

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР  
БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДА  
БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ**

**АШИРОВ ОЙБЕК НОРБОЙ ЎҒЛИ**

***PICHA PASTORIS* АЧИТҚИСИДА ОДАМ ГЕПАТИТ В ВИРУСИ ЮЗА  
АНТИГЕНИ, РЕКОМБИНАНТ S ОҚСИЛИНИНГ ЭКСПРЕССИЯСИ**

**03.00.12 – Биотехнология  
02.00.10 – Биоорганик кимё**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2020**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси**  
**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)**  
**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)**

**Аширов Ойбек Норбой ўғли**

*Pichia pastoris* ачитқисада одам Гепатит В вируси юза антигени, рекомбинант S оксилнинг экспрессияси.....3

**Аширов Ойбек Норбой угли**

Экспрессия рекомбинантного S белка поверхностного антигена вируса Гепатита В человека в дрожжах *Pichia pastoris*.....21

**Ashirov Oybek Norboy ugli**

Expression of recombinant S protein of human hepatitis B virus surface antigen in *Pichia pastoris* yeast.....39

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**

Список опубликованных работ

List of published works.....42

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР  
БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДА  
БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ**

**АШИРОВ ОЙБЕК НОРБОЙ ЎҒЛИ**

***PICHA PASTORIS* АЧИТҚИСИДА ОДАМ ГЕПАТИТ В ВИРУСИ ЮЗА  
АНТИГЕНИ, РЕКОМБИНАНТ S ОҚСИЛИНИНГ ЭКСПРЕССИЯСИ**

**03.00.12 – Биотехнология  
02.00.10 – Биоорганик кимё**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2020**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2019.4PhD/В413 рақам билан рўйхатга олинган.**

Диссертация Ўсимлик моддалари кимёси институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме) Илмий кенгаш веб-саҳифаси [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz) ва «ZiyoNet» ахборот таълим тармоғида ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

<b>Илмий раҳбарлар:</b>	<b>Азимова Шохноз Садыковна</b> биология фанлари доктори, профессор <b>Сасмаков Собирджан Анарматович</b> кимё фанлари номзоди, катта илмий ходим
<b>Расмий оппонентлар:</b>	<b>Турдикулова Шахло Утқуровна</b> биология фанлари доктори, профессор <b>Раҳманбердыева Рано Каримовна</b> кимё фанлари доктори, катта илмий ходим
<b>Етакчи ташкилот:</b>	Биоорганик кимё институти

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.В.38.01 рақамли Илмий кенгашининг 2020 йил «16» июль куни соат 09<sup>30</sup> даги мажлисида бўлади. Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7<sup>6</sup>-уй, Микробиология институти мажлислар зали, 3-қават Тел.:(+99871) 241-92-28, факс :(+99871) 241-92-71; e-mail: [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz).

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№\_\_ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7<sup>6</sup>-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-қават. Библиотека. Тел.:(+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс:(+99871) 241-92-71.

Диссертация автореферати 2020 йил «\_\_\_\_\_» куни тарқатилди.  
(2020 йил «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси).

**Арипов Таҳир Фатихович**  
Илмий даража берувчи Илмий кенгаш раиси  
б.ф.д., профессор, академик

**Жураева Рохила Назаровна**  
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш  
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

**Гулямова Ташхан Гафуровна**  
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш қошидаги  
Илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

## КИРИШ (фалсафа дотори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти. Дунёда гепатит В вируси (HBV) энг кенг тарқалган инфекцион касалликлардан бири ҳисобланади. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилотининг<sup>1</sup> маълумотларига кўра дунё бўйлаб 350 миллиондан ортиқ сурункали HBV га чалинганлар мавжуд бўлиб, ҳар йили миллионга яқин одамлар нобуд бўлмоқда. Таъкидлаш жоизки, ушбу касалликнинг олдини олишнинг замонавий усули - бу эмлашдир. Шунингдек, 160 га яқин мамлакатларда гепатит В вакцинаси билан чақалоқларни эмлаш миллий давлат дастурларига киритилган. Ҳозирда мавжуд бўлган гепатит В вирусига қарши вакциналарнинг асосини, генетик муҳандислик ва биоорганик кимё усуллари асосида олинган гепатит В вируси ДНК сининг 681 н.ж. ўлчамли S гени томонидан кодланувчи оқсил ташкил этади. Шу сабабли, Ўзбекистонда тарқалган Гепатит В вирусининг D генотипига мос клонлаштирилган рекомбинант S оқсиллини олиш илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Жаҳон амалиётида S-HBV оқсиллини ген муҳандислик усуллари ёрдамида турли хил экспрессия тизимларида самарали олиш борасида илмий ишлар олиб борилмоқда. Жумладан, *Pichia pastoris* ачитки экспрессия тизимида ҳам ушбу оқсил синтезини қиёсий ўрганиш; рекомбинант оқсилларни озуқа муҳитга экспрессия қилувчи секреция сигналларини аниқлаш; рекомбинант оқсилларнинг муқимлигини таъминлаш; оптимал экспрессия шароитларини танлаш; *Pichia pastoris* хужайрасидан рекомбинант оқсилни ажратиш ва тозалаш; S-HBsAg оқсиллининг антигенлик хусусиятларини аниқлаш ва уни амалиётга жорий этишни тақозо этмоқда.

Республикамизда импорт ўрнини босувчи ва экспортбоп дори воситаларини замонавий технологиялар асосида ишлаб чиқаришни кўпайтириш борасида кенг қамровли чора-тадбирлар ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада, гепатит В вирусининг рекомбинант Pres2-S оқсиллини ҳашарот хужайрасида (*Bombux mori*) олишга имкон берадиган генетик конструкцияни яратиш борасида муайян натижаларга эришилган. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси<sup>2</sup> «...аҳолини сифатли, хавфсиз ва арзон дори воситалари билан таъминлаш учун фармацевтика саноатини ривожлантириш» вазифалар белгилаб берилган. Мазкур вазифаларини амалга оширишда, жумладан, *Pichia pastoris* ачитқисида HBV рекомбинант S оқсиллини олишнинг усуллари ишлаб чиқиш ва улар асосида вирусли гепатит В касаллигига қарши маҳаллий вакциналарини олиш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғи жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора тадбирлар

<sup>1</sup> <https://www.who.int/bulletin/volumes/88/11/10-011110/en/>

<sup>2</sup> Ўзбекистон Республикасини Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» Фармони

тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон «Дори воситалари ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида»ги қарорида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Бир қатор хорижий - АҚШ, Франция, Германия, Корея, Хитой, Ҳиндистон, Исроил, Покистон, Туркия, Эрон ва бошқа давлатларда Cregg J. M (2000), Sophie Ottone (2007), Ahmad Adnan (2016), Nirmala Bardiya (2006), Deng Ning (2001), Ana Vassileva (2001), Daniel Shouva (2003), Ernawati Arifin Giri-Rachman (2015), Hande Selamoğlu (2009), Maryam Gazor (2018) каби хорижлик олимлар томонидан гепатит В вирусининг юза антигенини кодловчи рекомбинант S оксилени олиш ишлари *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae* ва бошқа ачитқи экспрессия тизимида олиб борилган ва бугунги кунда давом эттирилмоқда. Рекомбинант S оксими асосида ишлаб чиқарилган профилактик вакциналар - «Энджерикс В®, GlaxoSmithKline, USA»), «Н-В-VAX II, Merck&Co.», «Euvax B 20 mcg/ml, LG Life Sciences Ltd., Korea», «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India» ҳисобланади.

Республикамик микёсида гепатит В вирусининг рекомбинант Pres2-S оксилени ҳашарот ҳужайрасида (*Bombux mori*) олишга имкон берадиган генетик конструкция яратилиши бўйича Ш.С. Азимова (2004) ва бошқалар томонидан илмий тадқиқотлар амалга оширилган.

**Тадқиқотининг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Ўсимлик моддалари кимёси институти илмий-тадқиқот ишлари режаси ПЗ-20170926277 “Рекомбинант оксилларни янги диагностика ва дори воситалари яратиш мақсадида *Pichia pastoris* ачитқи экспрессия тизимида олишни ишлаб чиқиш” (2018-2020й) мавзусидаги амалий лойиҳаси доирасида бажарилмоқда.

**Тадқиқотнинг мақсади:** *Pichia pastoris* ачитқи экспрессия тизимида одам Гепатит В вируси юза антигени - рекомбинант S оксиленининг экспрессия усулини ишлаб чиқишдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

клонлаштириш учун мос келувчи праймерларни синтез қилиш мақсадида гепатит В вируси S генининг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш;

S-ген амплификацияси учун праймерлар синтез қилиш ва гепатит В касаллигига чалинган одам қон зардобидан амплификация қилинган S генини *Pichia pastoris* ачитқи векторларига (pPIC3.5 ва pPIC9) клонлаштириш;

клонлаштирилган S-ген ДНК фрагментининг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш;

олинган рPIC3.5-S ва рPIC9-S рекомбинант плазмидаларини *Pichia pastoris* GS115 штаммига киритиш (трансформациялаш);

S-HBsAg оқсилени экспрессия қилувчи рекомбинант *Pichia pastoris* штаммларини селекция қилиш;

*Pichia pastoris* штаммлари орасидан S оқсилени энг юқори даражада экспрессияловчи фенотипини аниқлаш;

рекомбинант S оқсиленинг хусусиятларини ИФА ва иммуноблотинг усуллари ёрдамида асослаш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида *Pichia pastoris* GS115 ачитқи замбруг штамми, рPIC3.5 ва рPIC9 трансфер векторлари, рекомбинант S оқсили ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг предмети** HBV юза антигенига жавоб берувчи S генининг амплификацияси, олинган генни клонлаш, рекомбинант плазмидаларни *Pichia pastoris*га трансформациялаш ва S оқсилени экспрессия қилишдан иборат.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқотда Биоорганик кимё ва биотехнология (праймерлар синтез қилиш, генларни клонлаштириш, ДНК нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш, ДНК молекулаларини ажратиш ва тозалаш, ПЗР, ачитқи хужайраларини кўпайтириш, ИФА, Иммуноблот анализи ва бошқ.) услубларидан фойдаланилган.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

трансфер векторларда клонлаштириш учун тўлиқ ўлчамли S-HBsAg генини махсус рестрикцион сайтлар ҳосил қилиниб амплификация қилиш учун тегишли праймерлар синтезланган;

илк бор *Pichia pastoris* GS115 штаммида Гепатит В вируси юза S оқсилени кодловчи рPIC3.5-S ва рPIC9-S рекомбинант плазмидалари клонлаштирилган;

клонлаштирилган рекомбинант S генининг нуклеотид кетма-кетлиги Ўзбекистонда тарқалган Гепатит В вирусининг D генотипига мос эканлиги аниқланган;

S оқсилени экспрессия қилувчи рекомбинант *Pichia pastoris* GS115 штаммлари олинган;

S оқсилени юқори даражада экспрессия қилувчи *Pichia pastoris* GS115 штаммининг - Mut<sup>S</sup> фенотипи аниқланган;

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қуйидагилардан иборат:

махсус синтез қилинган праймерлар ёрдамида гепатит В вирусининг юза оқсилени кодловчи S генини амплификация қилиш усуллари ишлаб чиқилган;

амплификация қилинган S генни ачитқи трансфер векторларига клонлаштириш усуллари такомиллаштирилган;

*Pichia pastoris* Mut<sup>S</sup> фенотипи S-HBsAg оқсилени энг юқори даражада экспрессия қилиши аниқланган;

S-HBsAg оқсилени *Pichia pastoris* экспрессия тизимида олишнинг оптимал шарт шароитлари асосланган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** тадқиқотларни замонавий биоорганик кимё ва биотехнология усуллари кўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Ҳар бир тадқиқот натижалар замонавий аналитик

усуллар ёрдамида таҳлил қилинган. Бунинг тасдиғи сифатида мутахассислар томонидан эксперт хулосалари, ҳамда республика ва халқаро илмий конференцияларда муҳокамадан ўтганлиги, рецензия қилинувчи илмий нашрларда чоп этилганлиги ва патентлаш учун топширилган аризалар хизмат қилади.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти тадқиқот давомида олинган янги рекомбинант плазмидалар асосида янги S оксилени экспрессия қилувчи *Pichia pastoris* продуцентлари олинганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, олинган рекомбинант S оксигени Гепатит В вирусига қарши маҳаллий вакциналарни яратишда ҳамда ИФА таҳлили учун микродорий жиҳатдан аниқловчи тест тизимларини ишлаб чиқариш учун асос бўлиб хизмат қилади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Гепатит В вируси юза антигенини кодловчи S генини клонлаштириш, мазкур генининг рекомбинант *Pichia pastoris* ачитки штамларидаги экспрессияси ҳамда ушбу оксиленинг антигенлик хусусиятларини ўрганиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

Рекомбинант S оксилени кодлайдиган ген кетма-кетлиги NCBI халқаро маълумотлар базасига киритилган (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>) маълумотлар базасига BankID 2308626 рақами орқали рўйхатдан ўтказилган. Натижада базага киритилган маълумотлар аналогик оксилларнинг аминокислота кетма-кетлигини, антигенлик хусусиятларини ҳамда мавжуд антиген детерминантларининг жойлашган ўрнини аниқлаш имконини берган;

*Pichia pastoris* ачитқисидан рекомбинант S оксилени кодловчи нуклеотидлар кетма-кетлиги EMBL LR746134 маълумотлар базасида рўйхатдан ўтказилган (<http://www.ebi.ac.uk>). Натижада келтирилган маълумотлар аналогик оксилларнинг қиёсий таҳлилинини глобал масштабда амалга ошириш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Мазкур тадқиқот натижалари диссертация мавзуси бўйича 3 та халқаро ва 7 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 15 та илмий ишлар чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 5 мақола, шулардан 4 таси республика ва 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

**Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши.** Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 101 бетни ташкил этган.

#### **ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ**

**Кириш** қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурийлиги,



мақсад ва вазифалари асослаб берилган, тадқиқотнинг объект ва предметлари ифодаланган, тадқиқотнинг республика фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мувофиқлиги келтирилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «*Pichia pastoris* экспрессия тизимида рекомбинант оксиллар олиш» деб номланган биринчи бобида рекомбинант оксилларни ҳар-хил экспрессия тизимларида олиш, *Pichia pastoris*ни бошқа экспрессия тизимлари билан солиштириш, *Pichia pastoris* экспрессия тизимида ишлатилинадиган штаммлар ва трансфер векторлар ҳақида хорижий илмий адабиётлар шарҳи батафсил баён этилган.

