий аналогларига қараганда сезиларли даражада фаол бўлади.

Кенг кўламли тадқиқотлар ва тиббий мақсадлар учун антимикроб пептидларни катта миқдорда синтез қилиш керак. Кўпгина АМП лар етарли даражада кам ва қаттиқ фазали синтез усули билан олиниши мумкин [34, 51]. Кўп миқдорда АМП олиш муаммоларини хал қилишнинг яна бир ёндашуви – бу бактериялар, замбуруғлар, хашоратлар ва ўсимликлар ҳужайраларида рекомбинант пептидларнинг биосинтезидир. Қадим замонлардан буён инсон қишлоқ хужалиги экин майдонларининг патогенлари ва зааркунандаларига қарши курашади. Ибтидоий қишлоқ хўжалиги бир неча йил ичida сугориладиган ерларни қисқа муддатли ишлатиш билан ажralиб турди, ундан кейин улар тарк этилди. Экинларнинг таркиби, хатто битта экин таркибida ҳам, катта турларнинг хилма-хиллиги эди. Мисол учун, буғдой экинлари таркибida жавдари ва арпа ўсимликлари катта қисмини эгаллаган.

Бундай экотизимларда зааркунандалар ва патогенлар маданий ўсимликлар билан хотиржам яшаб, муҳим экинлар йўқолишига олиб келмади. Бугунги кунда ер аҳолисининг ошиши ва қишлоқ хўжалигига мос келадиган соҳаларда бир қатор сабаблар туфайли экин майдонларини қисқариши ҳайдаладиган ерларнинг интенсив ишлатилиш заруриятини туғдирди. Юқори ҳосилни таъминлайдиган генетик жиҳатдан ўхаш монокультураларни етиштириш экинларни патоген ва хашоратларнинг агрессив ирқига заиф қаршилигига олиб келди. Бундай экинларда патогенлар ва зааркунандалар экин навларининг генетик бир хиллиги туфайли қаъий танлов орқали таъсирланади, натижада улар ўсимлик қаршилигини тез йўқолишига олиб келади. Замонавий препаратларга бўлган талабнинг кучайишига қарамай, уларнинг аксарияти атроф-муҳитга салбий таъсир кўрсатмоқда[23,34]. Патоген микрофлора, йиртқич хашоратлар, кичик ҳайвонлар ва қушлар патоген микроорганизмлар ва зааркундаларга қарши курашувчи восита бўлиб, бу кимёвий ҳимоя дозаларини кўпайтириш зарурлигига олиб келади. Бундай холатда трансген ўсимликлардаги гетерологик генларни экспрессияси эришилган ютуқлар тўлқинида тадқиқотчилар айниқса патогенларга чидамли ўсимликлар яратиш учун кичик антимикроб оқсилларни ёки пептидларни кодлаштирадиган генларни қўллаш эҳтимоли билан қизиқтиради. Уларнинг кўпчилиги ягона генлар томонидан кодлаштирилади, бу эса уларни топиш ва клонлаштиришни осонлаштиради. Антимикроб пептидлар узунлигини 100 аминокислотадан ошмаслигини ҳисобга олсак, генларни ўсимликларга ўтказиш вазифаси нисбатан оддийдир. Лаборатория шароитида ўсимликлардан олинган кўплаб антимикроб пептидлар тижорат мақсадида ишлатиладиган кимёвий препаратлар билан таққосланганида кўплаб патогенларга қарши юқори таъсир кўрсатди. Унинг фаоллик спектри одатий жиҳатдан кенг бўлиши мумкин, чунки бактериоцид ва фунгицид (циклотидлар учун яна гемолитик) фаолитига эга бўлган тионинлар ва циклотидлар учун одатий ҳисобланади. Бошқа пептидлар

фақат микроорганизмларнинг чекланган сонига нисбатан юқори таъсир кўрсатиши мумкин, бу эса танланган токсиклик туфайли уларни янада жозибадор қиласди. Бунга қўпгина патоген бактериялар ва замбуруғлар учун токсик бўлган [12,16], гевеин- ва кноттинга ўхшаш пептидлар [19,32] ва бошқалар киради. Бундай холда турли патогенларнинг ўсишини ингибирлаш қобилияти бир хил синф пептидлари учун ҳам фарқ қилиши мумкин. Шундай қилиб, ўсимликларнинг муайян патогенларига қаршилик қўрсатиш учун генларни топиш вазифаси осонлаштирилади.

Хозирги вақтда антимикроб пептидларни экспрессияловчи ва патогенларга чидамли трансген ўсимликлар олинган. Лекин бу соҳада чекланган микдордаги тадқиқотлар мавжуд.

2-жадвал

АМП ларни трансген ўсимлик ҳайвонлар яратишда ишлатилиши

[28,32]

Трансген организмлар	Ишлатилган пептидлар	Пептидлар микдори (баргдаги 1 мг оқсил ҳисобига)	Патогенларга чидамлилиги
Тамаки	Арпа α-Хордотионин	2-60 нг	<i>Clavibacter michiganensis</i>
Тамаки	Арпа β-Хордотионин	2-60 нг	<i>Clavibacter michiganensis</i>
Тамаки	Арпа α-Хордотионин	++	<i>Xanthomonas campestris</i>
Тамаки	Ипак қурти Секропин В	+	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i>

Картошка	Краб Тачиплезин I	+	<i>Erwinia</i>
Тамаки	Турп Дефензин Rs-AFP2	0.2-2.4 мкг	<i>Alternaria longipes</i> (замбуруғ)
Тамаки	Амарант Хевеин Ac-AMP2	0.6-1.1 мкг	<i>Invitro</i> да замбуруғларга чиダメлилиқ, аммо <i>in planta</i> да әмас
Тамаки	Ширин қалампир Кноттин Mj- AMP2	0.9-1.4 мкг	<i>In vitro</i> да замбуруғларга чиダメлилиқ, аммо <i>in planta</i> да әмас
Тамаки	секропина В SB- 37 ва Shiva-1 аналоглари	> 1 мкг	<i>Burkholderia</i> <i>solanacearum</i>
Тамаки	Арпа α-тионин	20 нг	<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Сичқон	секропина В аналоги	+	<i>Brycella abortus</i>
Тамаки	Арпа липид- ташувчи оқсили	+	<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i>

“++” – экспрессиянинг юкори даражаси;

“+” – экспрессиянинг паст даражаси.

Энг катта муваффақият ўсимлик дефензинлари билан амалга оширилган. Турп Rs-AFP2 дефензинини экспрессияловчи тамаки ўсимлиги *Alternaria longipes* патогенига юқори даражада қаршилик күрсатди. Дастреки маълумотларга кўра, трансген маккажӯхори ўсимлигига шакар лавлаги AX1 ва AX2 дефензинларининг экспрессияси *Exserohilium turcicum* патогенига нисбатан ўсимликнинг чидамлилигини ошишига олиб келди [45]. Арпа LTP ни экспрессияловчи трансген тамаки ва арабидопсис ўсимликлари барглари *Ps. syringae*. Патогени билан инфекцияланганда касаллик симптомларини сезиларли камайиши кузатилди. Шу билан бирга, трансген ўсимликларда гевеин- ва кноттинга ўхшаш пептидларнинг супер экспрессияси *Botrytis cinerea* и *A. Longipes* патогенларига қарши ўсимликлар чидамлилиги ошишига олиб келмади, гарчи трансген помидор ўсимлиги меваларида гевеинга ўхшаш пептид экспрессияси *Trichoderma hamatum* патогени инфекциясига камроқ сезгирабўлди[48].

Ҳозирги пайтда антимикроб пептидни экспрессияловчи трансген ўсимлик олиш бўйича битта иш бор ва у тижорат мақсадлари учун яроқлидир. Гап беда ўсимлигидан ажратилган дефензин генини экспрессияловчи картошка трансген ўсимлиги ҳақида кетаяпти. Бу ўсимликлар дала шароитида *Verticillium dahliae*, патогенига қаршилиги кимёвий фунгицидлар ишлатилганда эришиладиган барқарорликка ўхшаш қаршиликни кўрсатгани муҳимдир. Ҳимоя пептиларини экспрессияловчи трансген ўсимликларни ишлатишнинг мураккаблиги ва кенг миқёсда ишлатилиши якка генлар кодлаштирувчи патогенларга қарши чидамлиликни ўсимликлар томонидан тез йўқолиши билан боғлиқ. Ушбу муаммони бартараф этиш учун, турли хил синфларга тегишли бўлган антимикроб пептидлар ва оқсилларни кодлаштирувчи бир нечта чидамлилик генлари орқали ўсимлик қаршилигини таъминлаш мумкин. Шунга қарамай, трансген ўсимликлардаги антимикроб пептидлар ва оқсилларнинг экспрессияси бўйича муваффақиятли бир нечта ишлар

қишлоқ хұжалиғи әқинларини патогенларга чидамлигини яратиш учун бу ҳимоя бирикмаларининг қийматини оптимистик тарзда баҳолаш имконини беради[46, 51].

1.2-боб. Ўсимлик дефензинларини ишлаб чиқариш учун

гетерологик тизимлар

Дефензинлар антимикроб пептиidlар оиласига киради, улар умуртқалилар, умуртқасизлар, замбуруғлар, ва ўсимликларда мавжуд бўлиб, улар эукариотлар кенг тарқалишидан олдин пайдо бўлганини кўрсатади. Ўсимлик дефензинларнинг сут эмизувлчилар ҳужайралари учун токсиклиги йўқлиги янги тадқиқот базасининг пайдо бўлишига, яъни уларни инсон юқумли касалликларига қарши тиббий фойдаланишга олиб келди. Дефензинни табиий манбалардан ажратиб олиш узок вақт ва меҳнат талаб қилувчи жараён бўлиб, одатда пептиднинг чиқиши ҳам кам миқдордадир. Кенг миқдорда тоза, фаол дефензинларни ишлаб чиқариш стратегиялари гетерологик экспрессия системаларида, кўпинча *E.coli* системасида ишлатилади. Ҳар қандай бошқа технологиялар сингари, ГЭС да чекловлар ва камчиликлар мавжуд, бу тизимни танлашдан олдин этиборлилик билан экспериментал дизайн талаб этади. Ўсимлик тўқималари каби табиий манбалардан дефензинларни ажратиш жараёни кўп вақт сарфланадиган шу билан биргаликда одатда пептиднинг миқдори кам бўладиган жараёндир[53,56]. Шунинг учун, тозаланган фаол дефенизиларнинг керакли миқдорда кенг миқёсда ишлаб чиқариш учун бошқа стратегиялар, жумладан, самарали ва тез кенгайиб бораётган рекомбинант ДНК технологияси ишлатилиши керак. Кўп сонли тадқиқотларада дефензин ишлаб чиқариш учун турли хил гетерологик экспрессия тизимларидан (ГЭТ) фойдаланиш ҳақида хабар берилган. Бироқ, бошқа ҳар қандай технологиялар сингари, системани танлашдан аввал эхтиёткорлик билан тажриба дизайнни талаб қиладиган амалдаги чекловлар ва камчиликларни (ўсимлик бактерияларида ва замбуруғ платформаларида) қаратилган. [56, 58].

Шу нүқтаи назардан, *Escherichia coli* гетеролог экспрессия тизимида алоҳида аҳамият берадиган рекомбинант ўсимлик дефензинларини ишлаб чиқариш билан боғлиқ муҳим элементларини мухокама қилиш керак. Тақдим этилган маълумотлар пептидни ажратиш ва тозалашдан олдин кодлаштириладиган пептидининг кетма-кетлигини олиш босқичларини ўз ичига олади.

1.2.1. Ўсимлик дефензинини қидириш

Ўсимлик дефензини пептидининг етук кетма-кетлигини олиш асосан иккита асосий стратегия ёрдамида амалга оширилади: тескари генетика ёки маълумотлар базасидан қидириш.

Тескари генетика стратегияси

Тескари генетика стратегияси, асосан, ўсимлик дефензинларини ажратиб олиш ва тозалашдан иборат бўлиб, кейинчалик аминокислоталарнинг кетма-кетлигини аниқлашдан иборат. Бир хил дефензин мотивлари бўлган дефензин амино кислоталар кетма-кетлигини (маълумотлар олиш) ўсимлик геномлари маълумотлар базасидан қидириш учун биоинформатик воситаларарадан фойдаланишга асосланилади. Ҳар икки холда ҳам етук дефензин кетма-кетлигини билиш қДНК ва сунъий плазмида амплификацияси учун праймерларни танлаш учун зарур бўлган маълумотларни беради. Ўсимлик дефензинларининг консерватив таркиби ва биокимёвий ўзига хос хусусиятлари олдиндан номаълум пептидларни ўсимликлардан тозалаш имконини беради, бунинг учун уларнинг геномдаги кетма-кетлиги хали мавжуд бўлмаса ҳам. Дефензинни ажратиш учун уруғлар энг кўп ишлатиладиган тўқималар бўлса-да, дефензинлар бошқа ўсимлик органларидан ҳам ажратилади. Лай ва бошқалар [33] манзарали тамакидан битта дефензин ва *Petunia* дан иккита дефензинни ажратишиган, иккала холда ҳам гул тўқималаридан ажратдилар. Иммуноблоттинг тахлили орқали муаллифлар дефензинлар гуллар ривожланишининг дастлабки босқичларида япроқлар ва уруғчаларда кўпроқ миқдорда бўлишига эътибор қаратиш керак эканлигини

аниқладилар. Дефензинларни шунингдек, Capsicum annuum цитрус ўсимлигининг пишган меваларидан [17], Ipomoea batatas (L.) Lam. “Tainong 57” илдизларидан, [34], жарохатланган Arabidopsis thaliana [25], Spinacia oleracea бутун баргларидан [35] ажратилганлиги ҳақида маълумотлар мавжуд. Экстракция жараёни одатда тўқималарни порошок холатида майдалаш, уруғлик унини ҳосил қилиш ёки суюқ азот билан бошқа тўқималарни юмшатиш, сўнгра паст хароратда (4°C) физиологик эритма билан экстракция учун буфер қўшишини ўз ичига олади. Кейин супернатант тўпланади ва аммоний сульфатнинг турли концентрацияларида чўктирилади. Аммоний сульфатнинг ҳар бир концентрацияларида чўктирилган гранулалар қайтадан эритилади ва пептиднинг тозаланган намунасини олиш учун хроматография қилинади. Намуна олдин аффин хроматографияси ёрдамида тозаланади, сўнгра дефензин тутган фракция гель-фильтрацияда бўлинади.

Маълумотлар базасидан қидириш стратегияси

Микроб патогенларни дори-дармонларга нисбатан чидамлиги ошиши янги антимикроб воситаларини аниқлашга зарурат туғдириди.

Антимикроб пептиidlар, айниқса, ўсимлик дефензинлари, кўплаб бактериал ва замбуруғ патогенларга қарши самарали эканлиги исботланди ва улар сут эмизувчилар хужайраларига нисбатан токсик таъсир кўрсатмайди [56, 57]. Шунинг учун АМП ва дефензинлар маълумотлар базасини ишлаб чиқиши кўплаб тадқиқотчиларга нафакат пептид кетма-кетлигини билиш, балки улар қизиқтираётган оқсилни яхшироқ тушуниш учун маълумотни такомиллаштириш воситаларини тақдим этишга ёрдам берди. Баъзи маълумотлар базалари гомологияларни қидириш, бир неча кетма-кетликларни солишишириш, филогения, физика кимёвий профиллар ва бошқа хисоб-китоблар ва прогнозларни амалга ошириш учун дастурларни тақдим этади [38]. Бундай маълумотлар базаси ўсимликка хос табиий ўсимлик антимикроб пептиidlар учун маълумотлар сақланадиган жойдир. Рўйхатдан ўтган 55 та ўсимлик дефензинларини маълумотлар

базасидан топиш мүмкин, шунингдек, филогенетик дефензин дарахтлари, нуклеотидлар, аминокислоталар ва фаолликга оид фойдали диаграмма ва чизмаларини ҳам топиш мүмкин. Қидиувни осонлаштирадиган асбоблар ёки ўрганиш учун кўшимча маълумотларни тақдим этилиши, жумладан, ўхшашикларни қидириш, яширин марков модели, физик- кимёвий профиллари ва кетма-кетликларини текислаб солиштириш PhyAMP маълумотлар базасида мавжуд [39]. Баъзи холларда, агар тадқиқотчи излаётган оқсил билан таниш бўлса, GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) каби баъзи маҳсус бўлмаган маълумотлар базалари ҳам фойдали бўлиши мүмкин. Мисол тариқасида, Karri va Bharadwaja [40] Tfgd2-RsAFP2 бирлаштирилган генни (GenBank да KF498667 рақами билан кириш мүмкин) конструкциялаш учун Tfgd2 (Trigonella foenum - graecum defensin 2, GenBank кириш рақами AY227192) ва RsAFP2 (Raphanus sativus antifungal protein 2, GenBank кириш рақами U18556) ни GenBank дан қидирдилар. Мавжуд АМП ва дефензинлар маълумотлар базалари айримларини ифодаловчи рўйхат 2-жадвалда келтирилган.

