

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ХУЗУРИДАГИ ИЛМIIЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМIIЙ КЕНГАШ**

---

**АБДУРАХМАНОВ ЖАЛОЛИДДИН МИРДЖАМИЛЬЕВИЧ**

***BOMBUX MORI* ЛИЧИНКАЛАРИДА ГЕПАТИТ В ВИРУСИ (HBV)  
РЕКОМБИНАНТ PRES2-S ОҚСИЛИНИ ОЛИШ**

**02.00.10-Биоорганик кимё**

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

**Тошкент – 2020**

**Кимё фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси  
автореферати мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)  
по химическим наукам**

**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)  
on chemical sciences**

**Абдурахманов Жалолиддин Мирджамильевич**  
*Bombyx mori* личинкаларида Гепатит В вируси (HBV)  
рекомбинант PreS2-S оксилени олиш.....5

**Абдурахманов Жалолиддин Мирджамильевич**  
Получение рекомбинантного PreS2-S белка вируса  
Гепатита В (HBV) в личинках *Bombyx mori*.....21

**Abdurakhmanov Jaloliddin Mirdjamilevich**  
Obtaining recombinant protein PreS2-S Hepatitis B virus  
(HBV) in *Bombyx mori* larvae .....39

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**  
Список опубликованных работ  
List of published works.....43

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**АБДУРАХМАНОВ ЖАЛОЛИДДИН МИРДЖАМИЛЬЕВИЧ**

***BOMBYX MORI* ЛИЧИНКАЛАРИДА ГЕПАТИТ В ВИРУСИ (HBV)  
РЕКОМБИНАНТ PRES2-S ОҚСИЛИНИ ОЛИШ**

**02.00.10-Биоорганик кимё**

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

**Тошкент – 2020**

**Кимё фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2019.4.PhD/K77 рақам билан рўйхатга олинган.**

Диссертация Ўсимлик моддалари кимёси институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (рус, ўзбек, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси ([www.biochem.uz](http://www.biochem.uz)) ва «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

**Илмий раҳбар:**

**Азимова Шахноз Садыковна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Расмий оппонентлар:**

**Муҳамедов Рустам Султанович**  
биология фанлари доктори, профессор

**Раҳманбердыева Раъно Каримовна**  
кимё фанлари доктори, катта илмий ходим

**Етакчи ташкилот:**

**Тошкент фармацевтика институти**

Диссертация химояси Биоорганик кимё институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 рақамли Илмий кенгашининг 2020 йил «\_\_» \_\_\_\_\_ соат \_\_\_\_ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улугбек кўч., 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63, e-mail: [info@biochem.uz](mailto:info@biochem.uz)).

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (\_\_\_\_\_ рақами билан рўйхатларга олинган). Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улугбек кўч., 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63, e-mail: [shsha@mail.ru](mailto:shsha@mail.ru).

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

**Ш.И. Салихов**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш  
раиси, б.ф.д., академик

**Ш.А. Шомуротов**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш  
илмий котиби, к.ф.д.

**М.Б. Гафуров**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш  
қошидаги илмий семинар раиси, к.ф.д.

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

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти.** Бугунги кунда дунёда гепатит В вируси (HBV) билан касалланган 329 млн одам аниқланган бўлиб, ҳар йили 1,4 млн инсон ушбу касаллик сабабли нобуд бўлмоқда. Ушбу инфекцион касаллик ўлим сони бўйича сил касаллигидан сўнг иккинчи ҳамда касалланаётган одамларнинг сони бўйича ОИТС дан 9 баробар юқори ўринда туради. Афсуски, гепатит билан оғриган инсонларнинг 80% дан кўпроғи касалликни текшириш, даволаш ва олдини олиш воситаларидан маҳрумдирлар. Шу ҳолатларни инобатга олиб, Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти 2016-2021 йилларга мўлжалланган қон қуйиш хизматлари ва инфекцион назоратнинг самарадорлиги, ҳамда гепатит В га қарши эмлашни кенгайтиришни амалга ошириш учун шошилиш чора тадбирларни назарда тутган «Гепатит вирусига қарши курашишда Соғлиқни сақлаш секторининг глобал стратегияси»ни ишлаб чиқиб, тиббиёт амалиётга жорий қилмоқда.

Ҳозирги вақтда жаҳонда ген муҳандислиги технологиялари ёрдамида HBV ДНК нинг S региони асосида рекомбинант HBsAg оқсилли олиган бўлиб, гепатит В вирусига қарши тижорат вакциналари сифатида қўлланилиб келинмоқда. Ушбу оқсил (226 аминокислота қолдигидан иборат) гепатит В вирусининг барча генотипларига хос бўлган фақат 1 та умумий иммуноген "а" детерминанта сақлаб, вирусга нисбатан тўлақонли ҳимоя вазифасини бажараолмаяпти. Шу муносабат билан доимий равишда мутацияга учровчи гепатит В вирусига қарши энг яхши ҳимояни таъминлайдиган, бир нечта антиген детерминантларга асосланган янги самарали вакциналарни яратиш ҳамон долзарб вазифа бўлиб қолмоқда.

Республикада одам гепатит В вируси (HBV) юза антиген (HBsAg) оқсилларини ҳашарот хужайралари линияси - *Bombyx mori* (BMN1) да олиш ва уларнинг хусусиятларини тадқиқ этиш бўйича изланишлар олиб борилган бўлиб, бу борада муайян илмий ҳамда амалий натижаларга эришилган. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг 4-йўналишида «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларни арзон, сифатли дори воситалари билан таъминланишини яхшилаш» юзасидан муҳим вазифалар белгилаб берилган<sup>1</sup>. Бу борада, ипак қурти личинкалари "биофабрика" сифатида рекомбинант оқсилларни ишлаб чиқариш учун анча арзон манба эканлигини ҳисобга олган ҳолда, *Bombyx mori* личинкаларидан рекомбинант М-HBsAg (3 та иммуноген детерминанта сақлайди) оқсилли олиш усулини ишлаб чиқишга қаратилган илмий тадқиқот ишларини ташкил этиш муҳим аҳамиятга эга.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча

---

1. Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги Фармони.

чора-тадбирлар тўғрисида»ги, 2019 йил 10 апрелдаги ПФ-5707-сон «2019–2021 йилларда республиканинг фармацевтика тармоғини янада жадал ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги, 2019 йил 6 майдаги ПҚ-4310-сон «Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Қарорлари, 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармонида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

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

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Маълумки вирус геномининг PreS1 (108 а.к.) ва PreS2 (55 а.к.) регионлари кодлайдиган антиген структуралари унинг ташқи юзасининг юқори иммуноген хоссасига эга бўлган қисми ҳисобланади. HBV юза оксиленинг PreS2-S (PreS2 + S) региони (281 аминокислота қолдиғидан иборат) полиальбумин-боғловчи фаолликка эга ҳисобланиб, гепатоцитлар юза рецепторлари билан комплементар боғланиш хусусиятини намоён этади. Охириги йилларда олиб борилган тадқиқотлар натижасида гепатит В га қарши вакциналар таркибида PreS2-S оксиленинг мавжудлиги вакцинанинг иммуногенлик хоссасини тубдан оширишга сабаб бўлиши аниқланди. PreS2-S регионининг юқори консервативлиги ва иммуногенлиги сабабли мутацияга учраган гепатит В вирусини аниқлаш учун диагностик тест-тизимлар сифатида қўлланилиш имконияти ўрганилмоқда. Ўсимлик моддалари кимёси институти Молекуляр генетика лабораториясида гепатит В вирусининг модификацияланган PreS2-S оксилени ҳашарот ҳужайрасида (*Bombux mori*) олишга имкон берадиган генетик конструкция яратилган. Ушбу конструкцияни яратишда V-Catch промоторидан фойдаланилган бўлиб, бунинг натижасида рекомбинант оксилнинг экспрессия даражаси паст бўлган. Биз ўз изланишларимизда таркибида полиэдрин промотори назорати остидаги одам гепатит В вирусининг PreS2-S регионини сақлаган рекомбинант бакуловирин билан *Bombux mori* личинкаларининг турли хил зотларини тўғридан-тўғри инфицирлаш имкониятини ўрганиб чиқдик. Рекомбинант PreS2-S оксилени олишда тут ипак қурти личинкаларидан фойдаланиш энг арзон технология ҳисобланади. Ушбу платформанинг асосий устунлиги таннархи қиммат бўлган сунъий озуқа муҳитларидан, етиштириш учун махсус шароит ва жиҳозлардан фойдаланишни талаб этмайди.

**Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Ўсимлик моддалари кимёси институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг № КА-6-004 «Турли зотга мансуб *Bombux mori* личинкаларида

рекомбинант бакуловирус олиш усулини ишлаб чиқиш» (2015–2017 йй.) мавзусидаги амалий лойиҳаси доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** PreS2-S рекомбинант оксилни энг кўп миқдорда ишлаб чиқарадиган маҳаллий тут ипак қурти зотини аниқлаш, синтезланган оксилни тозалаш усуллари ишлаб чиқиш ҳамда унинг антигенлик хусусиятларини аниқлашдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

рекомбинант оксилни энг кўп миқдорда ишлаб чиқарадиган маҳаллий тут ипак қурти зотини аниқлаш учун турли зотга мансуб (Орзу, Марварид, Юлдуз, Гўзал) *Bombux mori* личинкаларини рекомбинант rBmNV-polh-PreS2-S бакуловируси билан инфицирлаш;

тут ипак қурти личинкалари таркибидан рекомбинант оксилни тоза ҳолда ажратиб олишнинг энг мақбул шароитларини аниқлаш;

тозалаб олинган рекомбинант оксилни тавсифлаш;

ажратиб олиган рекомбинант оксилнинг антигенлик хусусиятларини ўрганиш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида Орзу, Марварид, Юлдуз, Гўзал зотларига мансуб тут ипак қурти (*Bombux mori*) личинкалари ва рекомбинант rBmNV-polh-PreS2-S вируси олинган.

**Тадқиқотнинг предмети** рекомбинант PreS2-S оксили, унинг хроматографик, гель-электрофоретик ҳамда антигенлик хусусиятлари ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқотда биоорганик кимё (оксилларни миқдор ва сифат жиҳатидан аниқлаш, спектрофотометрия усуллари, оксилларни ажратиш ҳамда тозалаш усуллари: колонкали хроматография, ион-алмашилиш хроматографияси, ИФА тест синови, Иммуноблот таҳлили ва б.) услубларидан фойдаланилган.

**Диссертация тадқиқотининг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

илк бор рекомбинант PreS2-S оксилни экспрессияловчи *Bombux mori* личинкаларининг турли маҳаллий зотлари аниқланган;

энг кўп миқдорда рекомбинант оксил синтезловчи тут ипак қурти (*Bombux mori*) - маҳаллий "Марварид" зоти эканлиги аниқланган;

тут ипак қурти личинкалари таркибидан рекомбинант PreS2-S оксилни тоза ҳолда ажратиб олишнинг мақбул шароитлари аниқланган;

ИФА ва иммуноблот таҳлили натижаларига кўра олинган рекомбинант PreS2-S оксили юқори антиген спецификликни намоён этиши исботланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қуйидагилардан иборат:

энг кўп миқдорда рекомбинант оксил Марварид зотли тут ипак қуртида синтезланиши кўрсатилган;

ипак қурти личинкаларида синтезланган рекомбинант PreS2-S оксилни тоза ҳолда ажратиб олишнинг энг мақбул шароитлари, жумладан:

а) энг кўп миқдорда оксил экстракциялашга имконият берувчи гомогенлаш шароитлари ва унга кўра намуналарга 22 кГц ультратовуш билан

ишлов бериш ва таркибида 0,4 % SDS бўлган гомогенизация учун қўлланиладиган буфердан фойдаланиш энг мақбул эканлиги аниқланган;

б) керакли оқсилни фракциялашда 20% ва 60% концентрацияли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  танлаб олинган;

с) PreS2-S оқсилни тозалашнинг кейинги босқичларида Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF ва Supredex 75pg сорбентлари ёрдамида колонкали хроматографиядан фойдаланиш энг самарали эканлиги аниқланган;

ИФА ва иммуноблотинг таҳлиллари асосида рекомбинант PreS2-S оқсили юқори антиген спецификлик намоён этиши, ушбу рекомбинант оқсилнинг молекуляр оғирлиги эса гепатит В вируси PreS2-S региони ДНК кодлайдиган аминокислота кетма-кетлигига мос равишда 34 кДа эканлиги аниқланган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** замонавий биокимёвий ва молекуляр-биология усулларида фойдаланилганлиги билан асосланади. Натижалар замонавий аналитик ва статистик 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 шундан иборатки, рекомбинант PreS2-S оқсилни юқори даражадаги самарадорлик билан экспрессияловчи ипак курти личинкаларини аниқлаш ва рекомбинант оқсилни тоза ҳолда ажратиб олишнинг энг мақбул шароитларини аниқланганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, олинган 3 антиген детерминантларини сақловчи рекомбинант PreS2-S оқсили гепатит В вирусига нисбатан иммуногенлик хусусияти юқори бўлган янги самарали вакцина, ҳамда диагностик тест-тизимлар сифатида фойдаланишга хизмат қилиш имконини берганлиги билан изоҳланади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** PreS2-S рекомбинант оқсилни энг кўп миқдорда ишлаб чиқарадиган маҳаллий тут ипак курти зотини аниқлаш, синтезланган оқсилни тозалаш усуллари ишлаб чиқиш ва унинг антигенлик хусусиятларини аниқлаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