Диссертациянинг «**Рекомбинант S оксилни *Pichia pastoris* экспрессия тизимида олиш усуллари ва материаллари**» деб номланган иккинчи бобида генни трансфер векторларга клонлаштириш, рекомбинант плазмидаларни *Pichia pastoris* хужайрасига трансформациялаш ва бош. тажриба қисми ва материаллар келтирилган.

Диссертациянинг учинчи боби «***Pichia pastoris* ачитки экспрессия тизимида одам Гепатит В вируси юза антигени - рекомбинант S оксилнинг экспрессия қилиш**» га бағишланган. Мазкур бобда Гепатит В вируси юза антигенига жавоб берувчи S оксилнинг *Pichia pastoris* ачитқисида экспрессияси. Шунингдек, мазкур бобда S геннинг рPIC3.5 ва рPIC9 трансфер векторларида клонлаштириш, S ген ДНК фрагментининг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш, S генини сақловчи рекомбинант плазмидаларни *Pichia pastoris* GS115 штаммига киритиш, S оксилни энг кўп ишлаб чиқарувчи рекомбинант *Pichia pastoris* штаммларини танлаш ва селекция қилиш шу билан бирга олинган S оксилнинг хусусиятларини ИФА ва иммуноблот усуллари орқали ўрганиш натижалари келтирилган.

#### ***HBV S* ген ДНК сину рPIC3.5 ва рPIC9 плазмидаларига клонлаштириш ва унинг амплификацияси**

HBV S регионни *Pichia pastoris* да экспрессия қилиш учун *Pichia pastoris* геномига кира олувчи ва мақсадли генни АОХ1 промотори остида синтезловчи трансфер векторлари ишлатилди. рPIC3.5 ва рPIC9 трансфер векторларнинг рестрикция карталари шуни кўрсатдики, HBV S региони трансфер векторларнинг махсус полилинкер (MCS) сайтлари орасига киритилиши зарур. Мазкур полилинкер қисмида BamHI, EcoRI (рPIC3.5 учун) ва XhoI, EcoRI (рPIC9 учун) рестрикцион сайтлари мавжуд. Шу сабабли праймерлар HBV S регион ДНК сига комплементарлигини таъминлаш учун шундай синтез қилишимиз керак бўлдики, трансфер векторларнинг рестрикцион сайтларига мос келсин. HBV S регион ДНК кетма-кетлиги ва юқоридаги рестрикцион сайтлардан келиб чиқиб қуйидаги праймерлар синтез қилинди:

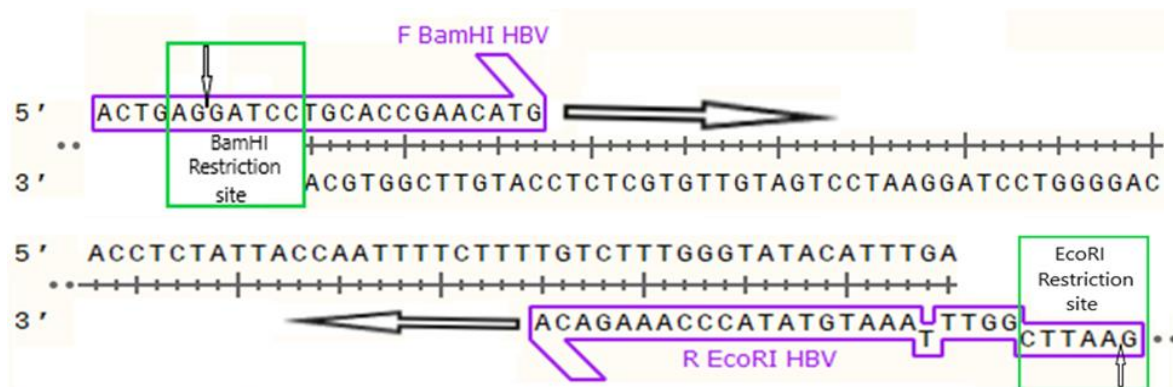
**pPIC3.5** трансфер вектори учун:

1) **Forward** – BamHI 5'-ACTGAGGATCCTGCACCGAACATG-3'

XhoI 5'- CTGCACTCGAGATGGAGAACATCACATCAGGAT-3'

2) **Reverse** – EcoRI 5'-

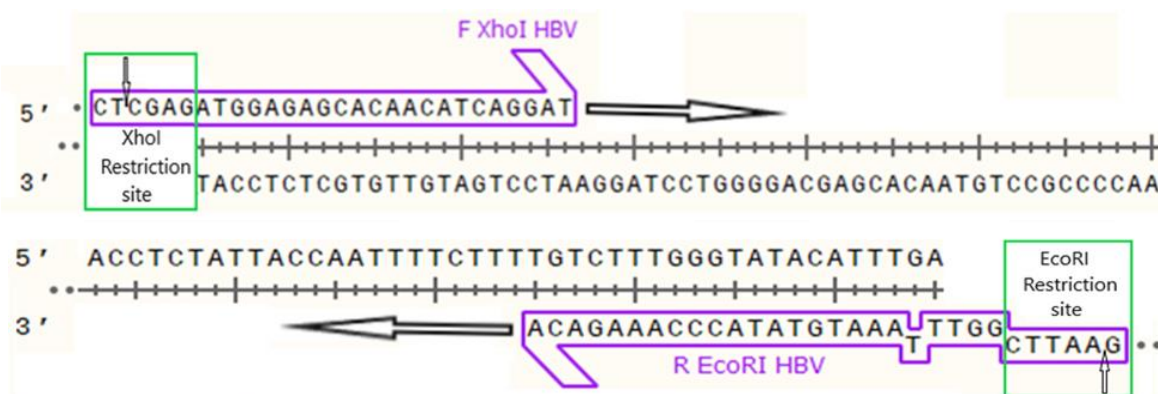
GGTTATTAGAATTCAAATGTATACCCAAAGACA -3'



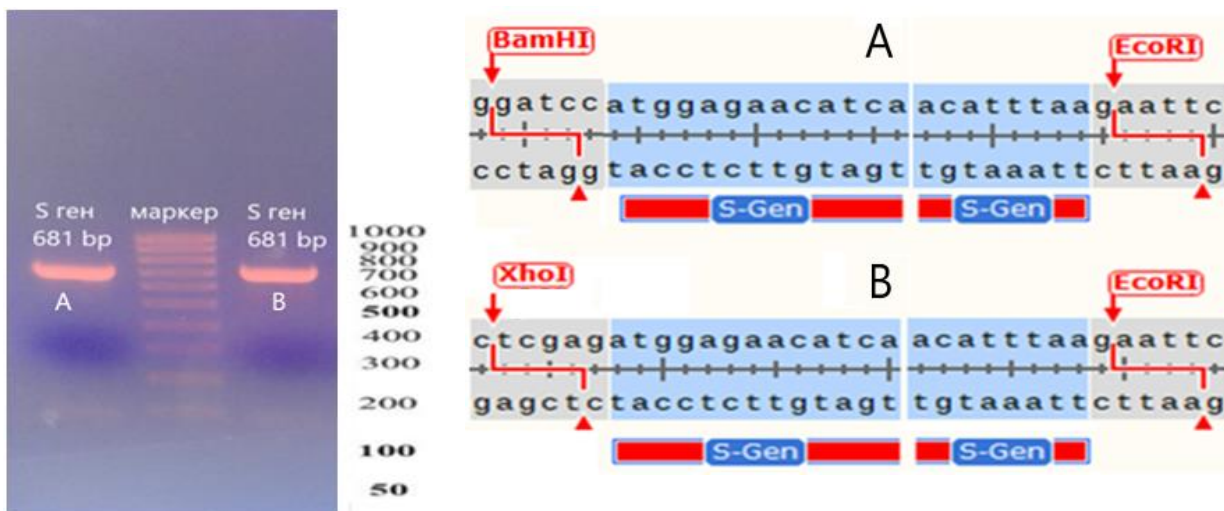
**pPIC9** трансфер вектори учун:

1) **Forward** XhoI 5'- CTGCACTCGAGATGGAGAACATCACATCAGGAT-3'

2) **Reverse** – EcoRI 5'- GGTTATTAGAATTCAAATGTATACCCAAAGACA -3'



Сўнгра шу праймерлар ёрдамида S гени HBV га чалинган беморлар қонидан амплификация қилинди. 1-расмда ПЦР амплификат (электрофорез) таҳлили келтирилган. Мазкур амплификат нафақат S ген, балки бошланғич векторларнинг рестрицион сайтларига комплементар нуклеотид кетма-кетликни сақлайди.

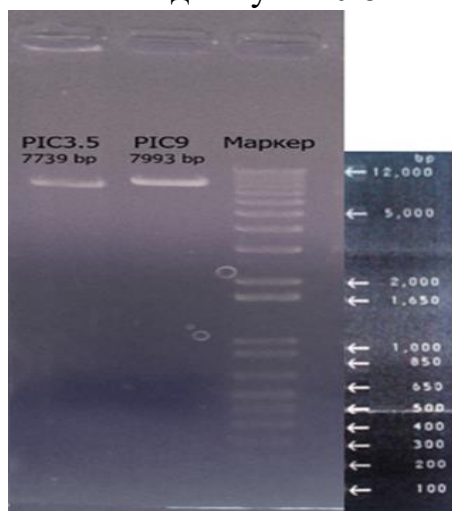


**1-расм. S ген ПЗР амплификантларнинг 1% гел электрофорез таҳлили** Бунда: **А.** S геннинг BamHI ва EcoRI рестрикция сайтли фрагменти (pPIC3.5 учун). **В.** S геннинг XhoI ва EcoRI рестрикция сайтли фрагменти (pPIC9 учун). амплификация қилинган S ген намуналари.

Бунда S ген кутилаётган назарий ўлчамга мос келди. Сўнгра амплификат **А** BamHI ва EcoRI рестриктаза ферментлари билан (pPIC3.5 га киритиш учун), **В** амплификат эса XhoI ва EcoRI рестриктаза ферментлари билан ишлов берилди (pPIC9 га киритиш учун). Натижада, «ёпишқоқ учлар» тутувчи S ген ДНК фрагменти олинди.

***pPIC3.5 ва pPIC9 Pichia pastoris ачитқи векторларини клонлаштириш жараёнига тайёрлаш***

pPIC3.5 ва pPIC9 плазмидалар (трансфер векторлар) мос равишда BamHI, EcoRI (pPIC3.5 учун) ва XhoI, EcoRI (pPIC9 учун) рестриктаза ферментлари ёрдамида ишлов берилди. Нуклеотид кетма-кетликларига мос равишда рестриктазалар билан ишлов берилгандан сўнг, трансфер векторларнинг 7739 ж.н. (pPIC3.5) ва 7793 ж.н. (pPIC9) ўлчамдаги чизиқсимон ДНК молекулалари ҳосил бўлди. 2-расмда мос рестриктаза ферментлари билан кесилгандан сўнги 0.8% гел электрофорездаги натижалари келтирилган.

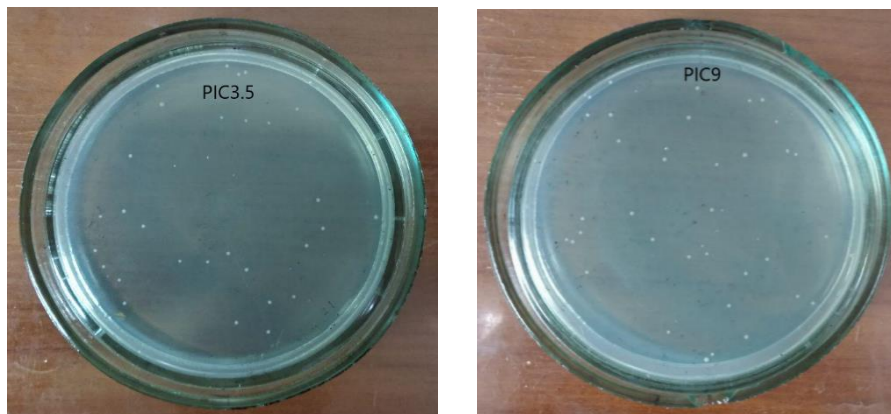


**2- расм. pPIC3.5, pPIC9 трансфер векторларнинг BamHI, XhoI ва EcoRI рестриктаза ферментлари билан ишлов берилгандан кейинги 0.8% агароза гел электрофорез таҳлили.**

2-расмдан кўришиб турибдики, чизиқсимон векторлар назарий кутилаётган ўлчамга мос келади.

### ***Рекомбинант E. coli* клонларини селекция қилиш**

Лигирлаш натижасида олинган рPIC3.5-S ва рPIC9-S рекомбинант плазмидалари *Escherichia coli* NEB-5 $\alpha$  хужайрасига электропорация усули ёрдамида трансформация қилинди. Мазкур плазмидалар ампициллинга чидамли ген тутади, шунинг учун ампициллинли селектив муҳитда фақат рекомбинант плазмидалар сақловчи клонларгина ўсади (3-расм).

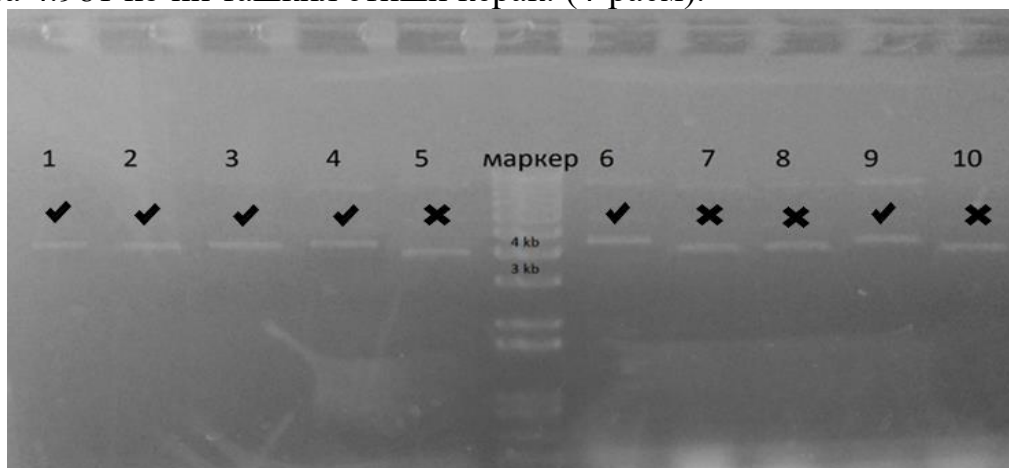


**3-расм. Рекомбинант E. coli** клонларининг ампициллинли LB агар муҳитида селекцияси.

Барча трансформантларни кейинги жараёнларда таҳлил қилиш учун янги тайёрланган ампициллинли LB агар муҳитга қайта экилди. Биз ҳар бир трансформацияга учраган клонлардан 5 тадан (1,5,10,15,20) танлаб олдик. Танлаб олинган *E.coli* хужайралари 1 мл суюқ LB озуқа муҳитига экилиб, тун давомида кўпайтирилди ва плазмидалар ишқорий лизис усули орқали ажратилди.