1.2.2. Рекомбинант ўсимлик дефензинларини олиниши

Рекомбинант ДНК технологияларининг муваффақиятлари ўсимлик дефензинларини юқори даражада ишлаб чиқариш имконини берди. Ушбу технология прокариотик ва эукариотик тизимларда экспрессия қилиш учун маҳсус векторларда ёт генларни клонлаштириш имконини беради ва ишлаб чиқариш харажатларининг энг самарали усули ҳисобланади. Оқсиллар баъзи хусусиятларини, жумладан, ҳажми, ҳужайра ичидаги жойлаши ёки секрецияси, тўғри бурмаланиши гетерологик ишлаб чиқариш учун «хўжайн» тизимларни танлашда эҳтиёткорлик билан текшириш керак бўлади. АМР ишлаб чиқаришда асосий «хўжайн» лар бактериялар ва ачитқилар ҳисобланади, улар гетерогик экспрессияланган АМП ларнинг 97,4 фоизини ташкил этади. Яқин ўтмишда, ўсимликлар АМП ишлаб чиқариш учун истиқболли «хўжайн» бўлиб келган, чунки трансген

ўсимликлар пептидни керакли культурада экспрессиясини микроб назорати учун тўғридан-тўғри ишлатилиши мумкин [42, 44]. Прокариотик ва эукариотик тизимларда ўсимлик дефензинларини ишлаб чиқариш учун турли «хўжайин» лар ишлатилган. Ўсимлик дефензинлари аллақачон бактерияларда [5,45,46], ачитқи [47-49] ва трансген ўсимликларда [50-52] муваффақиятли даражада олинган. Ген муҳандислигини расмий туғилган куни 1972 йилдан бошланган. АҚШ олимни Пол Наим Берг ва бошқа олимлар томонидан дастлабки рекомбинант ДНК олинди. Олинган рекомбинант ДНК учта манбадан бўлиб, булар: *SV40* онкоген маймун вирусининг тўлиқ геноми, λ 174 бактерияфаги ва *E.coli* лактоза оперони эди. Бу олинган рекомбинант ДНК функционал жиҳатдан ўрганилмади, чунки рекомбинант ДНКни одамга киритгандан сўнг онкоген касалликларни келтириб чиқариши мумкин эди (Попов, В. Н. ва бошқалар. 2009).

***Escherichia coli* экспрессия тизими**

Escherichia coli гетеролог оқсилларни ишлаб чиқариш учун энг қўп ишлатиладиган микроорганизм ҳисобланади. Ушбу тизим ўсимлик дефензинини ишлаб чиқариш учун «хўжайин» сифатида биринчи танлов бўлиб, ҳозиргача пептиднининг энг катта чиқиши шу тизимда эканлиги ҳақида хабар берилган. Бунинг бир қанча сабаблари бор: *E.coli* нинг тез ўсиши, тижорат экспрессия векторларининг кенг тўпламларининг, яхши ташкил этилган ДНК манипуляция протоколларини мавжудлиги ва унинг генетикаси, биокимёси ва физиологияси ҳақида кенг билилмар туфайли рекомбинант оқсили ишлаб чиқаришининг энг самарали усули эканлигини исботлади. Шу билан бирга, бактерияларни самарали ишлаб чиқаришга эришишга қаратилган айrim тузатишлар мавжуд. Ўсимлик дефензинлари аллақачон *E. coli* экспрессия тизимларида гетерологик тарзда ишлаб чиқарилган. Най ва бошқалар [5] pET-32 вектори (Novagen) ва *E. coli* BL21 (DE3) Origami pLys хужайралари ёрдамида 0.5 мг/л клонлаштирилган PpDFN1 ҳосил қилди. Олинган дефензин функционал бўлиб, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* и *Penicillium expansum* замбуруғларига қарши IC50 қийматлари мос равища 15,1, 9,9 и 1,1 мкг/мл активликни ташкил қилди. Худди шундай, Ковалева ва бошқалар [54] глютатион-S-трансфераза билан қўшилган *Pinus silvestris* defensin 1 (PsDef1) ни *E. coli* нинг pET42 ва BL21 (DE3) штаммларида экспрессияладилар. Улар GST га бириктирилган

тұлық дефензинни олдилар, лекин у биологик активлик күрсатмади. Бириктирилган GST ажратиб ташланғандан сүңг дефензин патоген замбуруғларга қарши функцияси тикланды. Кейинги бобларда *E. coli* гетерологик экспрессияси учун эътиборга олиниши керак баъзи қарашлар күриб чиқылады. *E.coli* бактерия системаси. Ичак таёқчаси рекомбинант оқсилларни ишлаб чиқарувчи объекти сифатида кенг қўлланилади. Ушбу бактериянинг авфзаллик ва камчиликлари З-жадвалда кўрсатилган. Улар тез ўсади, экспрессияси юқори, культура қилиш осон ва маҳсулотни қўп синтезлайди. Ушбу бактерия ёрдамида кўпгина рекомбинант оқсиллар олинади. Ушбу система гликозилирланмаган оқсилларни экспрессияси учун мос келади. *E.coli* геноми бошқа организмларга қараганда яхши ўрганилган. *E.coli* бактериясида транскрипция, транслация ва оқсиллар фолдинг жараёнлари яхши ўрганилган. Ушбу бактерия бошқа бактерияларга нисбатан мураккаб эукариот оқсилларини экспрессия қилиш учун қўпроқ аҳамиятлидир. Унинг геномини ўрганиш осон ва тез, промоторларни назорат қилиш мураккаб эмас. *E.coli* хужайра қуруқ массасини 80 % гача рекомбинант оқсилларни тўплаши мумкин ва ҳар хил ташқи муҳит шароитларига чидамли.

3- жадвал

E.coli экспрессион системасининг характеристикаси[41,43]

Афзаллиги	Камчилиги
Тез экспрессия қилиши	Дисульфид боғига эга оқсиллар қийин экспрессияланади
Оқсил экспрессиясини қўп бериши	Негликозилирланган оқсилларни ишлаб чиқаради
Культура ва унинг геномини осон модификациялаш	Оқсиллар эндотоксинлар билан ишлаб чиқарилади
Қиммат эмас	Ацетатнинг йиғилиши хужайрага захарлилик олиб келади
Ишлаб чиқариш тез ва иқтисодий жиҳатдан тежамли	Оқсиллар хужайрада инактив ҳолатда бўлади ва рефолдинг қилиш керак

Хужайраларнинг юқори даражада зичлиги ацетатни кўпайтиради ва токсик таъсир қиласи. Буни кислородни концентрациясини назорат қилиб бартараф қилиш мумкин. Оқсиллар хужайра таначасида кўпинча инактив ва эримайдиган ҳолатда бўлиб қолади ва қайтадан тахланиши талаб қиласи. Бундан ташқари, ишлаб чиқарилаётган оқсилларда дисульфид боғлари кўп бўлса, қайтадан тахланиши қийин бўлади. *E.coli* хужайрасида ишлаб чиқарилган оқсиллар, антитаналар гликозирланмаган, модификацияланмаган бўлиб, кўпгина сут эмизувчиларнинг оқсилларини шу сабабли танимайди. *E.coli* ишлаб чиқарувчанлигини ошириш учун қуидаги ўлчовларни қабул қилиш керак; ҳар хил штаммлардан фойдаланиш; шаперон коэкспрессияси ёки фолдаз; протоплазма мемранасидан озиқ муҳитига чиқариладиган оқсилларни; оқсил синтези тезлигини тушириш; озиқ муҳитини ўзгариши; оқсиллар фрагментлар экспрессияси; *in vitro* денатурация ва қайтадан оқсилларни тахланиши (Demain A. L., Vaishnav P. 2009). Ацетатни ишлаб чиқарилиш муаммосини глюкоза миқдорини камайтириш ҳисобига эришилади [62,63]. *E.coli* хужайраси таначасида ишлаб чиқарилган гетерологик оқсиллар эримайдиган ва ноактив ҳолатда бўлади. Актив оқсилни олиш учун таначани хужайрадан олиб ташлаш керак, оқсилни денатурация агентларини туз билан ишлов бериб, дисульфид боғларини олиб ташлаш керак. Рефолдинг жараёнини денатурация ва қайта тикланувчи агентларни йўқотиш йўли билан амалга оширилади. Гетерологик рекомбинант оқсилларни биологик актив формасини юқори даражада экспрессияда эрийдиган ҳолда олиш мумкин. *E.coli* хужайра цитоплазмасида қолдириладиган оқсиллар хужайрадан ташқарига чиқариладиган оқсилларга қараганда кўп синтезланади. Циотоплазма оқсилларини тозалаш ва тўғри ўраш осонроқ. Махсулотни кўпайтириш учун lac, atc, trc промоторларидан фойдаланилади. Промотор системаси мустаҳкам ва кучли бошқарилиши ва *E.coli* ни ҳар хил штаммларига осон кўчирилиши керак, озиқ муҳитини инградентларига боғлиқ техника индукцияларини

арzonлиги ва осонлиги бўлиши керак. *E.coli* рекомбинант оқсилларининг секрецияси периплазмага ёки озиқ мухитига бўлади ва асосан ҳужайра ичидага таначага боғланган ҳолда ишлаб чиқарилади. Бу эса тозалаш, фолдингда оқсилни ишлаб чиқариш қийматини туширади [20,32].

***Escherichia coli* штаммлари**

Турли штаммларда экспрессияланган ўсимлик рекомбинант дефензинларининг қиёсий тадқиқотлари етишмаслиги қайси турдаги штамм яхши натижага беришини олиндан аниқлашни қийинлаштиради. Экспрессия тизимини тўғри танлаш рекомбинант дефензиннинг қониқарли чиқишига эришиш учун жуда муҳимдир. Баъзида, турли хил штаммларни ишлатиб, кейин қарор қабул қилишга ёрдам беради, чунки рекомбинант оқсил ҳосил бўлиши эҳтиёткорликдан то тафовутгача 10 баробар фарқ қилиши мумкин [55]. Дефензинларда саккизта цистеин қолдиқлари мавжуд бўлиб, улар ўзаро таъсирлашиб, тўрт дисульфидли боғлар ҳосил қиласиди. Шунинг учун танланган экспрессияловчи штамм шундай бурмани ҳосил қила олиши муҳим аҳамиятга эга. Тиоредоксинлар мавжудлиги сабабли дисульфид боғланишининг шаклланиши *E.coli* цитоплазмасида ингибирланади ва фақат периплазмада актив бўлган ишқорий фосфатаза ферментига боғлиқ бўлган ҳолда. *E.coli* ичидаги дефензинларнинг цитопламатик экспрессияси тиоредоксинредуктаза (trxB) мутант штаммлардан фойдаланиш мумкин бўлди. Периплазматик изомераза бўлган дисульфид боғи изомеразаси (фолдазалар ҳам деб аталувчи DsbC дисульфид боғини ҳосил бўлиши ва тузатишни катализлайди) цитоплазмада экспрессия учун конструкцияланган.

Баъзи штаммлар камёб тРНК ларни кодлаштирувчи плазмидалар бўлиб, кодонлар силжишини заифлаштиради. Бу эса кодонлар оптимизациясини муваффақиятли экспрессия учун муҳимлигини камайтиради. Бошқалари trxB ва глутатионредуктаза (gor) генларидаги мутациялар туфайли рекомбинант дефензиндаги дисульфид боғларини ҳосил бўлишини яхшилаб, цитоплазмада оксидалangan муҳитни таъминлайди. *E.coli* да

экспрессияланаётган гетерологик оқсилларни цитоплазматик дисульфид билан боғланишини ва экспрессиясини яхшироқ назорат қилиш учун бу икки модификацияни ўз ичига олган штаммлар ҳам мавжуд. Тозалаш босқичларида оқсилларнинг парчаланишини ташқи мембраннынг мутацияга учраган ompT протеазаси ва ион протеазаси тутган штаммлар ишлатилганда жуда камайтириш мумкин. Энг мақбул экспериментал дизайн билан ҳам эрувчан рекомбинант дефензинни муваффақиятли ишлаб чиқариш натижасини олдиндан айтиб бериш мумкин эмаслигини таъкидлаш керак. Kovalskaya ва Hammod [61] BL21 (DE3) штаммларини гетерологик оқсилларни ишлаб чиқариш учун pET26b экспрессия вектор ва икки ўсимлик АМП, снакин (SN1) ва дефензинни (PTN1) ишлатиб кассеталар яратдилар. Эруван молекулаларни олиш стратегияси муваффақиятсиз тугади ва рекомбинант оқсиллар «қўшиб олиш таначалар» ида жамланади. Ҳар бири стратегик модификациялар турли комбинацияси эга ҳаммабоп кўплаб экспрессия штаммлари мавжуд: RNase E нинг мутант штаммлари ҳужайра ичидағи РНКни янада узоқроқ муддат учун, T7 Lysozyme токсик пептидларни яхши назорати учун, туз-индукцияловчи промоторлар яхши эрувчанлик учун, ҳар бир ҳужайрада индукциянинг гомоген даражалари учун, lacY мутантлари ва экспрессияни аниқ назорати, цитоплазматик яхши букулиш учун DsbC шаперонни кўшиш керакдир.

Экспрессия векторлари

Шуни таъкидлаш керакки, экспрессияни муваффақиятли бўлиши учун штаммларни ва экспрессия векторлари стратегиясини бирлаштиришга харакат қилиш керак. Масалан, lon протеаза ва мутант ташни мембраналар ompT билан ишлашганда N-охири сигнал relB ни кўрсатувчи экспрессия векторларининг фойдаланиши тавсия этилади, рекомбинант оқсилнинг перiplазматик жойлашишини, бурамаланиши ва эрувчанлик шароитларини яхшилаш имконини беради [62]. Экспрессияланаётган векторлар рекомбинант оқсилга уланувчи

молекулаларни қўшиши мумкин. Бунда оқсилни тозалаш учун камроқ вақт ва меҳнат сарф бўлади. Масалан, pMAL экспрессия векторлари (New England BioLabs) икки асосий грухга бўлинади: pMAL-с ва pMAL-р-векторлар. Ҳар икки гурух малтозани бирлаштирувчи оқсилни бир босқичли тозалаш жараёнида рекомбинант дефензинга қўшиб қўяди. PMAL-с векторлари (pMAL-c2x, pMAL-c5x, ва хоказо) бирлаштирилган оқсилнинг цитоплазмада экспрессиясига олиб келадиган malE сигнал кетма-кетлигининг йўқ қилинишини англатади. Бу пептид чиқишини ошишига олиб келади (рекомбинант оқсилнинг даражаси жами ҳужайра оқсилларининг 20-40 фоизини ташкил қиласди), аммо дисульфид боғларини ҳосил бўлишини талаб қилувчи пептидлар учун тавсия этилмайди [17]. PMAL-р серия malE гени интакт сигнал кетма-кетлигини очиб беради, натижада рекомбинант пептидни периплазмада секрециясига олиб келади. PMAL-р қатори камроқ чиқишини қўрсатади (рекомбинант оқсиллар даражалари 1-20 фоиз умумий ҳужайра оқсилига нисбатан), лекин улар дисульфид боғининг тўғри бурмаланиши ҳосил бўлишига кўпроқ мойил бўлади[57,58]. Ўсимлик дефензинини гетероген экспрессияси учун энг тарқалган экспрессия тизими pET тизими ҳисобланади. Бу тизим 1968 йилда W. F. Studier ва B. A. Moffatt биринча маротаба ишлаб чиқилган ва бактериофаг РНК полимераза T7 учун юқори селектив бўлган РНК-полимераза экспрессия системасидир[63]. Бу векторларнинг асосий хусусияти кучли гетерологик экспрессияга олиб келадиган кучли бактериофаг транскрипция сигнали бўлиб, индукциядан бир неча соат ўтгач, барча ҳужайра оқсилларининг 50 фоизи рекомбинант оқсиллар ҳисобланади. Ушбу векторлар экспрессия учун T7 полимераза гени тутган штаммларга клонлаштириш керак. BL21 (DE3) каби штаммлар L8-UV5 lac [64] нинг ҳосиласи бўлган lac- промоторининг назорати остида T7 полимераза генини ифодалаш учун яратилган. L8-UV5 lac промоторининг ҳосиласи учта алоҳида нуклеотидда бўлган мутацияни ўзида тутади, улар промотор кучини оширади, циклик АМФ га боғлиқликни камайтиради ва

глюкозага камроқ сезгир аммо кучлироқ промоторни яратади. Ушбу модификациялар IPTG ни индуктор сифатида ишлатиб, T7 РНК полимеразанинг кучли индукциясига имкон беради [63].