ажратиб олинган рекомбинант бакуловирус *pBmNPV-polh-PreS2-S* клонлари Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг «Фитопатоген ва бошқа микроорганизмлар ноёб илмий объекти коллекцияси» генофондига киритилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2020 йил 18 мартдаги 4/1255-790-сон маълумотномаси). Натижада коллекциянинг «Фитопатоген ва бошқа микроорганизмлар» генофондини бойитиш ҳамда ихтисослашган турлар хилма-хилликлари электрон базаси ахборот-таҳлил тизимини шакиллантириш имконини берган;



ажратиб олинган *Bombyx mori* рекомбинант *pBmNPV-polh-PreS2-S* бакуловируси Жаҳон микроорганизмлар маълумотлар марказининг Патоген микроорганизмлар миллий коллекцияси маълумотлар базасига киритилган (World Data Center for Microorganism, National Collection of Phytopathogenic Microorganisms, [http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by\\_id/1228](http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228)). Натижада дунёнинг турли минтақаларида тарқалган «бакуловирус/ҳашарот хужайраси»ни тадқиқ қилиш имконини берган;

рекомбинант PreS2-S оксилени кодлайдиган ген кетма-кетлиги NCBI халқаро маълумотлар базасига киритилган (АҚШ Миллий тиббиёт кутубхонаси, Миллий биотехнология ахборот маркази, GenBankID 2306674, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>). Натижада аналогик оксилларнинг аминокислота кетма-кетлигини, антигенлик хусусиятларини ҳамда мавжуд антиген детерминанталарининг жойлашган ўрнини аниқлаш имконини берган;

*Bombyx mori* личинкаларида рекомбинант PreS2-S оксилени кодловчи нуклеотидлар кетма-кетлиги EMBL LR745788 халқаро маълумотлар базасига киритилган (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/support>). Натижада аналогик оксилларнинг қиёсий таҳлилинини глобал масштабда амалга ошириш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Диссертация иши тадқиқот натижалари 3 та халқаро ва 6 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 16 та илмий ишлар чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 4 та, жумладан, 3 таси Республика ва 1 таси халқаро журналларда нашр этилган, патент учун 2 та талабнома топширилган.

**Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши.** Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 109 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 «**Рекомбинант антиген хусусиятли оксиллар, улар олинадиган экспрессия тизимлари ва тозалаш усуллари**» деб номланган

биринчи бобида рекомбинант антиген хусусиятли оксилларнинг тавсифи ҳамда хусусиятлари ёритилган бўлиб, ҳозирги кунда дунёда уларни олиш учун энг кўп қўлланилаётган экспрессия тизимлари ҳақида маълумотлар берилган. Бундан ташқари антиген хусусиятли рекомбинант оксилларни тозалаш усуллари ҳақида хорижий ва маҳаллий илмий адабиётлар шарҳи батафсил баён этилган.

Диссертациянинг иккинчи боби «*Bombyx mori* личинкаларидан рекомбинант PreS2-S оксилни ажратиш ва тозалаш» га бағишланган. Бобда антиген хусусиятли рекомбинант PreS2-S оксилни олишда тут ипак курт (*Bombyx mori*) личинкаларининг энг мақбул зотини танлаш, танлаб олинган *Bombyx mori* личинкалари таркибидан рекомбинант PreS2-S оксилни ажратиш ва тозалаш, тозалаб олинган рекомбинант оксилни тавсифлаш жараёнларида олинган натижалар келтирилган.

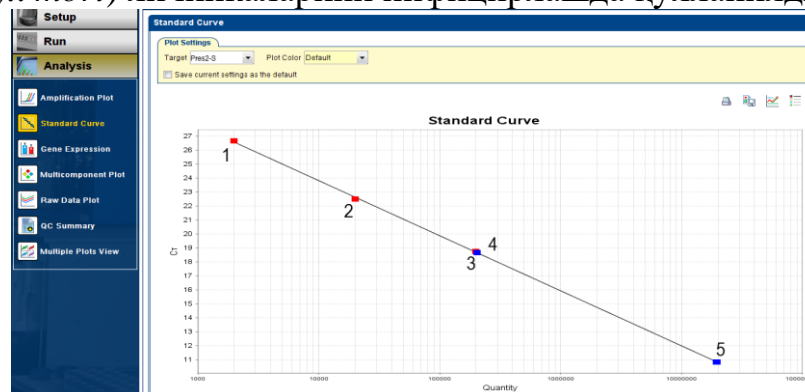
Диссертациянинг «**Рекомбинант оксилларни ажратиш, тозалаш ва тавсифлаш усуллари**» деб номланган учунчи бобида антиген хусусиятли рекомбинант оксилларни ажратиш, тозалаш ва тавсифлаш давомида фойдаланилган материал ва усулларнинг тавсифи баён этилган тажриба қисми келтирилган.

Тадқиқотларда ЎзР ФА Ўсимлик моддалари кимёси институти Молекуляр генетика лабораторияси ҳашарот хужайралари коллекциясида мавжуд бўлган *Bombyx mori* (BMN1) хужайраси, ушбу лаборатория ҳодимлари томонидан клонланган гепатит В вируси юза антиген оксилни *Bombyx mori* личинкаларида синтезланиши учун асос бўлиб хизмат қиладиган янги pVacPAK8-polh-PreS2-S рекомбинант вектор ДНК, юқоридаги лаборатория олимлари томонидан гепатит В вируси PreS2-S региони учун махсус синтезланган FHB73b2 (21 ж.н), rHB77a2 (21 ж.н) деб номланувчи праймерлар ва HBZFA02b (24 ж.н) номли зонд, шунингдек ЎзР Ипакчилик илмий-тадқиқот институти маҳаллий тут ипак куртлари коллекциясида мавжуд бўлган Орзу, Марварид, Юлдуз, Гўзал зотли ипак курт (*Bombyx mori*) личинкаларидан фойдаланилган.

Рекомбинант PreS2-S оксилни ажратиш ва тозалаш учун тузлар ёрдамида босқичлаб чўктириш, колонкадаги хроматографиянинг турли усулларида (гель-филтрация, ион-алмашилиш хроматографияси) фойдаланилган. Тозалаб олинган рекомбинант PreS2-S оксилни тавсифлашда ҳамда унинг иммунологик хусусиятларини ўрганишда ПААГ электрофорез, иммуноблоттинг ва миқдорий ИФА каби таҳлилий усуллардан фойдаланилган. ИФА таҳлилинини амалга оширишда гепатит В вирусини аниқлаш учун кенг қўлланилаётган "ЎзР ФА ЎМКИ диагностик синов тизимларини ишлаб чиқариш корхонаси", "ORTO Diagnostics" (АҚШ) ва НПО «Диагностические системы» (Россия) каби тижорат тўпламларидан фойдаланилган. Миқдорий қиёслаш стандарти сифатида «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India» ва «Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.» вакциналари қўлланилган.

## ***Bombyx mori* (тут ипак қурти) личинкаларини инфицирлаш учун рекомбинант rBmNV-polh-PreS2-S вирусини тайёрлаш**

Рекомбинант ДНК вектори асосидаги rBmNV-polh-PreS2-S вирус стокларининг миқдорий қийматлари RT-PCR усули ёрдамида идентификацияланди (1-расм). Ушбу тайёрланган вирус стоклари тут ипак қурти (*Bombyx mori*) личинкаларини инфицирлашда қўлланилди.



### **1-расм. PreS2-S регионининг миқдори бўйича RT-PCR таҳлили натижалари**

Графикдаги 1-3 квадратчалар маълум ДНК концентрациясига эга бўлган стандарт эритмаларни аниқлаш, концентрацияси мос равишда  $2 \times 10^3$  – 2000 нусха/мл (1),  $2 \times 10^4$  - 20000 нусха/мл (2),  $2 \times 10^5$  - 200000 нусха/мл (3) га тенг. Ўрганилаётган намуналар графикда 4-5 рақамли квадратчалар билан кўрсатилган. Графикда Ct (пороговуй цикл) қийматининг мавжуд эмаслиги экспериментнинг тозалигини кўрсатади.

RT-PCR таҳлили натижасига кўра стокда тут ипак қуртлари личинкаларини инфицирлаш учун етарли миқдордаги рекомбинант вирус мавжуд, яъни рекомбинант вирус стокиннинг концентрацияси  $C = 2 \times 10^6$  нусха/мл эканлиги аниқланди.

***Bombyx mori* личинкаларининг PreS2-S гени кодлайдиган оксилни энг кўп миқдорда синтезловчи зотларини ҳамда рекомбинант оксил экспрессиясининг энг мақбул вақтини аниқлаш.**

Аввалдан тайёрланган  $C = 2 \times 10^6$  нусха/мл концентрациядаги рекомбинант бакуловиралар стоклари билан Ўзбекистонда етиштириладиган маҳаллий Орзу, Марварид, Юлдуз, Гўзал зотли ипак қурти личинкалари rBmNV-polh-PreS2-S вирусини билан инфицирланди.

Сунъий инфицирлашнинг иккинчи кунидан бошлаб, ҳар куни, личинка гемолимфасида синтезланаётган оксилнинг мавжудлиги ИФА усули ёрдамида аниқланди. *Bombyx mori* личинкалари таркибидаги умумий оксилларнинг концентрациясини аниқлаш учун юқорида келтирилган зотли личинкалар 0.4% SDS, 2.4 mM EDTA, 2 mM PMSF таркибли 0.1M Трис буфери (pH 7.8) ёрдамида 1:5 нисбатда (1 г биомасса:5 мл буфер) 4 соат давомида экстракцияланди. Ҳужайраларни тўлиқ ёрилиши ва оксилларни эритмага максимал даражада чиқишини амалга ошириш учун гомогенатга ультратовуш (22 кГц) билан ишлов берилди. Шундан сўнг гомогенат центрифугаланди ва супернатант ажратиб олинди. Ажратиб олинган

супернатант таркибидаги умумий оксилларнинг миқдори Лоури усули ёрдамида аниқланди. Рекомбинант оксилнинг (PreS2-S) синтезланиш даражаси қаттиқ юзадаги иммунофермент таҳлили (ИФА) усули ёрдамида аниқланди. Таҳлил натижалари 1-жадвалда келтирилган.

### 1-жадвал

***Bombux mori* личинкалари таркибидаги умумий оксил миқдори ва синтезланган PreS2-S оксилнинг иммунофермент таҳлили (ИФА) натижалари**

Тут ипак курти зотининг номлари	Инфицирлашдан кейинги кун	Экстракт таркибидаги оксилларнинг миқдори (мг/мл)	ИФА натижалари (OD-450 нм)
Орзу	2-	1.87	0.151
	3-	2.09	0.453
	4-	3.54	1.562
	5-	4.39	2.422
	6-	3.12	1.187 (лизис)
Марварид	2-	2.52	0.480
	3-	3.11	0.794
	4-	4.33	1.992
	<b>5-</b>	<b>5.1</b>	<b>&gt;&gt;3.000</b>
	6-	4.01	1.831 (лизис)
Юлдуз	2-	1.74	0.210
	3-	2.01	0.547
	4-	3.33	1.532
	5-	4.11	2.584
	6-	3.02	1.201 (лизис)
Гўзал	2-	1.96	0.425
	3-	2.21	0.682
	4-	3.68	1.702
	5-	4.57	2.897
	6-	3.22	1.347 (лизис)
Зарарланмаган куртлар		4.33	0.082
Тўпلامдаги ижобий назорат стандарти			≥3.000
Тўпلامдан салбий назорат стандарти			0.097

1-жадвалдан кўриниб турибдики, рекомбинант оксил экспрессиянинг энг юқори миқдори вирус юктирилгандан сўнг бешинчи кунда *Bombux mori* личинкаларининг Марварид зотида аниқланди.

#### **Рекомбинант PreS2-S оксилни тозалаш**

*Bombux mori* личинкаларини гомогенизациялаш.

Биз SDS концентрацияси (0.1 дан 1% гача), экстракция вақти (2 дан 12 соатгача) ҳамда ультратовуш дезинтеграциясининг (18–30 кГц, 30–240 сек.) керакли оксил унумига таъсирини ўргандик. Экстракция давомида ажратиб олинган супернатант таркибидаги рекомбинант PreS2-S оксилнинг миқдори ИФА усули ёрдамида аниқланди (2-жадвал). Олинган экстракт таркибидаги оксиллар 10% ПААГ электрофорез усули билан тадқиқ этилди (2-расм).

Олинган натижалар асосида гомогенизация жараёнининг энг оптимал шароитлари белгиланди. Унга кўра 0.4% SDS сақлаган гомогенизация

буфериди 4 соат давомида олиб борилган экстракция жараёни ва дезинегратор кўрсаткичи 22 кГц ва давомийлиги 60 сек. бўлган ҳолатда керакли оксилнинг эритмага энг кўп микдорда ўтиши аниқланди.