### ***Рекомбинант плазмидаларнинг гел электрофорез таҳлили***

Трансфер векторларнинг ўлчамлари агароза гелида гел электрофорез таҳлили олиб борилганда рPIC3.5 ва рPIC9 трансфер векторларининг ўлчамлари 4.0 м.ж.н ва 4.3 м.ж.н ни ташкил этди, агар S геннинг ўлчами 681 ж.н. дан иборат бўлса рекомбинант плазмидаларнинг ўлчамлари тегишлича 4.681 ва 4.981 kb ни ташкил этиши керак. (4-расм).



**4-расм. Гел электрофорез усули орқали рекомбинант плазмидаларни танлаш.** Бунда 1-5- рPIC3.5 асосида олинган рекомбинант

плазмидалар. 6-10 эса рPIC9 асосида олинган рекомбинант плазмидалар.

Расмдан кўриниб турибдики, 1 дан 4 гача бўлган намуналар 4861 ж.н. ни ташкил этмоқда. рPIC9 асосида олинган трансформантларнинг 6 ва 9 намуналари қолган 7, 8 ва 10 ларга нисбатан юқори молекуляр ўлчамни ташкил этган.

Шундай қилиб, электрофорез таҳлил натижасига кўра 1-4 (рPIC3.5-S), 6 ва 9 (рPIC9-S) намуналари мақсадли S генини сақлайди.

Олинган натижаларни тўлақонли тасдиқлаш учун 1-4 (рPIC3.5-S), 6 ва 9 (рPIC9-S) рекомбинант плазмидаларнинг тегишлича ПЗР таҳлили олиб борилди(5-расм).

### ***рPIC3.5-S и рPIC9-S рекомбинант плазмидаларнинг ПЗР таҳлили***

ПЗР таҳлилида S генини аниқлаш учун биз синтез қилган праймерларни (Махнев А. билан бирга) ишлатиш орқали барча 10 плазмидаларнинг таҳлили олиб борилди. Мусбат намуна сифатида HBV касаллигига чалинган одам вирусидан фойдаланилди. ПЗР таҳлил натижалари 5-расмда келтирилган.



**5-Расм. Рекомбинант плазмидаларнинг 1 % агароза гелида ПЗР таҳлил натижалари.**

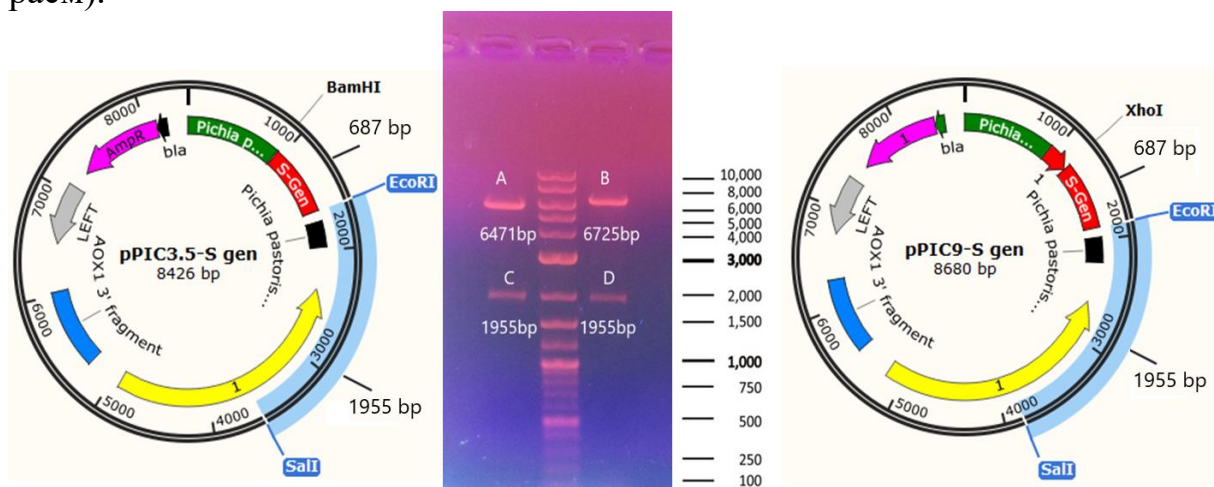
Бунда: М-маркер; **1-5** рPIC3.5-S асосида олинган трансформантлар, **6-10** - рPIC9-S асосида олинган трансформантлар, **11**- соғлом одам қон зардоби, **12**- Гепатит В вирусига чалинган одам қон зардоби.

6-расмдан кўриниб турибдики, ПЗР таҳлили натижалари 1-4 (рPIC3.5-S), ва 6, 9 (рPIC9-S) плазмидалари 681 ж.н ўлчамли S генини сақлаши аниқланди. Шу тариқа биз, S генини рPIC3.5 и рPIC9 трансфер векторларида клонлаштирдик ва рPIC3.5-S и рPIC9-S рекомбинант плазмидаларини олдик.

### ***S генининг трансфер векторларга тўғри йўналишда клонланганини аниқлаш***

S генининг трансфер векторларга тўғри йўналишда клонланганини аниқлаш мақсадида рPIC3.5-S, рPIC9-S рекомбинант плазмидалар EcoRI ва SalI рестриктаза ферментлари билан ишлов берилди. Натижада иккала рекомбинант плазмидаларда 6471 ж.н, 1955 ж.н (рPIC3.5-S) ва 6725 ж.н, 1955 ж.н (рPIC9-S) ўлчамли ДНК қисмлари ҳосил бўлди.

Намуналарнинг гелъ электрофорез таҳлили асосида S геннинг тўғри йўналишда клонланганда 1955 ж.н. ўлчамли ДНК фрагменти ҳосил бўлади. (6-расм).



**6-расм. Рекомбинант pPIC3.5-S ва pPIC9-S плазмидаларнинг EcoRI ва SalI рестриктаза ферментлари билан гидролизининг 0,8 % агароза гелидаги таҳлил натижалари.**

**A** ва **C** - pPIC3.5-S нинг 6471 ж.н. ва 1955 ж.н. ўлчамли фрагментлари.

**B** ва **D** - pPIC9-S нинг 6725 ж.н. ва 1955 ж.н. ўлчамли фрагментлари.

Модомики, S-ген ДНК си плазмидаларга уни EcoRI, XhoI ва BamHI рестриктазалар билан кесиш йўли билан киритилган экан, бунда EcoRI сайт киритилган геннинг 3' қисмида бўлиши керак. Бунда геннинг тўғри йўналишида тегишлича 1955 ж.н. ўлчамли фрагмент, нотўғри йўналишида эса 2642 ж.н. ўлчамли фрагмент ҳосил бўлиши керак эди.

Шу тариқа, pPIC3.5 ва pPIC9 трансфер векторларига киритилган S ген тўғри йўналишда клонлаштирилганлиги аниқланди.

***pPIC3,5-S ва pPIC9-S рекомбинант плазмидалари таркибидаги S ДНК сининг нуклеин кислоталар кетма-кетлигини аниқлаш***

Диссертация доирасида pPIC3.5-S ва pPIC9-S рекомбинант плазмидалари таркибидаги S ген сақловчи ДНК фрагментининг нуклеин кислоталар кетма-кетлиги аниқланди:

5'-ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACA  
GGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTA  
GACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACCACCGTGTGTC  
TTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCTTG  
TCCTCCAACCTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA  
TCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTCTTCTGG  
ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCGAC  
CACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAAC  
CTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGC  
ACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCSTATGGG  
AGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT  
CAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGAT

GATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCSTTTTТА  
CCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTТАА-3' (681н.ж.).

Секвенс қилинган S ген нуклеотид кетма-кетлиги NCBI маълумотлар базаси билан солиштирилди. Натижада мазкур базада биз клонлаштирган S ген Гепатит В вирусининг D генотипига тўғри келиши ва нуклеотид кетма-кетлиги тўлақонли мос эканлиги аниқланди.

Шундай қилиб, клонлаштирган pPIC3.5-S ва pPIC9-S рекомбинант плазмидалари таркибидаги S ген, Гепатит В вируси юза антигенининг S регионига тўлақонли мос келиши аниқланди.

### ***pPIC3.5-S ва pPIC9-S рекомбинант плазмидаларини Pichia pastoris хужайрасига киритиши***

pPIC3.5-S ва pPIC9-S рекомбинант плазмидаларини *P. Pastoris* га киритиш учун уларни *SacI* рестриктаза ферменти билан ишлов бердик ва чизиксимон ҳолга келтирдик. Мазкур фермент билан ишлов бериш орқали асосий углерод манбаи ва мақсадли геннинг инициатори бўлган метанолни юқори даражада утилизация хусусиятли Mut<sup>+</sup> фенотипи ҳосил бўлди.

Тажрибалар давомида биз трансформация унуми учун ДНК миқдорини оптималлаштирдик (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 и 2,0 мкг/мкл) (1-жадвал). Жараён унуми ҳосил бўлган трансформантлар сони асосида аниқланди.

1-жадвал.

#### **Трансформация унумининг ДНК концентрациясига боғлиқлиги.**

№	ДНК миқдори, мкг.	Хужайра оптик зичлиги OD <sub>600</sub>	Трансформантлар сони
1	0,1	3,0	13x10 <sup>4</sup>
2	0,2	3,0	31x10 <sup>4</sup>
3	<b>0,5</b>	<b>3,0</b>	<b>45x10<sup>4</sup></b>
4	1,0	3,0	26x10 <sup>4</sup>
5	2,0	3,0	11x10 <sup>4</sup>

Жадвалдан кўриниб турибдики, ДНК миқдори 0,5 мкг бўлганда энг кўп (45x10<sup>4</sup>) трансформантларга эришилган.

#### **Трансформация унумининг хужайралар сонига боғлиқлиги**

Электрокомпетент хужайраларни тайёрлаш жараёнида 2-жадвалда кўрсатилганидек, ҳар-хил оптик зичликда ўстирилди ва тажриба бир хил миқдордаги pPIC3.5-S ва pPIC9-S плазмид ДНК лари асосида (0,5мкг/мкл) олиб борилди.

2-жадвал.

#### **Трансформация унумининг хужайра оптик зичлигига боғлиқлиги.**

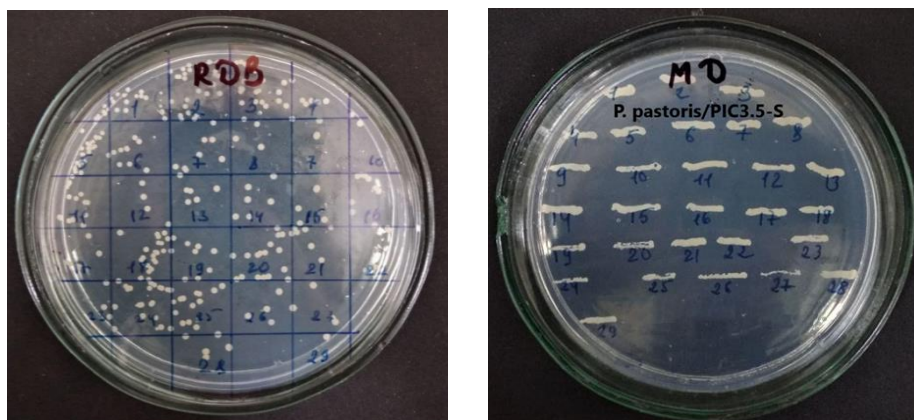
№	Хужайра оптик зичлиги OD <sub>600</sub>	ДНК миқдори, мкг.	Трансформантлар сони
1	0,5	0,5	29·10 <sup>4</sup>
2	1,0	0,5	45·10 <sup>4</sup>
3	<b>2,0</b>	<b>0,5</b>	<b>53·10<sup>4</sup></b>
4	3,0	0,5	48·10 <sup>4</sup>

5	5,0	0,5	$27 \cdot 10^4$
6	7,5.	0,5	$11 \cdot 10^4$

2-жадвалдан кўринадик, хужайранинг оптик зичлиги  $OD_{600}$  2.0 бўлганда максимал трансформантлар ( $53 \times 10^4$ ) сонига эришилган. Оптик зичлик ( $OD_{600}$  3.0) ошиб борган сари трансформация унуми тушганлигини кузатишимиз мумкин. Шундай қилиб, жараённинг энг оптимал унумдорлигини таъминлаш учун ачитқи хужайраларини оптик зичлиги ( $OD_{600}$ ) 1.0-3.0 гача ўстириш мақсадга мувофиқ эканлиги аниқланди.

### **Рекомбинант *Pichia pastoris* клонларининг селекцияси**

pPIC3.5 ва pPIC9 трансфер векторлар селектив маркер сифатида натив HIS4 генини сақлайди, *Pichia pastoris* хужайраларида эса мазкур ген мутация қилинган (*his4*), яъни улар гистидин аминокислотасиз ўса олмайдилар. Қачонки рекомбинант плазида ДНК лари *Pichia pastoris* хужайраларига трансформация қилинса, мутация қилинган *his4* ген натив HIS4 ген билан алмашинади. Натижада, трансформациядан сўнг фақатгина натив HIS4 ген сақловчи хужайраларгина ўса оладилар. Шу сабабдан ҳам трансформация жараёнидан сўнг хужайралар гистидинсиз озуқа (RDB) муҳитда ўстирилди (7-расм).