Оқсил ташувчилар ва секреция сигналлари

Прокариотик тизимда антимикроб пептиднининг экспрессияси «хўжайин» штаммларининг ўлимига олиб келиши ажабланарли эмас. Оқсил ташувчиларини ишлатилиши “хўжайин” ҳужайраларида экспрессияланган дефензиннинг токсик таъсирини камайтиришга ёрдам беради. Дефензинларнинг кичик ўлчамлиги туфайли улар ҳужайра ичидаги протеазалар томонидан парчаланишга мойил бўлади. Бундай парчаланиш оқсил таашувчининг гетерологик пептид билан қўшилиши орқали бартараф этиш мумкин. Оқсил-ташувчи *E.coli* табиий оқсиллари просигментларини имитация қиласи ва қўшилган оқсилни ҳужайра ичидаги протеазалардан ҳимоя қиласи. *E.coli* ичидаги эрувчан экспрессия қилиш учун иккита энг кўп ишлатиладиган ташувчилар тиоредоксин (TRX) ва глутатион-S-трансфераза (GST) дир. Bogomolovas ва бошқалар [66] 13 та ташувчилар орасида тиоредоксин энг юқори абсолют чиқишини кўрсатишини аниқладилар. Тиоредоксин *E.coli* нинг резидент оқсили бўлиб, у гетеролоик пептид билан бирлаштирилганда цитоплазмада оқсил эрувчанлигини кучайтиради ва уланиш таначаларида ушлаб қолади. Эрувчанликни кучайтириш табиий дисульфид боғларнинг тўғри ҳосил бўлиши учун керак, бу ўз навбатида бирлаштирилган оқсил чиқишини анча яхшилайди[67]. Тиоредоксинни кунгабоқар дефензини (На-DEF1) билан бирлаштирилиши натижасида [20] *E.coli* ҳужайра лизатидан эрувчан ва фаол пептидларни қайта тиклашга муваффақ бўлдилар. Бошқа антимикроб пептидлар [59,60] билан кўп муваффақиятли натижаларга қарамасдан, GST бирлашиши протеолитик парчаланишга жуда сезгир ва *E.coli* да самарасиз оқсил ишлаб чиқаришга олиб келади [61]. Бугунги кунга келиб, ташувчи-оқсил ва рекомбинант пептидларнинг юқори чиқиши билан тўғридан-тўғри боғлиқ эмас. Оқсил-ташувчиларнинг таъсири унга

боғланган ўзига хос оқсилга қараб фарқ қилиши мумкинлиги маълум бўлди [61]. Баъзи секреция сигналлари *E.coli* периплазмасида ажратишни бошқариш учун рекомбинант дефенсинга қўшилиши ёки хатто рекомбинант пептид миграцияси ва биологик фаоллигини бошқариши мумкин [62, 63], аммо бошқа антимикроб пептидлар [68, 69] билан муваффақиятли натижаларга қарамасдан, GST қўшилмалари протеолитик парчаланишга жуда сезгир ва *E. coli* да самарасиз оқсил ишлаб чиқаришга олиб келади [64]. Ковальская ва Хаммод [61] *E.coli* ичидаги гетерологик ишлаб чиқариш учун pET 26b экспрессия вектори ва иккита ўсимликнинг АМП, снакин ва дефензин (РТН1) ёрдамида кассеталарни яратдилар. PET 26b вектори N-охирি pelB сигнали туфайли танланган, бу вазифаси эса яхши бурамалаш ва эрувчанлик учун рекомбинант оқсилнинг периплазматик жойлашишини таъминлаш эди. Ушбу стратегия муваффақиятсизликка учради ва барча рекомбинант оқсил қўшиб олиш танаchalарида тўпланди.

Қўшиб олиш танаchalари

Қўшиб олиш танаchalарида агрегацияланган рекомбинант дефензин барча экспрессияланган пептидларнинг бойитиш ва тозалаш босқичларини камайтириш учун яна бир стратегия бўлиши мумкин. Тегишли ювиш шароитидан фойдаланиш тоза рекомбинант оқсилининг 90 фоизидан ортиқ қисмини ўз ичига олган қўшиб олиш танаchalарини ажратиш имконини беради[73]. Баъзи тадқиқотларда қўшиб олиш танаchalарининг ҳосил бўлишини стимуллаш учун ташувчи агрегация индукторларини атайлаб қўшишиди, бунда рекомбинант оқсил даражаси хужайра умумий оқсилнинг 30 фоизига ошади [74]. Kowalska ва Hammond [61] DTT (Dithiothreitol) моддасини ишлатиб, қўшиб олиш танаchalарида сақланаётган рекомбинант дефензин бурмаларини қайтадан ҳосил қилдилар ва олинган фаол молекула 7 мкМ концентрацияда бактериянинг (*Clavibacter michiganensis*) ва 14 мкМ да замбуругнинг (*Colletotrichum coccoides*) ўсишини ингибирлади. Қўшиб олиш танаchalари ҳосил

бўлишини яхшилаш учун баъзи пептидлар конструкцияларини ўзгартириш керак. Гексагистидин билан нишонланган кетостероидизмераза пептидининг экспрессияси олинган пептиднинг эрувчанлигини камайтиради, бу ўз навбатида унинг қўшиб олиш таначаларида йиғилишига олиб келади. Пептид тозалангандан сўнг 1 грамм қурук хужайра массасидан 30 мг тоза пептид олиш мумкин. Ушбу натижалар терапевтик пептидларни ўрганиш учун ишлатиладиган биологик тахлилларда ҳатто пептиднинг тозалик даражаси зарур миқёсда бўлса ҳам илмий тадқиқотлар учун пептидларни ишлаб чиқаришга жавоб беради [59].

1-боб бўйича хуроса

Оқсилларни муваффақиятли олишга эришиш учун янги ёки такомиллашган усулларни ишлаб чиқиш бўйича барча сай-харакатлар бактерияларни ишлаб чиқарувчи «хўжайин» сифатида кенг миқёсда қўллади. Шу билан бирга, маълумки, экспрессияланувчи пептид прокариотларда мавжуд бўлмаган посттрансляцион модификацияларни талаб қилса, дефензин ишлаб чиқариш учун турли «хўжайин» лар ҳисобга олиниши керак. Бундан ташқари, *E.coli* да рекомбинант оқсил ишлаб чиқаришда, оқсилларни эримайдиган ва тозалаш босқичлари каби баъзи муаммоларни бартараф этиш керак. Баъзи холларда *Pichia pastoris* каби хамиртурушлар, *E.coli* га нисбатан айрим жараёнлар учун масалан посттрансляцион модификацияларга нисбатан (айниқса, гликозиллашда), эрувчанликни ошишида ва гетерологик оқсилни катта миқдорда олишда баъзи афзаликларга эга. Бундан ташқари, *P.pastoris* рекомбинант оқсилнинг секрециясига имкон беради, бу тозалаш босқичларини камайтиради. *E.coli* учун маълум бўлган оқсил-ташувчилар талаб этилмайди, бу эса енгил миқёсли жараённи англатади, токсик моддаларсиз юқори зичликда ўстириш ёки иқтисодли культура мұхитларини ишлатиб этанол ишлаб чиқариш мүмкин. З-жадвалда *Pichia pastoris* va *Escherichia coli* да ўсимлик дефензинларининг гетерологик экспрессияга боғлиқ баъзи мұхим малумотлар келтирилган. Шу билан бирга, *P.pastoris*да ишлаб чиқарилган ўсимлик АМП миқдори 55 дан 748 мг/г культура мұхитида чекланган миқдорда мавжуддир. Шундай қилиб, *P.pastoris*, экспрессия учун яхши танлов “хўжайин” ҳисобланади. Ҳозирги пайтда *Escherichia coli* (*E.coli*) рекомбинант оқсил шунингдек мемранага боғланган оқсиллар олиш учун юқори даражада ген экспрессия қилувчи энг асосий организм бўлиб қолмоқда. Бактериал экспрессиянинг фойдали томонлари сифатида ушбу организмларнинг ташқи мұхит таъсирларига яхши мослашиши, ўстиришнинг осонлиги, юқори бўлинниш тезлигига эгалиги, уларни қўпайтиришнинг арzonлиги ва

хоказоларни айтиш мумкин. *E.coli* га ген экспрессия қилишнинг камчиликлари эса қўпинча трансляциядан кейинги модификациянинг йўқлигидир. Рекомбинант оқсиллар олишнинг ҳеч қандай универсал қолипдаги усули мавжуд эмас, лекин уларнинг деярли барчаси қуидаги схема асосида яратилади.

1. Донор организмдан керакли бўлган ген (ДНК) ажратиб олиниб, ферментатив гидролизланади (парчаланади, кесилади) ва бошқа ДНК (клонланадиган вектор)га уланади (тикилади), натижада янги рекомбинант молекула ҳосил қилинади.

2. Яратилган конструкция хўжайнин организм – реципиентга киритилади, бу ерда у репликацияланиш ва насл орқали алмашиниш имкониятига эга бўлади. Ушбу жараён трансформация дейилади.

3. Рекомбинант ДНКни тутган (трансформацияланган) ҳужайралар ажратиб олинади.

4. Киритилган ген асосида синтезланган специфик оқсил маҳсулоти олинади. Бу эса хўжайнин ҳужайрада киритилган рекомбинант ДНК ишлаётганидан далолат беради.

Донор организмдан керакли бўлган ген (ДНК) ажратиб олиш унчалик қийин бўлмаган босқич ҳисобланиб, генни олишда қДНКни клонлаш орқали яъни, бутун бир оқсилни кодловчи РНКга комплиментар бўлган (ревертаза) сунъий тарзда олинган ДНК орқали олиш мумкин. Хромосомал ДНК ушбу ўринда керакли натижани бермайди, унда генларга интронлар, яъни геннинг кодланмайдиган қисмлар ҳам қўшилиб қолади (Щелкунов С. Н. 2001). Бундан ташқари генни кимёвий усулда ҳам синтез қилса бўлади (Давыдова М. Е. 2002) ёки чет элдан буюртма асосида олинса ҳам бўлади. Кейинги босқичда эса ишлаб чиқармоқчи бўлаётган оқсилни самарали экспрессия қилувчи системани яъни организмни танлаб олиш керак бўлади. Кўп ҳолларда *E.coli* бактерияси ишлатилади, бундан ташқари ачитқилардан, ҳашарот ҳужайраларидан – бакуловирус системаси, сутэмизувчилар ҳужайраси ва ҳужайрасиз

экспрессия системаларидан фойдаланиш ҳам мумкин (Еремин А. Н., 2006). Экспрессион системани яратиш ўз ичига экспрессаловчи плазмидларни, экспрессия оптимумини яъни система қўп микдорда оқсил экспрессия қилиш учун зарур шароит танлашни ўз ичига олади. Бу энди жуда қийин вазифа ҳисобланиб, ҳар доим бир хил яхши натижада олиш мушкулдир. Муаммолар турли хил бўлиши мумкин – оқсил ҳужайра учун токсик бўлиши, тезда эриб кетиши, денатурацияси ва натижада керакли бўлган фаолликнинг йўқолиши ва ҳ.к. Ушбу муаммолар ҳал қилинган ҳолатда эса олинган оқсилни физик-кимёвий текширувдан ўтказиш, таҳлил қилиш, қандай ишлашини ўрганиш муҳим ҳисобланади. Агар ген муҳандислиги йўли билан олинган рекомбинант оқсил кўзланган вазифани бажармаса модификация қилиш керак. Баъзи ҳолларда эса ҳеч нарсани алмаштиришнинг кераги бўлмайди, масалан, медицина учун муҳим бўлган оқсил олинган бўлса ва олинган оқсил шундоқ ҳам яхши ишлаётган бўлса алмаштиришнинг кераги йўқ. Ўзгаришиш керак бўлган ҳолатларда эса мутагенездан фойдаланиб, мутант генлар керакли аминокислоталарни алмаштириш орқали олинади ва тизим бошидан қайта ўтказилади. Сўнгра яна натижалар анализи ўтказилади. Ҳақиқатдан керакли ва қизиқарли бўлган бирор бир оқсилни олиш учун худди шундай тажрибалар қайта-қайта ўтказилиши керак бўлади.

II БОБ. ТАДҚИҚОТЛАРДА ҚҰЛЛАНИЛГАН УСЛУБ ВА АШЁЛАР

2.1. Фойдаланилган ускуна, жиҳоз ва реактивлар

Магистрлик диссертатсия ишини бажариш давомида қуидаги замонавий илмий асбоб-ускуналардан фойдаланилди:

1. Veriti 96 well ПЦР – амплификатори, Applied Biosystems (АҚШ); +
2. BioSpec спектропотометри Nano Shimadzu Corporation (Япония);
3. Спектропотометр двух-лучевой Cary 60 , Agilent Technologies Manufacturing GmbH &Co. KG (Малайзия);
4. MULTIDOC-IT IMAGING SYST Гелни расмга олиш системаси дастурий таъминот билан, UVP (АҚШ);
5. Горизонтал электрофорез тизимлари, Cleaver (Буюк Британия).
6. Вертикал электрофорез тизимлари, Cole- Parmer (АҚШ).
7. Электрофорез ўтказиш учун ток манбаи, Consort (Бельгия).
8. Совутгичли микроцентрифуга, Hermle (Германия).9. Микроцентрифуга, Hermle (Германия).
10. Автоматик Микро Пипеткалар, Heathrow (Буюк Британия).
11. Вортекс – FVL – 2400 N, Combi-Spin BIOSAN.
12. Горизонтал оқимли ламинар шкафи, Biobase(Хитой).
13. Автоклав, Fedegari (Швейцария)
14. Стерилизатор.
15. Спиртли горелка.
16. Микроорганизмларни ўстириш учун шейкер-качалка, MRC (Израиль).
17. Бидистиллятор GFL 2104 GFL, (Германия).
18. Термостат, Memmert (Германия).
19. Электрон тарози, Kern (Германия).
20. Кимёвий идишлар ва термостабил колбалар

Керакли реактивлар:

LB- Broth (суюқ озиқ мұхитини тайёрлаш учун), LB-agar (қаттық озиқ мұхитини таёргауда өткізу учун), CaCl₂ ва ампицилин.

Бактерия штаммлари: Экспрессия системаси учун E.coli C43 (Invitrogen, АҚШ) штаммидан фойдаланилди.

Вектор конструкция: ушбу ишда pRSET_A рекомбинант вектордан ва бошқа ёрдамчи компонентлардан фойдаланилди.

0.9% агароза гель ДНК намуналарни детекция қилиш учун ишлатилади

0,9 гр - Агароза,

100 мл - 0.5x TBE буфер

Микротүлқинли печда эритилади. 40 0С бўлганда унга 7мкл этидиум бромид (1мг\мл) солинади. Хона ҳароратида сақланади.

10xTBE буфер (1 литр учун) Гель тайёрлаш учун ишлатилади.

121 гр - Трис

55 гр - Бор кислота

7,55 гр - ЭДТА

500 мл дис. сувда магнит аралаштиргич ёрдамида эритилади ва 1 литргача дис. сув қўйилади. Хона ҳароратида сақланади.

0,5xTBE буфер (1 литр учун) Гель тайёрлаш учун ишлатилади.

50 мл 10x TBE буфер

950 мл дис. сув. хона ҳароратида сақланади.

2% агарозали гельПЗР маҳсулотини детекция қилиш учун

2 гр - Агароза

100 мл - 0.5xTBE

Микротүлқинли печда эритилади. 40 0С бўлганда унга 7мкл этидиум бромид (1мг\мл) солинади. Хона ҳароратида сақланади.

Гелга намунани солиш учун бўёқ – Бромфенол кўки ва силенцианол

2,5 гр - Бромфенол кўки

2,5 гр - Ксиленцианол

10 мл - 30% глицерин

Вортексда аралаштирилади. +4 °C да сақланади.

Этидиум Бромид (1мгр\мл) ДНК занжирига бирикади ва ультрабинафша нурни қайтаради. Гельга қўшилади.

1 мг - Этидиум Бромид

1 мл - дис. сув

Вортексда аралаштирилади. Хона ҳароратида сақланади.

2.2. Экспрессия қилувчи *E.coli* бактериясининг C43 штамм компетент хужайраларини олиш

50 мм ли CaCl₂ тайёрлаш.

50 мм CaCl₂ бактерия хужайра пораларини вектор конструкция кира оладиган даражада очиб беришга ёрдам беради. Мемранадан моддаларни ўтказилишини таъминлайди. Унга қўшиладиган глицерин эса мемранани ёрилиб кетмаслигини ва мембрана майнлигини таъминлайди.