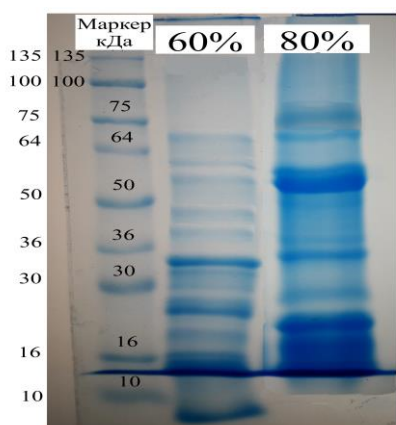
**2-жадвал**

**Супернатантнинг ИФА таҳлили**

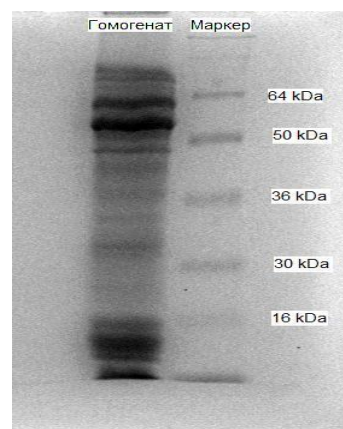
Текширилаётган намуна	Суялтириш даражаси	ИФА тест синови натижалари (OD -450 нм)
«Марварид» зотли тут ипак курти личинкаси	1:100	≥3.000 (out)
	1:1000	≥3.000 (out)
	<b>1:10000</b>	<b>0.580</b>
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	1:100	≥3.000 (out)
	1:1000	2.890
	<b>1:10000</b>	<b>0.251</b>
Тўпламдаги ижобий назорат стандарти		≥ 3000
Тўпламдаги салбий назорат стандарти		0.097
Зарарланмаган куртлар		0.082

*Рекомбинант PreS2-S сақловчи оксил фракциясини чўктиришнинг энг оптимал шароитларини танлаш.*

Тозалашнинг кейинги босқичида аммоний сульфат тузи ёрдамида фракциялаш усулидан фойдаланилди. Дастлаб, кераксиз юқори молекуляр оксиллардан қутилиш мақсадида  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  тузининг 10% - 25% концентрациялари қўлланилди. Олинган натижалар асосида аммоний сульфат тузи билан 20% тўйинтириш рекомбинант PreS2-S оксилнинг минимал даражада йўқотилиши билан бирга гомогенатни максимал даражада балласт оксиллардан тозалашга имкон берувчи оптимал концентрация эканлиги аниқланди.



**3-расм. Оксил фракцияларнинг 10% ПААГ электрофорези**



**2-расм. Марварид зотли тут ипак курти личинкалари супернатантнинг 10% ПААГ электрофорези**

Шундан сўнг рекомбинант PreS2-S сақловчи оксил фракцияларини йўқотишларсиз максимал даражада чўктириш (концентрлаш) учун аммоний сульфат тузи эритмасининг 50% дан 80% гача бўлган концентрацияларидан

фойдаланилди (3-жадвал). Фракциялар таркибини 10% ПААГ электрофорез усули ёрдамида таҳлил қилинди (3-расм).

### 3-жадвал

#### ИФА ва фракциялардаги оксилларнинг миқдорий таҳлили натижалари

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> миқдори (%)	Текширилаётган намуна	Умумий оксилларнинг миқдори (%)	ИФА тест синови натижалари	
			OD-450 нм	Суюлтириш даражаси
50	супернатант	75.8%	≥3.000 (out)	1:1
	чўкинди	19%	1.998	1:3000
60	супернатант	64.7%	0.320	1:1
	чўкинди	<b>30.1%</b>	<b>2.870</b>	1:3000
70	супернатант	53.5%	0.320	1:1
	чўкинди	41.3%	2.870	1:3000
80	супернатант	38.4%	0.299	1:1
	чўкинди	56.4%	2.871	1:3000
Тўпلامдаги ижобий назорат стандарти			≥ 3000	-
Тўпلامдаги салбий назорат стандарти			0.095	-

3-жадвал асосида аммоний сульфат тузи билан 60% тўйинтириш керакли оксилни чўктиришда энг оптимал концентрация эканлиги маълум бўлди.

Эришилган натижаларга таянган ҳолда рекомбинант PreS2-S оксиллини максимал даражада тозалаш учун босқичли чўктиришда аммоний сульфат тузи билан 20% ва 60% тўйинтириш энг оптимал концентрациялар эканлиги аниқланди.

*Рекомбинант PreS2-S оксиллини тутувчи фракцияни тузсизлантириш.*

Аммоний сульфатда чўккан PreS2-S сақловчи фракциялар Sephadex G-25 Fine сорбенти жойланган HiPrep 26/10 колонкаси орқали оқим тезлиги 8 мл/дақ, 0,3 МПа (3 bar) шароит остида тузсизлантирилди. Сўнг, тузсизлантирилган намуналар лиофиль курутгичда курутилди.

*Рекомбинант PreS2-S оксиллини Sephadex G-200 SF ёрдамидаги КХ усули билан тозалаш.*

Юқорида келтирилган электрофореграммага (3-расм) кўра аммоний сульфат тузи билан 60% тўйинтириб олинган чўкмада маълум миқдордаги юқори молекуляр оксиллар мавжуд. Шундан келиб чиқиб, керакли оксилни тозалашнинг кейинги босқичида Sephadex G-200 SF ёрдамидагидаги гел-хроматоргафия усулидан фойдаландик. Sephadex G-200 SF жойланган HiLoad 26/600 колонкасида хроматоргафиялашнинг энг мақбул шароитларини танлаш давомида рН кўрсаткичлари турли хил бўлган PBS (рН 7.4), ацетат буфер (рН 5) ва борат буферидан (рН 9.3) фойдаландик. Тегишли эритмалар қанча миқдорда PreS2-S оксиллини тутиши ИФА таҳлили ёрдамида аниқланди (4-жадвал).

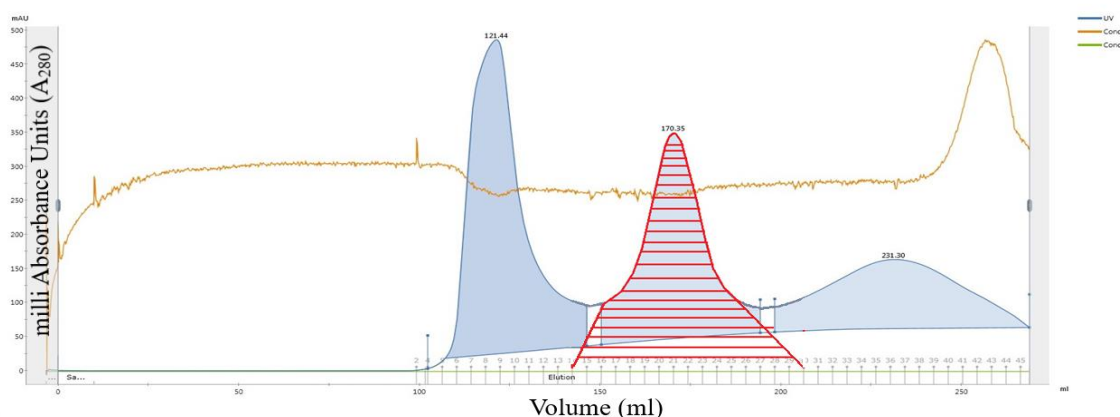
Куйидаги 4-жадвалдан борат буферидagi эритма PreS2-S оксиллини PBS ва ацетат буферларига қараганда сезиларли даражадаги кўп миқдорда сақлашини кўриш мумкин. Ушбу натижаларга таянган ҳолда Sephadex G-200

SF ёрдамидаги колонкали хроматография босқичи учун борат буферини танлаб олдик (4-расм).

#### 4-жадвал

#### Буфер эритмаларидаги PreS2-S оқсилнинг миқдори

Буфер тури	ИФА таҳлиliga кўра эритмалардаги PreS2-S оқсилнинг миқдори (OD-450 нм)
Ацетат буфери (pH 5)	0.201
PBS (pH 7.4)	0.599
Борат буфери (pH 9.3)	<b>1.053</b>



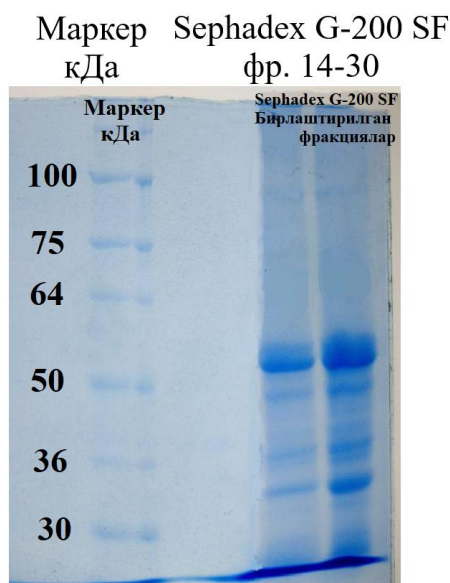
**4-расм. Борат буферда олиб борилган гел-филтрация жараёнинг хроматограммаси (2,6 мл/мин, 0.34 МПа, борат буфер: 8.9 мМ NaOH, 45.5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 9.3)**

ИФА натижасига кўра 14 дан 30 гача бўлган фракциялар таркибида турли миқдорларда PreS2-S оқсили мавжуд эканлиги аниқланди (4-расмда штрихлаб кўрсатилган). 10% ПААГ электрофорез таҳлили натижаларига кўра (5-расм) PreS2-S оқсини тутувчи фракция 16-55 кДа оралиғидаги 7 турли оқсилларни қамраб олган.

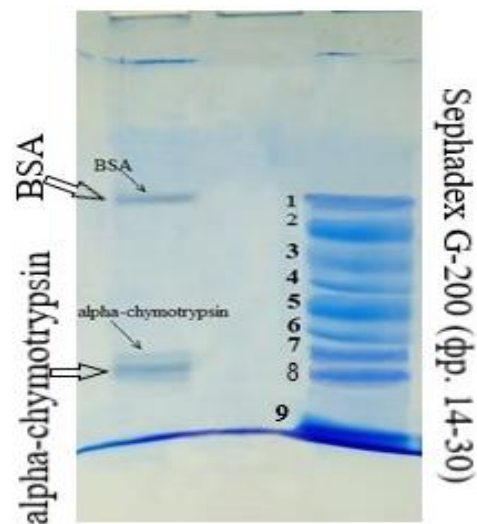
Шундай қилиб, G-200 SF ёрдамидаги гел-филтрация босқичида юқори молекуляр балласт оқсилларнинг бир қисмини ажратишга эришилиб, бу эса ўз навбатида ИФА таҳлили натижаларига кўра фракция таркибида PreS2-S оқсили миқдорининг ошишига имкон берди (4-расм).

SDS-PAGE таҳлили оқсилларни фақатгина молекуляр массаларига кўра тақсимлашга асосланади. Шундан келиб чиқиб оқсилларни табиий заряди ва иккиламчи тузилиши каби хоссаларига кўра фарқлаш имконини берувчи *NATIVE PAGE* усулидан фойдаланиб рекомбинант оқсил сақловчи намуналарни таҳлил қилдик.

Тажрибалар давомида ўрганилаётган оқсил намуналари учун *NATIVE PAGE* усулининг энг оптимал шароитлари: - Асосий гел: Tris HCl (pH 8.8) 244 mM; Bis-Acrylamide 10%; TEMED 0.08%; APS 0.08%; - Концентровчи гел: Tris HCl (pH 6.8) 125 mM; Bis-Acrylamide 4%; TEMED 0.05%; APS 0.05% эканлиги аниқланди.



**5-расм. PreS2-S оксилни тутувчи фракциянинг 10% ПААГ электрофорези**



**6-расм. PreS2-S оксилни тутувчи фракциянинг NATIVE PAGE таҳлили**

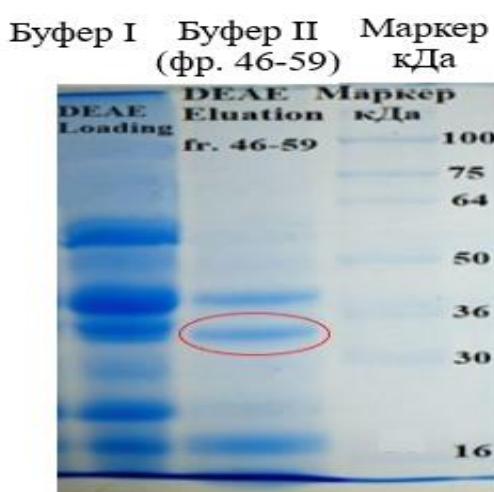
Тадқиқот натижалари PreS2-S сақловчи оксиллар фракцияси *NATIVE PAGE* шароитида 9 таркибий қисмдан (6-расм), SDS иштирокидаги электрофорезда эса 7 таркибий қисмдан иборат эканлигини кўрсатди (5-расм). Демак, керакли рекомбинант оксилни тоза ҳолда ажратиш учун Sephadex ёрдамидаги гел-филтрациядан ташқари, ион-алмашилиш ёки бошқа турдаги хроматография усулларида фойдаланиш тақоза этилади.

Шундан сўнг рекомбинант PreS2-S оксилни HiScale 50/20 колонкасида DEAE Sepharose FF ёрдамидаги ион-алмашилиш хроматографияси усули билан тозалаш амалга оширилди. Бунинг учун намуна буфер I (50мМ Трис-НСl рН 8.5, кондуктивлиги ~ 3,2 мS/см) билан мувофиқлаштирилган колонкага юкланди ва балласт оксиллар ажратилди (оқим тезлиги 3,5 мл/мин, ютилиш кўрсаткич чизиғи 280 нм да бошланғич қийматга (0) эришгунга қадар ювилди). ИФА таҳлилига кўра буфер I ёрдамида ажратилган оксиллар фракцияси таркибида PreS2-S оксиди аниқланмади.