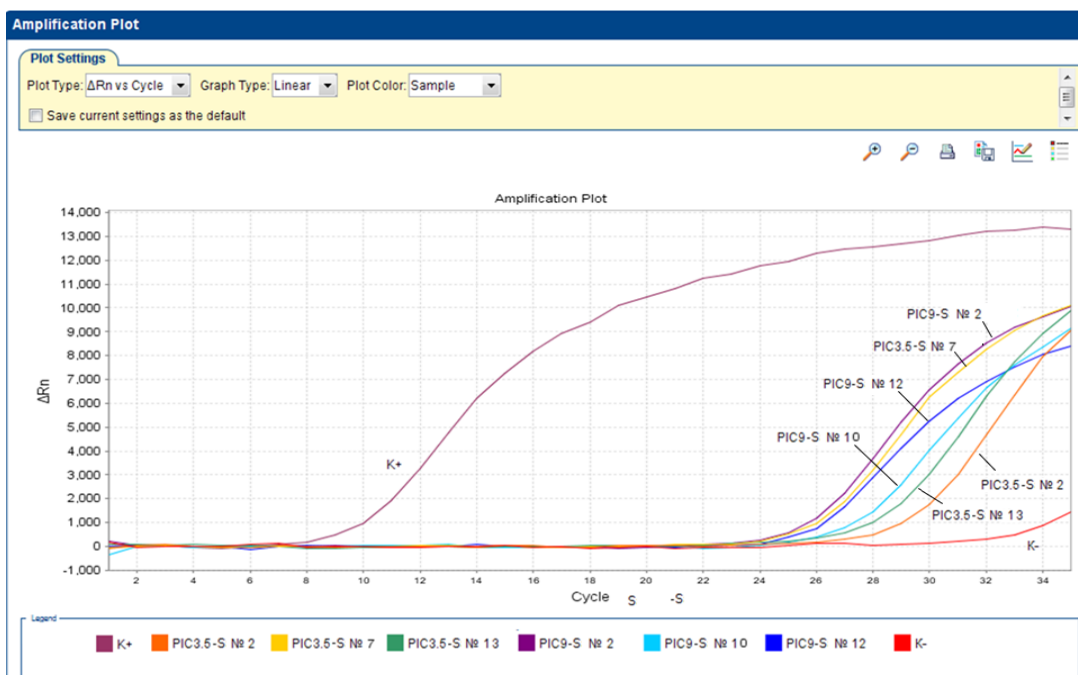


**7-расм. pPIC3.5-S рекомбинант плазмидаси асосида олинган *Pichia pastoris* колонияларининг гистидинсиз озуқа муҳитдаги селекцияси.**

Хужайралар кейинги жараёнларда қўллаш учун янги тайёрланган гистидинсиз MD Петри ликопчаларига қайта экилди.

MD муҳитида ўсиб чиққан барча штаммлар суюқ MD муҳитига қайта экилди ва тун давомида  $30^{\circ}\text{C}$  да инкубация қилинди. Ўсган культураларнинг оптик зичлиги 600нм тўлқин узунлигида ўлчанди. pPIC3.5-S ва pPIC9-S асосида трансформацияланган *Pichia pastoris* хужайраларидан 3 тадан энг юқори оптик зичликни намоён қилган - pPIC3.5-S рекомбинант плазмидаси асосидаги 3, 7 ва 13 намуналар, pPIC9-S рекомбинант плазмидаси асосидаги 2, 10 ва 12 чи намуналари танлаб олинди. Танлаб олинган рекомбинант штаммларнинг геном ДНК си ажратилди ва РВ-ПЗР усули ёрдамида таҳлил қилинди (8-расм).





**8-расм. рPIC3.5-S ва рPIC9-S рекомбиант плазмидаларини тутувчи *Pichia pastoris* колонияларининг РВ-ПЗР (RT-PCR) таҳлили.**

Олинган натижалардан шуни хулоса қилиш мумкинки, танлаб олинган 6 та *P. pastoris* рекомбиант штамmlарининг барчаси ўз таркибида мақсадли S генини тутиши аниқланди ва барча намуналар ПЗР нинг 24 чи кўтарилиш циклидан (пороговой цикл) бошланиши кузатилди. Мусбат намунада ДНК консентрацияси нисбатан баланд бўлганлиги сабабли 8 чи кўтарилиш циклидан бошланган. Кейинги жараёнлар учун нисбатан юқори ДНК нусхаларини намоён қилган (PIC3.5 №7 ва PIC9 №2) намуналар танлаб олинди.

### ***Pichia pastoris*нинг Mut<sup>S</sup> фенотипини олиш**

Mut<sup>+</sup> фенотиби метанолни кам утилизацияловчи Mut<sup>S</sup> фенотипига қараганда юқори ўсиш суръати ва шунингдек, юқори маҳсулдорликка эга. Шунга қарамасдан, адабиётларда келтирилган маълумотларга кўра Mut<sup>S</sup> штамmlари баъзи рекомбиант оқсиллар экспрессиясида Mut<sup>+</sup> штамmlарига нисбатан устундир. Мазкур маълумотларни инобатга олган ҳолда биз, S оксилнинг экспрессиясини Mut<sup>S</sup> ва Mut<sup>+</sup> фенотипларида солиштириш мақсадида Mut<sup>S</sup> фенотипини ҳам олдик. Бунинг учун, рPIC3.5-S ва рPIC9-S рекомбиант плазмидаларини Bgl II рестриктаза ферменти билан ишлов берилди ва уларни *Pichia pastoris* хужайрасига электропорация усули орқали трансформация қилинди. Электропорациядан сўнг хужайралар селектив RDB агар озуқа муҳитига экилди Петри ликопчаларида ўсиб чиққан колонияларнинг фенотипларни бир-бирларидан ажратиш мақсадида ММ селектив озуқа муҳитида кўпайтирилди. Mut<sup>S</sup> трансформанлар ММ озуқа муҳитида секин ўсиши ҳисобга олиниб фенотиплар бир биридан фақланди.

**Рекомбинант S оқили экспрессиясининг Mut<sup>+</sup> ва Mut<sup>S</sup> фенотипларига ва озуқа муҳитдаги метанолнинг миқдorigа боғлиқлиги**

Биз диссертация иши доирасида S оқилининг экспрессияси даражасини озуқа муҳитдаги метанолнинг миқдorigа ва фенотипларнинг турига боғлиқ ҳолда ўзгаришини ўрганиб чиқдик. Бунинг учун рекомбинант штаммлар биринчи босқичда BMGY муҳитида, иккинчи босқичда эса концентрациялари 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 % бўлган метанолли BMMY муҳитида кўпайтирилди. Экспрессия даражаси ИФА усули ёрдамида аниқланди (3-жадвал). Синтезланган рекомбинант HBsAg оқилининг миқдори қаттиқ фазали ИФА усули ёрдамида аниқланди. ИФА таҳлили учун "ЎЗР ФА ЎМКИ диагностик тест тизимларини ишлаб чиқариш корхонаси" ва Diagnostic Systems (Россия) каби тижорат тўпламларидан фойдаланилди. Қиёслаш стандарти сифатида гепатит В вируси «S антиген детерминантасини» ўз ичига олган «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India» ва «Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.» вакциналари қўлланилди.

3-жадвал.

**Рекомбинант S оқили экспрессия даражасининг фенотипларга ва озуқа муҳитдаги метанолнинг миқдorigа боғлиқ ҳолда ўзгариши**

Фенотип тури	Метанол концентрацияси	HBsAg нинг ИФА тест синови натижалари (OD=450 нм)	Суюлтириш даражаси	HBsAg нинг миқдори
Mut <sup>+</sup>	0,5%	1,0	1:20000	±10 мг/л
	<b>1,0%</b>	<b>1,21</b>	<b>1:20000</b>	<b>±12,1 мг/л</b>
	1,5%	0,92	1:20000	±9,2 мг/л
	2,0%	0,47	1:20000	±4,7 мг/л
Mut <sup>S</sup>	0,3%	1,12	1:20000	±11,2 мг/л
	<b>0,5%</b>	<b>1,35</b>	<b>1:20000</b>	<b>±13,5 мг/л</b>
	1,0%	1,02	1:20000	±10,2 мг/л
	2,0%	0,65	1:20000	±6,5 мг/л
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»		≥ 3000 (out)	1:1000	
		0.4	1:10000	±2 нг/мл
Тўпламдан салбий назорат стандарти. (соғлом одам зардоби)		0.097	-	-

3-жадвалдан кўриниб турибдики, Mut<sup>+</sup> фенотип хужайраларида S-HBsAg нинг 1,0% метанолдаги экспрессия даражаси ±12,1 мг/л ни, Mut<sup>S</sup> фенотип учун эса 0,5% метанолда экспрессия даражаси ±13,5 мг/л. ни ташкил этди.

***pPIC3.5-S* ва *pPIC9-S* асосидаги *Pichia pastoris* штамmlарининг  
экспрессия даражаларини солиштириши**

Биз тадқиқ этаётган *pPIC9-S* рекомбинант вектори, гетероген оқсилни озуқа муҳитга чиқарувчи 249 бр ўлчамли  $\alpha$ -factor ДНК кетма-кетлигини тутуди. Шунинг учун биз, *pPIC3.5-S* (хужайра ички) ва *pPIC9-S* (секреция қилувчи) асосида олинган *Pichia pastoris* штамmlарининг экспрессия даражасини солиштирдик. Натижалар 4-жадвалда келтирилган.

4-жадвал.

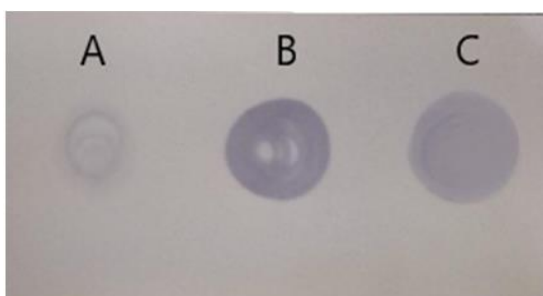
***pPIC3.5-S* ва *pPIC9-S* рекомбинант плазмидалари асосидаги *Pichia pastoris* штамmlарининг экспрессия даражалари солиштириши**

Штамм тури	HBsAg нинг экспрессия тури	ИФА тест натижалари (OD=450 нм)	Суялтир иш даражаси	HBsAg миқдори
<i>Pichia pastoris/</i> <i>pPIC3.5-S</i>	Оқсилнинг хужайра ичига экспрессияси	1,35	1:20000	±13.5 мг/л
	Озуқа муҳитга экспрессияси (секреция)	0,16	-	±0,8 нг/л
<i>Pichia pastoris/</i> <i>pPIC9-S</i>	Оқсилнинг хужайра ичига экспрессияси	1,31	1:20000	±13,1 мг/л
	Озуқа муҳитга экспрессияси (секреция)	0,18	-	±0,9 нг/л
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»		≥ 3000 (out)	1:1000	
		0.401	1:10000	±2 нг
Тўпламдан салбий назорат стандарти. (соғлом одам зардоб)		0.097	-	-

ИФА таҳлил натижаларидан кўриниб турибдики, *pPIC9-S* асосида олинган *Pichia pastoris* штамmlари мақсадли оқсилни озуқа муҳитга секреция қилмаслиги ва рекомбинант *S* оқсилнинг иккала олинган штамmlарида деярли бир хил эканлиги аниқланди.

***HBsAg* оқсилнинг *Dot Blot* ва иммуноблот таҳлиллари**

Синтезланган *S* оқсилнинг антигенлик хусусиятини аниқлаш учун анологик рекомбинант «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India» тижорат вакцинаси билан солиштириб дот ва иммуноблот таҳлиллари олиб борилди. *Pichia pastoris* хужайраларидан *S*-HBsAg экстракцияси буфер ишлатиш орқали амалга оширилди .

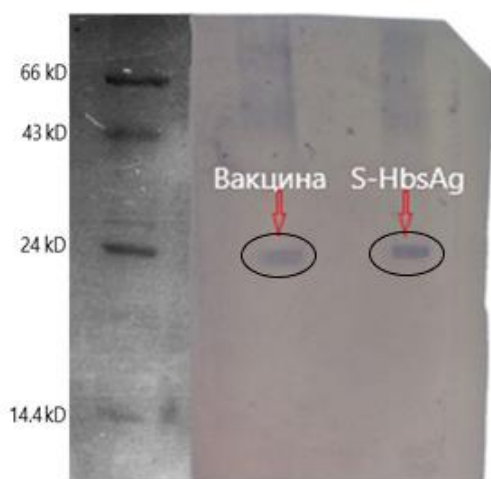


**9-расм. HBsAg нинг Dot Blot таҳлил натижалари.**

**A** - *Pichia pastoris* дан мақсадли оқсилсиз экстракти;

**B**- *Pichia pastoris* дан мақсадли оқсил сақловчи экстракти;

**C**-мусбат намуна (тижорат вакцинаси).



10-расм. Иммуноблот натижалари.

13-14 расмдан кўришиб турибдики, *Pichia pastoris* хужайраларида синтез қилинган рекомбинант S-HBsAg оқсили тижорат вакцина билан солиштирилганда юқори антигенлик хусусиятини ва мос келувчи 24 кД молекуляр массани намоён қилди.

## ХУЛОСАЛАР

1. Гепатит В вируси (HBV) юза антигени S оқсилини (226 аминокислота, 24 кДа) кодловчи S генини (681 ж.н.) амплификация қилиш учун HBV ДНК нуклеотид кетма-кетликлари аниқланди ва S-HBsAg генини трансфер векторларга конструкциялаш учун махсус рестрикция сайтлар ҳосил қилиниб, амплификация қилиш мақсадида тегишли праймерлар синтези амалга оширилди.

2. Илк бор гепатит В вируси юза S-HBsAg антигенини *Pichia pastoris* GS115 ачитқисида кодловчи янги pPIC3.5-S ва pPIC9-S рекомбинант плазмидалари клонлаштирилди. Клонлаштирилган S-HBsAg ген фрагментининг ДНК кетма-кетлиги аниқланиб, Ўзбекистонда тарқалган Гепатит В вируси D генотипига мос эканлиги қайд этилди.

3. Рекомбинант S-HBsAg ни экспрессия қилувчи рекомбинант *Pichia pastoris* GS 115 штаммининг Mut<sup>+</sup> ва Mut<sup>S</sup> фенотиплари олиниб, улар орасидан Mut<sup>S</sup> фенотипи, S-HBsAg ни юқори даражада синтез қилишини намоён этади.

4. ИФА ва иммуноблотинг усуллари ёрдамида *Pichia pastoris* га клонлаштирилган ген, гепатит В вирусига мос келувчи антигенлик хусусиятларини намоён қиладиган рекомбинант оқсилни экспрессиялаши қайд этилди.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc. 02/30.12.2019.В.38.01 ПО  
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ  
МИКРОБИОЛОГИИ**

---

**ИНСТИТУТ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

**АШИРОВ ОЙБЕК НОРБОЙ ЎҒЛИ**

**ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО S БЕЛКА  
ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В ЧЕЛОВЕКА  
В ДРОЖЖАХ *PICHLIA PASTORIS***

**03.00.12 – Биотехнология  
02.00.10 – Биоорганическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)  
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

**ТАШКЕНТ – 2020**

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В2019.4PhD/В413

Диссертация выполнена в Институте химии растительных веществ.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета ([microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz)) и Информационно-образовательном портале «Ziyounet» ([www.ziyounet.uz](http://www.ziyounet.uz)).