50 mM CaCl₂ни қўйидагича тайёрлашимиз мумкин:

CaCl₂* 2H₂O = 147

147 грамм CaCl₂* 2H₂O – 1000 мл – 1 М

3,675 гр - CaCl₂* 2H₂O – 50 мл - 500 mM (сток)

500 мМ CaCl_2 эритмасидан 10 мл олиб, 90 мл дистилланган сув қўшамиз, устига 17 мл 100 %ли глицерин қўшилади. Эритмани термостабил тоза колбага тайёрланади. Сўнг эритмани фильтрлаб стерилизация қилинади.

***E.coli* компетент ҳужайраларини олиш.**

- E.coli* компетент ҳужайралари қўйидаги протоколга биноан олинади:
- 1) Концентранган глицеринли *E.coli* ҳужайраларини чашкага экиш (янги тайёрланган) ва бир суткадан кейин ўсган коллониядан биттасини олинади.
 - 2) Чашкадаги ҳужайраларни (битта колониясини) 50 мл ли пробиркага 5 мл ли илитилган (37°C) суюқ муҳитга ўтказилиб, кечкуунга качалкага 37°C да 250 rpm айланиш/дақиқага ўстиришга қўйилади.
 - 3) Эрталаб 0,5 мл културани 50 мл илитилган (37°C) суюқ муҳита (250-500 мл ли конусли колбада) муҳитли колбага ўтказилиб, 37°C га 250 rpm га инкубацияга қўйилади.
 - 4) Бир соатдан кейин 600 нм да спектрофотометрда OD – оптик зичлик текшириб кўрилади (қиздирилган чироқ «Н»).
 - 5) OD 0,6 – 0,8 қийматга етганда ўсган културани 50 мл ли центрифуга пробиркаларига (тeng миқдорда) ўтказиш ва 10 дақиқага музга қўйилади.
 - 6) Совутилган холда (4°C) 2000 айл\дақ 10 дақиқага центрифугага қўйилади.
 - 7) Супернатантни олиб ташлаб, 5 мл муздек 10% ли глицерин қўшилган 0,1 М ли CaCl_2 қўшиш, чўкмани эхтиёткорона ресуспензия қилинади (ҳаммаси музда амалга оширилади).
 - 8) Пробиркаларни 15 дақиқа музда инкубирлаш.
 - 9) Кейин яна совутилган холда (4°C) 2000 айл\дақ да 15 дақиқага центрифуга қилиш.
 - 10) Супернатантни олиб ташлаб, 0,5 мл муздек 10% ли глицерин қўшилган 0,1 M ли CaCl_2 қўшиш, чўкмани эхтиёткорона ресуспензиялаш (ҳаммаси музда амалга оширилади).
- Янги 1,5 мл ли эппендорф пробиркаларини рақамлаб уларга 50 мкл дан копитент ҳужайраларини солиб қўйилади. (суюқ азотта музлатиб, -80°C да сақлаш мумкин ёки бирдан трансформацияни амалга ошириш мумкин).

2.3. pRSET_A вектор конструкцияни экспрессияловчи компетент *E.coli* бактериясининг C43 штаммига трансформация қилиш

Экспрессияловчи *E.coli* C43 ҳужайра штаммига вектор конструкцияни трансформациялаш қўйидаги протокол асосида амлага оширилади:

- 1) *E.coli* C43 компетент ҳужайраларни олиш ва уларни музда эритишиш (камиди 15 дақиқа).

- 2) 50 мкл компетент *E.coli* C43 ұхжайралар устига 10-50 нгр (ёки 1 дан 5 мкл гача) вектор құшиш.
- 3) Эплендорфларни өхтиёткорона уриб чайқатиши.
- 4) Пробиркаларни музда 20 дақықа инкубирлаш.
- 5) Пробиркаларни 1 дақықа 42°C га қўйиш, кейин яна музга 3 дақықага қолдириш.
- 6) 400 мкл илиқ(30°C) LB(суюқ озиқ) муҳитдан қўшиш ва 37°C да 30 дақықа инкубирлаш.
- 7) Одатий центрифугада 30 сония 4000 айл\дақ центрифугирлаш. Эхтиётлик билан 300 мкл чўкма устидаги суюқлик олиб ташлаш, бактерия қолдиғини ресуспензиялаш.
- 8) Бактерияларни Петри чашкасига LB-agarra(антибиотикли) муҳитга экиш.

Чашкаларни 20 -24 соат 37°C да инкубирлаш.

Чашкадаги ўсган бактерия колониясидан олиб уларни суюқ озуқали муҳитда кўпайтириб, дефензин пептидини экспрессиясини амалга оширилади.

2.4. Трансформация қилингандан *E.coli* бактериясининг С 43 штаммини индукция қилиш

Экспрессия қилинадиган оқсил (пептид)ни индукциялаш қуйидаги протокол асосида ўтказилади:

1. 3 мл ли тунги културадан 0.5 мл олиб, 50 мл (антибиотик бор бўлган, 50 мл озиқ муҳитга 50 мкл антибиотик) озиқ муҳитли 250 мл ли коник колбаларга ўтказиш ва ўстиришга 37 °C даги качалкага қўйилади.
2. Бир соатдан сўнг, 600 нм тўлқин узинлигига спектрофотометрда OD қийматини ўлчанади.
3. OD қиймати 0,6 – 1 га етгач, ўстирилаётган ҳар бир бактерия колбасига 1 M 50 мкл IPTG (1 M 50 мкл IPTG 50 мл культурага) қўшилади.
4. 37 °C да 3 соат давомида качалкада культиватция қилинади.
5. Колбалардаги култура 50 мл ли центрифуга пробиркасига ўтказилади (музда) ва 3500 об/мин 15 минут +4 °C да центрифуга қилинади
6. Супернатант олиб ташланади, чўкма 2 мл буфера A (50 mM Na₃PO₄ pH7.4 + 1mM ЭДТА) билан ресуспензия қилинади, олинган аралашма 2 та эплендорфга 1 мл дан бўлинади (барчаси музда)
7. Эплендорфлар 1 мин 13000 об/мин да +4 °C да центрифугу қилинади.
8. Супернатант олиб ташланади ва чўкма - 20 °C сақланади.

2.5. Ултратовуш ёрдамида индуксияланган E.coli бактериясининг С43 штамми хужайраларини бузиш

1. Хужайраларни ултратовуш билан парчалашдан олдин буффер эритмаларни тайёрлаш:

Буффер А 10 мл + 200 мкл Lysozym (4 мг/200 мкл) + 333 мкл DNase (сток).

2. Намуналарни ҳар бирига 900 мкл дан тайёрланган буффердан қўшиб, ресуспензия қилинади (музда)

3. Эппендорфларни 1 соатга инкубатсия учун совутгичга қўйилади, ҳар 20 минутда вортехда чайқатиб турилади.

4. Хужайраларни котта сентрафуга пробиркасига ўтказилади (50 мл) ва ултратовуш ёрдамида (22 кГц) 4 марта 1минутдан 20 секундлик танаффус билан қайта ишлов берилади (барчаси музда)

5. Ултратовуш билан ишланган хужайраларни қайта эппендорфларга кўчириб ўтказилади ва (+4°C) 14000 рпм 15 мин давомида сентрифугаланади (барчаси музда)

6. Лизат –супернатант қисм янги эппендорфга ажратиб олинади, чўкма ҳам текшириш учун сақлаб қўйилади. Барчаси – 20 °C ҳароратда сақланади

Бизга керакли бўлган оқсил лизат қисмда қолади

2.6. Ултратовуш ёрдамида бузилган бактерия хужайраларининг лизат-супернатантини 12 % ли полиакриламид гель (ПААГ) - электрофорез усулида текшириш

12 % ли Полиакриламид гелида Laemmli U.K методи бўйича электрофорез ўтказилди

Кўйида ўтказиладиган электрофорез учун керакли эритма ва буфферларни таркиби кўрсатилган

Ажратувчи гел таркиби:	
Дис.сув	3,5 мл
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 мл
Акриламид/БА 30%/0,9%	4,0 мл
10% SDS	100 мкл
10% Аммоний персульфат	50 мкл
TEMED	5 мкл

Концентранган гел таркиби:	
Дис.сув	2,7 мл
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 мл
Акриламид/БА 30%/0,9%	1,0 мл
10% SDS	50 мкл
10% Аммоний персульфат	50 мкл
TEMED	5 мкл

Электрофорез жарайони қуйдаги электр токи күчланишида амалга оширилади:

Дастлаб 20 минут 55 W, 2 соат 85 W

2.7. Трансфер - гелдаги оқсилларни нитроцеллиоза мембранага ўтказиши.

Трансфер жарайони қуйидаги протоколга биноан амалга оширилади:

Куйида ўтказиладиган Трансфер жарайони учун керакли буферни таркиби күрсатилган

10 x ли Трансфер буфер тайорлаш:

Tris base (250 mM)	30,25 gr
Glycin (1.92 mM)	142,5 gr
dis H ₂ O	1 l PH= 8,3

1 x ли Трансфер буфер тайорлаш:

10 x ли Трансфер	100 ml
dis H ₂ O	800 ml
CH ₃ -OH	100 ml PH= 8,3

1. Электрофорез амалга оширилган полиакриламид гели (ПААГ) камерадан ехтийоткорлик билан ечиб олинади, гелни маркерга нисбатан белгиланади.
2. Сендвич қилиб йеғишда ишлатиладиган нитроселлилўза мембрана, қоғозлар гел ўлчамида қирқиб тайор ҳолга келтирилади. Кичик молекуляр массага ега оқсиллар ва пептилларни трансфер қилишда 0.2 мкм ўлчамдаги нитроселлилўза мембранадан фойдаланилади.

3. Сендвич қилиб йеғилувчи барча ашёлар: 2 та мачалка, 2та қофоз, нитроселлилўза мембрана 1 x ли Трансфер буфер билан бир неча марта хўлланади
4. Сендвич қўйдаги тартибда йеғилади

Мачалка

Қофоз

Гел

Нитроселлилўза мембронадан

Қофоз

Мачалка

5. Йеғилган сендвич 1 x ли Трансфер буфер билан бир неча марта хўлланади
6. Сендвич электрофорез камерасига жойланади. Камера 1 x ли Трансфер буфер билан тўлдирилади.
7. +4 °C да 6 соат 35 W да электрофорез амалга оширилади.

2.8. His-Tag антителлалари билан Дот-блот анализини ўтказиши

Дот-блот усули Вестерн-блот усулига нисбатан тезроқ амалга оширилувчи усул бўлиб, бу усул ёрдамида лизат-супернатант ва пеллат таркибида биз учун керакли оқсил (пептид) бор ёки йўқлигини тезроқ аниқлаш имконини беради.

1. Нитроселлилоза мембрана устига семплер билан 50 мклдан икки хил намуна (Д/С ва К/С) томизилади. Мембрана маҳсус каробкага солинади ва устига бирламчи антителла эритмаси қўйилади (AB His Tag) (бирламчи анителла эритмаси қўйишдан аввал тайёрланади, AB His Tag сток ва TBS+TWEEN 20 буферидан қўйдаги нисбатда олинади: : 7,5 мл TBS+TWEEN 20 буфер ва 2,5 мкл AB His Tag сток).
Хона ҳароратида 15 минут чайқалишга қўйилади
2. Тезлик билан 3 марта TBS+TWEEN 20 буферда ювилади ва 15 минутга хона ҳароратида TBS+TWEEN 20 буферда чайқалишга қўйилади.
3. Барча TBS+TWEEN 20 буфери тўкиб ташланади, иккиламчи антителла қўшилади (иккиламчи анителла эритмаси қўйишдан аввал тайёрланади, Anti Mouse сток ва TBS+TWEEN 20 буферидан қўйдаги нисбатда олинади: : 7,5 мл TBS+TWEEN 20 буфер ва 5-7,5 мкл Anti Mouse сток).
Хона ҳароратида 15 мин чайқалишга қўйилади
4. Тезлик билан 3 марта TBS+TWEEN 20 буферда ювилади ва 15 минутга хона ҳароратида TBS+TWEEN 20 буферда чайқалишга қўйилади.
5. Барча TBS+TWEEN 20 буфери тўкиб ташланади

6. Нитроселлилоза мембрана қуритилгач, қоронғи жойда 5 мл АР буффер (РХ=9.5) +33 мкл NBT +16.5 мкл ВСИР (бу эритма қуишидан аввал тайёрланади ва тезлик билан қуилади) билан 3-5 минут чайқатилади.
7. Кўп вақт ўтмасдан нитроселлилоза мембрана қуритилади, мембранага томизилган намуналарда биз учун керакли оқсил (пептид) бўлса, айнан шу намунада қизғиши сигнал доғ ҳосил бўлади.

2.9. His-Tag антителлалари билан Вестерн-блот анализини ўтказиш

Вестерн-Блот қуидаги протокол бўйича ўтказилади:

Вестерн-блот усули ёрдамида лизат-супернатант ва пеллат таркибида биз учун керакли оқсил (пептид) бор ёки йўқлигини His-Tag ва Anti-Mouse антителлалари билан спесифик аниқлаш имконини беради.

1 Трансфер электрофорезидан кейин гел ва нитроселлилоза мембрана эҳтиёткорлик билан ечиб олинади, мембранны гелга тегиб турган қисми белгилаб олинади ва меркери бўлган бурчаги қирқиб қўйилади.

2. Нитроселлилоза мембрана маҳсус вестерн-Блот каробкасида хона ҳароратида 10 мин дис сув билан чайқатилади.

3. Тезлик билан мембрана блокираторга (20 мл) солинади ва хона ҳароратида 30 мин чайқатилади.

4. Блокиратор тўкиб ташланади ва селлилоза мембране 2-3 марта TBS+TWEEN 20 билан ювилади.

5. Бирламчи антителла эритмаси қуилади (AB His Tag) (бирламчи антителла эритмаси қуишидан аввал тайёрланади, AB His- Tag сток ва TBS+TWEEN 20 буферидан қуидаги нисбатда олинади: : 7,5 мл TBS+TWEEN 20 буфер ва 2,5 мкл AB His Tag сток).

6. Хона ҳароратида 60 мин чайқалишга қўйилади

7. Тезлик билан 3 марта TBS+TWEEN 20 буферда ювилади ва 15 минутга хона ҳароратида TBS+TWEEN 20 буферда чайқалишга қўйилади.

8. Барча TBS+TWEEN 20 буфери тўкиб ташланади, иккиламчи антителла қўшилади (иккиламчи антителла эритмаси қуишидан аввал тайёрланади, Anti-Mouse сток ва TBS+TWEEN 20 буферидан қуидаги нисбатда олинади: : 7,5 мл TBS+TWEEN 20 буфер ва 5-7,5 мкл Anti Mouse сток).

Хона ҳароратида 60 мин чайқалишга қўйилади

9. Тезлик билан 3 марта TBS+TWEEN 20 буферда ювилади ва 15 минутга хона ҳароратида TBS+TWEEN 20 буферда чайқалишга қўйилади.

10. Барча TBS+TWEEN 20 буфери тўкиб ташланади

11. Нитроселлилоза мембрана қуритилгач, қоронғи жойда 10 мл АР буффер ($\text{pH}=9.5$) +66 мкл NBT+33 мкл ВСІР (бу эритма қүйишдан аввал тайёрланади ва тезлик билан қуйилади) билан 3-5 минут чайқатилади.

12. Күп вакт ўтмасдан нитроселлилоза мембрана қуритилади, мембранның трансфер бўлган оқсиллар ичида биз учун керакли оқсил (пептид) бўлса, айнан шу керакли оқсил бендида қизғиш сигнал ҳосил бўлади.