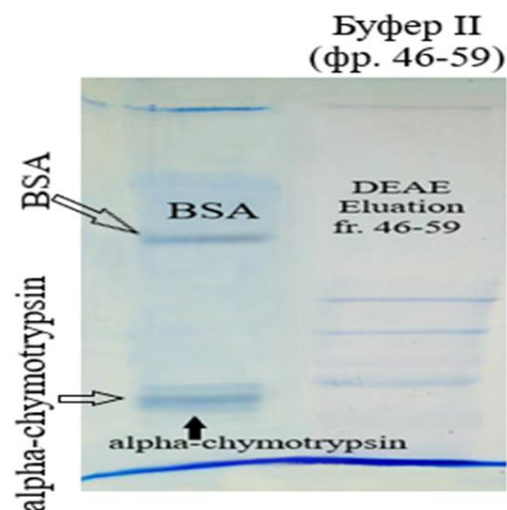
Кейинги босқичда керакли оксилни буфер II (50мМ Трис-НСl рН 8.5, 500 мМ NaCl, кондуктивлиги ~ 50мS/см, оқим тезлиги 3,5 мл/мин) ёрдамида элюирлаб олинди. ИФА таҳлили асосида PreS2-S сақловчи оксил фракциялари (46-59) бирлаштирилди.

ИФА таҳлили натижаларига кўра DEAE Sepharose FF ёрдамидаги колонкада хроматография усули билан тозалаш давомида керакли оксил 15% миқдорда йўқотилди. Олиб борилган 10% ПААГ электрофорез ва NATIVE PAGE таҳлили давомида фракцияда (46-59) 16-45 кДа оралиғидаги 3 та оксил компоненти мавжуд эканлиги аниқланди (7 ва 8-расмлар).





**7-расм. Ион-алмашувчи хроматографиядан сўнг бирлаштирилган фракцияларнинг (46-59) 10% ПААГ электрофорези**

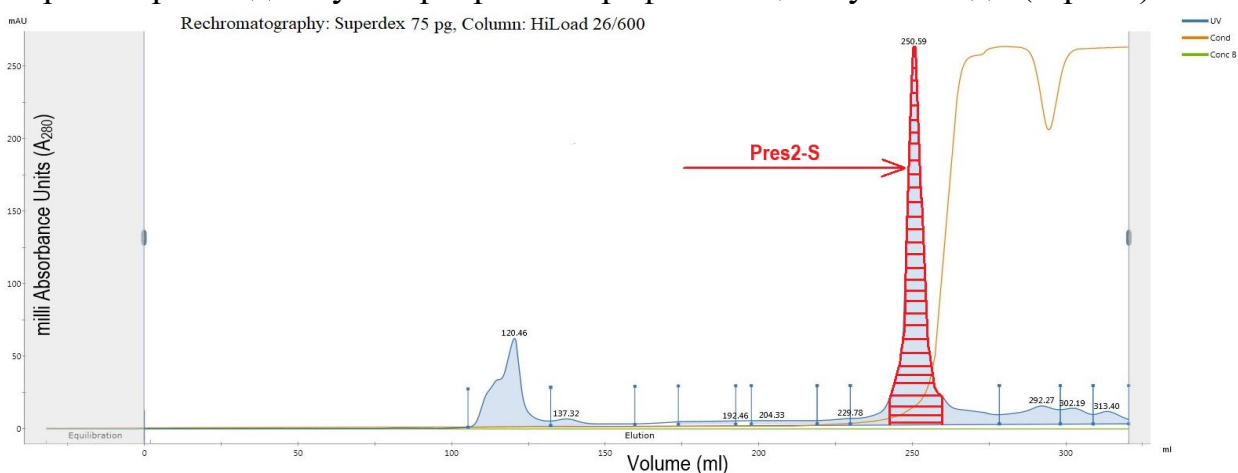


**8-расм. Ион-алмашувчи хроматография натижасида бирлаштирилган фракцияларнинг (46-59) NATIVE PAGE таҳлили**

Шунга кўра тозаланинг кейинги босқичида молекуляр массаси 3000 дан 70000 гача бўлган оқсилларни тақсимлашга имкон берувчи *HiLoad 26/600 Superdex 75 pg* колонкасидаги хроматографиядан фойдаландик.

Колонкали хроматография (*HiLoad 26/600 Superdex 75 pg*) усули ёрдамида рекомбинант *PreS2-S* оқсилни тозалаш.

Яқуний босқичда *Superdex 75 pg* сорбенти жойланган *HiLoad 26/600* колонкадаги хроматография усули ёрдамида рекомбинант *PreS2-S* оқсилни тозалаб олдик (оқим тезлиги 2,6 мл/мин, 0.34 МПа, элюент-борат буфери: 8.9 мМ NaOH, 45.5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 9.3). Йиғилган ҳар бир фракция ИФА таҳлилидан ўтказилди ва 32–64 фракциялар *PreS2-S* оқсилни сақлаши аниқланди. Ушбу фракциялар бирлаштирилиб, юқорида келтирилган шароитлар остида яқуний рехроматография босқичи ўтказилди (9-расм).

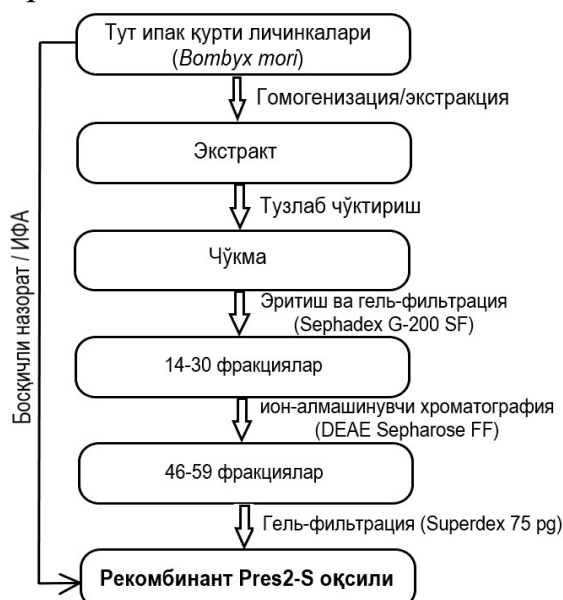


**9-расм. PreS2-S оқсилнинг рехроматографияси (2,6 мл/мин, 0.34 МПа, борат буфери: 8.9 мМ NaOH, 45.5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 9.3)**

9-расмда штрихлаб кўрсатилган 60–66 оқсил фракциялари ИФА таҳлилига кўра *PreS2-S* оқсилни эканлиги аниқланди.

10-расмда тут ипак қурти личинкалари таркибидан керакли PreS2-S оқсиллини ажратиш ва тозалашда биз ишлаб чиққан усулнинг асосий босқичлари схемаси келтирилган.

Қуйидаги 5-жадвалда тозалашнинг ҳар бир босқичидан сўнг рекомбинант PreS2-S оқсиллининг тозаллик даражаси берилган. Ушбу жадвалдан тозалашнинг якуний босқичидан сўнг рекомбинант PreS2-S оқсиллининг тозаллик даражаси **92%** ни ташкил этганлиги кўринади.



**10-расм. Рекомбинант PreS2-S оқсиллини ажратиш ва тозалаш схемаси**

**5-жадвал**

**Рекомбинант PreS2-S оқсиллининг тозаллик даражаси**

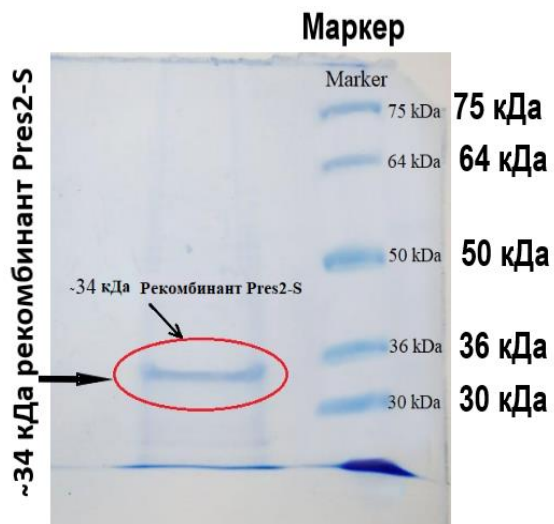
Рекомбинант PreS2-S оқсиллини ажратиш ва тозалаш босқичлари		Намуналардаги оқсиллар нисбати (%)	
		Умумий оқсил (балласт)	Рекомбинант PreS2-S
1	Гомогенизация	99.6 % ± 1%	0.4% ± 1%
2	Босқичли чўктириш (аммоний сульфат тузи билан 20% ва 60% гача тўйинтириш)	98.9 ± 5%	1.100 ± 5%
3	Sephadex G-200 SF ёрдамидаги КХ	96.25 ± 2%	3.75 ± 2%
4	DEAE Sepharose FF ёрдамидаги КХ	71.55 ± 5%	28.45 ± 5%
5	Superdex 75 pg ёрдамидаги рехроматография	8.00 ± 2%	<b>92.00*</b> ± 2%

\*~ 100 г тут ипак қурти личинкаларида 12.0 мг рекомбинант PreS2-S оқсилли синтезланиши аниқланиб, тозалаш жараёни якунида унинг унуми 4.8 мг (42%) ни ташкил этди.

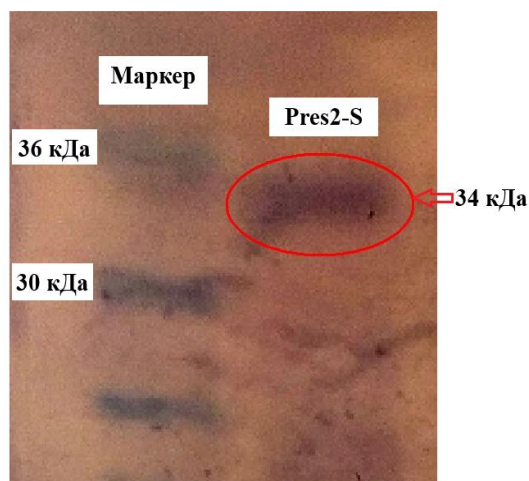
Олинган рекомбинант оқсилни тавсифлаш учун оқсиллар таҳлилининг қуйидаги усулларида фойдаланилди: 10% полиакриламиддаги гел-

электрофорези (11-расм), иммунофермент таҳлили (6-жадвал) ва иммуноблотинг (12-расм).

ПААГ электрофорез натижасига кўра тоза ҳолдаги рекомбинант оксилнинг молекуляр оғирлиги 34 кДа ни ташкил қилиб, бу унинг аминокислота кетма-кетлигидан келиб чиқадиган молекуляр оғирлигига мос келади (11-расм).



**11-расм.** Superdex 75pg  
ёрдамидаги HiLoad 26/600  
колонкасида тозаланган  
оксилнинг электрофореграммаси



**12-расм.** Рекомбинант PreS2-S  
оксилнинг иммуноблот таҳлили  
натижаси

Иммуноблот таҳлили учун «Western Breeze, Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen, Cat. WB7105)» тижорат тўпламидан фойдаланилди. Олинган натижалар ажратилган рекомбинант оксил гепатит В вирусига нисбатан юқори спецификлик намоён этишини кўрсатди (12-расм).

**6-жадвал**

**Намуналардаги рекомбинант PreS2-S оксилнинг ИФА таҳлили**

Намуна	ИФА таҳлили кўрсаткичи (OD 450 нм)	Оксилнинг умумий миқдори, мг/мл
1 PreS2-S салбий назорат стандарти	0,053	
2 PreS2-S ижобий назорат стандарти	≥3,000	
3 «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	2.405 (суялтириш даражаси 1:2000 )	21.2 × 10 <sup>-3</sup>
4 «Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.»	1.975 (суялтириш даражаси 1:2000)	21.4 × 10 <sup>-3</sup>
5 <b>КХ (HiLoad 26/600 Superdex G75pg) да тозалаб олинган рекомбинант PreS2-S оксили</b>	<b>2.902</b> (суялтириш даражаси 1:2000)	<b>21.5 × 10<sup>-3</sup></b>

Тозалаб олинган фракциядаги рекомбинант PreS2-S оксилнинг миқдори НПО «Диагностические системы» (Россия) ва “ORTO Diagnostics” (АҚШ) ИФА тест системаларидан фойдаланган ҳолда аниқланди. Қиёсий

стандарт сифатида «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India», «Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.» каби вакциналардан фойдаланилди.

### Хулоса

1. Илк бор турли зотга мансуб маҳаллий (Орзу, Гўзал, Марварид, Юлдуз) *Bombyx mori* личинкаларининг рекомбинант PreS2-S оқсилени синтез қилиш қобиляти тадқиқ этилди. Уларнинг орасида энг кўп миқдорда рекомбинант оқсил синтезловчи тут ипак қурти - маҳаллий Марварид зоти эканлиги аниқланди.

2. Тут ипак қурти личинкаларида синтезланган HBV рекомбинант PreS2-S оқсилени энг кўп миқдорда ажратиб олишга имконият берувчи экстракция шароити сифатида намуналарни 22 кГц катталиқдаги ультратовуш билан ишлов бериш ва 0.1 М Трис рН 7.8, 0.4% SDS, 2.4 мМ ЭДТА, 2 мМ PMSF таркибли системасида гомогенлаш тавсия этилди.