**Научные руководители:**

**Азимова Шохноз Садыковна**

доктор биологических наук, профессор

**Сасмаков Собирджан Анарматович**

кандидат химических наук, старший научный сотрудник

**Официальные оппоненты:**

**Турдикулова Шахло Уткуровна**

доктор биологических наук, профессор

**Рахманбердыева Рано Каримовна**

доктор химических наук, старший научный сотрудник

**Ведущая организация**

Институт биоорганической химии

Защита диссертации состоится «16» июля 2020 года в «09<sup>30</sup>» часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.12.2019.В.38.01 при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 76, конференц-зал Института микробиологии, 3 этаж Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, 246-02-24, e-mail: [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz)).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована под № \_\_\_\_). Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 76, Административное здание Института микробиологии, 5-й этаж, библиотека. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года.  
(реестр протокола рассылки № \_\_\_\_ от « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 года).

**Арипов Тахир Фатихович**

Председатель Научного совета по присуждению учёных степеней, б.ф.д., профессор, академик

**Жураева Рохила Назаровна**

Ученый секретарь Научного совета по присуждению учёных степеней, к.б.н., старший научный сотрудник

**Гулямова Ташхан Гафуровна**

Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёных степеней, д.б.н., профессор

## **ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))**

**Актуальность и востребованность исследования.** Вирус гепатита В (HBV) в настоящее время является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения<sup>3</sup>, во всем мире более 350 миллионов человек страдает хроническим гепатитом В, и каждый год умирает около миллиона человек. Современным методом предотвращения этого заболевания является вакцинирование. В настоящее время в 160 странах мира вакцина против гепатита В включена в национальные программы иммунизации. Основой существующих в настоящее время вакцин против вируса гепатита В является белок, кодируемый S геном ДНК поверхностного антигена вируса гепатита В длиной 681 п.н., получаемый методами генной инженерии и биоорганической химии. Следовательно, имеет научное и практическое значение получение рекомбинантного белка S, клонированного в соответствии с генотипом D вируса гепатита В в Узбекистане.

В мировой практике белок S-HBV получают методами генной инженерии в различных системах экспрессии. В частности, проводятся сравнительные исследования эффективности получения данного белка в дрожжевой системе *Pichia pastoris*; выявление секреторных сигналов; обеспечение стабильности рекомбинантных белков; подбор оптимальных условий экспрессии; выделение и очистка рекомбинантных белков из клеток *Pichia pastoris*; выявление антигенных свойств и применение в практике S-HbsAg белка и др.

В настоящее время в Республике проводятся широкомасштабные меры по увеличению производства отечественных импортозамещающих и экспортоориентированных лекарственных препаратов, в том числе на основе современных технологий. В связи с этим был достигнут определенный прогресс в разработке генетической конструкции, позволяющей получать рекомбинантный белок PreS2-S вируса гепатита В в клетках насекомых (*Bombus mori*). В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан<sup>4</sup>, определены задачи по «Развитию фармацевтической промышленности по обеспечению населения качественными, безопасными и дешевыми лекарственными средствами». В этой связи, особую актуальность приобретает разработка метода получения рекомбинантного S-белка, HBV в дрожжах *Pichia pastoris* с целью создания на его основе отечественной вакцины против вируса гепатита В.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О Стратегии дальнейшего развития Республики Узбекистан», Постановлении Президента Республики Узбекистан от ПП-3532 14 февраля 2018 года «О дополнительных мерах по

<sup>3</sup> <https://www.who.int/bulletin/volumes/88/11/10-011110/en/>

<sup>4</sup> Указ Президента Республики Узбекистан за № УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» от 7 февраля 2017 г.

ускоренному развитию фармацевтической отрасли», Постановлением Президента Республики Узбекистан, ПП-3489 от 23 января 2018 г «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

**Актуальность исследований в приоритетных направлениях развития науки и техники в республике.** Данное исследование проводилось в соответствии с VI приоритетным направлением развития науки и техники Республики «Медицина и фармакология».

**Степень изученности проблемы.** Во многих зарубежных странах- США, Франция, Германия, Корея, Китай, Индия, Израиль, Пакистан, Турция, Иран и др. такими учеными как, Cregg J. M (2000), Sophie Ottone (2007), Ahmad Adnan (2016), Nirmala Bardiya (2006), Deng Ning (2001), Ana Vassileva (2001), Daniel Shouva (2003), Ernawati Arifin Giri-Rachman (2015), Hande Selamoğlu (2009), Maryam Gazor (2018) проводятся исследования по получению рекомбинантного S белка, кодируемого S геном поверхностного антигена вируса гепатита В в дрожжевой системе экспрессии *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. Основными профилактическими вакцинами на основе рекомбинантного S белка являются «Энджерикс В®, GlaxoSmithKline, USA», «Н-В-VAX II, Merck&Co.», «Euvax В 20 mcg/ml, LG Life Sciences Ltd., Korea», «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India».

В нашей Республике, в лаборатории молекулярной генетики ИХРВ под руководством проф. Ш.С. Азимовой (2004) разработаны генетические конструкции, которые позволяют получать рекомбинантный Pres2-S белок вируса гепатита В в клетках насекомого (*Bombux mori*).

**Связь диссертационного исследования с исследовательской работой научно-исследовательского учреждения.** Диссертационное исследование проводилось в рамках научно-исследовательского проекта Института химии растительных веществ АН РУз № ПЗ-20170926277 «Разработка получения рекомбинантных белков в дрожжевой системе экспрессии *Pichia pastoris* с целью создания новых диагностических и лекарственных средств» (2018-2020 г)

**Цель исследования:** Разработка метода экспрессии рекомбинантного S-белка поверхностного антигена Вируса гепатита В человека в дрожжах *Pichia pastoris*.

**Задачи исследования:**

определение участков нуклеотидной последовательности S гена для синтеза соответствующих праймеров для клонирования;

синтез праймеров для амплификации S гена и клонирование амплифицированного из сыворотки крови больных вирусом гепатита В S гена в дрожжевые векторы (pPIC3.5 и pPIC9);

определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК S гена;



введение рекомбинантных плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S, содержащих S ген в штамм *Pichia pastoris* GS115 (трансформация);

селекция рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, продуцирующих S-НВsAg;

выявление фенотипов штаммов *Pichia pastoris*, продуцирующих наибольшее количество S-НВsAg;

характеристика полученного рекомбинантного S-НВsAg методами ИФА, иммуноблотинга.

**Объект исследования:** штамм дрожжей *Pichia pastoris*, трансферные векторы pPIC3.5 и pPIC9, рекомбинантный S белок.

**Предметом исследования** является амплификация S гена, кодирующего поверхностный антиген HBV, клонирование полученного гена, трансформация рекомбинантных плазмид в *Pichia pastoris* и экспрессия S белка.

**Методы исследования.** В исследовании использовали методы биотехнологии и биоорганической химии (синтез праймеров, клонирование генов, определение нуклеотидной последовательности ДНК, выделение и очистка молекул ДНК, ПЦР, культивирование дрожжевых клеток, ИФА, иммуноблот и др.).

**Научная новизна исследования** заключается в следующем:

синтезированы праймеры для амплификации полноразмерного гена S-НВsAg, с конструированием сайтов рестрикции для клонирования в трансферные векторы;

впервые клонированы новые рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S, кодирующие S белок поверхностного антигена вируса гепатита В в дрожжах *Pichia pastoris* GS115;

выявлено, что нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК S гена соответствует генотипу D вируса гепатита В, распространённому в Узбекистане;

получены рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris* GS115, продуцирующие S-НВsAg;

выявлено, что фенотип штамма *Pichia pastoris* GS115 - *Mut<sup>S</sup>*, продуцирует наибольшее количество S-НВsAg;

**Практические результаты исследования:**

разработан метод амплификации S гена, кодирующего поверхностный антиген вируса гепатита В, с помощью специально синтезированных праймеров;

улучшены методы клонирования амплифицированного гена S в дрожжевые трансферные векторы;

выявлен фенотип штамма *Mut<sup>S</sup>*, продуцирующий наибольшее количество рекомбинантного S белка;

обоснованы оптимальные условия получения белка S-НВsAg в системе экспрессии *Pichia pastoris*.

**Достоверность результатов исследования** обосновывается использованием современных методов биотехнологии и биоорганической

химии. Научные результаты анализировали современными аналитическими методами. Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение результатов исследований на республиканских и международных научных конференциях, публикации результатов исследований в рецензируемых научных изданиях и получение патентов.

#### **Научная и практическая значимость результатов исследования.**

Научная значимость результатов исследования заключается в получении новых рекомбинантных плазмид и на их основе новых штаммов-продуцентов *Pichia pastoris*, продуцирующих рекомбинантный S-HBsAg.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что полученный рекомбинантный S-HBsAg, может служить основой при создании отечественной вакцины против HBV, а также количественной ИФА тест системы.

#### **Внедрение результатов исследований.**

На основании результатов научных исследований по клонированию гена S, кодирующего поверхностный антиген вируса гепатита В, и его экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*, а также изучении его антигенности:

- Последовательность гена, который кодирует рекомбинантный белок S, включена в международную базу данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная медицинская библиотека США, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>) и зарегистрирована с идентификатором BankID 2308626. В результате они могут быть использованы для определения аминокислотной последовательности и местоположения антигенных детерминант аналогичных белков;

- Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего рекомбинантный белок S в дрожжах, зарегистрирована в базе данных EMBL LR746134 (<http://www.ebi.ac.uk>). В результате стало возможным использование данной информации для сравнительного анализа аналогичных белков в глобальном масштабе.

**Апробация результатов исследования.** Результаты исследований по теме диссертации изложены в виде докладов и прошли апробацию на 3 международных и 7 республиканских научно-технических конференциях.

**Публикация результатов исследования.** Опубликовано 15 научных работ по теме диссертации, 5 научных работ – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации, в том числе 4 в Республиканских и 1 в международном журнале.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованных литературных источников и приложений. Объем диссертации составляет 101 страниц.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Во Введении обоснована актуальность диссертационной работы, изложены цели и задачи, обозначены объекты и предметы исследования,

соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и техники Республики Узбекистан, научная и практическая значимость полученных результатов, информация о внедрении результатов, опубликованные работы и структура диссертации.

В первой главе диссертации «**Получение рекомбинантных белков в системе экспрессии *Pichia Pastoris***», представлен обзор зарубежной научной литературы о различных системах экспрессии для получения рекомбинантных белков, сравнение *Pichia pastoris* с другими системами экспрессии, информация о штаммах и трансферных векторах, используемых в системе экспрессии *Pichia pastoris*.

Во второй главе диссертации «**Методы и материалы по получению рекомбинантного S-HBsAg в системе экспрессии *Pichia pastoris***» приведена экспериментальная часть, описывающая методики клонирования гена в трансферные вектора, трансформацию рекомбинантных плазмид в клетки *Pichia pastoris* а также другие материалы, используемые в работе.

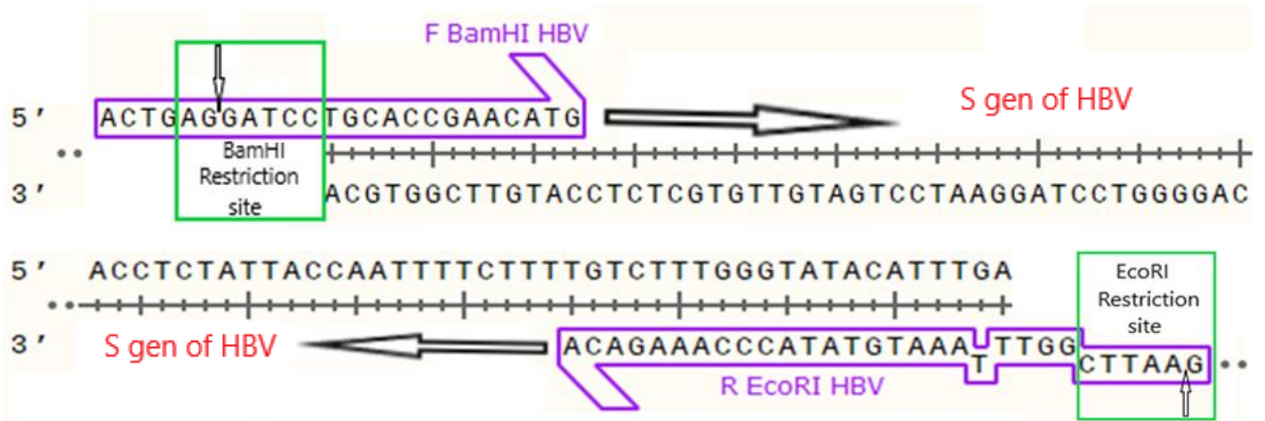
Третья глава диссертации посвящена «**Экспрессии рекомбинантного S белка поверхностного антигена вируса гепатита В человека в дрожжах *Pichia pastoris***». В этом разделе описываются результаты клонирования S гена в дрожжевые векторы pPIC3.5 и pPIC9, определена нуклеотидная последовательность полученного фрагмента ДНК S гена, введение рекомбинантных плазмид, содержащих S ген в штамм *Pichia pastoris* GS115, селекция и отбор рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, продуцирующих S белок, выявление фенотипов штаммов *Pichia pastoris*, продуцирующих наибольшее количество S белка, а также характеристика полученного S белка методами ИФА и иммуноблоттинга.