2.10. Талон методи бўйича оқсилни металл-аффин (хелат) хроматография усули бўйича тозалаш

1. Таркибида Со +2 ионлари бўлган Талон реагентини яхшилаб ресуспензия қилинади
2. Тезлик билан 50 мкл сорбентни стрил пробиркага кўчириб ўтказилади
3. Сорбентни чўқтириш учун 700 об/мин 2 минут давомида сентрифугаланди
4. Супернатант (суюқ оқ қисм) олиб ташланади
5. 500 мкл 1 X ли Wash буфер-В $\text{pH}=7.4$ қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади
6. Сорбентни чўқтириш учун 700 об/мин 2 минут давомида сентрифугаланди
Супернатант олиб ташланади
7. 5 ва 6- амаллар қайтарилади
8. Ишлов берилган Талон сорбентига 100 -200 мкл намунадан ва 100 мкл контрол қўшилади
9. +4 С кечасига роторга қўйилади
10. 700 об/мин 3-5 минут давомида сентрифугаланди
11. Оҳисталик билан максимал миқдорда супернатант қисм -20 С га олиб қўйилади
12. Сорбент 500 мкл Washing буфер билан ювилади
13. 700 об/мин 5 минут давомида сентрифугаланди
14. Супернатант олиб қўйилади
15. 12 ва 14- амаллар қайтарилади
16. 50 мкл Elution буфер қўшилади ва ресуспензия қилиниб, 30 мин га +4 С ҳароратга роторга қўйилади
17. +4 С ҳароратда 1-1.5 минут 13000 об/мин сентрифугаланди, бизага керакли бўлган элюат олинади

2.11. Тозаланган пептидни полиакриламид гель (ПААГ) - электрофорез усулида текшириш

Талон методи бўйича металл-аффин (хелат) хроматография усулида тозаланган лизат-супернатантни 15 % ли полиакриламид гель (ПААГ) - электрофорез усулида текшириш

15 % ли Полиакриламид гелида Laemmli U.K методи бўйича электрофорез ўтказилди

Қуида ўтказиладиган электрофорез учун керакли эритма ва буферларни таркиби кўрсатилган

Ажратувчи 15 % ли гел таркиби:	
Дис.сув	3,45 мл
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3.75 мл
Акриламид/БА 30%/0,9%	7.5 мл
10% SDS	150 мкл
10% Аммоний персульфат	150 мкл
TEMED	12 мкл

Концентранган гел таркиби:	
Дис.сув	2,7 мл
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 мл
Акриламид/БА 30%/0,9%	1,0 мл
10% SDS	50 мкл
10% Аммоний персульфат	50 мкл
TEMED	5 мкл

Электрофорез жарайони қайдаги электр токи кучланишида амалга оширилади:

Дастлаб 20 минут 55 W, 2 соат 85 W

2.12. Олинган рекомбинант дефензин пептидинининг 6 та гистидин His-Tag кетма-кетлигини энтерокиназа ферменти билан қирқиши

Ферментатив реаксия қайдаги тартибда үтказилади:

Намуна оқсил	20 мг
10 x EKMax™ буфер	3 мкл
EKMax™	1-4 мкл
Деионизид сув	29 мкл гача
Умумий ҳажми	30 мкл

Моддалар аралашмаси 37°C кечасига 16 соатта инкубатсияга қўйилади. Ферментатив жараёнда энтерокиназа (EKMax™) ферменти оқсил молекуласидаги бта гистидин кетма-кетликни спектроскопик билан кесади.

2.13. Олинган рекомбинант дефензин пептидинининг антибактериал ва замбуруғга қарши биологик активлигини “икки қаватли агардаги дөғ” усули билан баҳолаш

Икки қаватли Мюллер-Хинтон (антибиотиксиз) озуқа-муҳити тайёрланади.

Петри чашкасига 1- қаттиқ Мюллер-Хинтон озуқа-муҳити қўйилади (1л дис сувга 15 г Мюллер-Хинтон) ва стерилланади. Мак-Фарланд бўйича стандарт хиалик (0.5 мл 1.175 % ли барий хларид эритрасига 99.5 мл 1% ли сулфат кислота қўшиш йўли билан 0.5 Мак Фарланд бўйича стандарт хиалик) тайёрланади. Тайёрланган 0.5 Мак-Фарланд стандартига таққослаб тест-културалар (бактерия, замбуруғлар) суспензияси тайёрланади.

Масалан 1мл тест-културалар (бактерия, замбуруғлар) суспензиясини 5 мл юмшоқ Мюллер-Хинтон (1л сувга 7.5 г Мюллер-Хинтон) билан аралаштириб, петри чашкасидаги 1- қаттиқ қават Мюллер-Хинтон озуқа-муҳити устига қўйилади. 0.5 Мак Фарланд бўйича тайёрланган тест-култура суспензияли Мюллер-Хинтон озуқа-муҳитида 30 мкл ли лункалар ҳосил қилинади ва бу лункаларга керакли микдорда ферментатив ишланган, тозаланган дефензин пептиди қўйилади. 3-5 минут давомида диффузия жараёни амалга ошади. Петри чашкалари 24 соат 37°C да инкубатсия қилинади. Петри чашкасининг битта лункаси *negative* контрол бўлса, бошқаси *positive* контрол бўлиб хизмат қиласи. *Negative* контрол антибактериал пептид инокулятни ўз ичига олмайди.

Тажриба 3 карра қайтарилиш билан ўтказилди. Инкубатсиядан сўнг антимикроб хусусиятли пептид активлигини оддий кўз билан кўриш мумкин.

2.14. Рекомбинант дефензин пептидининг физик-кимёвий хоссаларини ўрганиш (дефензин пептидининг нуклеотидлар кетма-кетлиги, аминокислоталар кетма-кетлиги, молекуляр оғирлиги, изоэлектрик нуқтаси, таркибидаги ди-сулфид боғлар сони)

ДНК works компьютер программаси ёрдамида Nigella Sativa L (кора седана) уруғидаги (Нс-Д2) дефензин генининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланди:

1

AAATTCTGCGAAAAACCGTCTGGTACCTGGTCTGGTGTTCGCGTAA
CTCTGGTGCGTGC

61

AAAGACCAGTGCATCCGCCTGGAAGGTGCGAACACGGTTCTTGCAA
CTACAAACTGCCT

121

GCGCACCGTTGCATCTGCTACTACGAATGC

Бунга кўра Нс-Д2 дефензин генининг нуклеотидлар сони 150 жуфт эканлиги аниқланди.

Nigella sativa L (кора седана) уруғидаги (Нс-Д2) дефензиннинг нуклеотидлар кетма-кетлигидан келиб чиқиб бирламчи структур тузилиши аниқланди:

Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-Leu-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

>KFCEKPSGTWSGVCGNSGACKDQCIRLEGAKHGSCNYKLPAHRCICY
YEC

Бунга кўра Нс-Д2 дефензин 50 та аминокислотадан ташкил топган эканлиги аниқланди.

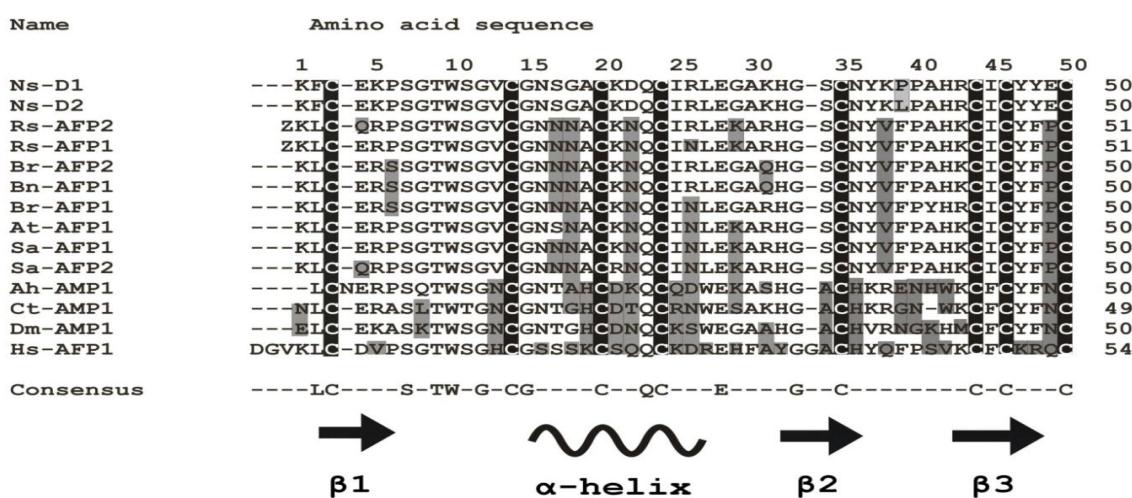
ДНК workс компьютер программаси ёрдамида Nigella Sativa L дан ажратилган Нс-Д1 ва Нс-Д2 дефензинлар аминокислота кетма-кетлигидаги ўхшашлик ва фарқлари аниқланди.

Hс-Д1: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-Pro-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

Нс-Д2: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-Leu-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

Иккита полипептид 50 та амино кислота қолдиғидан ташкил топғанлиги аниқланди, полипептидлар ўртасидаги фарқ занжирнинг 39-холатида битта ўзгариш пролин амино кислота қолдиғи лейсин амино кислота қолдиғи билан алмашғанлигидир. Ундан ташқари олинган антибиотик пептидлар аввал аниқланган *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Hippocastanaceae* оилалари уруғларидаги дефензинга гомологик эканлиги аниқланди.

Гомологик қидирудук натижалари:



13-расм. 5 қДа Дефензин билан N-учли Нс-Д1 ва Нс-Д2 амино кислота кетма-кетлигини айрим ўсимликларда солишиши.

*малумотлар базаси <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**түқ ширфт билан идентик амино кислоталарнинг қолдиғи белгиланган, кулранг билан ўхшаш қолдик белгиланган.

Дефензин таркибидаги ди-сульфид боғлар:

Дефензин таркибиде барқарорликни таъминловчи тўртта дисульфид боғини ҳосил қилувчи саккизта цистеин қолдиқлари бор эканлиги ва дефензинлар ўзида учтадан бештагача дисульфид боғларини тутиши, улар альфа-спираль атрофидаги антипараллел бета-варақни барқарорлаштириши, бу эса pH ва хароратнинг экстремал қийматларига қаршилик кўрсатиши <http://www.molbiol.ru/> манбаси орқали аниқланди.

<http://www.molbiol.ru/> манбаси орқали дефензин пептидининг изоэлектрик нуқтаси ва молекуляр массаси, амино кислоталар сифат микдори аниқланди. Қуйда ойналар кетма-кетлиги кўрсатилган.

Г аминокислотный пос... Пептидная связь являет... E-learning и медицинск... Анализ белков | molbiol |

← → ⌂ ⓘ Не защищено | molbiol.ru/scripts/01_18.html

Сервисы Google Google Переводчик ⌂ Home - PubMed - N AvikonTex в Ташкен... Фармацевтические Scopus - Search for LEX.UZ - Узбекистон Центр Геномики и ...

Анализ последовательности белка

<http://vitalonic.narod.ru/biochem/index.html>

• Дополнить Клименков Виталий,
Широкая Александра,
Адей Алексей.

Аминокислотная последовательность в однобуквенном формате:
(допускаются строчные и заглавные буквы, а также любое количество пробелов)
N-KFCEKPSGTWSGVCGNSGACKDQCIRLEGAKHGSCKNYKLPANHCYCYEC **-C**

Что рассчитывать:
 % состав
 изоэлектрическую точку
 заряд при pH =
 молекулярную массу

введенno 50 АК

Изотопный состав:
 ¹³C
 ¹⁵N
 D

Расчет!

Help

Смотри также:
/ссылки на сетевые ресурсы/
Расш. форма Скр./Откры...

-- как прислать био-картинку --

16:53 22.06.2018

Г аминокислотный пос... Пептидная связь являет... E-learning и медицинск... Анализ белков | molbiol |

← → ⌂ ⓘ Не защищено | molbiol.ru/scripts/01_18.html

Сервисы Google Google Переводчик ⌂ Home - PubMed - N AvikonTex в Ташкен... Фармацевтические Scopus - Search for LEX.UZ - Узбекистон Центр Геномики и ...

Анализ последовательности белка

<http://vitalonic.narod.ru/biochem/index.html>

• Дополнить Клименков Виталий,
Широкая Александра,
Адей Алексей.

Аминокислотная последовательность в однобуквенном формате:
(допускаются строчные и заглавные буквы, а также любое количество пробелов)
N-KFCEKPSGTWSGVCGNSGACKDQCIRLEGAKHGSCKNYKLPANHCYCYEC **-C**

Что рассчитывать:
 % состав
 изоэлектрическая точка
 заряд при pH =
 молекулярную массу

введенno 50 АК

Изотопный состав:
 ¹³C
 ¹⁵N
 D

Расчет!

Help

Смотри также:
/ссылки на сетевые ресурсы/
Расш. форма Скр./Откры...

-- как прислать био-картинку --

Результаты расчета - Google Chrome
about:blank

Длина белка: **50** аминокислот(ы)
Брутто-формула: **C₂₃₃H₃₅₉N₆₉O₇₀S₈**

Молекулярная масса: **5503.28** Да
(с учетом естественного содержания изотопов)

Изоэлектрическая точка: **pI = 9.52**

Ведите последовательность белка, выберите необходимые пункты и нажмите кнопку "Расчет!". Брутто-формула и длина белка рассчитываются независимо от выбранных пунктов. Для расчета молекулярной массы неченного белка необходимо отметить нужные изотопы. На странице "Help" рассказано о погрешности и алгоритме расчета. Трехбуквенную запись можно преобразовать в однобуквенную с помощью программы "Трёхбуквенные-однобуквенные аминокислотные последовательности". Получить последовательность белка из нуклеотидной можно с помощью программы "Трансляция нуклеотидной последовательности".

EN 16:54 22.06.2018

Результаты расчета - Google Chrome
① about:blank

Молекулярная масса: **5503.28 Da**
(с учетом естественного содержания изотопов)

Изоэлектрическая точка: **pI = 9.52**

Состав:

аминокислота	количество	%
A	3	6
C	8	16
G	6	12
V	1	2
L	2	4
I	2	4
M	0	0
S	4	8
T	1	2
F	1	2
Y	3	6
W	1	2
D	1	2
E	3	6
N	2	4
Q	1	2
H	2	4
K	5	10
R	2	4
P	2	4

EN 16:54 22.06.2018

2-боб бўйича хулоса

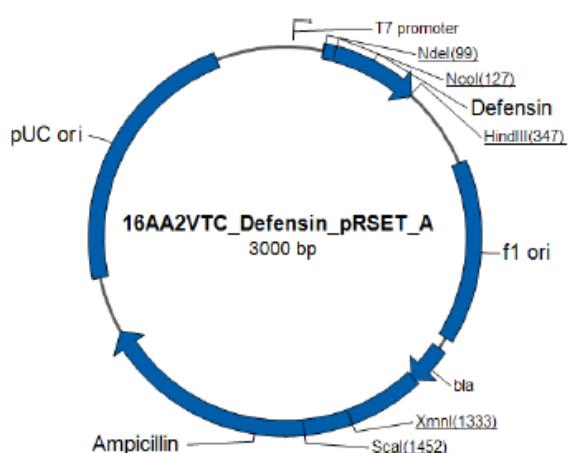
Мазкур бобда татқиқотлар давомида фойдаланилган реагентлар, асбоб-ускуналар, ҳамда қўлланилган методларнинг тавсифи, бажарилиши протоколлар асосида батафсил ёритилган. Тадқиқот давомида 8 та методдан фойдаланилганлиги баён етилган. *Nigella Sativa L* (седана) уруғидаги дефензин пептиди гени тикилган pRSET_A рекомбинант вектор конструкцияси, *E.coli* бактериясининг C43-деф продуценти тадқиқотнинг обьекти сифатида ишлатилди. Ўрганилган татқиқот методлари ва материаллари татқиқот ишининг мазмун ва моҳиятини ҳамда амалий аҳамиятини тўлиқ ёритилишига имкон беради.