3. Рекомбинант PreS2-S оқсилени аммоний сульфат ёрдамида босқичли фракциялашнинг мақбул концентрациялари сифатида, жумладан, юқори молекуляр балласт оқсилларни йўқотиш учун 20%, керакли оқсилни чўктириш учун 60% ли эритмалари тавсия этилди.

4. PreS2-S оқсилени хроматография усули ёрдамида самарали тозалаш учун Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF ва Supredex 75pg сорбентларидан фойдаланиш тавсия этилди.

5. ИФА ва иммуноблотинг таҳлиллари асосида рекомбинант PreS2-S оқсилни юқори антиген спецификлик намоён этиши, ушбу рекомбинант оқсилнинг молекуляр оғирлиги эса гепатит В вируси PreS2-S региони ДНК кодлайдиган аминокислота кетма-кетлигига мос келувчи 34 кДа ни ташкил этиши аниқланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 ПО  
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ  
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

---

**АБДУРАХМАНОВ ЖАЛОЛИДДИН МИРДЖАМИЛЬЕВИЧ**

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО PRES2-S БЕЛКА ВИРУСА  
ГЕПАТИТА В (HBV) В ЛИЧИНКАХ *BOMBYX MORI***

**02.00.10 – Биоорганическая химия**

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

**Ташкент – 2020**

**Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам  
зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров  
Республики Узбекистан за номером В2019.4.PhD/К77**

Диссертация выполнена в Институте химии растительных веществ

Автореферат диссертации на трёх языках (русском, узбекском, английском (резюме))  
размещен на веб-сайте Научного Совета ([www.biochem.uz](http://www.biochem.uz)) и на Информационно-  
образовательном портале «ZiyoNet» ([www.ziyo.net.uz](http://www.ziyo.net.uz)).

**Научный руководитель:** **Азимова Шахноз Садыковна**  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Мухамедов Рустам Султанович**  
доктор биологических наук, профессор

**Рахманбердыева Раъно Каримовна**  
доктор химических наук, с.н.с.

**Ведущая организация:** **Ташкентский фармацевтический институт**

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_ часов на заседании  
Научного Совета DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 при Институте биоорганической химии  
(Адрес: 100125, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс:  
(+99871) 262-70-63).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института  
биоорганической химии (регистрационный номер № \_\_\_\_\_). Адрес: 100125, Ташкент,  
ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63, e-mail:  
shsha@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан: «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года.  
(реестр протокола рассылки \_\_\_\_\_ от «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года).

**Ш.И. Салихов**

Председатель Научного Совета по присуждению  
ученых степеней, д.б.н., академик

**Ш.А. Шомуротов**

Ученый секретарь Научного Совета по присуждению  
ученых степеней, д.х.н.

**М.Б. Гафуров**

Председатель Научного семинара при Научном Совете  
по присуждению ученых степеней, д.х.н., с.н.с.

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

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** На сегодняшний день во всем мире вирусным гепатитом В (HBV) инфицированы 329 млн человек, и ежегодно от него умирает 1,4 млн человек. По уровню смертности данная инфекционная болезнь стоит на втором месте после туберкулеза, а число людей, инфицированных гепатитом, в 9 раз превышает число ВИЧ-инфицированных. Однако свыше 80% людей, больных гепатитом, не имеют доступа к средствам профилактики, тестирования и лечения. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения разработала и внедряет в медицинскую практику «Глобальную стратегию сектора здравоохранения по вирусному гепатиту 2016-2021», предусматривающую срочные меры по повышению эффективности работы служб крови и инфекционного контроля, а также расширения вакцинации от гепатита В.

В настоящее время в мире для профилактики этого заболевания используется вакцина к вирусу HBV, представляющая собой рекомбинантный белок HBsAg, на основе S-региона HBV. Данный белок (состоит из 226 аминокислот) содержит только одну общую для всех генотипов HBV иммуногенную «а» детерминанту и не может обеспечить полную защиту от вируса. В связи с этим является актуальным создание новых эффективных вакцин, основанных на нескольких антигенных детерминантах, которые смогут обеспечить более эффективную защиту.

Ранее в нашей Республике проводились исследования по получению рекомбинантного белка поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В человека (HBV) в клеточной линии насекомых - *Bombyx mori* (BMN1) и достигнуты определенные научные и практические результаты. По 4-му направлению стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан «дальнейшее развитие фармацевтической промышленности и улучшение обеспеченности населения и медицинских учреждений доступными, качественными лекарственными средствами и изделиями медицинского назначения»<sup>2</sup> были определены важные задачи. Основываясь на этом, разработка способа получения рекомбинантного М-HBsAg (содержит 3 иммуногенную детерминанту), непосредственно в личинках *Bombyx mori* является актуальной, так как, личинки тутового шелкопряда в качестве «биофабрики» являются дешевым источником для получения рекомбинантного белка.

Данное диссертационное исследование в определенной степени направлено на выполнение задач, Постановлений Президента Республики Узбекистан от 14 февраля 2018 года ПП-3532 «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли», от 10 апреля 2019 года

---

<sup>2</sup> Указ Президента Республики Узбекистан «О стратегии действий по дальнейшему развитию республики Узбекистан» №УП-4947 07.02.2017

УП-5707 «О дальнейших мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли Республики в 2019 — 2021 годах», от 6 мая 2019 года ПП-4310 «О мерах по дальнейшему развитию системы медицинского и фармацевтического образования и науки», Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», 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.**

Известно, что белки, кодируемые PreS1 (108 а.о.), PreS2 (55 а.о.) и S (226 а.о.) регионами генома вируса, являются частью его внешней поверхности и высоко иммуногенные. Считается, что область PreS2-S (PreS2 + S) поверхностного белка HBV (содержащая 281 аминокислоту) обладает полиальбумин - связывающей активностью, что указывает на комплементарность поверхностных рецепторов гепатоцитов. Недавние исследования показали, что присутствие PreS2-S белка в вакцине против вируса гепатита В способствует значительному повышению иммуногенности вакцины. Из-за высокой консервативности и иммуногенности PreS2-S региона изучается возможность использования данного домена PreS2-S в качестве компонента при создании диагностической тест-системы для выявления мутированного вируса гепатита В. В лаборатории молекулярной генетики Института химии растительных веществ разработаны генетические конструкции, которые позволяют производить модифицированный белок PreS2-S вируса гепатита В в клетках насекомого (*Bombux mori*). Однако выход рекомбинантного белка был не высоким, так как в качестве промотора использовался V-Catch. В нашей работе мы исследовали возможность прямого заражения различных пород личинок *Bombux mori* рекомбинантным бакуловирусом, содержащий PreS2-S регион вируса гепатита В человека, под контролем промотора гена полиэдрина. Использование личинок тутового шелкопряда для получения рекомбинантного PreS2-S является более дешевой технологией. Преимуществом этой разработки является то, что она не требует использования дорогих питательных сред, специальных условий культивирования.

**Связь диссертационного исследования с исследовательской работой научно-исследовательского учреждения.** Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских проектов Института химии растительных веществ № КА-6-004 «Разработка способа получения рекомбинантного бакуловируса в различных породах личинок *Bombux mori*» (2015-2017 гг.).

**Цель исследования** является выявление местной породы тутового шелкопряда, продуцирующего наибольшее количество рекомбинантного



белка PreS2-S, разработка методов очистки синтезированного белка и определить его антигенных свойства.

**Задачи исследования:**

инфицирование личинок *Bombyx mori* местных пород (Орзу, Марварид, Юлдуз, Гузал) рекомбинантным бакуловирусом rBmNV-polh-PreS2-S, для выявления пород продуцирующих рекомбинантный белок с наибольшим выходом;

определение оптимальных условий очистки рекомбинантного белка PreS2-S из личинок тутового шелкопряда;

характеристика очищенного рекомбинантного белка;

изучение антигенных свойств выделенного белка.

**Объектом исследования** являются породы тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) - Орзу, Марварид, Юлдуз, Гузал, рекомбинантный вирус rBmNV-polh-PreS2-S.

**Предметом исследования** является рекомбинантный белок PreS2-S, его хроматографические, гель-электрофоретик и антигенные свойства.

**Методы исследования.** В исследовании использовали методы биоорганической химии (количественное и качественное определение белка, спектрофотометрия, методы выделения и очистки белка: колоночная и ионообменная хроматография, ИФА, иммуноблотинг и т. д.).

**Научная новизна диссертационного исследования** заключается в следующем:

впервые определены различные местные породы личинок *Bombyx mori*, экспрессирующих рекомбинантный белок PreS2-S;

установлено, что с наибольшим выходом рекомбинантный белок синтезируется в породе личинок Марварид;

определены оптимальные условия очистки рекомбинантного белка PreS2-S из личинок тутового шелкопряда;

методом ИФА и иммуноблотинга выявлено, что рекомбинантный белок PreS2-S проявляет высокую антигенную специфичность.

**Практические результаты исследования** состоят в следующем:

показано, что с наибольшим выходом рекомбинантный белок синтезируется в породе Марварид;

подобраны оптимальные условия очистки рекомбинантного белка PreS2-S, синтезируемого в личинках тутового шелкопряда:

а) определены условия гомогенизации, обеспечивающие максимальную экстракцию белка. Установлено, что ультразвуковая обработка образцов при 22 кГц и использование 0,4% SDS в составе гомогенизирующего буфера являются наиболее оптимальными;

б) выбран 20% и 60% растворы  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для фракционирования целевого белка;

с) установлена, что для последующей очистки белка PreS2-S наиболее эффективным является колоночная хроматография с использованием сорбентов Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF и Supredex 75pg.

методом ИФА и иммуноблотинга установлено, что рекомбинантный белок PreS2-S проявляет высокую антигенную специфичность, а молекулярная масса рекомбинантного белка составляет 34 кДа, что соответствует его аминокислотной последовательности, кодируемой ДНК PreS2-S региона вируса гепатита В.

**Достоверность результатов исследования** обосновывается использованием современных биохимических и молекулярно-биологических методов. Научные результаты анализировали современными аналитическими и статистическими 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 выявлении высокопроизводительной породы личинок тутового шелкопряда, экспрессирующих рекомбинантный белок PreS2-S и подборе оптимальных условий его выделения и очистки.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что полученный рекомбинантный PreS2-S, содержащий 3 антигенные детерминанты, может быть использован в качестве основы при создании новой эффективной вакцины против вируса гепатита В, а также в диагностических тест-системах.

**Внедрение результатов исследований.** На основании результатов научных исследований по выявлению местной породы тутового шелкопряда, продуцирующего наибольшее количество рекомбинантного белка PreS2-S, разработке методов очистки синтезированного белка, изучению его антигенности:

выделенные рекомбинантные бакуловирусные клоны *pBmNPV-polh-PreS2-S* включены в генофонд Института генетики и экспериментальной биологии растений «Коллекция редких фитопатогенных и других микроорганизмов» (Справка Академии наук Республики Узбекистан от 18 марта 2020 г. №4/1255-790). В результате коллекция пополнила генофонд «фитопатогенных и других микроорганизмов» и дал возможность использования для формирования электронной базы данных о специализированном видовом разнообразии;

рекомбинантный *pBmNPV-polh-PreS2-S* бакуловирус зарегистрирован в базу данных Национальной коллекции патогенных микроорганизмов Всемирного центра микроорганизмов (World Data Center for Microorganism, National Collection of Phytopathogenic Microorganisms, [http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by\\_id/1228](http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228)). В результате удалось изучить «бакуловирусную/насекомую клетку», которая распространена по всему миру;

последовательность гена, который кодирует рекомбинантный белок PreS2-S, включен в международную базу данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная медицинская библиотека США, GenBankID 2306674, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>). В результате позволяет использовать их для определения аминокислотной последовательности, местоположение антигенных детерминант аналогичных белков;

нуклеотидная последовательность гена, кодирующего рекомбинантный белок PreS2-S в личинках тутового шелкопряда *Bombyx mori*, зарегистрированы в базе данных EMBL LR745788 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/support>). В результате стало возможным использование данной информации для сравнительного анализа аналогичных белков в глобальном масштабе.

**Апробация результатов исследования.** Результаты исследования диссертационной работы прошли апробацию на 3 международных и 6 республиканских научно-практических конференциях.

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано всего 16 научных работ. Из них 4 научных статей, в том числе 1 в зарубежных и 3 в республиканских научных журналах, рекомендованные Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, поданы 2 заявки на патентование.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 109 страницы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **вступительной** части диссертации обосновываются актуальность и востребованность, цель и задачи темы диссертации, характеризуются объект и предмет проведенного исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

Первая глава диссертации, озаглавленная **«Рекомбинантные антигенные белки, системы экспрессии и методы их очистки»**, описывает характеристики и свойства рекомбинантных белков и предоставляет информацию о наиболее часто используемых системах экспрессии в мировой практике. Подробно описан обзор зарубежной и отечественной научной литературы о способах выделения и очистки рекомбинантных белков.

Вторая глава диссертации посвящена **«Выделению и очистке рекомбинантного белка PreS2-S из личинок *Bombyx mori*»**. В этой главе

описываются выявление наиболее подходящей породы личинок тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) для получения рекомбинантного белка PreS2-S, выделение и очистка рекомбинантного белка PreS2-S из отобранной породы личинок *Bombyx mori*, а также результаты исследований по характеристике свойств полученного рекомбинантного белка.