#### **Клонирование ДНК S гена HBV в плазмиды pPIC3.5 и pPIC9 и его амплификация**

Нами для экспрессии S региона HBV в дрожжах *Pichia pastoris* были использованы трансферные векторы, которые способны внедрять чужеродную ДНК в хромосому *Pichia pastoris* и синтезировать целевой белок под промотором АОХ1. Анализ рестриктной карты трансферных векторов pPIC3.5 и pPIC9 показал, что ДНК S региона HBV должна быть инсертирована между полилинкерными сайтами (MCS) трансферных векторов. Данный полилинкер имеет рестрикционные сайты BamHI, EcoRI (для pPIC3.5) и XhoI, EcoRI (для pPIC9). Следовательно, было необходимо синтезировать праймеры таким образом, чтобы обеспечить их комплементарность как к ДНК S региона HBV, так и к соответствующим сайтам рестрикции трансферных векторов. Исходя из последовательности ДНК S региона HBV и вышеуказанных сайтов рестрикции, нами сконструированы следующие праймеры:

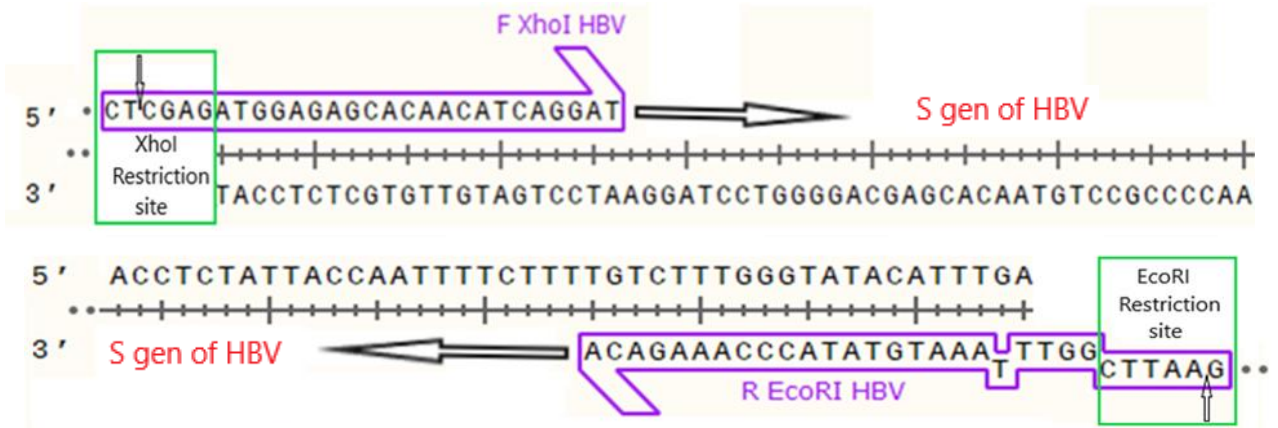
Для трансферного вектора **pPIC3.5:**

- 1) **Forward** – BamHI 5'-ACTGAGGATCCTGCACCGAACATG-3'
- 2) **Reverse** – EcoRI 5'-GGTTTATTAGAATTCAAATGTATACCSA AAGACA -3'



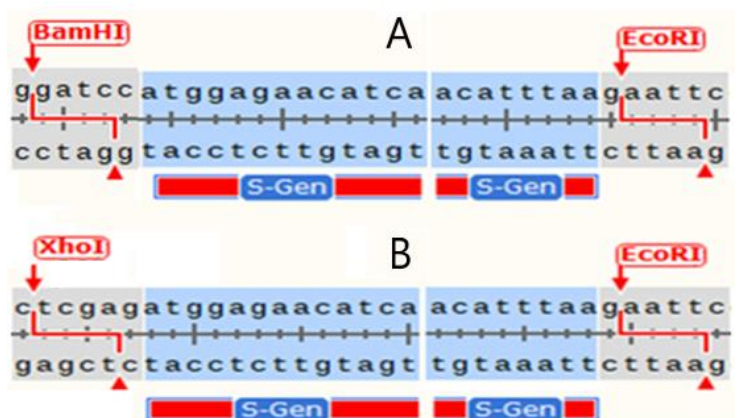
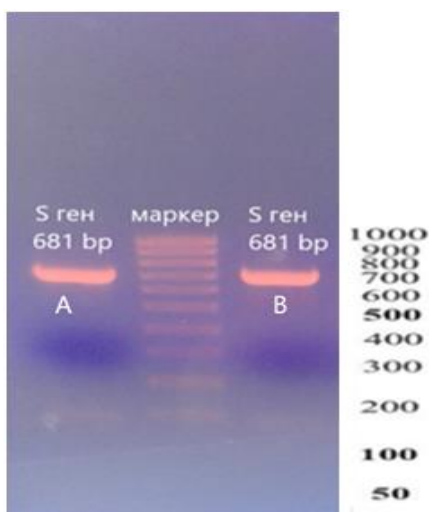
Для трансферного вектора pPIC9:

- 1) **Forward** XhoI 5'- CTGCA**CTCGAG**ATGGAGAACATCACATCAGGAT-3'
- 2) **Reverse** – EcoRI 5'- GGTTTATTAG**GAATTC**AAATGTATACCCAAA GACA -3'



Затем с помощью этих праймеров мы амплифицировали и выделили S ген из ДНК крови больных HBV.

На рисунке 1 представлен анализ ПЦР амплификата. Данный амплификат содержит не только S ген, но и нуклеотидные последовательности ДНК, комплементарные сайтам рестрикции исходных векторов.

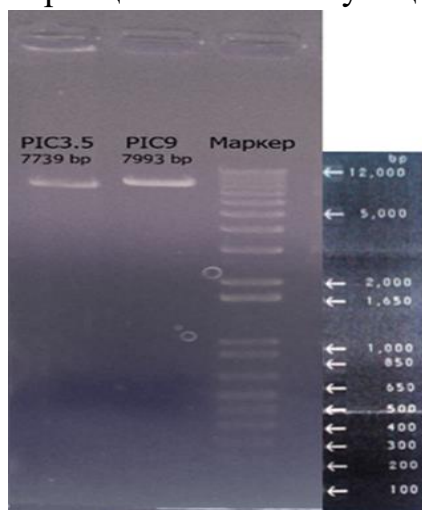


**Рисунок 1. Гель-электрофорез ПЦР амплификатов S гена в 1% агарозном геле, где: А. Фрагмент S гена (pPIC3.5), с сайтами рестрикции BamHI и EcoRI, В. Фрагмент S гена (pPIC9), с сайтами рестрикции рестрикции XhoI и EcoRI.**

При этом размер клонированного S гена соответствовал теоретически ожидаемому. Далее, амплификат А обрабатывали ферментами BamHI и EcoRI (для инсерции в плазмиду pPIC3.5), а амплификат В – XhoI и EcoRI (для инсерции в плазмиду pPIC9). В результате были получены фрагменты ДНК S гена, содержащие «липкие концы».

### ***Подготовка дрожжевых векторов pPIC3.5 и pPIC9 Pichia pastoris для клонирования***

Плазмиды (дрожжевые векторы) pPIC3.5 и pPIC9 обрабатывали ферментами - рестриктазами BamHI, EcoRI (для pPIC3.5) и XhoI, EcoRI (для pPIC9) соответственно (линеаризовали). После обработки рестриктазами, в соответствии с нуклеотидной последовательностью, трансферные векторы, образуют линейные молекулы ДНК размером 7739 п.н. (pPIC3,5) и 7793 п.н. (pPIC9. На рис. 2 представлены результаты электрофореза в 0,8% геле после рестрикции соответствующими ферментами.

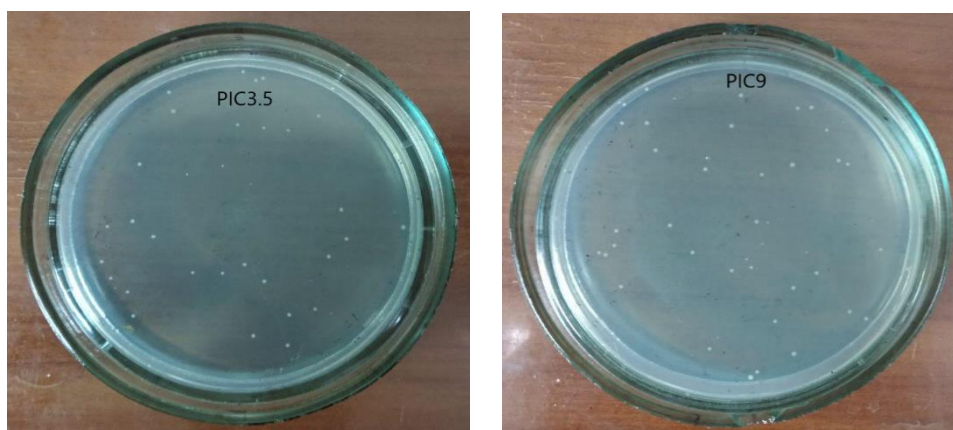


**Рисунок 2. Гель-электрофорез трансферных векторов pPIC3.5, pPIC9 после обработки ферментами BamHI, XhoI и EcoRI. в 0,8% агарозном геле.**

Как видно из рисунка 2, эти линейные векторы имеют размер, соответствующий теоретически ожидаемому.

### ***Селекция рекомбинантных клонов E.coli***

В результате лигирования полученные рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S трансформировали в клетки *Escherichia coli* NEB-5α методом электропорации. Данные плазмиды содержат гены устойчивости к ампициллину, поэтому в селективной среде с ампициллином растут только те клоны, которые содержат рекомбинантные плазмиды (рис. 3).

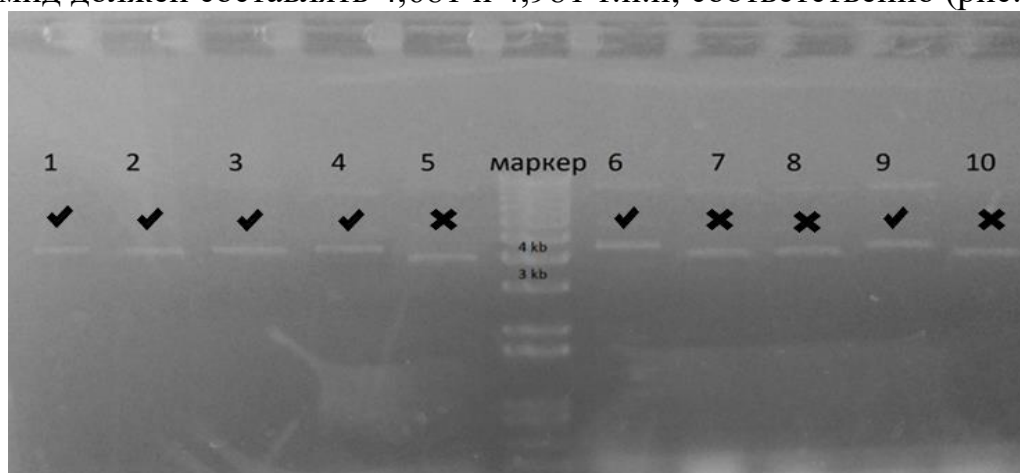


**Рис. 3. Отбор рекомбинантных клонов *E. coli* в питательной среде LB агар с ампициллином.**

Для дальнейшего анализа все трансформанты пересеивали на свежеприготовленный LB агар с ампициллином. Нами отобрано из каждой трансформированной плазмиды по 5 (1,5,10,15,20) колоний *E.coli*. Отобранные колонии *E.coli* культивировали в течение ночи в 1 мл питательной среды LB и выделяли плазмиды методом щелочного лизиса.

#### ***Гель-электрофорез рекомбинантных плазмид***

Методом гель-электрофореза в агарозном геле были проанализированы размеры трансферных векторов – размер pPIC3.5 и pPIC9 составляет 4,0 и 4,3 т.п.н., а размер S гена - 681 п.н., следовательно, размер рекомбинантных плазмид должен составлять 4,681 и 4,981 т.п.н, соответственно (рис. 4).



**Рисунок 4. Отбор рекомбинантных плазмид, с помощью метода гель-электрофореза в 0,8% агарозном геле. Где: 1–5 рекомбинантные плазмиды на основе pPIC3.5, а 6-10 рекомбинантные плазмиды на основе pPIC9.**

Как видно из рисунка, размер образцов **1-4** составляет 4,861 т.п.н. Рекомбинантные плазмиды, полученные на основе pPIC9-S **6** и **9** имеют более высокий молекулярный размер, чем остальные 7, 8 и 10.

Таким образом, на основании данных электрофореза очевидно, что образцы **1-4** (pPIC3.5-S), **6** и **9** (pPIC9-S) содержат целевой S ген.

Для подтверждения полученных результатов проводили ПЦР анализ рекомбинантных плазмид **1-4** (pPIC3.5-S), **6** и **9** (pPIC9-S), соответственно (рис. 5).

### ***ПЦР анализ рекомбинантных плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S***

Анализ ПЦР на содержание S гена всех 10 плазмид проводили с использованием синтезированных нами праймеров (совместно с м.н.с. Махневым А.А.) (рис. 5). В качестве контроля использовали образцы крови больных HBV. Результаты ПЦР анализа приведены на рисунке 5.



**Рисунок 5. Результаты ПЦР анализа рекомбинантных плазмид в 1% агарозном геле.**

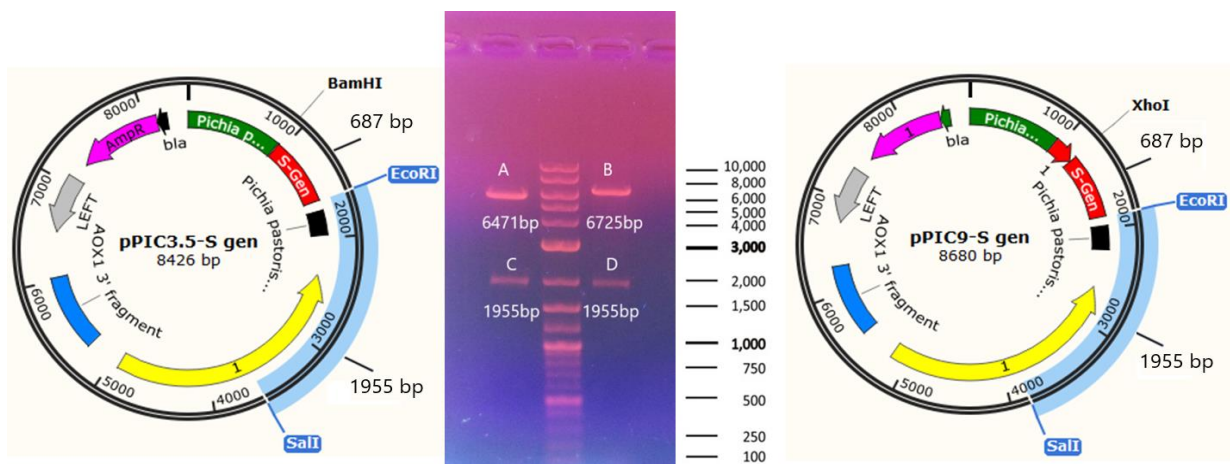
**М**-маркер; **1-5** – трансформанты, полученные на основе pPIC3.5-S, **6-10** – трансформанты, полученные на основе pPIC9-S, **11**- стандарт отрицательного контроля, сыворотка крови здорового человека **12**- стандарт положительного контроля, сыворотка крови человека, заражённого вирусом Гепатита В.

Как видно из рисунка 6, результаты ПЦР анализа, подтвердили наличие S гена с размером 681 п.н., в плазмидах 1-4 (pPIC3.5-S), и 6 и 9 (pPIC9-S). Таким образом, мы клонировали S ген в дрожжевые трансферные векторы pPIC3.5 и pPIC9, и получили рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S.