З-БОБ. ОЛИНГАН НАТИЖАЛАР ВА УЛАРНИНГ ТАҲЛИЛИ

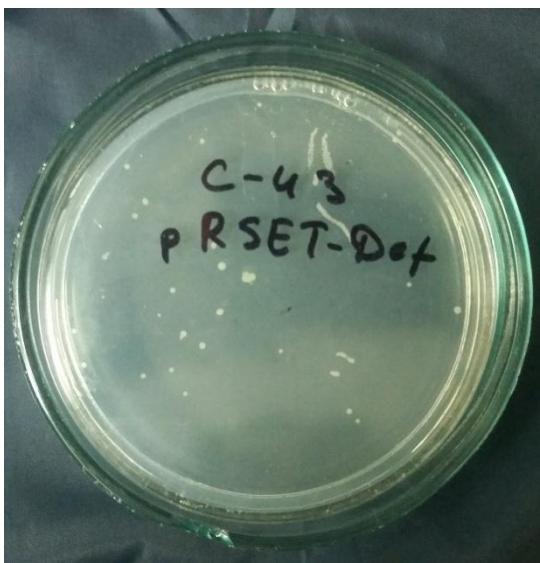
3.1 *E.coli* бактериясининг С43 штамми ва pRSET_A- Дефензин вектор конструкцияси асосида дефензин пептидининг продуцентини олиш

Дефензин пептидининг продуцентини олиш учун *E.coli* бактериясининг С43 штаммини CaCl₂ эритмаси билан ишлов бериб, штаммнинг компетент хужайраларини олдик. Бунда CaCl₂ эритмасининг вазифаси шуки бактерия хужайра пораларини вектор конструкция кира оладиган даражада очиб бериш билан бирга мембранадан моддаларни ўтказилишини ҳам таъминлашдир. CaCl₂ эритмаси таркибидаги глицериннинг вазифаси эса мембрани ёрилиб кетмаслигини ва мембрана майнинлигини бир ҳил меёрда ушлаб туришдир. Компетент хужаралар бу CaCl₂ эритмаси билан ишлов берилган, поралари очик, трансформатсияга тайёр ҳолатдаги бактерия хужайралар колониясидир. Олинган компетент С43 штамми хужайраларига лабаротория шароитида олинган таркибида дефензин пептиди генини тутувчи pRSET_A-дефензин вектор конструксиясини хит-шок методи бўйича трансформатсия қилдик. Хит-шок методи ҳароратнинг бирданига кескин кўтарилиб тушишига асосланган бўлиб, бунда биз копитент *E.coli* С43 ҳужайрамизнинг 50 мкл миқдорига 5 мкл pRSET_A-дефензин векторини қўшиб, эппендорфларни эҳтиёткорона уриб чайқатдик. Бактерия солинган пробиркаларни 20 дақиқа музда, 1 дақиқа 42°Cда инкубирладик кейин яна 3 дақиқа музда ушлаб турдик. Бунга сабаб совук ва иссиқ ҳароратда бактерияларнинг поралари кенгайиб вектор-плазмидлар хужайра ичига киришга имкон бўлади. Олинган чўкма бактерияларни Петри чашкасидаги LB-агар га(антибиотики) экдик ва чашкаларни 37°C да 20 -24 соатга инкубирлаш учун термостатга қўйдик. Бактерияларни антибиотики LB-агар га экишдан мақсад трансформацияга учраган бактерияларни ажратиб олишдир. Бунга кўра муҳитда трансформатсияга учраган бактериялар ўсиб, трансформацияга учрамаган бактериялар нобуд бўлади. Бунга сабаб бактерия хужайрасига киритилган pRSET_A-дефензин вектор конструксиясида дефензин гени билан

биргаликда селектив танлашни осонлаштирувчи ампителиин антибиотикига чидамлилик гени ҳам бор эканлигидир. Ампителиин антибиотикига чидамлилик маркерига кўра селектив танлашни амалга оширидик ва pRSET_A-дефензин вектор конструксиясини ўзида тутувчи *E.coli* C43 [De3] pRSET_A-Дефензин штамм бактерия ҳужайраларини олдик. Олинган бактерия штамми биз кўзлаган дефензин пептидини синтез қилувчи яни трансформатсияга учраган бактерия ҳужайраларири. Ишнинг кейинги босқичида чашкадаги ўсган бактерия колониясидан олиб 3 мл ли озиқ-мухитга ўтказдик ва 16 соат қултуватсия қилдик. Дефензин пептиди генини C43 бактерия штаммиде экспрессиялаш учун pRSET_A-дефензин конструкцияси танланди. Бу векторга хос хусусият шуки, *E.coli* ҳужайрасида рекомбинант оқсил экспрессия қила олади ва ампителиин антибиотикка чидамлилик генини тутади. Бундан ташқари вектор ўз ичига полилинкер яқинида Ҳис-Таг учини кодлайдиган кетма-кетлик сайтини олади. Антитана ана шу Ҳис-Таг гистидинли нишонни ўзига боғлаб олади ва дефензин пептидини бошқа оқсиллардан тозалаб олишда муҳим саналади. Яни Co^{+2} ёки Ni^{+2} - таркибли ташувчида хромотография ўтказиш анчайин осонлашади, бундан ташқари аффин хромотографиядан кейин ортиқча амино кислоталардан қутилиш учун кесувчи энтеркиназа сайти ҳам бор. S-таг региони пептидини ҳужайра мембранасидан ташқарига чиқарилиш ва оқсилнинг бирмунча турғунлигини таъминлаш вазифасини бажаради.



4-расм. Дефензин генини тутган pRSET_A-Дефензин вектор конструксиясининг харитаси.



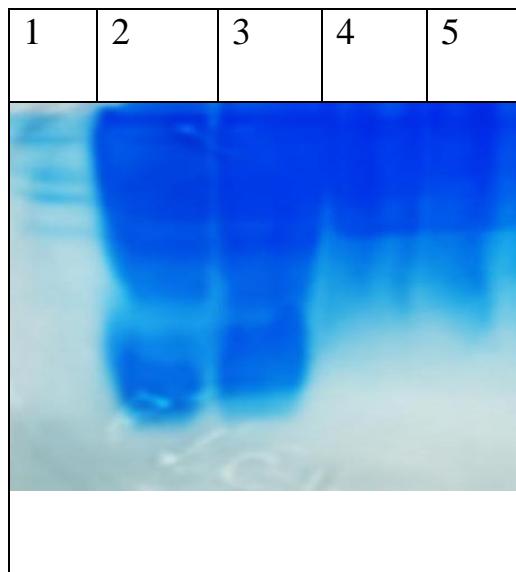
5-расм. pRSET_A-Дефензин вектор конструксиясини трансформация ва ампитсилинили мұхитда селексия қилингандан кейинги Петри чашкасида ўсиб чиқган *E.coli* C43 штаммлари колонияси

Хулоса қилиб айтганда трансформация ва ампитсилинили селексия натижаси ампитсилини озуқа мұхити LB агарда бактерия колониясининиг ўсиб чиқғанлыгидир (5-расм).

3.2 Рекомбинант дефензин экспрессияловчи *E.coli* C43 штамм хужайрасида экспрессия шароитини оптималлаштириш ва Ҳис-Таг антителлалари билан Вестерн-блот ва Дот-блот усулида дефензин пептидини сифат анализ қилиш

Локтоз промотор индуксияси оптимал параметрини аниқлаш учун, 0.4-1.2 оптик зичлик диапазонда 600 нм түлкін узунлигіда бактериал хужайралар култиватсиясини оптик зичлик бўйича саралаш йўли билан экспрессияловчи *E.coli* C43 штамм хужайраларини оптимал концентратсиясини аниқладик, яни локтоз промотор бўлған 1M ли IPTG - индукторини қўшдик ва 3 соатга инкубатсияга қўйдик. Бу индуксия давомида IPTG-промотор тасирида дефензин пептидининг экспрессияси кучайди. Хужайраларни ултратовуш билан парчалаш қўйдаги режим билан ўтказилди: имулсия режими, кучи- 50 %, давомийлиги -30 секунд, танаффус – 2 минут, 5 та сикл. Локтоза промотори индуксияси ва ферментатсиядан кейин рекомбинант пептидни аниқлаш учун 15% ли ПАГЕ-гелида трансформация қилинмаган контрол хужайра лизати ва дефензин экспрессия қилинган хужайра лизатлари электрофорез ва

хужайра лизатидаги дефензин пептидининг гистидин маркери учун нитроселлилоза мембранада ҳис-таг ва анти-моусе антителлали билан Дот-блот ва Вестр-Блот анализи ўтказилди.

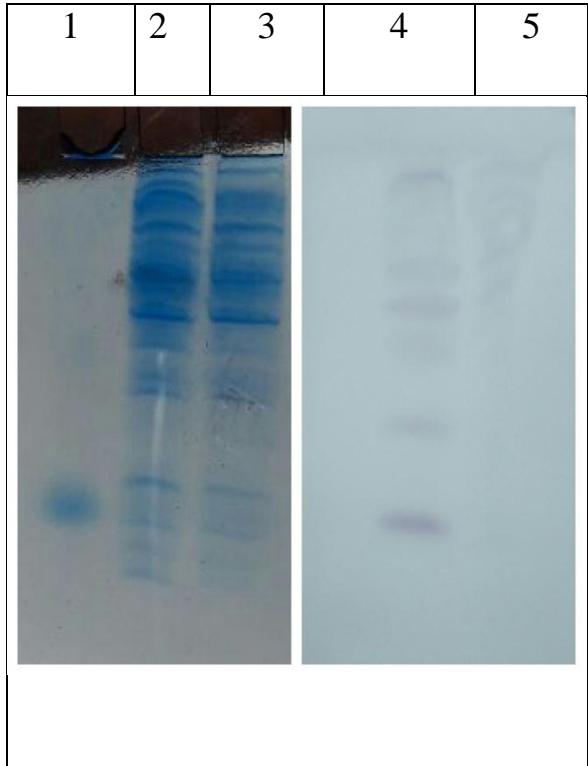


6- расм. Электрофорез малумоти кўрсатилган.



7-расм. Контрол ҳужайраларга қарши рекомбинант дефензин экспрессияловчи C43 ҳужайра лизатининг Дот-блот тахлил натижалари.

Антителла сифатида 6 та гистидин кетма-кетлигига қарши His-Tag антителлари, иккиламчи антителла сифатида Anti-mouse конюгат ва ишқорий фосфатаза ишлатилди.



1- колонка –маркер

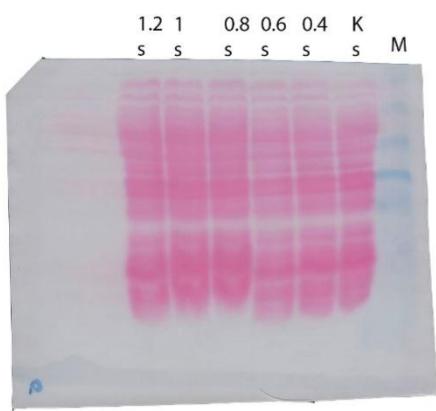
2- колонка –лизат C43 дефензин;

3–колонка-контрол

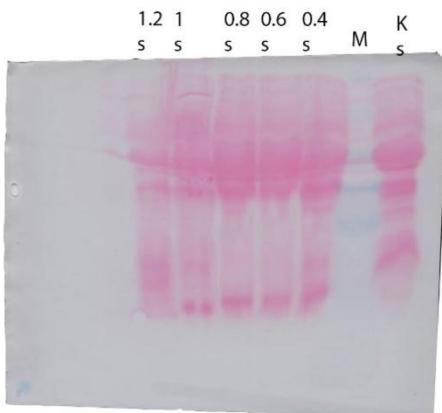
8- Расм. С43 ҳужайрасидан ажратилган His-Tag рекомбинант оқсилига қўйилган электрофорез кейинги босқичида амалга оширилган антителлали Вестр-блот анализи натижалари

ПАГЕ гел- электрофорез натижалари ва келгуси Вестерн-Блот тахлил натижаларидан кўриниб турибдики 600 нм тўлқин узунлигига оптимал оптик зичлик ОД 1,0 ни кўрсатди ва бу концентратсия индуксиясида рекомбинанат дефензиннинг миқдори кўпроқ бўлди.

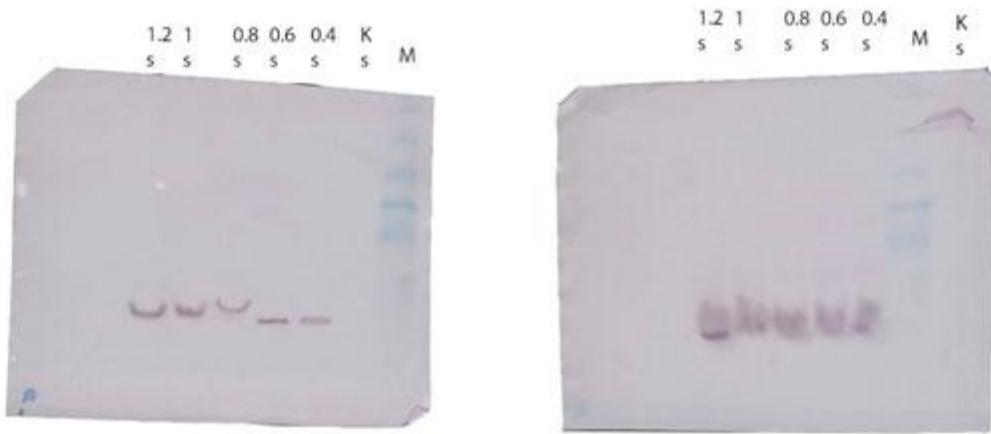
Кейинчалик индуксияни ҳужайра оптик зичлиги ОД 1,2 га етгунча 600 нм тўлқин узунлигига ўтказилди.



A



B



9-расм. Рекомбинант дефензин экспрессиясини мухтининг културал-бактериал оптик зичлигига ОД 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 боғлиқлигини кўрсатувчи натижалар.

А – *E.coli* C43-Дефенсин ҳужайралари лизати

В – *E.coli* C43-Дефенсин ҳужайралари чўкмаси

Юқори панел Понсеау Стайннинг барча оқсил фраксилари,

Пастки панел Ҳис-Таг га қарши Вестерн Блот тахлил натижалари

Вестрн-блот тахлил натижалари ҳар-хил молекуляр массали экспрессияланган дефензин бор эканлигини аниқлади, шу билан бирга экспрессия натижасида дефензиннинг нафақат мономер шакланишлари балки шу пептиднинг ди-тетрамер кўринишдаги шакллари бўлиши мумкинлигини кўрсатди.

Хулоса қилиб шуни айтиш керакки, трансформация, селектив танлаш ва оқсил экспрессия индуксиясидан кейин олинган Дот-блот, гел электрофорез ва Вестрн-блот тахлил натижалари *E.coli* C43 штамм ҳужайра лизатида рекомбинант дефензин бор эканлигини кўрсатди.

3.3 Талон методи бўйича Co^{2+} иони таркибли сефароза шарикларда металл-аффин (хелат) хроматография усули билан рекомбинант дефензинни тозалаш ва полиакриламид гель (ПАГЕ) – электрофорез усулида текшириш

Металл-аффин хромотография методи асосида органик бирикмларнинг бази металл ионлари билан турли хил боғланишлари ётади.

Металл ионлари ёрдамчи субстратда (силикогел, агароза, сефароза, тикилган сополимер полистирол ва дивинилбензол) имобилланган полидентант лиганди билан хелотирит қилинган. Биринчи бўлиб металл-аффин хромотография консепсияси Порат томондан шаклланган ва тақдим этилган. Металл-аффин хромотография асосида машхур ўтувчи метал ионларининг (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) сув эритмасида гистидин ёки систеин билан боғланиши кузатилади.

Кейинчалик оқсилни фраксиялаш учун зич фраксия қилинган металл ионларини ишлатиш фикри пайдо бўлди. Коидага кўра метал ионларининг комплекс шакллантириш реаксияси ва бази органик молекула гуруҳларининг бирикиш реаксияси (масалан фосфат гуруҳлари) қайтар жараёндир. Шунингдек иммобилланган метал ионларини сорбент сифатида ишлатиш мумкин. Тасир жараёнида сорбент ва аналит рН кўрсаткичи ўзаро бир- бирига боғлиқ, шунинг учун рН ни ўзгаририб, буфернинг ион кучини камайтирган ҳолда, ёки бошқа хелатланган агентларни ишлатган ҳолда (масалан ЭДТА ёки имидазол) боғланган моддаларни элиюрлаш мумкин. Мах нинг энг машхур дастурларидан бири бу гистидин белгили оқсилни (His) тозалашдир. Мах нинг муҳмроқ кўллаш майдонларидан бири, нисбатан боғланиш кучи юқори ва 6 та ёки ундан кўпроқ гистидин қолдиқ таркибли айrim металларнинг эпитомга спетсификлиги натижасида рекомбинант оқсилни тозалаш ҳисобланади.