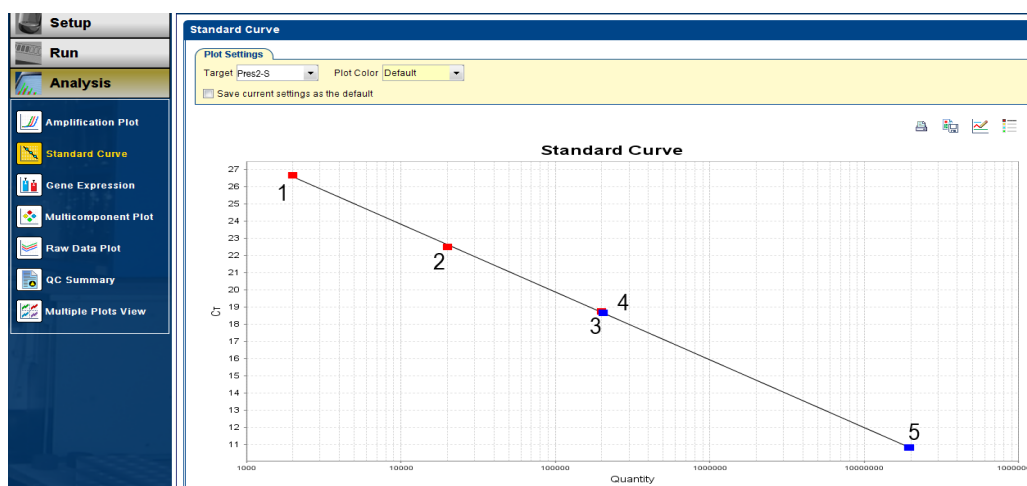
Третья глава диссертации, озаглавленная «**Методы разделения, очистки и характеристики рекомбинантных белков**», представляет экспериментальный раздел, в котором описаны материалы и методы, используемые при выделении, очистки и характеристики рекомбинантных белков.

В работе использовали клетки *Bombyx* (BMN1), имеющиеся в коллекции клеток насекомых лаборатории молекулярной генетики ИХРВ АН РУз, клонированную рекомбинантную плазмиду pBacPAK8-polh-PreS2-S, праймеры синтезированные для PreS2-S региона вируса гепатита В - FHV73b2 (длиной 21 п.н.), rHB77a2 (длиной 21 п.н.) и зонд HBZFA02b (24 п.н.). В исследованиях использовали личинки тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) из коллекции Научно-исследовательского института шелководства - породы Орзу, Марварид, Юлдуз, Гузал.

Для выделения и очистки рекомбинантного белка PreS2-S использовали ступенчатое осаждение в присутствии различных солей, а также методы колоночной хроматографии (гель-фильтрация, ионообменная хроматография). Для изучения иммунологических свойств очищенного рекомбинантного белка PreS2-S были использованы методы иммуноблоттинг и количественный ИФА. Характеристику выделенного белка проводили методом электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. При анализе ИФА использовали коммерческие наборы, такие как «Диагностические тест системы производства ИХРВ АН РУз», ORTO Diagnostics (США) и ДС (Россия). В качестве калибровочного стандарта использовали вакцину Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India и «Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.»

#### **Приготовление рекомбинантного вируса rBmNV-polh-PreS2-S для инфицирования личинок *Bombyx mori* (тутового шелкопряда)**

Вирусный сток, содержащий рекомбинантные бакуловирусы предназначенные для заражения личинок шелкопряда (*Bombyx mori*) был проанализирован методом RT-PCR (рис. 1).



**Рисунок 1. Результаты анализа RT-PCR на содержание PreS2-S**  
**1-3** квадраты на графике соответствуют стандартным растворам с известной концентрацией ДНК -  $2E3$  – 2000 копий/мл (**1**),  $2E4$  – 20000 копий/мл (**2**),  $2E5$  – 200000 копий/мл (**3**), соответственно. Под цифрами **4** – **5** обозначены исследуемые образцы. Отсутствие значения  $C_t$  (пороговый цикл) указывает на чистоту эксперимента.

Анализ RT-PCR показал, что концентрация исходного рекомбинантного вируса в стоке была достаточной для инфицирования личинок тутового шелкопряда и составляла  $C = 2 \times 10^6$  копий/мл.

**Определение породы личинок *Bombyx mori*, синтезирующих наибольшее количество белка, кодируемого PreS2-S геном и оптимального времени экспрессии рекомбинантного белка.**

Местные породы личинок Орзу, Марварид, Юлдуз, Гузал были инфицированы рекомбинантным бакуловирусом rBmNV-polh-PreS2-S с концентрацией  $C = 2 \times 10^6$  копий / мл.

Ежедневно, со второго дня инфицирования в гемолимфе проводилось исследование наличия синтезированного белка методом ИФА. Для определения общей концентрации белка в личинках *Bombyx mori* отбирали насекомых из каждой породы, и экстрагировали в течение 4 часов в среде содержащей 0.4% SDS, 2.4 mM EDTA, 2 mM PMSF, с использованием 0.1 M трис-буфера (pH 7.8) в соотношении 1:5 (1 г биомассы: 5 мл буфера). Затем гомогенат обрабатывали ультразвуком (22 кГц) для полного разрушения клеток. Далее гомогенат центрифугировали и отделяли супернатант. Общее содержание белка в супернатанте определяли методом Лоури, а степень синтеза рекомбинантного белка PreS2-S определяли методом ИФА. Результаты анализа представлены в Таблице 1.

Из таблицы 1 следует, что самый высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка наблюдается на пятые сутки после заражения вирусом в личинках породы Марварид.

**Таблица 1**

**Содержание общего белка в личинках *Bombyx mori* и результаты иммуноферментного анализа белка PreS2-S**

Название пород тутового шелкопряда	День после инфицирования	Содержание белка в экстракте (мг/мл)	Результаты ИФА (OD-450 нм)
Орзу	2-	1.87	0.151
	3-	2.09	0.453
	4-	3.54	1.562
	5-	4.39	2.422
	6-	3.12	1.187 (лизис)
Марварид	2-	2.52	0.480
	3-	3.11	0.794
	4-	4.33	1.992
	<b>5-</b>	<b>5.1</b>	<b>&gt;&gt;3.000</b>
	6-	4.01	1.831 (лизис)
Юлдуз	2-	1.74	0.210
	3-	2.01	0.547
	4-	3.33	1.532
	5-	4.11	2.584
	6-	3.02	1.201 (лизис)
Гузал	2-	1.96	0.425
	3-	2.21	0.682
	4-	3.68	1.702
	5-	4.57	2.897
	6-	3.22	1.347 (лизис)
Неинфицированные личинки		4.33	0.097
Стандарт положительного контроля в наборе			≥3.000
Негативный контрольный стандарт из набора			0.082

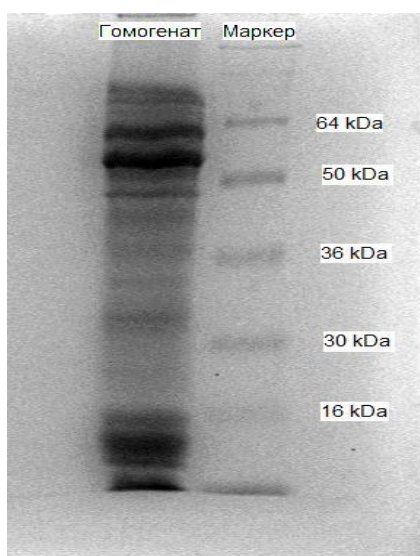
### **Очистка рекомбинантного белка PreS2-S**

#### *Гомогенизация личинок Bombyx Mori.*

Нами исследованы влияния на выход целевого белка различных концентраций SDS (от 0.1 до 1%), времени экстракции (от 2 до 12 ч), а также влияние ультразвуковой дезинтеграции (18–30 кГц, 30–240 с).

Количество рекомбинантного белка PreS2-S в супернатанте определяли методом ИФА (таблица 2). Состав экстракта исследовали методом электрофореза в 10% ПААГ (рис. 2).

Таким образом, определены оптимальные условия гомогенизации: 0.4% SDS в буфере, время экстракции - 4 ч, ультразвуковая дезинтеграция при 22 кГц в течение - 60 сек. при которых обеспечивается максимальный выход целевого белка.



**Рисунок 2. 10% ПААГ электрофорез супернатанта личинок тутового шелкопряда породы Марварид**

**Таблица 2**

**ИФА супернатанта**

Образец	Степень разбавления	Результаты теста ИФА (OD -450 нм)
Личинки тутового шелкопряда породы «Марварид»	1:100	≥3.000 (out)
	1:1000	≥3.000 (out)
	<b>1:10000</b>	<b>0.580</b>
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	1:100	≥3.000 (out)
	1:1000	2.890
	<b>1:10000</b>	<b>0.251</b>
Стандарт положительного контроля в наборе		≥ 3000
Негативный контрольный стандарт из набора		0.097
Неинфицированные личинки		0.082

*Подбор оптимальных условий для осаждения белковой фракции, содержащей рекомбинантный PreS2-S.*

На следующем этапе очистки использовали фракционирование сульфатом аммония. Для удаления высокомолекулярных белков использовали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в концентрации от 10% до 25%. Результаты показали, что 20% высаливание экстракта с сульфатом аммония является наиболее оптимальным для удаления балластных белков, при котором минимальны потери целевого белка PreS2-S.

Затем использовали растворы сульфата аммония в концентрации от 50 до 80%. (таблица 3). Состав фракции исследовали методом электрофореза в 10% ПААГ (рис. 3).

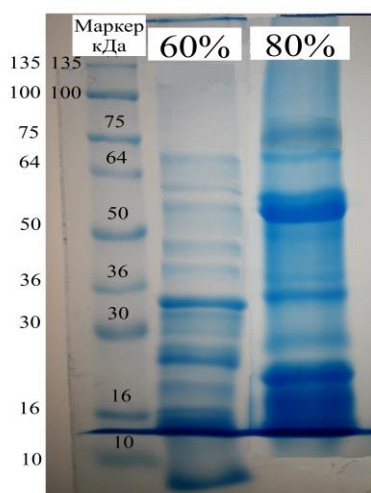


Рисунок 3. 10% ПААГ электрофорез фракции белка

Таблица 3

Результаты ИФА и содержание белков во фракциях

Сульфат аммония (%)	Проверенный образец	Процент общего белка (%)	Результаты теста ИФА	
			OD-450 нм	Степень разбавления
50	супернатант	75.8%	$\geq 3.000$ (out)	1:1
	осадок	19%	1.998	1:3000
60	супернатант	64.7%	0.320	1:1
	осадок	<b>30.1%</b>	<b>2.870</b>	1:3000
70	супернатант	53.5%	0.320	1:1
	осадок	41.3%	2.870	1:3000
80	супернатант	38.4%	0.299	1:1
	осадок	56.4%	2.871	1:3000
Стандарт положительного контроля в наборе			$\geq 3000$	-
Негативный контрольный стандарт из набора			0.095	-

Из таблицы 3 видно, что 60% высаливание экстракта с сульфатом аммония наиболее оптимален для осаждения целевого белка.

Таким образом, ступенчатое осаждение 20% и 60% растворами сульфата аммония являются оптимальным для максимальной очистки рекомбинантного белка PreS2-S.

*Обессоливание фракции рекомбинантного белка PreS2-S.*

Фракция, содержащая PreS2-S белок после осаждения сульфатом аммония обессоливали на колонке HiPrep 26/10, Sephadex G-25 Fine, скорость потока 8 мл/мин, 0,3 МПа (3 бара). Затем, обессоленные образцы были высушены лиофильно.

*Очистка рекомбинантного белка PreS2-S методом колоночной хроматографии на Sephadex G-200 SF.*



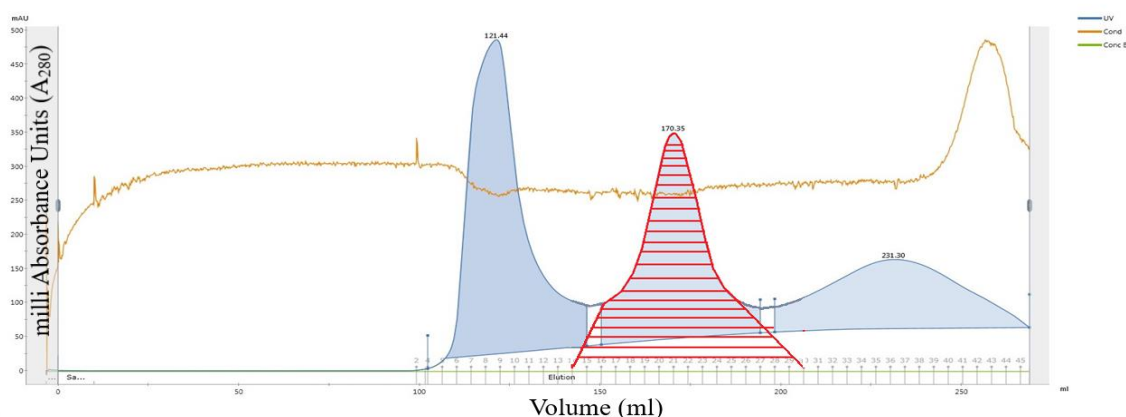
Как видно из электрофореграммы (рис. 3) осадок полученный после 60% осаждения сульфатом аммония содержит определенное количество высокомолекулярных белков. В этой связи мы использовали для их разделения гель-хроматографию на Sephadex G-200 SF. Для подбора условий хроматографирования на колонке (HiLoad 26/600) с Sephadex G-200 SF использовали различные буферы - PBS (pH 7.4), ацетатный буфер (pH 5) и боратный буфер (pH 9.3). Количество белка PreS2-S в растворе анализировали с помощью ИФА (табл. 4).