#### ***Определение ориентации клонированного S гена в трансферных векторах***

С целью определения ориентации клонированного S гена, на основе физической карты, рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S обрабатывали рестриктазами EcoRI и Sall. В результате были получены фрагменты ДНК размером 6471 п.н., 1955 п.н. (pPIC3.5-S) и 6725 п.н., 1955 п.н. (pPIC9-S).

При правильной ориентации S гена образуется фрагмент ДНК размером 1955 п.н., который был выявлен при гель-электрофорезе образцов (рис. 6).



**Рис. 6. Результаты рестрикционного анализа рекомбинантных плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S с использованием рестриктаз EcoRI и Sall 0,8 % агарозном геле.**

А и С фрагменты pPIC3.5-S размером 6471 п.н. и 1955 п.н.

В и D фрагменты pPIC9-S размером 6725 п.н. и 1955 п.н.

Поскольку ДНК S гена инсертрована в плаزمиды путем разрезания ее ферментами EcoRI, BamHI и XhoI, и при этом сайт EcoRI должен оказаться в 3'-конце инсерируемого гена, то соответственно, при правильной ориентации образуются фрагменты длиной 1955 п.н., а при неправильной ориентации - 2642 п.н.

Таким образом, установлено, что S ген, введенный в трансферные вектора pPIC3.5 и pPIC9, клонирован в правильной ориентации.

#### ***Определение нуклеотидной последовательности ДНК S гена в рекомбинантных плаزمиды pPIC3.5-S и pPIC9-S***

В рамках диссертационной работы была определена последовательность фрагмента ДНК S гена в рекомбинантных плазмиды pPIC3,5-S и pPIC9-S:

5'-ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACA  
GGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAAATACCGCAGAGTCTA  
GACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACCACCGTGTGTC  
TTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTG  
TCCTCCAATTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA  
TCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGG  
ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCGAC  
CACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAAC  
CTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGC  
ACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGGCTTTCGGAAAATTCTATGGG  
AGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT  
CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGAT  
GATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCSTTTTA  
CCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAA-3' (681п.н.).

Нуклеотидную последовательность секвенированного S гена сравнивали с базой данных NCBI. В результате было обнаружено, что



клонированный нами S ген, соответствует генотипу D вируса гепатита В, и нуклеотидная последовательность полностью совпадает.

Таким образом, определено, что S ген, содержащийся в рекомбинантных, клонированных плаزمидах pPIC3.5-S и pPIC9-S, полностью соответствует S региону поверхностного антигена вируса гепатита В.

### ***Трансформация рекомбинантных плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S в клетки Pichia pastoris***

Для интеграции рекомбинантных плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S в клетки *P. pastoris*, плазмиды обрабатывали рестриктазой SacI, для того чтобы получить линейную форму. При использовании данного фермента получен фенотип Mut<sup>+</sup>, который характеризуется высоким уровнем утилизации метанола – основного источника углерода и инициатора экспрессии целевого гена.

В ходе экспериментов мы оптимизировали условия эффективности трансформации в зависимости от концентрации ДНК от (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 и 2,0 мкг/мкл) (Таблица 1). Эффективность процесса определяли по количеству образовавшихся трансформантов.

Таблица 1.

#### **Зависимость эффективности трансформации от концентрации ДНК**

№	Концентрация ДНК, мкг.	Оптическая плотность клеток OD <sub>600</sub>	Количество трансформантов
1	0,1	3,0	13x10 <sup>4</sup>
2	0,2	3,0	31x10 <sup>4</sup>
<b>3</b>	<b>0,5</b>	<b>3,0</b>	<b>45x10<sup>4</sup></b>
4	1,0	3,0	26x10 <sup>4</sup>
5	2,0	3,0	11x10 <sup>4</sup>

Из таблицы видно, что наибольшее число (45x10<sup>4</sup>) трансформантов было получено при концентрации ДНК- 0,5 мкг.

#### ***Зависимость эффективности трансформации от количества клеток Pichia pastoris***

Электрокомпетентные клетки выращивали при различной плотности, как показано в таблице 2, и эксперименты проводили с оптимальным количеством ДНК (0,5 мг/мкл) плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S.

Таблица 2.

#### **Зависимость эффективности трансформации от оптической плотности клеток**

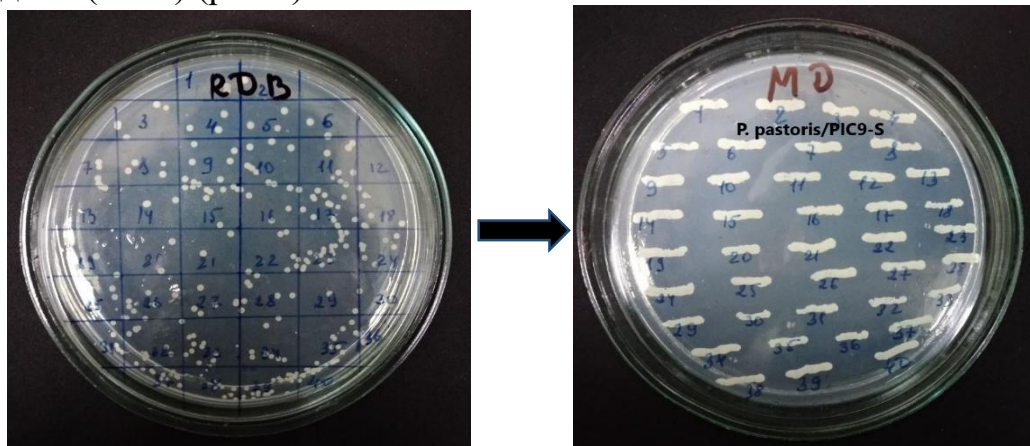
№	Оптическая плотность клеток OD <sub>600</sub>	Концентрация ДНК, мкг.	Количество трансформантов
1	0,5	0,5	29·10 <sup>4</sup>
2	1,0	0,5	45·10 <sup>4</sup>
<b>3</b>	<b>2,0</b>	<b>0,5</b>	<b>53·10<sup>4</sup></b>
4	3,0	0,5	48·10 <sup>4</sup>
5	5,0	0,5	27·10 <sup>4</sup>

6	7,5.	0,5	$11 \cdot 10^4$
---	------	-----	-----------------

Как видно из таблицы 2, максимальное количество трансформантов ( $53 \times 10^4$ ) достигается при значении  $OD_{600}$  2.0. При увеличении оптической плотности ( $OD_{600}$  3.0) эффективность трансформации снижается. Таким образом, выявлено, что для эффективной трансформации нужно выращивать дрожжевые клетки до достижения значений оптической плотности ( $OD_{600}$ ) - 1.0-3.0.

### **Селекция рекомбинантных клонов *Pichia pastoris***

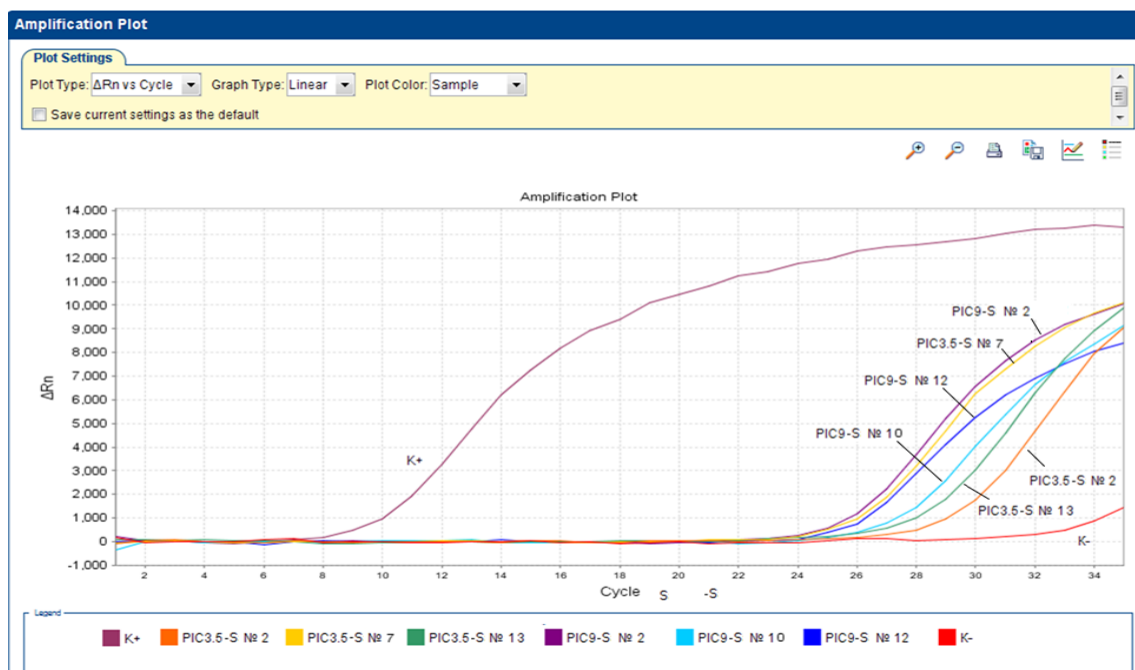
Векторы, pPIC3.5 и pPIC9 в качестве селективного маркера содержат нативный ген гистидинолдегидрогеназы *HIS4*, а в клетках *Pichia pastoris* этот ген мутирован (*his4*), то есть они не могут расти без аминокислоты гистидина. Когда рекомбинантные плазмидные ДНК трансформируют в клетки *Pichia pastoris*, мутированный *his4* ген заменяется нативным *HIS4*. В результате после трансформации растут только те клетки, которые содержат нативный *HIS4* ген. В этой связи клетки после трансформации выращивали в среде без гистидина (RDB) (рис 7).



**Рисунок 7. Отбор колоний *Pichia pastoris*, содержащих рекомбинантную плазмиду pPIC3.5-S в питательной среде без гистидина.**

Клетки пересевали на другие чашки Петри со средой MD без гистидина для последующего использования.

Все штаммы, которые выросли на среде MD, пересевали в жидкую MD среду и инкубировали в течение ночи при 30°C. Оптическую плотность выращенных культур клеток измеряли при длине волны 600 нм. Нами отобрано по 3 образца *Pichia pastoris*, трансформированных плазмидами pPIC3.5-S и pPIC9-S с наибольшей оптической плотностью – отобраны образцы 2, 7 и 13 из колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S, и образцы 2, 10 и 12 из колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды pPIC9-S. Геномная ДНК отобранных рекомбинантных колоний была выделена и проанализирована с использованием метода РТ-ПЦР (рис. 8).



**Рисунок 8. RT-ПЦР анализ колоний *Pichia pastoris*, содержащих рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S**

На основе полученных результатов (Рисунок 10) можно заключить, что выбранные 6 образцов рекомбинантных штаммов *P. pastoris* содержали в своем составе целевой S-ген и все 6 образцов достигли порогового цикла в 24 ом цикле ПЦР. В положительном контрольном образце концентрация ДНК больше, поэтому пороговый цикл был достигнут в 8 ом цикле ПЦР. В последствии образцы с высоким количеством копий ДНК (PIC3.5 № 7 и PIC9 № 2) были отобраны для дальнейших исследований.

### ***Получение фенотипа Mut<sup>S</sup> Pichia pastoris***

Клетки дрожжей фенотипа Mut<sup>+</sup> имеют более высокие темпы роста, а также более высокую продуктивность, чем фенотипы с низким уровнем утилизации метанола (Mut<sup>S</sup>). Тем не менее, из литературы известно, что штаммы Mut<sup>S</sup> превосходят штаммы Mut<sup>+</sup> по экспрессии некоторых рекомбинантных белков. Учитывая эти данные, для сравнительного анализа уровня экспрессии рекомбинантного S белка в фенотипах Mut<sup>S</sup> и Mut<sup>+</sup>, нами были получены клетки фенотипа Mut<sup>S</sup>. Для этого рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S были обработаны с помощью фермента Bgl II и эти плазмиды трансформировали в клетки *Pichia pastoris* методом электропорации. После электропорации клетки пересевали на селективную питательную среду RDB агар. Для того чтобы отличить фенотипы образованных колоний, клетки инкубировали в селективной среде MM. Были отобраны фенотипы с низкой скоростью роста трансформантов Mut<sup>S</sup> в метанолной среде MM.

**Экспрессия рекомбинантного S белка в зависимости от фенотипов Mut<sup>+</sup> и Mut<sup>S</sup> и от концентрации метанола в питательной среде**

В рамках диссертационной работы мы исследовали уровень экспрессии рекомбинантного S белка в зависимости от фенотипов клеток и количества метанола в питательной среде. Для этого рекомбинантные штаммы были культивированы на первом этапе в среде VMGY, на втором этапе в среде VMMY с добавлением метанола в концентрациях - 0,5; 1,0; 2,0; 2,5%. Культуры, выращенные в среде VMGY, центрифугировали после достижения OD<sub>600</sub> 2-6, суспендировали (пересевали в среду) в среде VMMY и инкубировали в течение 96 ч в термошейкере. В питательную среду каждые 24 часа добавляли метанол в вышеуказанных концентрациях. Уровень экспрессии определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) (таблица 3). При анализе использовали коммерческие наборы, такие как «Диагностические тест системы ИХРВ АН РУз» и Diagnostic Systems (Россия). В качестве калибровочного стандарта использовали вакцину против вируса гепатита В (pДНК) 20 мкг/мл, Serum Institute of India и Euvax B 20 мкг/мл, Sanofi Pasteur Korea Ltd .

Таблица 3

**Изменение уровня экспрессии рекомбинантного S белка в зависимости от фенотипов клеток и количества метанола**

Тип фенотипа	Концентрация метанола	Результаты теста ИФА (OD-450 нм)	Степень разбавления	Количество HBsAg
<b>Mut<sup>+</sup></b>	0,5%	1,0	1:20000	±10 мг/л
	<b>1,0%</b>	<b>1,21</b>	<b>1:20000</b>	<b>±12,1 мг/л</b>
	1,5%	0,92	1:20000	±9,2 мг/л
	2,0%	0,47	1:20000	±4,7 мг/л
<b>Mut<sup>S</sup></b>	0,3%	1,12	1:20000	±11,2 мг/л
	<b>0,5%</b>	<b>1,35</b>	<b>1:20000</b>	<b>±13,5 мг/л</b>
	1,0%	1,02	1:20000	±10,2 мг/л
	2,0%	0,65	1:20000	±6,5 мг/л
Стандарт положительного контроля в наборе (Сыворотка крови человека, заражённого вирусом гепатита В).		≥ 3000 (out)	1:1000	
		0.4	1:10000	±2 нг/мл
Стандарт отрицательного контроля в наборе (Сыворотка крови здорового человека).		0.097	-	-

Как видно из таблицы 3, уровень экспрессии S-HBsAg в клетках фенотипа Mut<sup>+</sup> при концентрации метанола 1.0% составляет ±12,1 мг/л, а для фенотипа Mut<sup>S</sup> при концентрации метанола 0,5%, этот показатель равняется ±13.5 мг/л.

### **Сравнение уровней экспрессии штаммов *Pichia pastoris* на основе pPIC3.5-S и pPIC9-S**

Исследуемый нами рекомбинантный вектор pPIC9-S содержит сигнальную ( $\alpha$ -factor) последовательность ДНК длиной 249 п.н., которая выделяет гетерогенный белок в питательную среду. В связи с этим, мы сравнили уровень синтеза рекомбинантного S белка штаммами *Pichia pastoris*, полученного на основе pPIC9-S (секретируемый), а также pPIC3.5-S (внутриклеточный). Результаты экспериментов приведены в таблице 4.

Таблица 4

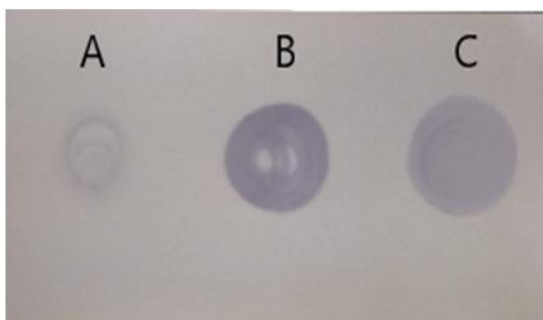
#### **Сравнительный анализ уровней экспрессии штаммов *Pichia pastoris* на основе pPIC3.5-S и pPIC9-S**

Тип штаммов	Тип экспрессии HBsAg	Результаты теста ИФА (OD -450 нм)	Степень разбавления	Количество HBsAg
<i>Pichia pastoris</i> /pPIC3.5-S	Внутренняя экспрессия белка	1,35	1:20000	±13.5 мг/л
	Экспрессия в питательную среду (секреция)	0,16	-	±0,8 нг/л
<i>Pichia pastoris</i> /pPIC9-S	Внутренняя экспрессия белка	1,31	1:20000	±13,1 мг/л
	Экспрессия в питательную среду (секреция)	0,18	-	±0,9 нг/л
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»		≥ 3000 (out)	1:1000	
		0.401	1:10000	±2 нг
Стандарт отрицательного контроля в наборе (Сыворотка крови здорового человека).		0.097	-	-

Результаты ИФА показывают, что штамм *Pichia pastoris*, полученный на основе рекомбинантной плазмиды pPIC9-S, не секретирует целевой белок в питательную среду и уровень экспрессии рекомбинантного S белка в обоих полученных штаммах является практически одинаковым.

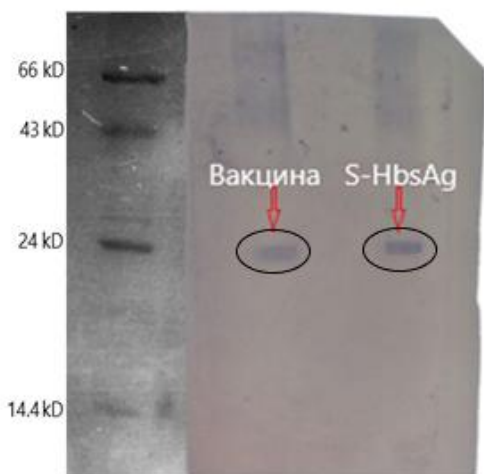
#### **Дот-блот и иммуноблот анализ белка HbsAg**

Для определения антигенной специфичности синтезированного S белка проводили дот-блот и иммуноблот анализ в сравнении с коммерческой вакциной «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India», содержащей аналогичный рекомбинантный белок. Экстракцию S-HBsAg из клеток *Pichia pastoris* проводили с использованием буфера.



**Рисунок 9. Результаты Dot Blot анализа S-HBsAg**

А- экстракт из *Pichia pastoris*, не содержащий целевой белок; В- экстракт из *Pichia pastoris*, содержащий рекомбинантный S белок; С- положительный контроль (коммерческая вакцина).



**Рисунок 10. Результаты иммуноблотинга.**

Как видно из рисунков 13-14, синтезированный в клетках *Pichia pastoris* рекомбинантный S-HBsAg, проявляет антигенную специфичность аналогичную коммерческой вакцине и имеет соответствующую молекулярную массу 24 кД

## ВЫВОДЫ

1. Определены участки нуклеотидных последовательностей ДНК вируса Гепатита В (HBV) для амплификации гена S-HBsAg (681 bp), кодирующего S регион поверхностного антигена HBV (226 аминокислот, 24-26 кДа). Синтезированы праймеры для амплификации полноразмерного гена S-HBsAg, проведено конструирование сайтов рестрикции для клонирования в трансферные векторы.

2. Впервые клонированы новые рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-S и pPIC9-S, кодирующие S регион поверхностного антигена вируса гепатита В в дрожжах *Pichia pastoris* GS115. Определена нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК S-гена, которая соответствует генотипу D HBV распространённого в Узбекистане.

3. Получены штаммы *Pichia pastoris* GS115 фенотипов Mut<sup>+</sup> и Mut<sup>S</sup>, экспрессирующие рекомбинантный S-HBsAg. Выявлен фенотип штамма Mut<sup>S</sup>, продуцирующий наибольшее количество рекомбинантного S белка.

4. Методом ИФА и иммуноблотинга установлено, что белок кодируемый S геном, клонированного в *Pichia pastoris* GS115 проявляет антигенную специфичность относительно вируса гепатита В.

**ONCE-ONLY SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING  
SCIENTIFIC DEGREES DSc.02/30.12.2019.B.38.01 AT THE  
INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

---

**INSTITUTE OF THE CHEMISTRY OF PLANT SUBSTANCES**

**ASHIROV OYBEK NORBOY UGLI**

**EXPRESSION THE RECOMBINANT S PROTEIN OF HUMAN  
HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN IN PICHIA  
PASTORIS YEAST**

**03.00.12 – Biotechnology  
02.00.10 – Bioorganic Chemistry**

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR  
OF PHILOSOPHY (PhD) OF BIOLOGICAL SCIENCES**

**Tashkent – 2020**

**Subject of this dissertation for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) has been registered under no. B2019.4PhD/B413 by the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.**

The doctoral dissertation has been conducted at the Institute of the Chemistry of Plant Substances

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (abstract)) languages on the website of the Scientific Council (microbio@academy.uz) and on the website «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

**Scientific supervisors:** **Azimova Shakhnoz Sadikovna**  
Doctor of biological sciences, Professor

**Sasmakov Sobirdjan Anarmatovich**  
Candidate of chemical sciences, senior scientific researcher

**Official opponents:** **Turdikulova Shaxlo Utkurovna**  
Doctor of biological sciences, Professor

**Raxmanberdieva Rano Karimovna**  
Doctor of biological sciences, senior scientific researcher

**Leading organization:** **Institute of Bioorganic chemistry**

The defense of the dissertation will take place on «16» July 2020 at 09<sup>30</sup> the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.38.01 of Institute of Microbiology at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology under №\_\_ (Address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: [info@microbio.uz](mailto:info@microbio.uz)).

The abstract of the dissertation is distributed on «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 year  
(protocol at the register No \_\_\_\_\_ dated by «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 year)

**Aripov Takhir Fatikhovich.**  
Chairman of the scientific council awarding of scientific degrees, Dr.S.B., Academician

**Juraeva Roxila Nazarovna**  
Scientific secretary of the scientific council awarding scientific degrees, PhD, senior researcher

**Gulyamova Tashkhan Gafurovna.**  
Chairman of the scientific seminar under the scientific council awarding scientific degrees, Dr.Sc.B., Professor



## INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

**The aim of research work** was to develop a method for the expression of recombinant S protein of the surface human Hepatitis B virus antigen in *Pichia pastoris*.

**The objects of the research work** were yeast strain of *Pichia pastoris*, transfer vectors pPIC3.5 and pPIC9, recombinant S protein.

**Scientific novelty of the research work:**

primers for amplification of the full-size S-HBsAg gene with the construction of restriction sites for cloning into transfer vectors were synthesized;

for the first time, new recombinant plasmids pPIC3.5-S and pPIC9-S, encoding the S protein of Hepatitis B virus surface antigen in *Pichia pastoris* GS115 yeast were cloned;

it was revealed that the nucleotide sequence of the cloned DNA fragment of the S gene corresponds to the genotype D of the Hepatitis B virus common in Uzbekistan;

the recombinant strains of *Pichia pastoris* GS115 producing the S-HBsAg were obtained;

the phenotype of the strain *Pichia pastoris* GS115 - Mut<sup>S</sup> producing the highest amount of S-HBsAg was revealed;

**Scientific novelty of the research work:**

based on the results of cloning of the S gene encoding the surface antigen of Hepatitis B virus and its expression in *Pichia pastoris* yeast, as well as the study of its antigenicity:

the sequence of the gene that encodes the recombinant protein S is added to the NCBI international database (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>) and registered with GenBankID 2308626. As a result, it can be used to determine the amino acid sequence, the location of antigenic determinants of similar proteins;

the nucleotide sequence of the gene encoding the recombinant protein S in the *Pichia pastoris* yeast is registered in the EMBL database LR746134 (<http://www.ebi.ac.uk>). As a result, it became possible to use this information for a comparative analysis of similar proteins on a global scale;

**The structure and volume of the thesis.** The dissertation consists of introduction, three chapters, conclusion, list of used literature and applications. The volume of the dissertation is 101 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. Подбор оптимальных условий индукции для получения наибольшего количества биомассы клеток дрожжей *Pichia pastoris* // *Universum: химия и биология: Научный журнал*. – № 10(64) -2019, pp 16-18 (02.00.00, №3).
2. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Эшбоев Ф.Б., Юсупова Э.Г., Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантных плазмид рPIC3.5-S и рPIC9-S, кодирующие S регион вируса гепатита b человека (HBV) в GS115 *PICHTA PASTORIS* // *Узбекский биологический журнал*, № 4-2019, pp 3-7(03.00.00, №6).
3. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. Получение «зелёного флуоресцентного белка - GFP» в дрожжах *PICHTA PASTORIS* как репортер экспрессии гетерологичных белков // *Химия и химическая технология*, № 4-2019, pp 72-75 (02.00.00, №3).
4. Ashirov O.N., Sasmakov S.A., Abdurahmonov J.M., Xasanov Sh.Sh., Sagdullayev T.X., Azimova Sh.S.. Transfer vektorlarni *PICHTA PASTORIS* achitqisiga kiritishning elektroporatsiya sharoitlarini optimallashtirish // *Samarqand davlat univerisiteti axborotnomasi 2019–yil, 5-son (117). 145-148 betlar* (02.00.00, №3).
5. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Садуллаев Т.Х., Пиякина Г.А., Азимова Ш.С. *Pichia pastoris* ачитки экспрессия тизимида рекомбинант оксиллар олиш учун макбул штамм ва трансфер векторларни танлаш // *Farmatsevtika jurnali*, №1, 2019 pp 103-106 (02.00.00, №2).

**II часть (II бўлим, II part)**

6. Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Махнева Е., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Получение рекомбинантных клеток *Pichia pastoris*, штамма GS115 методом электропорации // Конференция молодых ученых посвящ. памяти С.Ю.Юнусова, 12 марта, 2015. Ташкент. Сборник тезисов - стр. 101.
7. Ashirov O.N., Sasmakov S.A., Abdurahmonov J.M., Xasanov Sh.Sh., Azimova Sh.S.. USE of *Pichia pastoris* expression system for obtaining of recombinant proteins // XII International Symposium «*Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds*» Tashkent, September 7-8, 2017. P.209
8. Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантных плазмид PIC3,5-GFP и PIC9-GFP, кодирующие рекомбинантный gfp (зелёный флуоресцентный белок) в дрожжах *Pichia pastoris* // *Научная и научно-техническая конференция Совета молодых ученых и Союза молодежи Узбекистана*, 30

- марта 2018 г., Ташкент. Труды республиканской научной и научно-технической конференции «XXI век – век интеллектуальной молодёжи» С. 43-44.
9. Аширов О.Н, Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Азимова. *Pichia pastoris* achi tqi hujayaralariga rekombinant plazmidalarni transformatsialash sharoitlarini tanlash // *Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 75 йиллик юбилейига бағишланган Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари 23-ноябрь 2018 йил. Б. 79.*
  10. Аширов О.Н, Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. PICHIA PASTORIS ачитқи экспрессия тизимида рекомбинант оксиллар олиш истиқболлари // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси, Тошкент. 5 декабрь 2018 й, Б. 131-132.
  11. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Икрамов С.А., Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантных плазмид рPIC3.5-B-GAL и рPIC9-B-GAL, кодирующих β-галактозидазу // *Научно-практическая конференция молодых учёных «Актуальные проблемы химии природных соединений», посвящённой 110-летию академика С.Ю.Юнусова. 18-19 марта 2019 г. Ташкент. С.18.*
  12. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Пиякина Г.А., Азимова Ш.С. Получение β-галактозидазы в дрожжах *Pichia pastoris* // «Химия и технология растительных веществ», Тезисы докладов XI Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, 27-31 мая 2019 г., Сыктывкар, Республика Коми, Россия. С. 45.
  13. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. PIC3,5-S ва PIC9-S рекомбинант плазмидаларининг *pichia pastoris* ачитқи ҳужайрасига интеграцияси // *O'zbekistonning taniqli biokimyovo va biotexnolog olimi, akademik A.G. Xolmurodovning 80 yilligiga bag'ishlangan Respublika ilmiy-amaliy anjumani. Toshkent 24- oktabr 2019. B. 26-27.*
  14. Sasmakov S., Ashirov O., Abdurhakhmanov J., Khasanov Sh., Azimova Sh. Determination of inducing conditions for high-level expression of recombinant protein in *pichia pastoris* // *XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2019, Shanghai. pp 192.*
  15. Ashirov O.N., Sasmakov S.A., Abdurahmonov J.M., Xasanov Sh.Sh., Sagdullayev T.X., Azimova Sh.S. PICHIA PASTORIS ачитқиси genom DNK sini fermentlar ishtirokisiz ajratish // *Ўзбекистон республикаси фанлар академияси. Фан ва таълимни ривожлантиришда Ёшларнинг ўрни. Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари 22 ноябрь 2019 йил. Б. 51.*