Бу усул хаттоки тозалашнинг биринчи босқичида кўп ҳолатларда оқсил препарати тозалигини шундай даражасига олиб келадики, машхур биохимия масалаларини ечиш учун ҳам етарли бўлади. Белгининг уни структураси, яни унинг ҳолати, кетма-кетлиги ва узунлиги, оқсил ишлаб чиқариш прессии тезлигига, металл-аффин сорбент боғланиш имкониятига, уч ўлчамли оқсил структураси шаклланишига, оқсил кристаллари шаклланишига ва кам даражада унинг эриши ва активлигига. Кенг тарқалган His учли форма бу 6 та гистидин кетма-кетлик қолдигидан

иборат бўлиб у металлар билан етарли даражада боғланади ва кўпроқ ассотсатсия/дисотссасия мувозанатини кўп ҳолларда стабил боғланишга олиб келувчи ассотсатсия томонига суради. Шунингдек биз томондан олинган рекомбинант конструксия N-учли пептидида 6 та гистидин қолдиғини ўз ичига олади, шунинг учун ҳам металл-аффин хроматография методи рекомбинант дефензинни тозалаш учун муваффақиятли қўлланилди. Тозалаш учун Clon Tech компаниясининг Co^{2+} сефарозли шариклари ишлатилди. Тозалаш муҳтини оптимизатсияси учун Талон ва лизат ҳужайраларини микдорини умумий ҳажми 700 мкл бўлган нисбатда олинади:

Талон – 100 үл; Лизат- 100 үл

Талон – 100 үл; Лизат - 200 үл

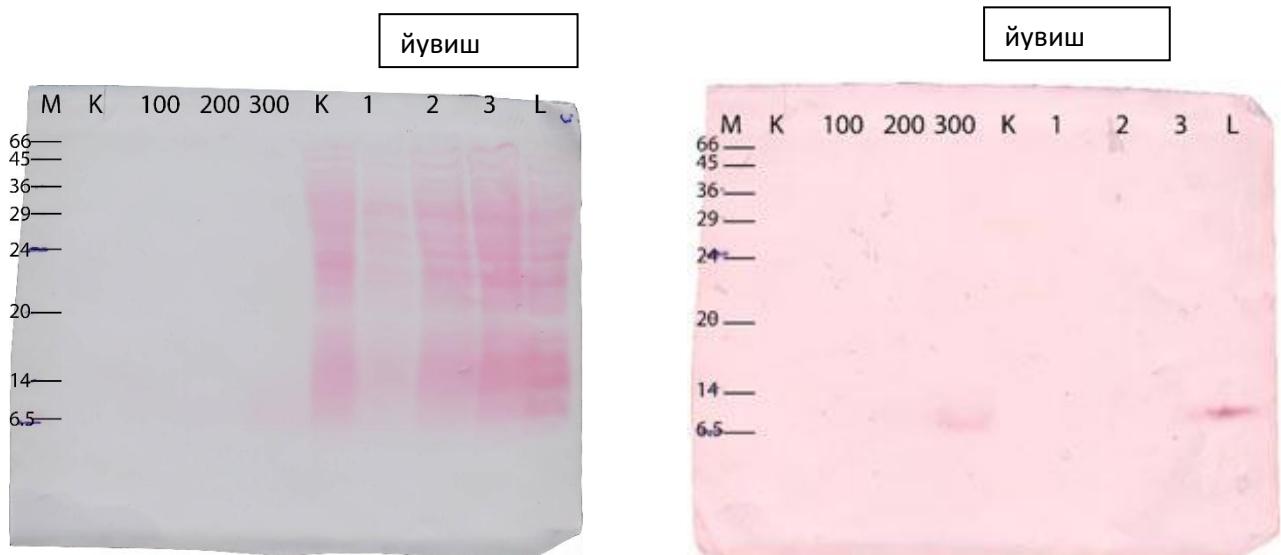
Талон – 100 үл; Лизат - 300 үл

Талон – 100 үл; Лизат 200 үл контрол

Хужаяраларни ултратовуш билан парчалнишида ингбитор протеаз қўшимчаси билан буфер А да ўтказилди. Хужаяраларни ултратовуш билан парчаланиши қўйдаги режимда ўтказилди: импулс режими, кучи -50 %, давомийлиги -30 секунд, танаффус- 2 минут, сикл-5 та.

9-расмда кўрсатилганидек, 100 мкл Талонга 300 мкл *E.coli* лизат ҳужайраси нисбатида, экспрессия дефензини тозаланган пептид микдори детексия учун етарли даражада олиняпти.

Total volume 700 үл



10- расм. Ponceau stain ва Western blot:

М –молекуляр массали Маркер;

К – контрол; 100 – 100 μl – лизат;

200- 200 μl – лизат; 300-300 μl – лизат;

К' – контрол, боғланмаган пептидни ювилиши;

1- 100 μl – лизат, боғланмаган пептидни ювилиши;

2- 200 μl – лизат, боғланмаган пептидни ювилиши;

3- 300 μl – лизат, боғланмаган пептидни ювилиши;

Л- лизат

3.4 Олинган рекомбинант дефензин пептиди молекуласидаги полигистидин His-Tag кетма-кетликдан иборат дум қисмни энтерокиназа ферменти билан олиб ташлаш

Тозалашнинг охирги босқичида 1 Юнит концентратсиядаги фермент 120 мкг оқсилдаги полигистидин доменни энтерокиназа ферменти ЕКМахTM ёрдамида ажратиб олиш жараёни ўтказилди, реаксия 37 °С да 16 соат давомида амалга оширилди.

Тозаланган фраксия юқори эффектив суюқлик хроматография методи билан таҳлил қилинди.

Анализ шароити:

Автоматик намунларни саралаб олиш ва Хроматограф Агилент Agilent Technologies 1260 ДАД детектори билан.

Колонка: 4,6x150 мм Eclipse ХДБ C18, 5 μm .

Ҳаракатдаги фаза : А – 0,1% Учторуксус кислотаси, В – Ацетонитрил
Оқим тезлиги - 1 мл/мин

Градиент: % ацетонитрил минутда.

0% –0-5 мин

40%– 15-20 мин

0% – 23 мин

226 нм да сўрилиши, референт – 360 нм

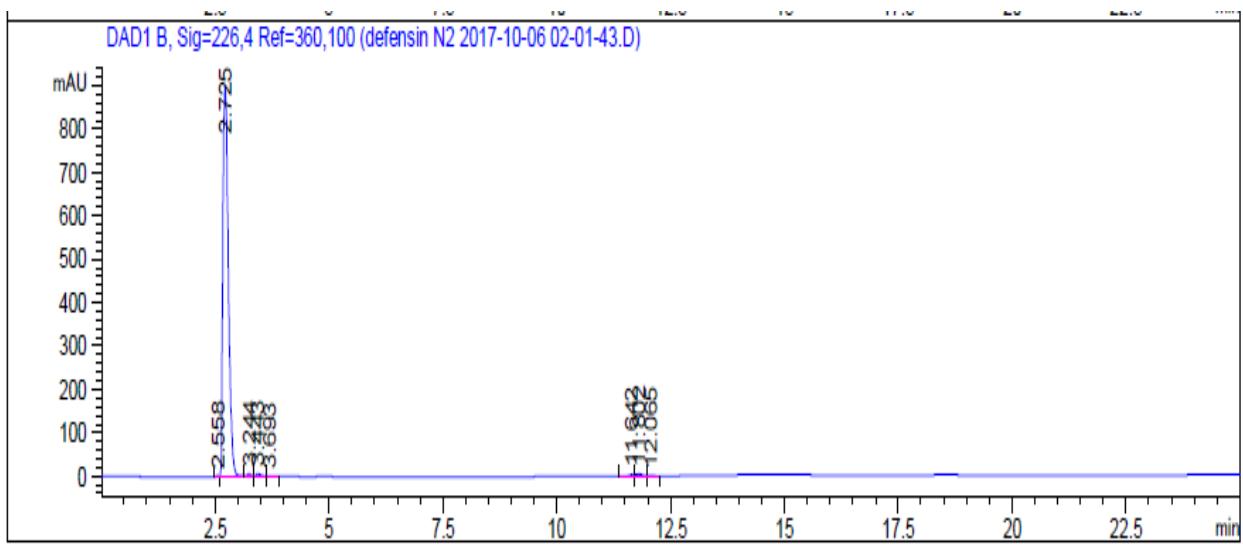
Анализ қилинаётган намуна концентратсияси – 1 мг/ мл

Қўшиладиган намунанинг ҳажми-5 мк л

Анализ давомийлиги – 23 мин.

Юқори эффектив суюқлик хроматография методи билан тозаланган дефензиннинг тозалик даражаси 98% эканлиги аниқланди.

Бу тозалик даражаси дефензин асосида ишлаб чиқариладиган дори-препаратларни тайёрлаш учун етарли бўлади.



11-расм. Металл-аффин хроматография ва энтерокиназа ферменти билан қайта ишлангандан сўнг дефензиннинг Юқори эффектив суюқлик хроматографияси

3.5 “Икки қаватли агардаги дөғ” усули билан олинган рекомбинант дефензин пептидинининг антибактериал ва замбуруғга қарши минимал ингибирлаш концентратсиясини аниқлаш

Ҳозирда бактерияларнинг антимикроб агентларига сезирлигини аниқловчи методлар жуда кўп. Метод танлашда қўйдаги омилларга асосланилади: амалиётда қўлланилиши, мослашувчанлиги, нархланиши, кўп микдорда ишлаб чиқарилиши, аниқлиги ва индивудал абзаллиги.

Натижаларни солиштириш ва антимикроларнинг активлигини аниқлаш методининг стандартлашишига эришиш учун: методларни саралаш, қайсики, малумотларни аниқ ва қайта ишлаб чиқаришни тамилловчи, ҳам сифатий ҳам микдорий антимикроларни баҳолаш, антимикроб агентларни бошқарувчи сифатида ишлатилиши учун ва кейинчалик натижаларни талқин қилиш учун сараланади.

Пептиднинг антимикроб активлигини скрининг қилиш учун биз икки қаватли агардаги модификатсияланган доғ методини қўлладик. Тест қилинаётган антибактериал модданинг микро миқдорида антимикроб ёки замбуруғга қарши активлиги мавжудлигини аниқлаш ва битта чашка Петрида кўп микдордаги намуналарни ишлатиш имконини беради, модификатсион метод йўли билан озуқа моддасини мухим даражада қисқартиради. Моддаларнинг антимикроб активлигини аниқлаш учун ишлаб чиқилган икки қаватли агардаги доғ методи антимикроб пептидларга индикатор штаммларнинг сезгир скрининги учун самарали ва ҳамён бопдир.

Антимикроб хусусиятни аниқлаш учун Тест култура сифатида *S.aureus*, *C.albicans* ишлатилди. Текширилаётган дефензин 7,5мкг/мл дан 26 мкг/мл гача концентратсияда эди.



1- 18 мкг/мл;

2- 9 мкг/мл;

3- 4,5 мкг/мл;

4-контроль (лизат)

***C.albicans* (бактерия)**



1- 7.5 мкг/мл;

2- 3.75 мкг/мл;

3- 1.87 мкг/мл;

4- контроль (лизат)

***S.aureus* (замбуруғ)**

12-Расм. Рекомбинант дефензиннинг

антимикроб ва фунгисид активлигини аниқлаш

Петри чашкасининг битта лункаси *negative* контрол бўлса, бошқаси *positive* контрол бўлиб хизмат қилади. *Negative* контрол антибактериал пептид инокулятни ўз ичига олмайди. Тажриба 3 карра қайтарилиш билан ўтказилди. Инкубатсиядан сўнг антимикроб хусусиятли пептид активлигини оддий кўз билан кўриш мумкин.

Қилинган ишнинг натижаси шуни кўрсатдики, *C.albicans* учун рекомбинант дефензин минимал концентратсияси бактеростатик эффест кузатилганда 9 мкг/мл, *S.aureus* учун эса 7,5 мкг/мл га тенг.

3.6 Рекомбинант дефензин пептидининг физик-кимёвий хоссаларини ўрганиш (дефензин пептидининг нуклеотидлар кетма-кетлиги, аминокислоталар кетма-кетлиги, молекуляр оғирлиги, изоэлектрик нуктаси, таркибидаги ди-сулфид боғлар сони)

ДНК workс компьютер программаси ёрдамида *Nigella Sativa L* (кора седана) уруғидаги (Нс-Д2) дефензин генининг нуклеотид кетма-кетлиги аникланди:

1

AAATTCTGCGAAAAACCGTCTGGTACCTGGTCTGGTGTTCGCGGTAA
CTCTGGTGCGTGC

61

AAAGACCAGTGCATCCGCCTGGAAGGTGCGAACACGGTTCTGCAA
CTACAAACTGCCT

121

GCGCACCGTTGCATCTGCTACTACGAATGC

Бунга кўра Нс-Д2 дефензин генининг нуклеотидлар сони 150 жуфт эканлиги аникланди.

Nigella sativa L (кора седана) уруғидаги (Нс-Д2) дефензиннинг нуклеотидлар кетма-кетлигидан келиб чиқиб бирламчи структур тузилиши аникланди:

Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-Leu-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

>KFCEKPSGTWSGVCGNSGACKDQCIRLEGAKHGSCNYKLPAHRCICY
YEC

Бунга кўра *Nigella sativa L* (қора седана) уруғидаги Нс-Д2 дефензиннинг аминокислоталарининг сифатий кетма-кетлиги ва сони 50 та эканлиг аниқланди.

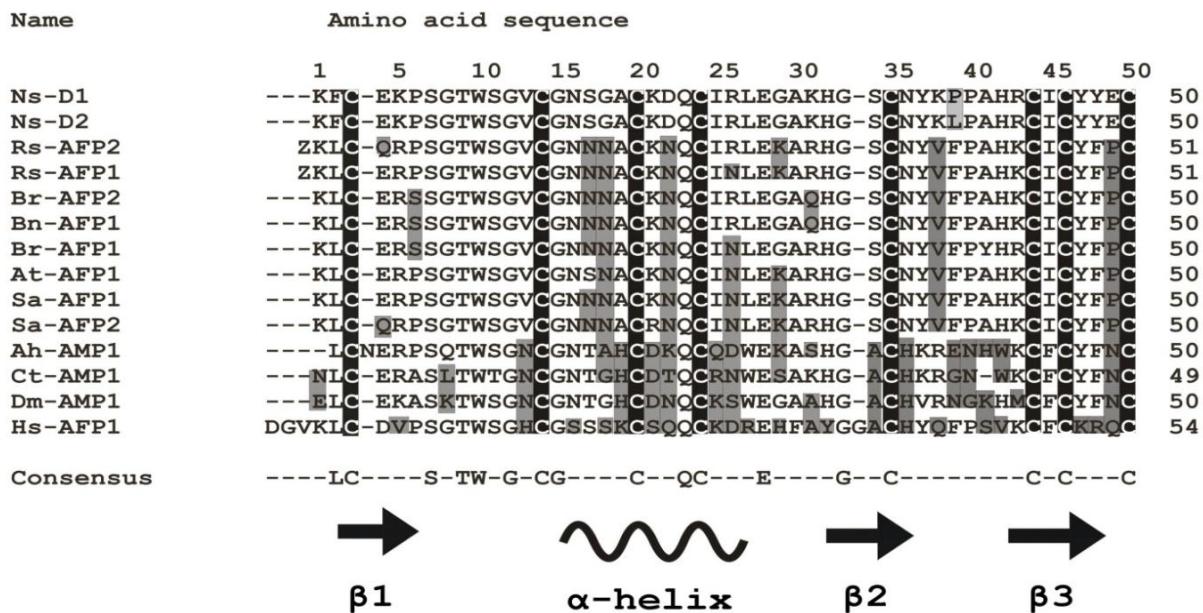
ДНК воркс компьютер программаси ёрдамида *Nigella Sativa L* дан ажратилган Нс-Д1 ва Нс-Д2 дефензинлар аминокислота кетма-кетлигидаги ўхшашлик ва фарқлари аниқланди.

Нс-Д1: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Pro**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

Нс-Д2: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Leu**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

Иккита полипептид 50 та амино кислота қолдигидан ташкил топганлиги аниқланди, полипептидлар ўртасидаги фарқ занжирнинг 39-холатида битта ўзгариш пролин амино кислота қолдиги лейсин амино кислота қолдиги билан алмашганлигидир. Ундан ташқари олинган антимикроб пептидлар аввал аниқланган *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Hippocastanaceae* оилалари уруғларидағи дефензинга гомологик эканлиги аниқланди ва инвирто тестида юқори антимикроб активликни кўрсатади.

Гомологик қидирудук натижалари:



13-расм. 5 кДа Дефензин билан N-учли Нс-Д1 ва Нс-Д2 амино кислота кетма-кетлигини айрим ўсимликларда солишиши.

*малумотлар базаси <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**түқ ширфт билан идентик амино кислоталарнинг қолдиғи белгиланган, кулранг билан үхашаш қолдиқ белгиланган.

<http://www.molbiol.ru/> манбаси орқали дефензин пептидининг изоэлектрик нұқтаси ва молекуляр массаси, амино кислоталар сифат міндері анықланды.

Анализ последовательности белка

Аминокислотная последовательность в однобуквенном формате:
(допускаются строчные и заглавные буквы, а также любое количество пробелов)

N: KFC-EKPSGTWSGVCGNSGACKDQCIRLEGAHG-SCNYKPPAHCICYYEC

Что рассчитать:

- % состав
- изоэлектрическую точку
- заряд при pH = []
- молекулярную массу

Изотопный состав:

- ^{13}C
- ^{15}N
- D

Расчет!

Смотрите также:
/ссылки на сетевые ресурсы/
Разн. формы Скр. / Открыть

-- как прислать био-картинку --

Ведите последовательность белка, выберите необходимые пункты и нажмите кнопку "Расчет!". Брутто-формула и длина белка рассчитываются независимо от выбранных пунктов. Для расчета молекулярной массы неченного белка необходимо отметить нужные изотопы. На странице "Ново" рассказано о погрешности и алгоритме расчета. Трехбуквенную запись можно преобразовать в однобуквенную с помощью программы "Трехбуквенное-однобуквенное аминокислотные последовательности". Получить последовательность белка из күмпелтидной можно с помощью программы "Трансляция күмпелтидной последовательности".

Анализ последовательности белка

Аминокислотная последовательность в однобуквенном формате:
(допускаются строчные и заглавные буквы, а также любое количество пробелов)

N- KFCEKPSGTWSGVCGNSACKDQCLLEGAKHGSCNYKLPRHICYYEC -C

Что рассчитать:
 % состав
 изоэлектрическая точка
 заряд при pH =
 молекулярную массу

введенно 50 АК

Расчет!

Смотрите также:
[/ссылки на симиларные ресурсы/](#)
[Расч. формула](#) [Скр./Открыть](#)

... как пристать био-картинку ...