**Таблица 4**

**Содержание Pres2-S белка в буферных растворах**

Название	Количество Pres2-S белка в растворе по ИФА (OD=450 нм)
Ацетатный буфер (pH 5)	0.201
PBS (pH 7.4)	0.599
Боратный буфер (pH 9.3)	<b>1.053</b>

Как видно из таблицы 4, что при использовании боратного буфера содержится наибольшее количество белка PreS2-S. В этой связи, для колоночной хроматографии на Sephadex G-200 SF использовали боратный буфер.



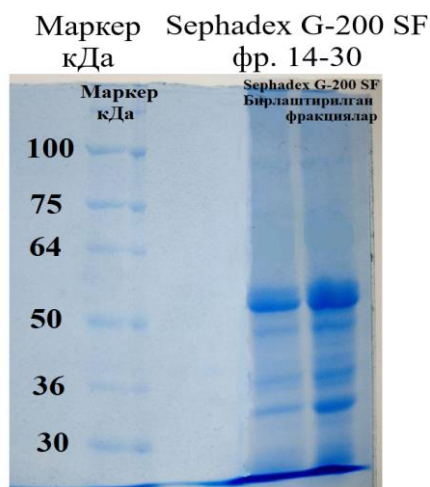
**Рисунок 4. Хроматограмма процесса гель-фильтрации в боратном буфере (2,6 мл/мин, 0.34 МПа, боратный буфер: 8.9 мМ NaOH, 45.5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 9.3)**

Согласно ИФА фракции с 14 по 30 содержали различные количества рекомбинантного белка PreS2-S (рисунок 4, штрих). По данным электрофореза в 10% ПААГ (рис. 5), фракций, с PreS2-S белком содержат 7 компонентов в диапазоне ММ от 16 до 55 кДа.

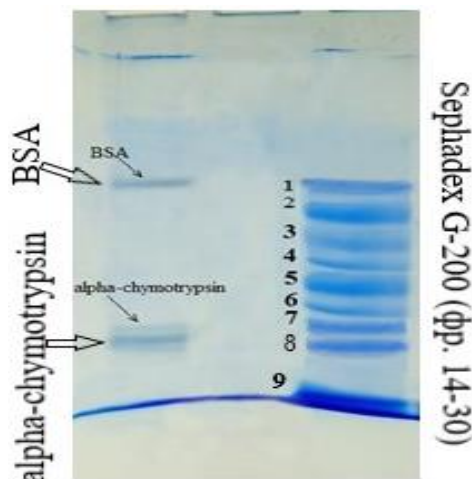
Таким образом гель-фильтрация на G-200 SF позволила отделить часть балластных высокомолекулярных белков, что увеличило содержание PreS2-S белка во фракциях по данным ИФА (рисунок 4).

Поскольку метод электрофореза в SDS позволяет разделить белки практически только по их молекулярной массе, то мы использовали метод NATIVE PAGE, позволяющий дифференцировать белки по их свойствам - естественному заряду.

Подобраны условия для проведения NATIVE PAGE: - Разделяющий гель: Трис HCl (pH 8.8) 244 mM; Бис-акриламид 10%; ТЕМА 0.08%; APS 0.08%; - Концентрирующий гель: Трис HCl (pH 6.8) 125 mM; Бис-акриламид 4%; TEMED 0.05%; APS 0.05%.



**Рисунок 5. Гель-электрофорез фракций, содержащих белок PreS2-S**

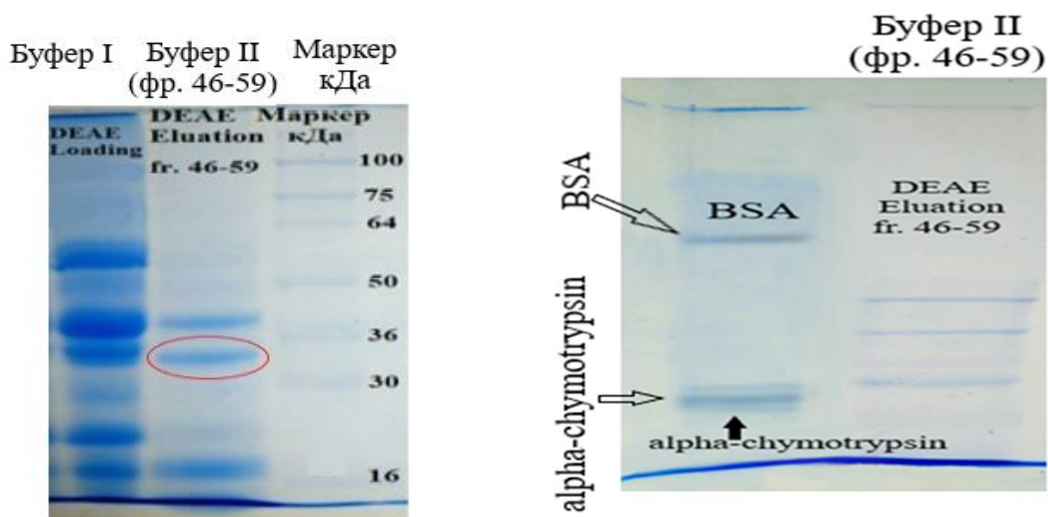


**Рисунок 6. NATIVE PAGE электрофорез фракций, содержащих белок PreS2-S**

Результаты NATIVE PAGE показали, что фракция PreS2-S в условиях NATIVE PAGE состоит из 9 компонентов (рис. 6), тогда как в присутствии SDS из 7 компонентов (рис. 5). Следовательно, для очистки целевого рекомбинантного белка помимо гель-фильтрации на основе сефадекса должны быть применены ионообменная или другой тип хроматографии.

В связи с этим фракции, содержащие рекомбинантный PreS2-S белок разделяли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE Sepharose FF, HiScale 50/20. Для этого образец нанесли на колонку с 50 mM Трис-HCl pH 8.5 (промывочный буфер I) и удалили балластные белки (скорость потока - 3,5 мл/мин, детекция при 280 нм). Результаты анализа ИФА показали, что белковые фракции, выделенные с использованием буфера I не содержали PreS2-S белок. Затем, буфером II (50 mM Tris- HCl, 500 mM NaCl, pH 8.5, кондуктивность 50мS/см, скорость потока - 3,5 мл/мин) проэлюировали целевой белок. Белковые фракции, содержащие PreS2-S (46–59) объединяли.

Таким образом, колоночная хроматография на DEAE Sepharose FF позволила в соответствии с данными ИФА очистить белок при потере 15%. По данным электрофореза в 10% ПААГ и NATIVE PAGE, фракции (46-59) содержат белки 3 компонента с ММ в интервале от 16 до 45 кДа (рис. 7-8).



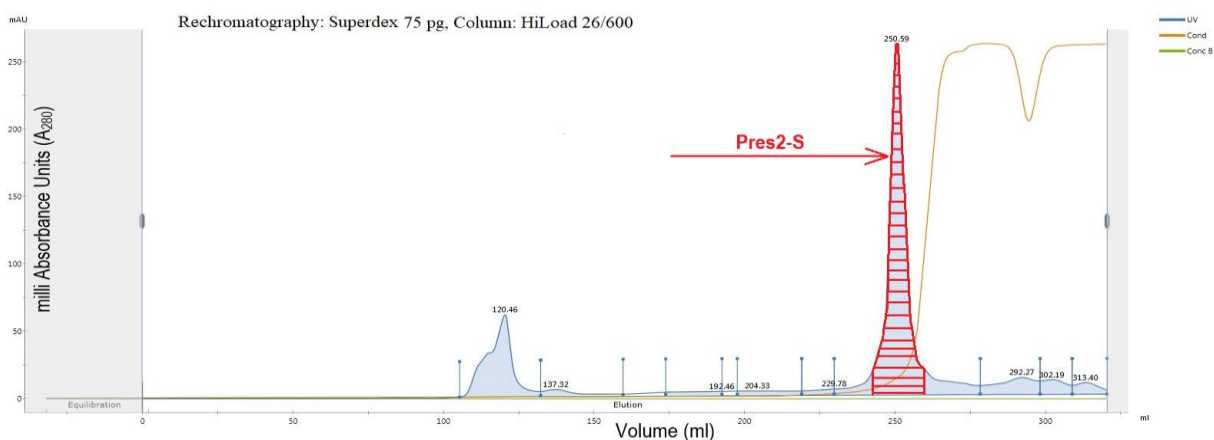
**Рисунок 7. 10% ПААГ электрофорез после ионообменной хроматографии объединенной фракции (46-59)**

**Рисунок 8. NATIVE PAGE после ионообменной хроматографии объединенной фракции (46-59)**

В этой связи для дальнейшей очистки использовали хроматографию на колонке *HiLoad 26/600 Superdex 75 pg*, позволяющая разделить белки с ММ от 3000 до 70000.

*Очистка рекомбинантного PreS2-S белка методом колоночной хроматографии на HiLoad 26/600 Superdex 75 pg.*

На последнем этапе рекомбинантный PreS2-S белок очищали с помощью колоночной хроматографии *HiLoad 26/600 Superdex 75 pg* (скорость потока - 2,6 мл/мин, 0.34 МПа, элюент - боратный буфер: 8.9 мМ NaOH, 45.5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 9.3). Фракции анализировали с помощью ИФА, и было выявлено, что фракции 32-64 содержат белок PreS2-S. Эти фракции объединяли и рехроматографировали в тех же условиях (рис. 9).



**Рисунок 9. Рехроматография PreS2-S белка (2,6 мл/мин, 0.34 МПа, боратный буфер: 8.9 мМ NaOH, 45.5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 9.3)**

На рисунке 9 показано заштрихованным пиком фракции с 60 – 66, содержащие белок PreS2-S.

На рисунке 10 приведена отработанная нами схема основных этапов выделения и очистки целевого PreS2-S белка из личинок тутового шелкопряда.



**Рисунок 10. Схема выделения и очистки рекомбинантного PreS2-S белка**

В таблице 5 приведена степень очистки рекомбинантного белка PreS2-S после каждого этапа очистки. Как видно из таблицы на конечном этапе степень очистки рекомбинантного белка PreS2-S составляет **92%**.

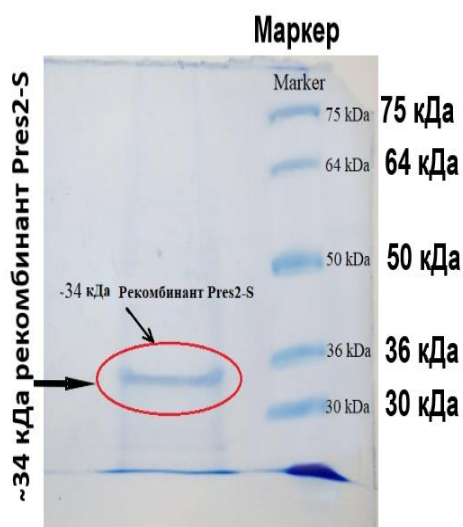
**Таблица 5**

**Степень очистки рекомбинантного белка PreS2-S**

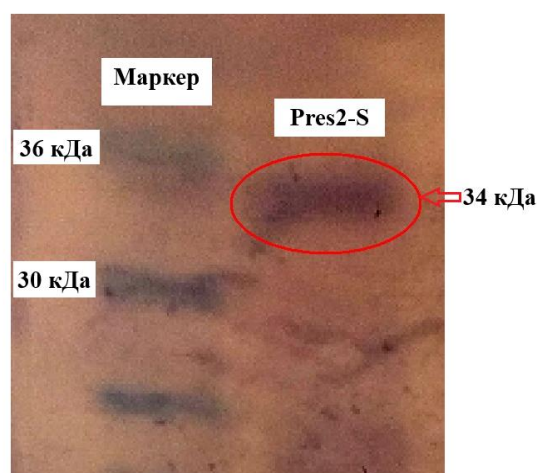
Этапы выделения и очистки рекомбинантного PreS2-S белка		Соотношение белков в образцах (%)	
		Общий белок (балластный)	Рекомбинантный PreS2-S
1	Гомогенизация	99.6 % ± 1%	0.4% ± 1%
2	Ступенчатое осаждение (20% и 60% сульфатом аммония)	98.9 ± 5%	1.100 ± 5%
3	КХ на Sephadex G-200 SF	96.25 ± 2%	3.75 ± 2%
4	КХ на DEAE Sepharose FF	71.55 ± 5%	28.45 ± 5%
5	Рехроматография на Superdex 75 pg	8.00 ± 2%	<b>92.00*</b> ± 2%

\*Установлено, что в ~ 100 г личинок тутового шелкопряда синтезируется 12.0 мг рекомбинантного белка PreS2-S, и к концу процесса очистки его выход составляет 4.8 мг (42%).

Характеристику очищенного белка проводили с помощью электрофореза в 10% ПААГ (рис. 11), ИФА (табл. 6) и иммуноблотинга (рис. 12).



**Рисунок 11. 10% ПААГ электрофорез очищенного белка на колонке HiLoad 26/600 Superdex 75pg**



**Рисунок 12. Иммуноблотинг белка PreS2-S**

По данным электрофореза очищенный рекомбинантный белок имеет молекулярную массу 34 кДа, что соответствует ожидаемой массе белка на основе его аминокислотной последовательности (рис. 11).

Для анализа иммуноблоттинга использовали коммерческий набор «Western Breeze, Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen, Cat. WB7105)». Установлено, что выделенный рекомбинантный белок проявляет высокую антигенную специфичность к вирусу гепатита В (рис. 12).

**Таблица 6**

**ИФА рекомбинантного PreS2 белка в образцах**

Исследуемый образец		Результаты теста ИФА (OD-450 нм)	Общий белок, мг/мл
1	PreS2-S стандарт отрицательного контроля	0,053	
2	PreS2-Стандарт положительного контроля	$\geq 3,000$	
3	«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	2.405 (Степень разбавления 1:2000)	$21.2 \times 10^{-3}$
4	«Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.»	1.975 (Степень разбавления 1:2000)	$21.4 \times 10^{-3}$
5	<b>Рекомбинантный белок PreS2-S, очищенный на КХ (HiLoad 26/600 Superdex 75pg)</b>	<b>2.902</b> (Степень разбавления 1:2000)	<b><math>21.5 \times 10^{-3}</math></b>

Количество белка PreS2-S в очищенной фракции определяли с использованием тест-систем НПО «Диагностические системы» (Россия) и «ORTO Diagnostics» (США). В качестве сравнительного стандарта использовали вакцины, такие как «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India», «Euvax B 20 mcg/ml, Sanofi Pasteur Korea Ltd.».

### **Выводы**

1. Впервые исследована способность синтеза рекомбинантного белка PreS2-S в местных породах личинок *Bombyx mori* (Орзу, Гузал, Марварид, Юлдуз). Установлено, что наибольшее количество рекомбинантного белка синтезируется в личинках тутового шелкопряда породы Марварид.

2. Проведение ультразвуковой обработки образцов при 22 кГц и экстракцию с составом гомогенизирующего буфера (0.1 М Трис-буфер с pH 7.8, 0.4% SDS, 2.4 mM ЭДТА, 2 mM PMSF) рекомендована в качестве оптимального условия экстракции, обеспечивающие максимальный выход целевого белка.

3. В качестве оптимальной концентрации при ступенчатой фракционировании целевого белка сульфатом аммония, рекомендованы 20% растворы для удаления высокомолекулярных балластных белков и 60% растворы для осаждения целевого белка PreS2-S.

4. Для наиболее эффективной очистки белка PreS2-S рекомендованы хроматография с использованием сорбентов Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF и Supredex 75pg.

5. Методом ИФА и иммуноблотинга установлено, что рекомбинантный белок PreS2-S проявляет высокую антигенную специфичность, а молекулярная масса рекомбинантного белка составляет 34 кДа, что соответствует его аминокислотной последовательности, кодируемой ДНК PreS2-S региона вируса гепатита В.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES  
DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 AT THE INSTITUTE OF THE BIOORGANIC  
CHEMISTRY**

**ABDURAKHMANOV JALOLIDDIN MIRDJAMILEVICH**

**OBTAINING RECOMBINANT PROTEIN PRES2-S HEPATITIS B VIRUS  
(HBV) IN *BOMBYX MORI* LARVAE**

**02.00.10 – Bioorganic chemistry**

**DISSERTATION ABSTRACT  
FOR THE DOCTOR OF PHILOSOPHY ON CHEMICAL SCIENCES  
(PhD)**

**Tashkent – 2020**

**The title of the dissertation of doctor of philosophy (PhD) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2019.4.PhD/K77**

The dissertation has been carried out at the Institute of the Chemistry of Plant Substances.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council ([www.biochem.uz](http://www.biochem.uz)) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)).

**Scientific supervisor:** **Azimova Shakhnoz Sadikovna**  
doctor of sciences in biology, professor

**Official opponents:** **Mukhamedov Rustam Sultanovich**  
doctor of sciences in biology, professor

**Rakhmanberdieva Rano Karimovna**  
doctor of sciences in chemistry, Senior Researcher

**Leading organization:** **Tashkent Pharmaceutical Institute**

Defense will take place on «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 year \_\_\_\_ at the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 of the Institute of the Bioorganic Chemistry at the following address: 100125, Tashkent, 83, M. Ulugbek street. Phone: (+99871) 262-35-40, Fax: (+99871) 262-70-63.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of the Bioorganic Chemistry (registration number № \_\_\_\_\_). Address: 100125, Tashkent, 83, M. Ulugbek street. Phone: (+99871) 262-35-40, Fax: (+99871) 262-70-63, e-mail: [shsha@mail.ru](mailto:shsha@mail.ru).

Abstract of the dissertation is distributed on «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 y.  
(protocol at the register No \_\_\_\_\_ dated «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 y).

**Sh.I. Salikhov**  
Chairman of scientific council on award of  
scientific degrees, D.B.Sc., academician

**Sh.A. Shomurotov**  
Scientific secretary of scientific council on award of  
scientific degrees, D.Ch.Sc.

**M.B. Gafurov**  
Chairman of scientific seminar under scientific council  
on award of scientific degrees, D.Ch.Sc.



## INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

**The aim of research work** is identification of the local silkworm breed producing the largest amount of PreS2-S recombinant protein, development of methods for purifying the synthesized protein and studying its antigenic properties.

**The objects of the research work** are Orzu, Marvarid, Yulduz, Guzal - Silkworm larvae (*Bombyx mori*) and the recombinant virus rBmNPV-polh-PreS2-S.

**Scientific novelty of the research work:**

for the first time, various local breeds of *Bombyx mori* larvae expressing the recombinant PreS2-S protein were studied;

it was found that with the highest yield, the recombinant protein is synthesized in the breed of larvae of Marvarid;

the optimal conditions for the purification of the recombinant PreS2-S protein from silkworm larvae were determined;

ELISA and immunoblotting revealed that the recombinant PreS2-S protein exhibits high antigenic specificity.

**Implementation of the results** based on the results obtained in the study of identifying the local silkworm breed producing the highest amount of PreS2-S recombinant protein, to develop methods for purifying the synthesized protein, and to study its antigenicity:

isolated recombinant baculovirus clones pBmNPV-polh-PreS2-S are included in the gene pool of the Institute of Genetics and Experimental Plant Biology "Collection of rare phytopathogenic and other microorganisms" (Certificate of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated March 18, 2020 No. 4 / 1255-790). As a result, the collection replenished the gene pool of "phytopathogenic and other microorganisms" and made it possible to use the specialized species diversity to create an electronic database;

recombinant pBmNPV-polh-PreS2-S baculovirus is registered in the database of the National collection of pathogenic microorganisms of the World center of microorganisms (World Data Center for Microorganism, National Collection of Phytopathogenic Microorganisms, [http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by\\_id/1228](http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228)). As a result, it was possible to study the "baculovirus/insect cell", which is distributed throughout the world;

the sequence of the gene that encodes the recombinant protein PreS2-S is included in 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 2306674. 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 PreS2-S in the silkworm larvae (*Bombyx mori*) is registered in the EMBL database LR745788 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/support>). 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 the introduction, three chapters, conclusion and list of references. The volume of the thesis is 109 pages.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

### Эълон қилинган ишлар рўйхати

#### List of published works

#### I часть (I бўлим, I part)

1. N.A. Tosheva, S.A. Sasmakov, J.M. Abdurakhmanov, Sh. Khasanov, O.N. Ashirov, F. Eshboev, Sh.S. Azimova, D.A. Ismatullaeva, Y.M. Ziyaeva, Sh.R. Umarov. Different silkworm (*Bombyx mori*) breeds for obtaining of PreS2-S protein // Uzbek Biological Journal, 2017, №4. - P. 6-9. (03.00.00; №5)

2. Абдурахманов Ж.М. Сасмаков С.А. Хасанов Ш.Ш. Аширов О.Н. Эшбоев Ф. Б. Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантной плазмидной ДНК рВасРАК8-polh- PreS2-S, кодирующий PreS2-S регион вируса гепатита В (HBV) в бакуловирусах // Universum: химия и биология, 2019, №10(64). – С. 25-29. (02.00.00; №2)

3. Ж.М. Абдурахманов, С.А. Сасмаков, Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, Ш.С. Азимова. Градиентное осаждение рекомбинантных белков содержащихся в тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) с помощью сульфата аммония // Химия и химическая технология, 2019, №2. – С. 77-79. (02.00.00; №3)

4. Жалолитдин М. Абдурахманов, Собирджан А. Сасмаков, Шухрат Ш. Хасанов, Ойбек Н. Аширов, Шахноз С. Азимова // Исследование фракции рекомбинантных белков из *Bombyx mori* и *Pichia pastoris* методом нативного гель-электрофореза // Химия и химическая технология, 2020, №1. – С. 60-63. (02.00.00; №3)

#### II часть (II бўлим, II part)

5. J.M. Abdurakhmanov, S.A. Sasmakov, Sh. Khasanov, O.N. Ashirov, F. Eshboev, Sh.S. Azimova. Purification of recombinant PreS2-S protein, the surface antigen of human hepatitis B virus (HBV) expressed in *Bombyx mori* larvae // European Science Review, 2019, № 9–10. – P. 7-10.

6. Ф. Эшбоев, Ж. Абдурахманов, О. Аширов, Ш. Хасанов, Сасмаков С.А., Ш. Азимова. Получение рекомбинантного GFP (зеленый флуоресцентный белок) в бакуловирусах // “Физик-кимёвий биология ва эндокринологиянинг долзарб муаммолари” мавзусидаги илмий-амалий анжумани материаллари“ Тошкент 2016 й. 121-123 бетлар.

7. J.M. Abdurakhmanov, Sh.Sh. Xasanov, O.N. Ashirov, N.A. Tosheva, A.A. Eshmuratova, S.A. Sasmakov Sh.S. Azimova. Designing of recombinant plasmid DNA рВасРАК8-TP, encoding target proteins in baculoviruses // XII International Symposium «Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds» Tashkent, September 7-8, 2017. Abstract book -P. 211.

8. J.M. Abdurakhmanov, N.A. Tosheva, A.A. Eshmuratova, S.A. Sasmakov G.A.Piyakina Sh.S. Azimova. Determination of high-level producing Silkworm

larvae sorts of recombinant proteins // XII International Symposium «Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds» Tashkent, September 7-8, 2017. Abstract book -P. 212.

9. Ж.М. Абдурахманов, Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, Ф.Б. Эшбоев, С.А. Икрамов, С.А. Сасмаков, Ш.С. Азимова. Рекомбинант оксиларни аммоний сульфат тузи ёрдамида градиентлаб чўктириш // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси, 5 декабрь 2018 й, Тошкент. Конференция материаллари, 129-130 бетлар.

10. Ж.М. Абдурахманов, Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, Ф.Б. Эшбоев, С.А. Икрамов, С.А. Сасмаков, Ш.С. Азимова. Личинки тутового шелкопряда *Bombyx mori* в качестве «биореактора» для получения рекомбинантных белков // 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. 21-22.

11. S. Sasmakov, J. Abdurhakhmanov, Sh. Khasanov, E. Yusupova, G. Piyakina, Sh. Azimova. Obtaining of recombinant protein in the *Bombyx mori* expression system // XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2019, Shanghai. -P. 26.

12. J.M. Abdurhakhmanov, S.A. Sasmakov, Sh.Sh. Khasanov, O.N. Ashirov, E.G. Yusupova, F.B. Eshboev, Sh.S. Azimova. Use of Superdex 75 µg HiLoad columns for purification of the proteins from Silkworm larvae and yeast of *Pichia pastoris* // Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН РУз, Совет молодых ученых и журнал «Химия природных соединений», 18-19 марта 2019 г., Ташкент. «Актуальные проблемы химии природных соединений» С. 69.

13. Abdurhakhmanov J.M., Sasmakov S.A., Khasanov Sh.Sh., Ashirov O.N., Eshboev F.B., Azimova Sh.S. The importance of the method of PAGE in the study of recombinant PreS2-S protein // Академия наук республики Узбекистан институт микробиологии. «Состояние и перспективы развития микробиологии и микробной биотехнологии в Узбекистане» 24 октября 2019 г., Ташкент. С. 16-17.

14. Ж.М.Абдурахманов, С.А. Сасмаков, Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, Ф.Б. Эшбоев, С.А. Икрамов, Ш.С. Азимова. Тут ипак қурти личинкаларида синтезланган PreS2-S оксилани гомоген ҳолда ажратиб олишда гел-фильтрацион хроматография усули якуний босқич сифатида // ЎзР ФА «Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни» Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари 22 ноябрь 2019 йил. Тошкент. 27-28 бетлар.

15. Н.А. Тошева, С.А. Сасмаков, Ж.М. Абдурахманов, О.Н. Аширов, Ш.Ш. Хасанов, Г.А. Пиякина, Ш.С. Азимова, Д.А. Исматуллаева, Я.М. Зияева, М.Ш. Жуманиезов. Способ получения рекомбинантного белка

PreS2-S в личинках тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) и выявление высокопроизводительной породы. Заявка на патентования № IAP20160473

16. Ж.М. Абдурахманов, С.А. Сасмаков, Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, Г.А. Пиякина, Ш.С. Азимова. Способ очистки рекомбинантного белка PreS2-S, поверхностного антигена вируса гепатита В человека. Заявка на патентования № IAP 20190100