Длина белка: **50** аминокислот(ы)
Брутто-формула: **C₂₃₃H₃₅₉N₆₉O₇₀S₈**

Молекулярная масса: **5503.28** Да
(с учетом естественного содержания изотопов)

Изоэлектрическая точка: **pI = 9.52**

Состав:		
аминокислота	количество	%
A	3	6
C	8	16
G	6	12
V	1	2
L	2	4
I	2	4
M	0	0
S	4	8
T	1	2
F	1	2
Y	3	6
W	1	2
D	1	2
E	3	6
N	2	4
Q	1	2
H	2	4
K	5	10
R	2	4
P	2	4

Дефензин таркибидаги ди-сульфид боғлар:

Дефензин таркибида барқарорликни таъминловчи тўртта дисульфид боғини ҳосил қилувчи саккизта цистein қолдиқлари мавжуддир. Асосан, дефензинлар ўзида учтадан бештагача дисульфид боғларини тутади, улар альфа-спираль атрофидаги антипараллел бета-варақни барқарорлаштиради, бу эса pH ва хароратнинг экстремал қийматларига қаршилик кўрсатади. Бу молекуларда дисульфид бирикмаларнинг асосий роли учламчи структурани барқарорлаширишдир: альфа-спираль, бета-

лист ёки альфа-спираль бета-лист билан биргаликда. Антимикроб пептидларнинг бу кенжасини дефензин деб атала бошланди.

Ажабланарли томони шундаки, дефензин молекуларини йигишида иштирок этган цистеин қолдиқлари дисульфид боғларини ҳосил қилишга қодир бўлмаган аналог билан алмаштирилиши мумкин. Бунда фунгицид ва антибактериал фаоллик йўқолмайди.

ХУЛОСА

1. Ўзбекистонда биринчи бор *Nigella Sativa L* (қора седана) уруғидан ажратилган антимикроб Нс-Д2 дефензин пептидининг рекомбинант формасини олиш технологияси ишлаб чиқилди.
2. Рекомбинант дефензин экспрессияловчи *E.coli* бактериясининг С43 штамм хужайраларида рекомбинант дефензиннинг экспрессия шароити оптималлаштирилди.
3. His-Tag антителлали Вестерн-блот анализи ва ПАГЕ-гел электрофорез методи билан олинган производент С43-Деф штамм хужайралари лизатида рекомбинант дефензин пептиди бор эканлиги тасдиқланди.
4. Металл-аффин хроматография методи билан His-Tag белгили рекомбинант дефензинни тозалаш ва энтерокиназа ферменти ёрдамида бта гистидин кетмакетликдан иборат дум қисмни олиб ташлаш шароити ишлаб чиқилди ва оптималлаштирилди.
5. Минимал ингибирлаш концентратсия методи билан олинган рекомбинант пептидининг антимикроб ва фунгисид активлигини аниқловчи тест система ишлаб чиқилди.
6. Олинган рекомбинант дефензин фраксиясини *C.albicans* ва *S.aureus* микроорганизмларига қарши антимикроб ва фунгисид активлиги аниқланди.
7. Олинган рекомбинант дефензин пептидининг физик-химёвий хоссалари DNKworks ва <http://www.molbiol.ru/> программыси ва <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> малумотлар базаси ёрдамида ўрганилди.

АДАБИЁТЛАР РҮЙХАТИ

1. Sergio H., Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. //Electronic Journal of biotechnology. – 2002. – Vol. 6. – P. 273-275.
2. Huang H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – P. 8347-8352.
3. V. Mosolov and T. A. Valueva. Proteinase inhibitors and their functions in plants: a review // Biochemistry and microbiology – 2005 – Vol.41, pp. 227-246
4. Thomma B.P.H.J., Cammue B.P.A., Thevissen K. Plant defensins. //Planta. – 2002. – Vol. 216. – P. 193-202.
5. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. //Nature Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 3. – P. 710-720.
6. H. Kaku, Y. Nishizawa, N. Ishii-Minami, Ch. Akimoto-Tomiyama, N. Dohmae, K. Takio, E. Minami and N. Shibuya. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. //PNAS – July 18, 2006 – Vol. 103 – №. 29 – P. 11086–11091
7. Nakajima Y., Ishibashi J., Yokohiro F., Asaoka F., Taylor D., Yamakawa M. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. //Biochim. Biophys. Acta. – 2003 – Vol. 5. – № 1624 – P. 125-30.
8. H.M. Do, S.C. Lee, H.W. Jung, K.H. Sohn, B.K. Hwang, Differential expression and *in situ* localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*, Plant Sci. 166 (2004) 1297-1305.
9. Van Loon L.C., Van Strien E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. //Physiol. Mol. Plant Pathol. – 1999. – Vol. 55. – P. 85.
10. Fritig B, Heitz T, Legrand M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. //Curr. Opin. Immunol. – 1999. – Vol. 10. – № 1. – P. 16-22.

- 11.P. Bulet, R. Stöcklin, Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation, Protein Pept. Lett. 12 (2005) 3-11.
- 12.G.-H. Chen, M.-P. Hsu, C.-H. Tan, H.-Y. Sung, C.G. Kuo, M.-J. Fan, Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from azuki bean, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 982-988.
13. L. Da-Hui, J. Gui-Liang, Z. Ying-Tao, A. Tie-Min, Bacterial expression of a *Trichosanthes lirilowii* defensin (TDEF1) and its antifungal activity on *Fusarium oxysporum*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 (2007) 62-75.
14. Hancock R.E.W., Chdpple D.S.In vitro antibacterial activities of platelet microbiocidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. //Antimicrob. Agentsand Chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – № 6. – P. 1317.
15. Ferry N. Transgenic plants for insect pest control. A forward looking scientific perspective. //Transgenic Res. – 2006, - Vol. 15. – P. 13–19.
16. Broekaert W.F., Terras F.R.G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N.V., Osborn R.W., Kester A., Rees S.B., Garcia-Olmedo F., Segura A., Moreno M., Molina A. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. //FEBS Letters. – 1998. – Vol. 435. – P. 159.
17. Nielsen K.K., Nielsen J.E., Madrid S.M., Mikkelsen J.D. Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce. //Plant Mol. Biol. – 1996. – Vol. 31. – P. 539.
18. Wang D.-C, Shao F., Hu Z., Xiong Y.-M., Huang Q.-Z.,Wang C.-G., Zhu R.-H. A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. //Biochim. et Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1430. – P. 262.
19. Shigeru Oita, Mayumi Ohnishi-Kameyama. Binding of barley and wheat α -thionins to polysaccharides // Biochem – 2000 – Vol. 64. – № 5. – Pp. 958-964

20. Cammue B.P.A , De Bolle M.F.C, Terras F.R.G, Proost P, Van Damme J, Rees S.B, Vanderleyden J, Broekaert W.F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa L.* seeds. //J Biol Chem. – 1992. – Vol. 26. – P. 2228–2233.
21. Choon Koo, J. Jin Chun, H. Cheol Park, H. Chul Kim, M. Duck Koo, Y. Cheol Koo, S. Mi Ok, H. Jeong Park, S. Lee, S. H. Yun, D. J. Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. //Plant Mol. Biol. – 2002. – Vol. 50. – № 3. – P. 441-452.
22. Karolien P.B. Van den Bergh, Paul Proost. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree // FEBS Letters – 2002 – P. 181-185
23. Karolien P.B. Van den Bergh, Paul Proost. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus L.*) // An International Journal of Plant Biology – 2004 – P. 102-115
24. Silverstein K.A.T., Moskal W.A., Jr., Wu H., Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D, and VandenBosch K.A. Small cysteine peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. //Plant J. – 2007. – Vol.51. – № 2. – P. 262-80.
25. Evans IJ., Tailor R.H., Acland D.P., Attenborough S., Cammue B.P.A., Osborn R.W., Ray JA., Rees S.B., Broekaert W.F. A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Seed of *Impatiens balsamina* is derived from a Single Precursor Protein. //J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – № 39. – P. 24480.
26. Berrocal-Lobo M, Segura A., Moreno M., Lopez G., Garcia-Olmedo F., Molina A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. //Plant Physiol. –2002. – Vol. 128. – P. 951-961.
27. M.E. Selsted, A.J. Ouellette, Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, Nat. Immunol. 6 (2005) 551–557.

28. Petra L., Ulf G., Senia J., Per C., Joachim G., Rolf L., Lars B. Cyclotides: A Novel Type of Cytotoxic Agents. //Molecular Cancer Therapeutics. – 2002. – Vol. 1. – P. 365-369.
29. L. Da-Hui, J. Gui-Liang, Z. Ying-Tao, A. Tie-Min, Bacterial expression of a *Trichosanthes lirilowii* defensin (TDEF1) and its antifungal activity on *Fusarium oxysporum*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 (2007) 62-75.
30. M.A. [Graham](#), K.A. [Silverstein](#), S.B. [Cannon](#), K.A. [VandenBosch](#), Computational identification and characterization of novel genes from legumes, [Plant Physiol.](#) 135 (2004) 1179-1197.
31. Silverstein K.A.T., Moskal W.A., Jr.Wu, H. Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D, and VandenBosch K.A. Small cysteine peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. //Plant J. – 2007. – Vol.51. – № 2. – P. 262-80.
32. M.A. [Graham](#), K.A. [Silverstein](#), S.B. [Cannon](#), K.A. [VandenBosch](#), Computational identification and characterization of novel genes from legumes, [Plant Physiol.](#) 135 (2004) 1179-1197.
33. Kelly L. Brown and Robert E.W. Hancock Cationic host defense (antimicrobial) peptides. //Immunology. – 2006. – Vol. 18. – P. 24–30.
34. Shewry P. R., and Pandya M. J. in Seeds Proteins (Shewry P. R., and Casey R., Eds.) //Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – 1999.
35. Monsalve, R. I., Villalba, M., Rico, M., Shewry, P. R., and Rodriguez, R. The 2S albumin proteins, in *Plant Food Allergens* (Mills, E. N. C., and Shewry, P. R., Eds.)// Blackwell Science, Oxford, U.K. – 2003. – P. 42-56
36. Terras F. R., Schoofs H. M., De Bolle M. F., Van Leuven F., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P., and Broekaert W.F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds //J. Biol. Chem. – 1992a. – Vol. 267. – P. 15301-15309.
37. Svendsen, I. B., Nicolova, D., Goshev, I., and Genov, N. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the seeds of kohlrabi (*Brassica*

- napus* var. *rapifera*) belonging to the napin family of storage proteins. //Carlsberg Res. Commun. – 1989. – Vol.54. – P. 231-239.
38. Lorenzini D.M., Da Silva P.I.Jr., Fogaca A.C., Bulet P., and Daffre S. Acanthoscurrin: A novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. //Develop. Compar. Immun. – 2003. – Vol. 27. – P. 781-791.
39. B.J.C. Janssen, H.J. Schirra, F.T. Lay, M.A. Anderson, D.J. Craik, Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds, Biochemistry 42 (2003) 8214-8222.
40. Karin T., Alexandre G., Genoveva W. De S., Colin B., Rupert W. Os. Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. //The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. – 1999. – Vol. 65. – № 12. – P. 5451-5458.
41. Lay F. T., Anderson M. A. Defensins - Components of the Innate Immune System. //Current Protein and Peptide in Plants. – 2005. – Vol. 6. – P. 85-101.
42. Broekaert W.F., Franky R. G., Gammue B. P. A. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host defense System. //Plant Physiol. – 1995. – Vol. 108. – P. 1353-1358.
43. Fujimura M., Minami Y., Watanabe K. and Tadera K. Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from Seeds of Buckwheat gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). (*Fagopyrum esculentum* Moench.). //Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003. – Vol. 67. – №8. – P. 1636-1642.
44. Terras F.R.G., Cammue B. P. A., Osborn R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. //Plant Physiol. – 1995. – Vol. 108. - № 4. – P. 1353.

45. W.F. Broekaert, B.P.A. Cammue, M.F.C. De Bolle, K. Thevissen, G.W. De Samblanx, R.W. Osborn, Antimicrobial peptides from plants, Crit. Rev. Plant Sci. 16 (1997) 297-323.
46. G.-H. Chen, M.-P. Hsu, C.-H. Tan, H.-Y. Sung, C.G. Kuo, M.-J. Fan, Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from azuki bean, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 982-988.
47. Cammue B.P.A., Thevissen K., Lemaire K., Winderickx J., Dickson R.C., Lester R.L., Ferket K.K.A., Van Even F., Parret A.H.A., Broekaert W.F. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). //Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – № 17. – P. 953136.
48. A.K. [Kristensen](#), J. [Brunstedt](#), J.E. [Nielsen](#), J.D. [Mikkelsen](#), P. [Roepstorff](#), K.K. [Nielsen](#), Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*, [Protein Expr. Purif.](#) 16 (1999) 377-87.
49. M. Koike, T. Okamoto, S. Tsuda, R. Imai, A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 298 (2002) 46-53.
50. Fuji G., Selsted M. E. and Eisenberg, D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). //Protein So. – 1993. – Vol. 2. –P. 1301-1312.
51. Huang H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. //Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – P. 8347-8352.
52. Selsted M. E. Purification, primary structures, and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. //J. Biol. Chem. – 1993. – Vol. 268. – P. 6641-6648.

53. F.T. Lay, F. Brugliera, M.A. Anderson, Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia, *Plant Physiol.* 131 (2003) 1283-1293.
54. K.F. Lin, T.R. Lee, P.H. Tsai, M.P. Hsu, C.S. Chen, P.C. Lyu, Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin, *Proteins* 68 (2007) 530-540.
55. Y.I. Liu, C.S. Cheng, S.M. Lai, M.P. Hsu, C. Chen, P.C. Lyu, Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids, *Proteins* 63 (2006) 777-786.
56. D.S. Lobo, I.B. Pereira, L. Fragel-Madeira, L.N. Medeiros, L.M. Cabral, J. Faria, M. Bellio, R.C. Campos, R. Linden, E. Kurtenbach, Antifungal Pisum sativum defensin 1 interacts with Neurospora crassa cyclin F related to the cell cycle, *Biochemistry* 46 (2007) 987-996.
57. Zhang X. L, Selsted M. E. and Pardi A. NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 1. Resonance assignment and secondary structure determination of rabbit NP-2 and human HNP-1. //Biochemistry. – 1992. – Vol. 31. – P. 11348-11356.
58. E. Mendez, A. Moreno, F. Colilla, F. Pelaez, G.G. Limas, R. Mendez, Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 533-539.
59. E. Mendez, A. Rocher, M. Calero, T. Girbes, L. Cidores, F. Soriano, Primary structure of ω - hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems, *Eur. J. Biochem.* 239 (1996) 67-73.
60. Nagata K., Kudo N., Abe K, Arai S., Tanokura M. Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1). β -defensins, a new family of antimicrobial peptides

from bovine neutrophils //Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – № 48. – P. 14753-14760.

61. Reeck G.R., Kramer K.J., Baker J.E., Kanost M.R., Fabrick J.A. and Behnke C.A. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. //London, Taylor and Francis. – 1997. – P. 157-183.
62. Ataee R. A., Mehrabi-Tavana A., Hosseini S. M. J., Moridi Kh., Zadegan M. G. A Method for Antibiotic Susceptibility Testing: Applicable and Accurate. Jundishapur J Microbiol. 2012;5(1):341-345
63. Cunha L.R., Fortes Ferreira C.L.L., Durmaz E., Goh Y.J., Sanozky-Dawes R.B. and Klaenhammer T.R.. Characterization of Lactobacillus gasseri isolates from a breast-fed infant. Gut Microbes 3:1, 15–24; January/February 2012; G 2012 Landes Bioscience

ФОЙДАЛАНИЛГАН WEB САЙТЛАР РЎЙХАТИ

64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22079/>
65. <http://www.jove.com/video/3998/polymerase-chain-reaction-basic-protocol-plus-troubleshooting>
66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147122>
67. <http://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>
68. http://homepage.univie.ac.at/nikos.pinotsis/webPP/genetoprotein/clo_pcr_strategy/optimizing_PCR.html
69. www.bio.bsu.bu

ИЛОВА

pRSET_Авектор конструкция таркибидаги Дефензин пептиди генинни нуклеотидлар кетма-кетлиги (Аденин-нуклеотиддан бошланиб Ситозин-нуклеотидда тугайди).

1

AAATTCTGCGAAAAACCGTCTGGTACCTGGTCTGGTGTTCGCGTAA
CTCTGGTGCGTGC

61

AAAGACCAGTGCATCCGCCTGGAAGGTGCGAACACGGTTCTGCAA
CTACAAACTGCCT

121

GCGCACCGTTGCATCTGCTACTACGAATGC

Дефензин пептидининг аминокислоталар кетма-кетлиги қўйда келтирилган. Пептид 50 та аминокислотадан иборат.

Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-Leu-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys