

**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

ҲАСАНОВ ШУХРАТ ШАВКАТОВИЧ

**“БАКУЛОВИРУС / ҲАШАРОТ ҲУЖАЙРАСИ” ЭКСПРЕССИЯ
ТИЗИМИДА MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) ОҚСИЛИНИ
ЭКСПРЕССИЯЛАШ**

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)

Ҳасанов Шухрат Шавкатович

“Бакуловирус / ҳашарот ҳужайраси” экспрессия тизимида MIS - (мюллер ингибирловчи субстанцияси) оксилени экспрессиялаш 3

Ҳасанов Шухрат Шавкатович

Экспрессия белка MIS – ингибирующей субстанции мюллера в системе экспрессии «бакуловирусы - клетки насекомых».....21

Khasanov Shukhrat Shavkatovich

Expression of protein MIS (mullerian inhibiting substance) in the expression system “Baculoviruses - insect cells”.....39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....43

**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

ҲАСАНОВ ШУХРАТ ШАВКАТОВИЧ

**“БАКУЛОВИРУС / ҲАШАРОТ ҲУЖАЙРАСИ” ЭКСПРЕССИЯ
ТИЗИМИДА MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) ОҚСИЛИНИ
ЭКСПРЕССИЯЛАШ**

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/В418 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 ва «ZiyoNet» ахборот таълим тармоғида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбарлар:	Азимова Шахноз Садыковна биология фанлари доктори, профессор Сасмаков Собирджан Анарматович кимё фанлари номзоди, катта илмий ходим
Расмий оппонентлар:	Исмаилов Зафар Файзуллаевич биология фанлари доктори Муҳамедов Рустам Султанович биология фанлари доктори, профессор
Етакчи ташкилот:	Биоорганик кимё институти

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.В.38.01 рақамли Илмий кенгашининг 2020 йил «28» декабрь куни соат 10⁰⁰ даги мажлисида бўлади. Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7^б-уй, Микробиология институти мажлислар зали, 3-қават Тел.:(+99871) 241-92-28, факс:(+99871) 241-92-71; e-mail: 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^б-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 Тахир Фатихович
Илмий даража берувчи Илмий кенгаш раиси
б.ф.д., профессор, академик

Жураева Роҳила 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 доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти. Бугунги кунда дунёда фақат биотехнологик усуллар ёрдамида олинадиган биологик фаол рекомбинант оксилларни (инсулин, эритропоэтин, интерферон, вакциналар ва б.) турли хил экспрессия тизимларида (бактериал, ачитқи, бакуловирус/ҳашарот хужайраси ва сутэмизувчи хужайралари) олишнинг самарали усуллари ишлаб чиқишга алоҳида эътибор қаратилоқда. Бу борада, бакуловирус/ҳашарот хужайраси экспрессия тизими ўз функционал хусусиятлари билан табиий аналогларидан деярли фарқланмайдиган рекомбинант оксиллар олишга имкон бериши билан ажралиб туради. Ушбу тизимдан фойдаланган ҳолда рекомбинант оксиллар экспрессияси устида олиб борилган изланишларнинг кўпчилиги тут ипак қурти *Bombyx mori* ядро полиэдрози вирусига асосланган рекомбинант бакуловируслардан фойдаланишга қаратилган. Таъкидлаш жоизки, ушбу вируслар ўзига хос специфик бўлиб, фақат бир турдаги ҳашаротларни зарарлайди, одамлар ва хўжалик ҳайвонлари учун хавфсиздир. Шунингдек, *in vitro* шароитида *Bombyx mori* ҳашарот хужайра культураларида рекомбинант оксилларни синтезлаш қиммат жараёнлигини инобатга олган ҳолда бевосита тут ипак қурти личинкаларидан “биореактор” сифатида фойдаланиш қиммат озуқа муҳитларини ва махсус шароитларни талаб этмайди, натижада рекомбинант оксилларнинг таннархи пасайиши имконияти яратилади.

Жаҳон амалиётида MIS оксиллини (Мюллер ингибирловчи субстанцияси цитокинлар оиласига тегишли гликопротеин) ген муҳандислик усуллари ёрдамида бакуловирус экспрессия тизимида ва сутэмизувчиларнинг хужайра культураларида самарали олиш борасида илмий ишлар олиб борилмоқда. Биологик фаол MIS оксиллини олиш учун оксил экспрессияси даражасида қиёсий тадқиқотлар ўтказилади; бунда MIS оксиллини олишнинг мақбул шароитларини танлаш, рекомбинант оксилни ажратиш ва тозалаш, унинг организмдаги таъсир механизмларини аниқлаш каби муҳим ишларни амалга оширишни тақозо этмоқда.

Республикамизда турли касалликларга ташхис қўйиш ва даволаш, фармацевтик препаратлар билан таъминлаш ва моддий техник базани яхшилаш борасида кенг қамровли чора-тадбирлар ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда, шунингдек, саратон касаллигига қарши дори воситалари ёки диагностика умумлар тайёрлаш борасида муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида¹ 2017 йил 4 апрелдаги “2017-2021 йилларда устувор вазифаларни амалга ошириш доирасида Онкологик хизматларни ривожлантириш ва Онкологик ёрдамни кўрсатиш тўғриси”да ПҚ – 2863 сонли қарори бўйича муҳим вазифалар белгилаб берилган. Мазкур вазифаларини амалга оширишда, жумладан, бакуловирус экспрессия тизимини қўллаш орқали биологик фаол MIS оксиллини олиш усуллари аниқлаш муҳим аҳамият касб этади.

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7-февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида” ги Фармони.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралда ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистонни ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси» ва 2016 йил 16 сентябрдаги ПҚ-2595-сон «2016-2020 йилларда республика фармацевтика саноатини янада ривожлантириш чора-тадбирлари дастури тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2019 йил 1-августда 641-сон «Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлиги ҳузуридаги Фармацевтика тармоғини ривожлантириш агентлигининг Фармацевтика тармоғини қўллаб-қувватлаш ва ривожлантириш жамғармаси тўғрисида»ги низоми 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 устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялари ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Адабиётлардан маълумки дунёдаги бир қатор илмий лабораторияларда MIS генни бактерия (*E.coli*) ва ачитқи тизимларида экспрессиялаш муваффақиятсиз эканлиги тасдиқланиб, унинг асосий сабаби сифатида бактерия тизимида MIS оқсиллини тўлиқ экспрессиялашга мўлжалланган пост-трансляцион модификация мавжуд эмаслиги ва ачитқиларда MIS генининг 17 та ўқилмайдиган кодонлари бор эканлиги келтирилган.

Мюллер ингибирловчи субстанцияси (MIS) маълум турдаги хужайраларнинг ўсишини, фарқланишини ва апоптозини тартибга солувчи молекулалар синфига киради. MIS эмбрионларда Мюллер каналининг регрессияси, Фаллопиев найлари, бачадон ва қин шаклланишида иштирок этади.

Дунёда рекомбинант MIS оқсиллини олиш бўйича бир қатор тадқиқотлар ўтказилган. Хусусан, Patricia Donahoe, David MacLaughlin (2000) ва Jose Teixeira, Shyamala Maheswaran (2001) томонидан Хитой ҳоммияки тухумдони (СНО) хужайраларида рекомбинант инсон MIS (rhMIS) оқсиллини кам унум билан ажратиб олишган. Ушбу оқсилнинг СНО хужайраларида экспрессияланиши мураккаб жараён ҳамда нисбатан қиммат озуқа муҳити ва кўп босқичли тозалашни тақоза этади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўсимлик моддалари кимёси институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ГНТП А-6-287 «Рекомбинант оқсилларни юқори самарали экспрессияси учун модификацияланган бакуловиролар экспрессия тизимини ишлаб чиқиш». ва КА-6-004 «Турли зотга мансуб *Bombux mori* личинкаларида рекомбинант бакуловиролар олиш усулини ишлаб чиқиш» (2015-2017) мавзуларидаги амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади: *Bombyx mori* бакуловирус / хашарот хужайралари экспрессия тизимида рекомбинант MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) оксилени экспрессиялашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) генини *pVasPAK8* бакулавирус трансфер векторига клонлаштириш ва олинган рекомбинант *pVasPAK8-polh-MIS* плазмидани *Escherichia coli* NEB5 α хужайрасига трансформациясини амалга ошириш;

Рекомбинант *pVasPAK8-polh-MIS* плазмидасини ПЗР усулида селекция қилиш учун праймерлар синтез қилиш. Олинган MIS гени ДНК фрагментининг нуклеотид кетма кетлигини аниқлаш;

Ёввойи турдаги *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вируси ва рекомбинант *pVasPAK8-polh-MIS* плазида ДНК сини *Bombyx mori* хужайраларига (BMN1) ко-трансфекциялаш;

MIS генини экспрессияловчи рекомбинант *rBmNPV*- MIS бакуловирус клонларини тозалаш ва идентификация қилиш;

Bombyx mori (BMN1) хужайра культураларида MIS оксилени экспрессиялаш;

ПААГ электрофорез ва иммуноблотинг усуллари ёрдамида рекомбинант MIS оксилени тавсифлаш;

Тадқиқотнинг объекти сифатида ёввойи турдаги *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вируси *wtBmNPV* ДНКси, *Bombyx mori* (BMN1) хужайра культуралари ва *pVasPAK8* трансфер вектори ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети рекомбинант *pVasPAK8-polh-MIS* плазида ДНКси, Мюллер ингибирловчи субстанциясини кодловчи MIS генидан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотни бажариш жараёниларида биоорганик кимё ва биотехнология (праймерлар синтез қилиш, генларни клонлаштириш, ДНК нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш, ДНК молекулаларини ажратиш ва тозалаш, ПСР, *Bombyx mori* хужайраларини кўпайтириш, ПААГ, Иммуноблот анализи ва бошқ.) услубларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор *Bombyx mori* бакуловирус / хашарот хужайраларида MIS - Мюллер ингибирловчи субстанциясини кодловчи янги рекомбинант *pVasPAK8-polh-MIS* плазмидаси клонлаштирилган.

илк бор ёввойи турдаги *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вируси ва рекомбинант *pVasPAK8-polh-MIS* плазида ДНКсини *Bombyx mori* хужайраларига (BMN1) ко-трансфекцияланган;

MIS оксилени экспрессияловчи рекомбинант *rBmNPV*-MIS бакуловирус клонлари идентификация қилиниб тоза ҳолда ажратиб олинган;

илк бор *Bombyx mori* (BMN1) хужайра культураларида MIS оксилени олинган;

ПААГ электрофорез ва иммуноблотинг усуллари ёрдамида олинган рекомбинант MIS оксиленинг молекуляр оғирлиги ва юқори антигенлик

хусусиятларини намоён этиши асосланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Мюллер ингибирловчи субстанциясини (MIS) кодловчи ўлчами 7596 н.ж. га тенг бўлган янги рекомбинант *pBacPAK8-polh-MIS* плазмидаси клонлаштирилган.

Рекомбинант *pBacPAK8-polh-MIS* плазида ва ёввойи турдаги *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вируси ДНКни *Bombyx mori* хужайраларига ко-трансфекциялашнинг оптимал шароитлари аниқланган.

rBmNPV-MIS бакуловирус клонларини идентификациялаш ва тоза ҳолда ажратиш олиш усуллари ишлаб чиқилган.

Bombyx mori хужайра культураларида MIS оқсилнинг синтези амалга оширилиб, унинг молекуляр оғирлиги ва антигенлик хусусиятлари аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончилиги тадқиқотларни замонавий биоорганик кимё ва биотехнология усуллари қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Ҳар бир тадқиқот натижалар замонавий аналитик усуллар ёрдамида таҳлил қилинган. Бунинг тасдиқи 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 қилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти шундан иборатки, янги рекомбинант плазида клонлаштириш ва унинг асосида *Bombyx mori* бакуловирус хужайра культураларида рекомбинант MIS оқсилни экспрессия қилишга имкон берувчи янги рекомбинант бакуловирус яратилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, янги рекомбинант *pBacPAK8-polh-MIS* плазмидаси клонлаштирилди ва унинг асосида *Bombyx mori* бакуловирус/ҳашарот хужайраларида мақсадли оқсилни экспрессияловчи рекомбинант rBmNPV-MIS бакуловирус олинган. Янги рекомбинант MIS оқсили саратон касаллигига қарши янги дори воситалари ёки одам репродуктив ҳолатини ташхислаш мақсадида диагностика воситаларини ишлаб чиқариш учун асос бўлиб хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *Bombyx mori* бакуловирус / ҳашарот хужайраси экспрессияси тизимида рекомбинант MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) оқсилни экспрессиялашни ўрганиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

Bombyx mori рекомбинант *pBmNPV-polh - MIS* бакуловируси Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг “Фитопатоген ва бошқа микроорганизмлар” ноёб объекти коллекцияси генофондига топширилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси 2020 йил 18 мартдаги 4/1255-789-сон маълумотномаси). Натижада фитопатоген микроорганизмлар штамлари коллекция генофондини бойитиш, вирус турлари хилма-хилликлари электрон базаси ахборот таҳлил тизимини шакллантириш имконини берган;

ажратиб олинган *Bombyx mori* рекомбинант *pBmNPV-polh - MIS* бакуловируси Жаҳон микроорганизмлар маълумотлар марказининг Патоген Микроорганизмлар Миллий коллекциясининг (World Data Center for Microorganism (WDCM) Collection of plant pathogenic and other microorganisms) маълумотлар базасига GEPB WDCM 1228-рақами (http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228/) орқали рўйхатдан ўтказилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси 2020 йил 18 мартдаги 4/1255-789-сон маълумотномаси). Натижада дунёнинг турли минтақаларида бакуловирус/ҳашарот хужайрасини тақиқ қилишда глобал доирада фойдаланиш имконини берган;

Bombyx mori ядро полиэдрози вирусига асосланган рекомбинант *pBmNPV-MIS* бакуловирустан Ф-А-2018-012 рақамли «Тут ипак куртининг ядро полиэдрози касаллигига чидамли тизимларни олиш учун дастлабки селекцион материални яратиш» мавзусидаги амалий лойиҳасида турли хил тут ипак курти зотларини бакуловирусларга чидамли зотни аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистан саноат уюшмасининг 2020 йил 10 мартдаги 2-3/624-сон маълумотномаси). Натижада ипакчилик саноатини ядро полиэдроз вирусига нисбатан чидамли бўлган тут ипак курти зоти билан таъминлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 2 та халқаро ва 9 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 15 та илмий иш чоп этилган, шундан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларида 4 та мақола, жумладан, 3 таси республика ва 1 таси хорижий илмий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 97 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 оксилларни бакуловирус экспрессия тизимида ифодалаш**» деб номланган биринчи бобида бакуловируслар ҳақида умумий маълумотлар, *Bombyx mori* (*BmNPV*) ядро полиэдроз вирусини тузилиши, Бакуловирус экспрессия тизимини бошқа экспрессия тизимлари билан солиштириш, Бакуловирус экспрессия тизимида

ишлатилинадиган штаммлар ва трансфер векторлар ҳақида хорижий илмий адабиётлар шарҳи батафсил баён этилган.

Диссертациянинг “**Рекомбинант бакуловирусларни конструкциялаш, трансфекциялаш ва идентификациялаш усуллари.**» деб номланган иккинчи бобида генини трансфер векторларга клонлаштириш, рекомбинант плазмидаларни *Bombyx mori* (BmNPV) хужайра линияларига котрансфекциялаш, ПЗР усули ва идентификациялаш ҳамда бошқа экспрессиялаш усуллари келтирилган.

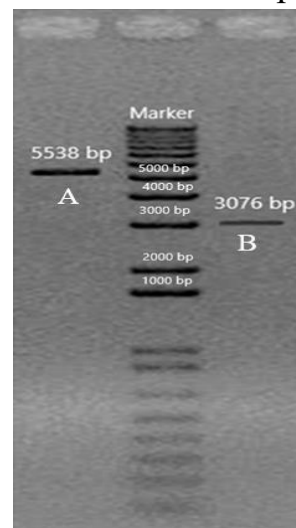
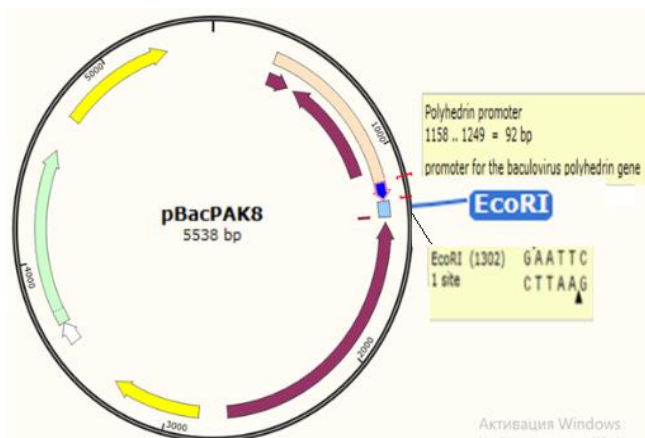
Диссертациянинг учинчи боби «**Бакуловирус хашарот хужайраси экспрессия тизимида рекомбинант MIS оқсилни экспрессиялаш**» га бағишланган. Мазкур бобда MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) генини ўз ичига олган pVasPAK8 трансфер вектори асосида рекомбинант плазмидларни конструкциялаш. Шунингдек MIS ген ДНК фрагментининг нуклеотид кетма кетлигини аниқлаш, MIS генини сақловчи рекомбинант плазмидани *Bombyx mori* (BMN1) хужайрасига киритиш, ушбу оқсилни энг кўп ишлаб чиқарувчи рекомбинант pBmNPV- MIS бакуловирус клонларини тозалаш ва идентификация қилиш шу билан бирга олинган MIS оқсилнинг хусусиятларини ПААГ электрофорез ва иммуноблот усуллари орқали ўрганиш натижалари келтирилган.

MIS - (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) генини pVasPAK8 бакулавирус трансфер векторига клонлаштириш.

MIS оқсилни *Bombyx mori* (BMN1) хужайраларида экспрессиясини амалга ошириш учун, *Bombyx mori* ядро полиедроз вирусига асосланган pVasPAK8 трансфер вектори танлаб олинди. pVasPAK8 плазмидаси 5538 ж.н. ўлчамли ҳамда ўзида *Bombyx mori* гономи қисмларини сақлаган ва мақсадли оқсилни юқори унум билан олишга имкон берадиган полиэдрин (polh) генининг промотри ҳисобланади.

MIS гени ЎзФА ЎМКИ Молекуляр генетика лабораториясидаги pVs-Ac-polh-MIS плазмидадан олинди.

pVasPAK8 трансфер векторига MIS генини киритиш учун унинг физик картасига муофиқ EcoRI ферменти билан рестриктаза таҳлили олиб борилди.



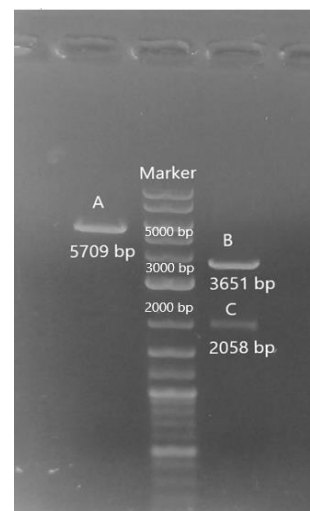
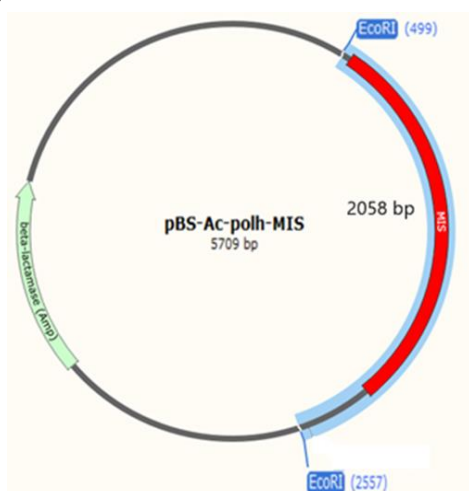
1-

расм. рВасРАК8 трансфер вектори физик картаси ва унинг рестрикция таҳлили

Бунда, **А**- рВасРАК8 трансфер векторининг *EcoRI* рестриктаза ферменти билан ишлов берилгандан сўнг чизиқсимон шакли; **В**- рВасРАК8 трансфер векторининг ҳалқасимон шакли.

Рестрикция натижалари 0.8% ли гелъ-электрофорез усули орқали таҳлил қилганда рВасРАК8 трансфер векторининг 5538 ж.н. ўлчамли чизиқсимон шакли ҳосил бўлди (1-расм).

MIS генини тайёрлаш учун рVs-Ас-polh-MIS плазмид ДНК сига *EcoRI* ферменти билан ишлов берилди ва тегишли ДНК фрагменти ажратиб олинди (2-расм).

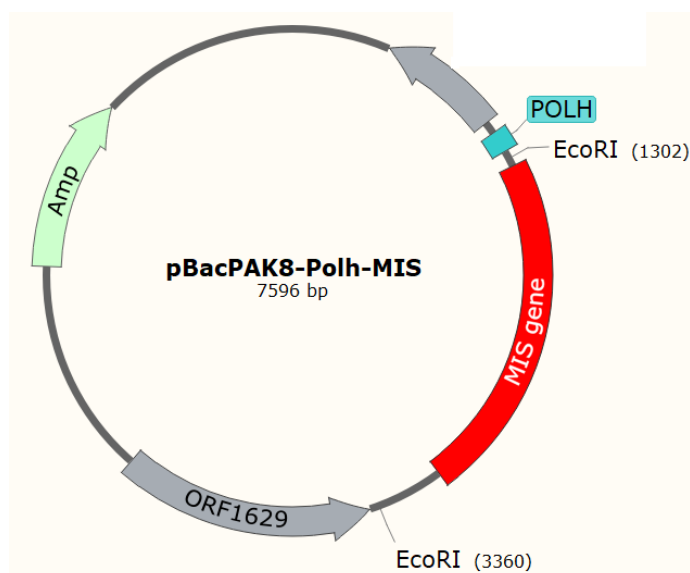


2 – расм рVs-Ас-polh-MIS плазмидасига *EcoRI* ферменти билан ишлов берилгандан кейинги таҳлили.

Бунда; **А**- рVs-Ас-polh-MIS плазмидасининг чизиқсимон шакли. **В** ва **С** рVs-Ас-polh-MIS плазмидасига *EcoRI* рестриктаза ферменти билан ишлов берилгандан кейинги рVs-Ас-polh ва MIS ДНК фрагментлари.

2-расмдан кўриниб турибдики рVs-Ас-polh-MIS плазмидасига *EcoRI* рестриктаза ферменти билан ишлов берилгандан сўнг иккита ДНК фрагментлари (**В**) 3651 ж.н рVs-Ас-polh ва (**С**) 2058 ж.н. MIS ҳосил бўлди. Натижада MIS гени 0,8% агароза гелидан гомоген ҳолатда Элюция қилиб ажратиб олинди.

Векторнинг кесилган учлари ўз-ўзига ёпишиб қолмаслиги учун унга ишқорий фосфатаза ферменти билан ишлов берилди. Ҳосил бўлган ДНК молекулалари Т4 ДНК лигаза ферменти ёрдамида 1:10 (вектор ва ген) нисбатда лигирланди.

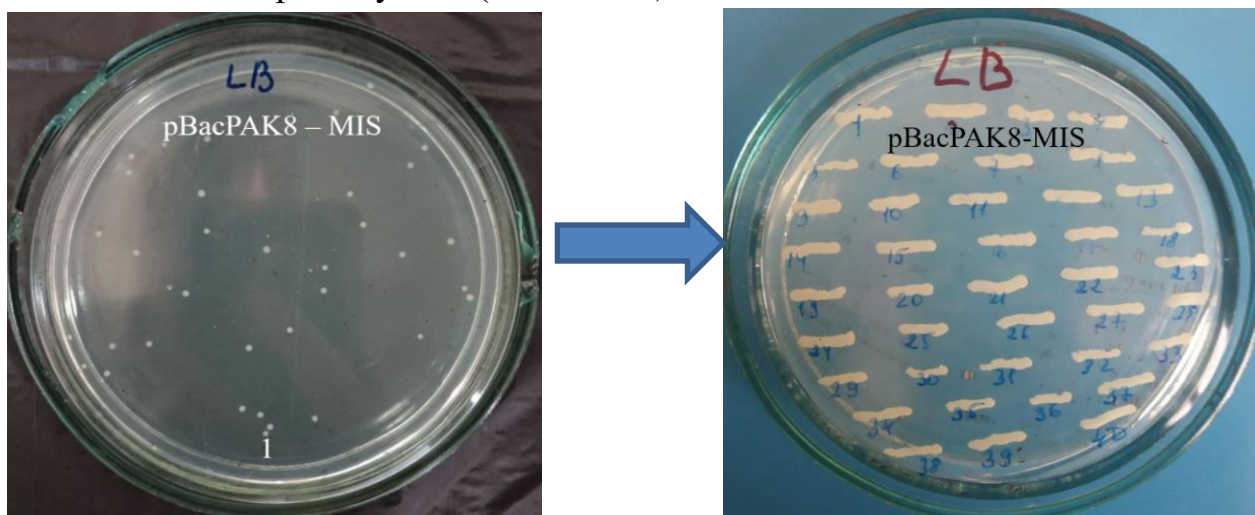


3–расм. MIS ген тутувчи рекомбинант pBacPAK8-polh-MIS плазмидасининг генетик картаси.

Лигирланиш жараёнидан сўнг ўзида MIS ген тутувчи pBacPAK8-polh-MIS рекомбинант плазмидаси олинди. Кейинги жараёнда олинган рекомбинант плазмида *Escherichia coli* хужайрасига трансформация қилинди.

Рекомбинант pBacPAK8-polh-MIS плазмидасини Escherichia coli NEB-5α хужайрасига трансформацияси ва олинган клонларини селекция қилиш

Лигирланган аралашма *Escherichia coli* NEB-5α хужайрасига электропорация усули ёрдамида трансформация қилинди. Рекомбинант pBacPAK8-polh-MIS плазмидаси ампициллинга чидамли ген тутуди, шунинг учун ампициллинли селектив муҳитда фақат рекомбинант плазмидалар сақловчи клонларгина ўсади (100мкг/мл).

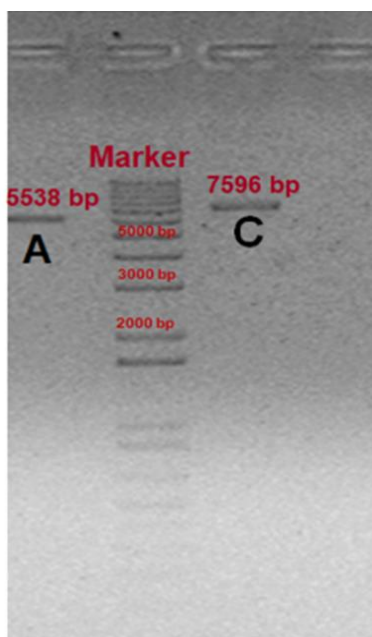


4 - расм Рекомбинант *E.coli* клонларининг ампициллинли LB агар муҳитида селекцияси

Кейинги тадқиқотлар учун ампициллинли муҳитга ўстирилган трансформантлардан фойдаланилди.

Рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS клонларининг электрофорез таҳлили

Кейинги тажрибаларимизда биз, *E.coli* хужайрасидан ажратиб олинган рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмидасини рестрикция таҳлилини олиб бордик. Бунда дастлабки рВасРАК8 (5538) плазмидасига ва рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмидаларига EcoRI (G↓AATTC ва CTTAA↓G) рестриктаза ферменти билан ишлов берилди. Натижада 5538 ж.н. ва 7596 ж.н. (5538 п.н.+2058 п.н.) ДНК фрагментлари олинди бу эса рВасРАК8 плазмидасининг физик картасига асоаланиб (см. рис. 1) олинган ДНК фрагментлари кутилган ўлчамга мос келишини кўрсатди (5-расм).



5-расм. рВасРАК8 ва рВасРАК8-polh-MIS плазмидаларининг чизиксимон ҳолдаги 0.8 % гелъ электрофорез таҳлил натижалари

Бунда А-фрагмент рВасРАК8 вектори, С-фрагмент рВасРАК8-polh-MIS рекомбинант плазмидаси.

Юқоридаги электрофорез таҳлил натижасидан шуни хулоса қилиш мумкинки, рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмидаси ўз таркибида MIS генини сақлайди.

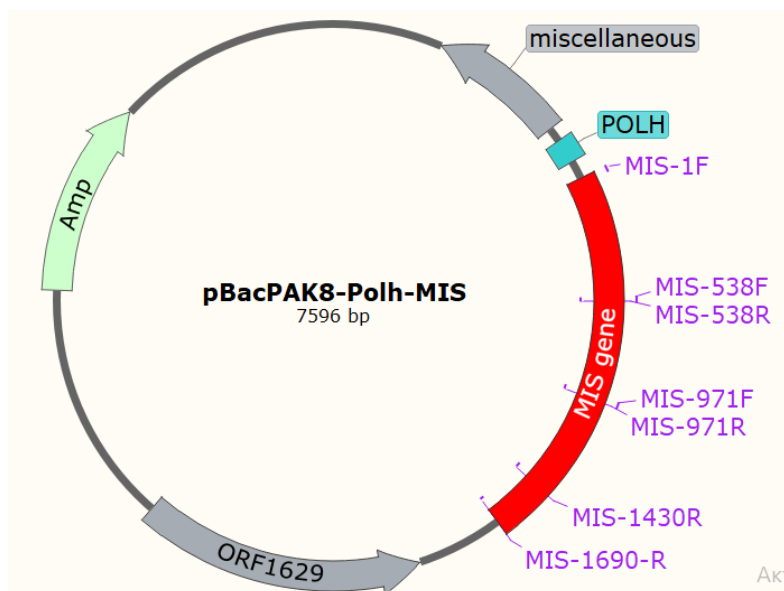
рВасРАК8-polh-MIS рекомбинант плазмидасининг ПЗР таҳлили

Кейинги тадқиқотларимизда олинган рекомбинант клонларнинг тегишли ПЗР таҳлили олиб борилди. Бунинг учун “MIS” генига специфик праймерлар NCBI маълумотлар базасидан фойдаланган ҳолда MIS генининг 4 хил ДНК қисмига 4 жуфт праймерлар синтез қилинди (1-жадвал). Праймерлар синтези «Синтезатор ДНК/РНК ASM-2000» ускунасида амалга оширилди.

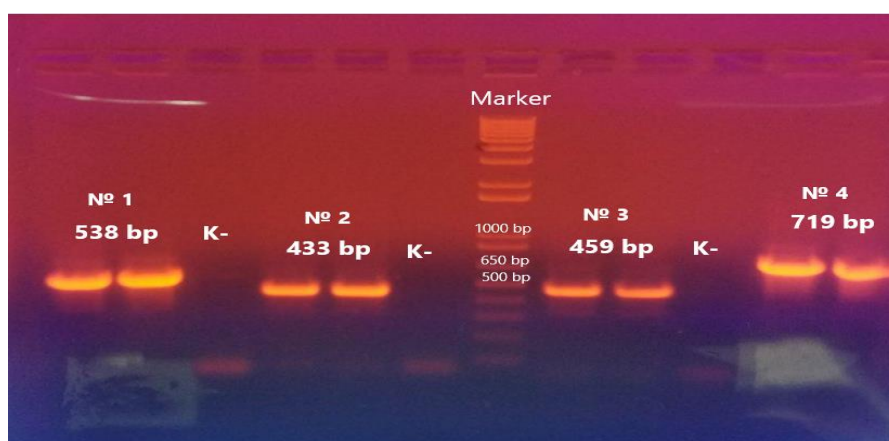
Синтез қилинган праймерлар 25 % ПААГ гели ёрдамида тозаланди. Жадвалда келтирилган праймерлар асосида стандарт ПЗР таҳлили амалга оширилди. Амплификация маҳсулотлари 1% ли агароза гелидаги электрофорез усули ёрдамида таҳлил қилинди (7-расм).

Олигонуклеотидларнинг (праймер) тузулиши

Праймер рақами	Праймер кетма-кетлиги 5'->3'	Tm °C	н.ж.	Амплификат ўлчами	
1	F_MIS-1F	ATGCGGGACCTGCCTCTCACCA	68.9	22	538
	R_MIS538R	AGGCTCTGGGCACCCGGCAG	69.6	20	
2	F_MIS-538F	CTGCCGGGTGCCCAGAGCCT	69.6	20	433
	R_MIS971R	TCCGACAGGTTGACTAGGCCCT	63	22	
3	F_MIS-971F	AGGGCCTAGTCAACCTGTCGGA	63	22	459
	R_MIS1430R	TCTCGGGGATGAGTACGGAGCGCT	69.6	24	
4	F_MIS-971F	AGGGCCTAGTCAACCTGTCGGA	63	22	719
	R_MIS1690R	TCACCGGCAGCCACACTCGG	68.5	20	



6-расм. MIS генига синтез қилинган праймерларнинг генетик картадаги кўриниши.



7-расм. Клонланган pBacPAK8-polh-MIS рекомбинант плазмидасининг стандарт ПЗР таҳлили натижалари

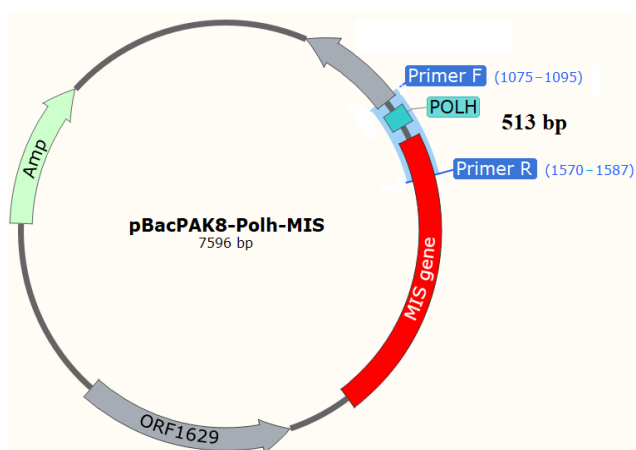
рВасРАК8-polh-MIS рекомбинант плазмидасидаги MIS генининг ўлчами 1683 ж.н. эканлигини инобатга олсак, юқорида амалга оширилган ПЗР таҳлиллари натижасида мазкур геннинг барча ДНК қисимларида керакли ўлчамли ДНК молекулаларининг ҳосил бўлганлигини кўришимиз мумкин. Шундай қилиб тўлиқ ўлчамли MIS гени рВасРАК8-polh-MIS плазмидасига клонланганлиги аниқланди.

MIS геннинг трансфер векторга тўғри йўналишда клонланганини аниқлаш

Кейинги тажрибаларимизда биз, MIS гени рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмидасига тўғри йўналишда клонланганини аниқлашни мақсад қилдик. Бунинг учун плазмидасининг маълум ДНК қисимларига махсус праймерлар синтез қилинди.

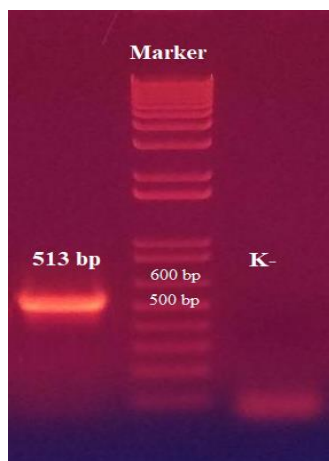
Forward primer: 5'- TTGTTAAAAATAACAGCCATT -3' (полиэдрин гени промотр ДНК кетма кетлигидан)

Reverse primer: 5'- TCTAAGCGCCTATGAGCA -3' (MIS генининг маълум қисмидан)



8-расм. MIS генига синтез қилинган праймерларнинг генетик картадаги кўриниши.

Юқоридаги синтез қилинган праймерлар ёрдамида керакли ДНК молекуласи стандарт ПЗР усули ёрдамида амплификация қилинди (513 ж.н.) (9-расм).



9-расм. MIS генининг тўғри йўналишини аниқлаш учун олиб борилган ПЗР таҳлили натижаси.

9-расмдан кўриниб турибдики синтез қилинган праймерлар ёрдамида амплификация қилинган ДНК молекуласи назарий ўлчамга мос келмоқда. Агар MIS гени рВасРАК8 плазмидасига нотўғри йўналишда жойлашганда ҳосил бўлган амплификат 513 bp эмас 1441 bp ни ташкил қилиши керак эди.

Демак, юқорида олиб борилган ишлар натижаларидан шуни хулоса қилиш мумкинки, мақсадли MIS гени рекомбинант *pВасРАК8-polh-MIS* плазмидасига тўғри йўналишда клонланган.

pВасРАК8-polh-MIS рекомбинант плазмидаси таркибидаги MIS генининг нуклеин кислоталар кетма-кетлигини аниқлаш.

Кейинги таҳлилларда рВасРАК8-polh-MIS рекомбинант плазмидаси таркибидаги MIS генининг нуклеин кислоталар кетма-кетлигини аниқланди.

5' **ATGCGGGA** CCTG CCTCTCA CCA GCCTGGCCC
TAGTGTGTCTG CCCTGGGGGCTCTGCTGGGGACTGAGGCCCTCAGAGCAGAGGAG
CCAGCTGTGGGCACCAAGTGGCCCTCATCTTCCGAGAAGACTTGGACTGGCCTCCAGGC
ATCCCACAAGAG GCCTCTGTGCCTGGTGGCACTGGGC GGGGACAGCAATGGCAGCAG
CTCCCCCTGCGGGTGGTGGGGGCTCTAAGCGCCTATGAGCAGGCCTTCTGGGGGGC
CGTGCAGAGGG CCCCCTGGGGCCCCCGAGACCTGGCCACCTTCGGGGTCTGCAACA
CCGGTGACAGGCAAGCTGCCTTGCCCTCTCTACGGCGGCTGGGGGCCTGGCTGCGG
GACCCCTGGGGGG CAGCGCCTGGTGGTCTTACAACCTGGAGGAAGTGACCTGGGAGCC
AACACCCCTCGCTGAGGT TCCAGGAGCCCCCGCCTGGAGGAGCTGGCCCCCCAGAGC
TGGCGCTGCTGGTG CTGTACCCTGGGCCTGGCCCTGAGGTCACCTGTGACGAGGGCTG
GGCTGCCGGGTGCCAGAGCCTCTGCCCCTCCCAGACACCCGCTACCTGGTGTAG
CGGTGGACCGCCCTGCGGGGGCCTGGCGCGGCTCCGGGCTGGCCTTGACCCCTGCAG
CCCCGCGGAGAGGACTCCCCTGAGTACCGCCCGGCTGCAGGCACTGCTGTTCCGG
CGACGACCAACCGCTGCTTACACGGATGACCCCCGGCCCTGCTCCTGCTGCCGCGGTC
CGAGCCCCGCGCCGCTGCCTGCGCACGGCCAGCTGGACACCGTGCCCTTCCCGCCGCC
CAGGCCATCCGCGGAACCTCGAGGAGTCCGCAACCCAGCGCAGACCCCTTCCCTGGAGA
CGCTCACCGCGCCTGGTGCGGGCGCTGCGGGTCCCCCGGCCCGGGCCTCCGCGCCCGC
GCCTGGCCCTGGATCCGGACCGCTGGCCGGCTTCCCAGGGCCTAGTCAACCTGT
CGGACCCCCGCGGCGCTGGAGCGCCTACTCGACGGCGAGGAGCCGCTGCTGCTGCTG
CTGAGGCCCACTGCGGCCAACCACGGGGATCCTGCGCCCTGCACGACCCCCACGTC
GGCGCCGTGGGCCACGGCCCTGGCGCGCCCGGTGGCTGCTGAACTGCAAGCGGCGG
CTGCCGAGCTGCGAAGCCTCCCGGGTCTGCCCTCCGGCCACAGCCCCGCTGCTGGCGC
GCCTGCTCGCGCTCTGCCAGGAGCCCCGGCGGCCTCGGCGATCCCCCTGCGAGCGC
TGCTGCTCCTGAAGGCGCTGCAGGGCCTGCGCGTGGAGTGGCGCGGGCGGGATCCG
CGCGGGCCGGGTGGGACAGCGCAGCGCGGGGGCCACCGCCGCCGACGGGCCGT
GCGCGCTGCGGAGCTCAGCGTAGACCTCCGCGCCGAGCGCTCCGTACTCATCCCCG
AGACCTACCAGGCCAACAATTCAGGGCGTGTGCGGCTGGCCTCACTCCGACCCGC
AACCCCGCTACGGCAACCACGTGGTGTGCTGCTGCTGAAGATGCAGGCCCGTGGGGC
CGCCCTGGCGCGCCCAACCTGCTGCGTGCACCCGCTACCGGGCAAGCTGCTCAT
CAGCCTGTGGAGGAACGCATCAGCGCGACCCACGTGCCCAACATGGTGGCCACCG
AGTGTGGCTGCCGGTGA - 3' A-209; T-240; C-641; G-593;

Секвенс қилинган MIS ген нуклеотид кетма-кетлиги NCBI маълумотлар базаси билан солиштирилди. Натижада мазкур базада биз клонлаштирган MIS ген нуклеотид кетма-кетлиги тўлақонли мос эканлиги аниқланди.

Ёввойи турдаги *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вируси ва рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмиди ДНК сини *Bombyx mori* хужайраларига (BMN1) ко-трансфекциялаш.

рВасРАК8-polh-MIS плазмиди ДНКси ва BmNPV вируси геноми ДНКси орасидаги гомологик рекомбинация *Bombyx mori* BMN1 хужайра линиясида *in vitro* усулида амалга оширилди. Бунда керакли *Bombyx mori* BMN1 хужайра культураси, хашарот хужайралари учун мўлжалланган 10% ли инактивацияланган бузоқ эмбриони зардоби (FBS) ва Grase'с озуқа муҳитида субкультивирланди. *Bombyx mori* BMN1 хужайра линиясида ко-трансфекцияси жараёни Metafectene PRO (Биотех, Германия) липосомал реагенти ёрдамида амалга оширилди. Кейин эса тирик хужайралардан экспрессия самараси миқдорий ПЗР (РТ-ПЗР) усулида баҳоланди.

Трансфекциялаш учун 0.5 дан 2.0 мкг гача рВасРАК8-polh-MIS плазмид ДНКси ҳамда ёввойи тур вируси ДНКси ва бир хил миқдордаги хужайралардан (6×10^4 хужайра/мл) фойдаланилди. 2- жадвалда Metafectene PRO, плазмид ва вирус ДНК ларининг оптимал нисбатлари келтирилган.

2-жадвал

***Bombyx mori* BMN1 хужайраларида трансфекциялашнинг мақбул шароитларини танлаш**

Трансфекциялаш учун ДНКнинг оптимал миқдори			
Плазмид ДНК миқдори	0.5 мкг	1.0 мкг	2.0 мкг
Вирус ДНК миқдори	0.5 мкг	1.0 мкг	2.0 мкг
Трансфекцияловчи реагентнинг оптимал миқдори			
Metafectene PRO	5 мкл	10 мкл	15 мкл
Оптимал нисбатлари			
ДНК		Трансфекцияловчи реагент Metafectene PRO	
3 мкг		10 мкл	

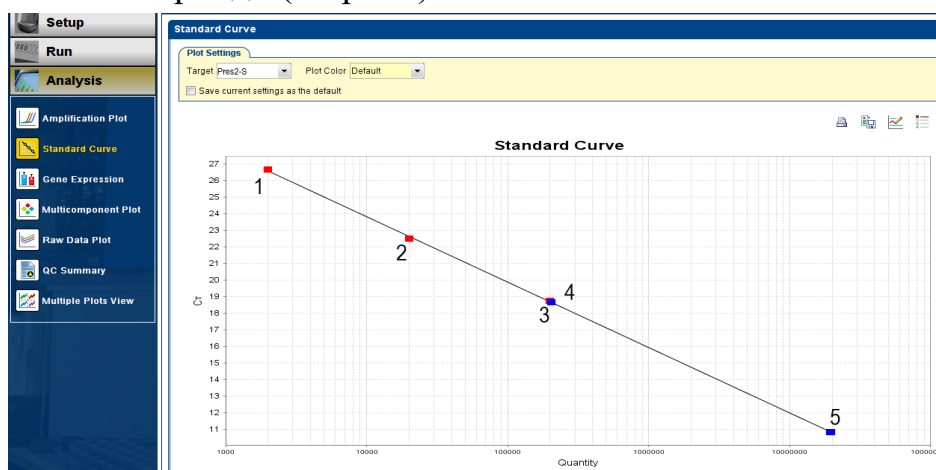
Олинган натижаларга кўра, трансфекцияланган хужайралар миқдори трансфекцияловчи реагент миқдорига боғлиқлиги ҳамда трансфекциянинг мақбул шароитлари аниқланди. Бунда вирус ДНКси учун *Bombyx mori* BMN1 хашарот хужайра мембранасининг ўтказувчанлиги махсус равишда оширилди.

MIS гени экспрессияловчи рекомбинант rBmNPV- MIS бакуловирус клонларини тозалаш ва идентификация қилиш.

Юқорида котрансфекция жараёни асосида олинган рекомбинант бакуловирус rBm-polh-MIS клонларини ёввойи типдаги бакуловируслардан тозалаш учун изоляция қилинган вирус колонияларини ажратиш усули - *Plaque assay* тозалаш усулидан фойдаланилди. Бу жараённи жуда кўп қайтариш натижасида мақсадли гени экспрессияловчи энг юқори

миқдордаги вирус сақловчи колониялар тозаланди.

Шундан сўнг вирус клонларининг генетик бир ҳиллигига эришиш учун ҳамда рекомбинант вирус миқдори аниқлаш ва бакуловируслар учун қўлланилган хужайра линиялари таъсирчанлигини аниқлашда ҳар бир танланган рекомбинант вирус клонлари TCID50 лимитловчи суюлтириш усули орқали 3 босқичли тозалашдан ўтказилди. Натижада керакли геннинг экспрессиясини таъминловчи вирус колонияларини тозалаб олишга эришилди. Ушбу тайёрланган вирус стоклари кейинчалик *Bombyx mori* тут ипак қурти хужайраларини инфицирлашда фойдаланилади. Тайёрланган вирус стокидан рекомбинант вирус миқдорини аниқлаш мақсадида РТ-ПЗР таҳлили амалга оширилди (10-расм).



10 - расм. MIS регионининг миқдори бўйича РТ-ПЗР таҳлили натижалари

Графикдаги **1-3** квадратчалар маълум ДНК концентрациясига эга бўлган стандарт эритмаларни англатиб, концентрацияси мос равишда $2E3$ - 2000 нусха/мл (**1**), $2E4$ - 20000 нусха/мл (**2**), $2E5$ - 200000 нусха/мл (**3**) га тенг. Ўрганилаётган намуналар графикда **4-5** рақамли квадратчалар билан кўрсатилган.

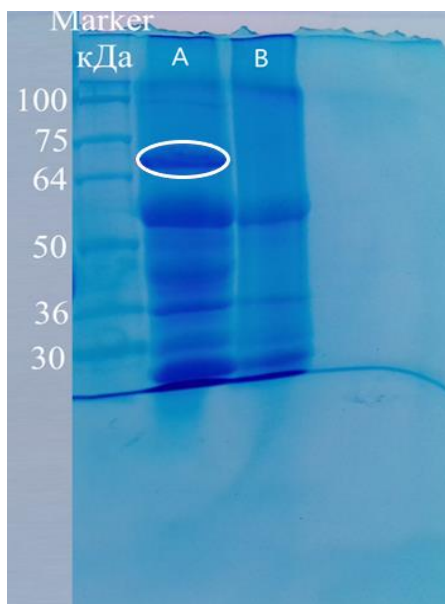
Демак изоляция қилинган колонияларни РТ-ПЗР да ўрганиш ва таҳлил қилишдан сўнг керакли миқдордаги вирус стоклари танлаб олинди. Бунда хашарот хужайра линияларини инфицирлаш учун керак бўладиган рекомбинант вирус стокининг концентрацияси $C = 2 \times 10^6$ нусха/мл эканлиги аниқланди.

***Bombyx mori* (BMN1) хужайра культураларида MIS-оқсилни экспрессиялаш**

Рекомбинант *rBm-polh-MIS* бакуловирус билан зарарланган *Bombyx mori* хужайра линиялари $+22^{\circ}\text{C}$ дан $+26^{\circ}\text{C}$ гача бўлган ҳароратда 10-15 % FBS (бузоқ эмбриони зардоби) тутган Grace's ли озуқа мухитида ўстирилди. Хужайралар 7 кун давомида инкубатцияда кўпайтирилди ҳамда центрифуга қилиниб тегишли оқсилнинг хусусиятлари ПААГ электрофорез ва иммуноблот таҳлилларида кўрилди.

Рекомбинант MIS-оқсилни тавсифи (ПААГ электрофорез, Иммуноблот)

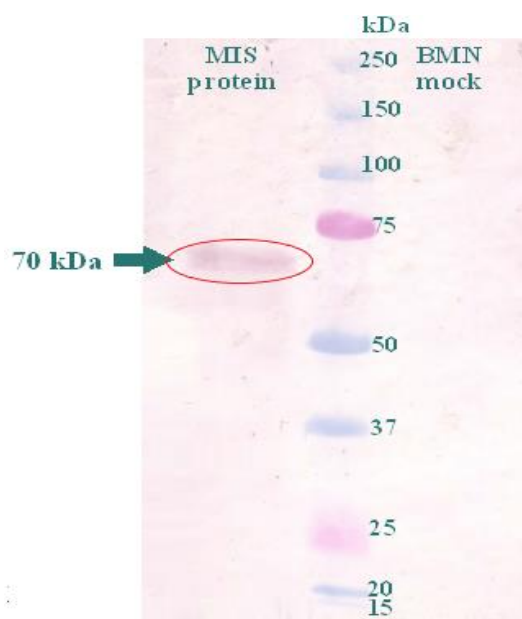
Рекомбинант MIS оқсилни денатурация шароитида 10% ПААГ гелъ-электрофорез таҳлили амалга оширилди. Таҳлил натижасига кўра рекомбинант MIS оқсилни (А) молекуляр оғирлиги 70 кДа ни ташкил қилиб, бу унинг адабиётларда кўрсатилган аминокислота кетма-кетлиги асосида ҳисобланган мономернинг молекуляр оғирлигига мос келди (11-расм).



11-расм. Рекомбинант MIS оқсилнинг 10% ПААГ электрофорез таҳлили

Бунда (А) MIS оқсилни ўз ичига олган *Bombyx mori* хужайраларининг гомогенати. (В) *Bombyx mori* хужайра линияларининг гомогенати.

Кейинги тадқиқотларда биз иммуноблот усули билан MIS оқсилни ўзида сақлаган хужайрали гомогенатни текширдик. Иммуноблот учун «Monoclonal Antibody to Anti-Mullerian Hormone (AMH) (Cloud-Clone Corp. Cat. MAA228Hu22)» тижорат тўпламидан фойдаландик (12-расм).



12 – расм. MIS оқсиленинг иммуноблот таҳлили

12-расмдан кўриниб турибдики *Bombyx mori* хужайра культураларида экспрессия қилинган рекомбинант MIS оқсили, инсон MIS оқсиленинг моноклональ антитаналарига нисбатан антигенлик хусусиятини намоён қилди.

Шундай қилиб, *Bombyx mori* хужайра культураларида экспрессия қилинган рекомбинант MIS оқсиленинг молекуляр оғирлиги 70 кДа (мономер) эканлиги ва антиген спецификлик намоён этганлиги аниқланди.

ХУЛОСА

“Бакуловирус / ҳашарот хужайраси” экспрессия тизимида MIS - (мюллер ингибирловчи субстанцияси) оқсилени экспрессиялаш” мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар асосида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Илк бор *Bombyx mori* бакуловирус / ҳашарот хужайралари экспрессия тизимида MIS - Мюллер ингибирловчи субстанциясини кодловчи янги рекомбинант *pBacPAK8-polh-MIS* плазмидаси клонлаштирилди.
2. Клонланган MIS - ген ДНК фрагментининг нуклеотид кетма кетлиги аниқланиши билан изоҳланади.
3. *Bombyx mori* хужайраларида ко-трансфекция йўли билан рекомбинант *pBacPAK8-MIS* ва *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вирус ДНКлари асосида янги рекомбинант *rBmNPV-MIS* бакуловируси ажратиб олинди.
4. Илк бор *Bombyx mori* (BMN1) хужайра культураларида рекомбинант MIS оқсили экспрессияси қайд этилди.
5. Олинган рекомбинант MIS оқсиленинг молекуляр оғирлиги 70 кДа эканлиги ва антигенлик хусусиятини намоён этди.

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

ИНСТИТУТ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

ХАСАНОВ ШУХРАТ ШАВКАТОВИЧ

**ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА MIS – ИНГИБИРУЮЩЕЙ СУБСТАНЦИИ
МЮЛЛЕРА В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ «БАКУЛОВИРУСЫ -
КЛЕТКИ НАСЕКОМЫХ»**

**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 B2019.4PhD/B418

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) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научные руководители:

Азимова Шахноз Садыковна
доктор биологических наук, профессор
Сасмаков Собирджан Анарматович
кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Исмаилов Зафар Файзуллаевич
доктор биологических наук

Муҳамедов Рустам Султанович
доктор биологических наук, профессор

Ведущая организация

Институт биоорганической химии

Защита диссертации состоится «28» декабря 2020 года в «10⁰⁰» часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.12.2019.B.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).

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. В настоящее время в мире особое внимание уделяется на получение биологически активных рекомбинантных белков (инсулин, эритропоэтин, интерфероны, вакцины и др.) в различных системах экспрессии (бактериальная, дрожжевая, бакуловирусы / клетки насекомых и клетки млекопитающих) биотехнологическими методами. Отличительной чертой системы экспрессии бакуловирусы / клетки насекомых является, что она позволяет получать рекомбинантные белки, не отличающиеся от природных аналогов по функциональным свойствам. Большинство работ, посвящённых экспрессии рекомбинантных белков с применением данной экспрессионной системы, описывают получение рекомбинантных бакуловирусов на основе вируса ядерного полиэдроса тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Необходимо упомянуть, что данные вирусы являются высокоспецифичными, заражают только один вид насекомых, безопасны для человека и сельскохозяйственных животных. Учитывая дороговизну процесса синтеза рекомбинантных белков *in vitro* в культуре клеток насекомых *Bombyx mori*, использование личинок тутового шелкопряда непосредственно в качестве «биореактора» не требует дорогостоящих питательных сред и специальных условий, что в конечном итоге приводит к снижению стоимости рекомбинантных белков.

В мировой практике белок MIS (Ингибирующая субстанция Мюллера, гликопротеин принадлежащий к семейству цитокинов) получают методами генной инженерии в различных системах экспрессии, такие как бакуловирусная система и культуры клеток млекопитающих. Для получения полноценного и активного белка MIS проводятся сравнительные исследования по уровню экспрессии белка; подбор оптимальных условий для получения MIS белка; выделение и очистка рекомбинантного белка; выявление механизмов его действия в организме и др.

В нашей Республике уделяется особое внимание разработке и внедрению комплексных мер по диагностике и лечению различных заболеваний, обеспечению фармацевтическими препаратами и улучшению материально-технической базы, а также достигнуты определенные результаты в приготовлении противораковых препаратов или средств диагностики. В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан¹ определены важные задачи в соответствии с Указом Президента Республики Узбекистан № 2863 от 4 апреля 2017 года «О развитии онкологической службы и оказании онкологической помощи в реализации приоритетов на 2017-2021 годы». При выполнении этих задач важно определить методы получения биологически активного MIS белка, в том числе с использованием системы экспрессии бакуловирусы/клетки насекомых.

¹ Указ Президента Республики Узбекистан «О стратегии действий по дальнейшему развитию республики Узбекистан» №УП-4947 07.02.2017

Данная диссертационная работа выполнена в соответствии с Постановлением Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года, УП-4947 «О Стратегии действий по пяти приоритетам развития Узбекистана на 2017–2021 годы», указе Президента от 16 сентября 2016 года ПП-2595 «О Программе мероприятий по дальнейшему развитию фармацевтической промышленности республики на 2016–2020 годы», 1 августа 2019 года Правительство утвердило Положение о Фонде поддержки и развития фармацевтической сети Агентства по развитию фармацевтической сети при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан. Данное диссертационное исследование способствует реализации целей, изложенных в других правовых актах, связанных с этой деятельностью.

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. На основе литературных данных известно что в некоторых научно-исследовательских лабораториях мира проведены множество попыток экспрессии данного гена в системах экспрессии как *E.coli*, так и в дрожжевой системе, и показана безуспешность получения данного белка в этих системах, так как в бактериальной системе отсутствуют пост-трансляционные модификации, необходимые для полноценного созревания MIS белка, а в дрожжевой системе 17 кодонов MIS гена не транслируются. В этой связи мы исследовали возможность получения биологически активного MIS белка с помощью бакуловирусной системы экспрессии.

Ингибирующая субстанция Мюллера (MIS) - входит в класс молекул регулирующих рост, дифференциацию и апоптоз различных видов клеток. В эмбрионах MIS вызывает регрессию Мюллерова канала, формирование Фаллопиевых труб, матки и зачатки влагалища.

В мире проведен ряд исследований по получению рекомбинантного белка MIS. В том числе в работе Patricia Donahoe, David MacLaughlin (2000) и Jose Teixeira, Shyamala Maheswaran (2001) др. получен рекомбинантный MIS человека (rhMIS) в яйцеклетках китайского хомячка (CHO) с низким выходом. При получении данного белка в этих клетках используются относительно дорогие питательные среды при сложной процедуре культивирования и очистки.

Связь диссертационного исследования с исследовательской работой научно-исследовательского учреждения. Диссертационное исследование проводилось в рамках научно-исследовательских проектов Института химии растительных веществ АН РУз ГНТП А-6-287 «Разработка модифицированной бакуловирусной системы для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных белков» и КА-6-004 «Разработка способа получения рекомбинантного бакуловируса в различных породах личинок *Bombyx mori*» (2015-2017).

Цель исследования: Экспрессия рекомбинантного белка MIS - Ингибирующей субстанции Мюллера в системе бакуловирусы/клетки насекомых *Bombyx mori*.

Задачи исследования:

Клонирование гена MIS - (Ингибирующая Субстанция Мюллера) в бакуловирусный трансферный вектор *pBacPAK8* и трансформация полученной рекомбинантной плазмиды *pBacPAK8-polh-MIS* в клетку *Escherichia coli* NEB-5 α .

Синтез праймеров для селекции методом ПЦР рекомбинантной плазмиды *pBacPAK8-polh-MIS*. Определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК MIS гена.

Котрансфекция вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* дикого типа и рекомбинантной плазмидной ДНК *pBacPAK8* в клетки *Bombyx mori* (BMN1).

Идентификация и очистка рекомбинантных клонов бакуловируса *rBmNPV-MIS*, экспрессирующих ген MIS.

Экспрессия целевого белка MIS в культуре клеток *Bombyx mori* (BMN1).

Характеристика полученного рекомбинантного белка MIS методами электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга.

Объект исследования: ДНК вируса ядерного полиэдроза *wtBmNPV Bombyx mori* дикого типа, культура клеток *Bombyx mori* (BMN1), трансферный вектор *pBacPAK8*.

Предметом исследования являются рекомбинантная плазмидная ДНК *pBacPAK8-polh-MIS*, ген MIS, кодирующий Ингибирующую субстанцию Мюллера.

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 клеток *Bombyx mori*, электрофорез в ПААГ, иммуноблот и др.).

Научная новизна исследования заключается в:

Впервые клонирована новая рекомбинантная плазида *pBacPAK8-polh-MIS*, кодирующая MIS - Ингибирующую субстанцию Мюллера в бакуловирусах / клетках насекомых *Bombyx mori*

Впервые котрансфекция вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* дикого типа и рекомбинантной плазмидной ДНК *pBacPAK8-polh-MIS* в клетки *Bombyx mori* (BMN1)

Проведены идентификация и очистка рекомбинантных клонов бакуловируса *rBmNPV-MIS*, экспрессирующих целевой ген

Впервые получена экспрессия рекомбинантного белка MIS в культурах клеток *Bombyx mori* (BMN1)

Методами электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга показано, что полученный рекомбинантный белок MIS имеет соответствующую молекулярную массу и проявляет высокую антигенную специфичность

Практические результаты исследования:

Клонирована новая рекомбинантная плазида *pBacPAK8-polh-MIS* размером 7596 п.н., кодирующая MIS - Ингибирующую субстанцию Мюллера в бакуловирусах / клетках насекомых *Bombyx mori*

Определены оптимальные условия проведения котрансфекции ДНК вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* дикого типа и рекомбинантной плазмидной ДНК *pBacPAK8-polh-MIS* в клетки *Bombyx mori* (BMN1)

Разработаны методы идентификации и очистки рекомбинантных клонов бакуловируса *rBmNPV-MIS*, экспрессирующих целевой ген.

В культурах клеток *Bombyx mori* (BMN1) синтезирован рекомбинантный белок MIS, определена его молекулярная масса и антигенные свойства.

Достоверность результатов исследования обосновывается использованием современных методов биотехнологии и биоорганической химии. 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.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в получении новой рекомбинантной плазмиды и на её основе рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего рекомбинантный белок MIS в бакуловирусах/клетках *Bombyx mori*.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что клонирована новая рекомбинантная плазида *pBacPAK8-polh-MIS* и на её основе получен рекомбинантный *rBmNPV-MIS* бакуловирус, экспрессирующий целевой белок. Полученный рекомбинантный белок MIS может быть использован для создания новых противораковых лекарственных препаратов или диагностикумов для оценки репродуктивного состояния человека.

Внедрение результатов исследований. На основании научных результатов, полученных в результате изучения экспрессии рекомбинантного белка MIS – ингибирующей субстанции Мюллера в системе бакуловирусы / клетки насекомых *Bombyx mori*:

выделенные рекомбинантные клоны бакуловируса *rBmNPV-polh - MIS* добавлены в генофонд Института генетики и экспериментальной биологии «Коллекция уникальных научных объектов фитопатогенных и других микроорганизмов» (Справка Академии наук Республики Узбекистан от 18 марта 2020 г. № 4/1255-789). В результате коллекция пополнила генофонд «фитопатогенных и других микроорганизмов» и дала возможность использования для формирования электронной базы данных о специализированном видовом разнообразии;

полученный рекомбинантный бакуловирус *rBmNPV-polh-MIS* зарегистрирован в международной базе 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). В результате данная информация была использована в разных регионах мира при исследовании "Бакуловирусы/клетки насекомых".

в проекте под номером Ф-А-2018-012 «Создание исходного селекционного материала для выведения устойчивых линий тутового шелкопряда к ядерному полиэдрозу» использовался рекомбинантный *rBmNPV-MIS* бакуловирус, основанный на вирусе ядерного полиэдроза *Bombyx mori*, для определения сортов тутового шелкопряда, устойчивых к бакуловирусу (Справка Ассоциации "Ўзбекипаксаноат" от 10 марта 2020 г. № 2-3/624). В результате получена возможность поставки сортов личинок тутового шелкопряда, устойчивых к вирусу ядерного полиэдроза, для шелководства.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований по теме диссертации изложены в виде докладов и прошли апробацию на 2 международной и 9 республиканских научно-технических конференциях.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 4 научных статей, в том числе 3 в республиканских и 1 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Объем диссертации составляет 97 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **Введении** обоснована актуальность и необходимость 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.

Первая глава диссертации называется «**Экспрессия рекомбинантных белков в бакуловирусной системе экспрессии**». Приводится структура вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* (BmNPV), сравнение бакуловирусной экспрессионной системы с другими системами, информация о штаммах и трансферных векторах, используемых в бакуловирусной системе экспрессии.

Во второй главе диссертации «**Методы конструирования, трансфекции и идентификации рекомбинантных бакуловирусов**» приведена экспериментальная часть, описывающая методики клонирования гена в трансферные вектора, котрансфекция рекомбинантных плазмид в клетки *Bombyx mori*, идентификация клонов методом ПЦР, а также материалы, используемые в работе.

Третья глава диссертации посвящена **Экспрессии белка MIS в**

системе «бакуловирусы - клетки насекомых». В этой главе представлены данные по конструированию рекомбинантной плазмиды на основе трансферного вектора *pVasPAK8*, содержащего ген *MIS*. Определение нуклеотидной последовательности гена *MIS*, котрансфекция вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* дикого типа и рекомбинантной плазмидной ДНК *pVasPAK8* в клетки *Bombyx mori* (BMN1), идентификация и очистка рекомбинантных клонов *rBmNPV-MIS*, экспрессирующих целевой ген. Экспрессия целевого белка *MIS* в культуре клеток *Bombyx mori* (BMN1) и характеристика полученного рекомбинантного белка *MIS*.

Клонирование гена MIS - Ингибирующей Субстанции Мюллера в бакуловирусный трансферный вектор pVasPAK8.

Для экспрессии белка *MIS* в бакуловирусах/клетках *Bombyx mori* (BMN1) использовали трансферный вектор *pVasPAK8*, на основе вируса ядерного полиэдроза *B. mori*. Плазмида *pVasPAK8* представляет собой вектор, содержащий фрагменты генома вируса ядерного полиэдроза *B. mori*, размером 5.538 т.п.н., промоторную последовательность гена полиэдрина (*polh*), который позволяет получить целевой белок с высоким выходом.

Источником гена *MIS* служила плазмида *pVs-Ac-polh-MIS*, депонированная в лаборатории Молекулярной генетики ИХРВ АН РУз.

В соответствии с физической картой плазмиды *pVasPAK8* для инсерции гена *MIS* была проведена обработка рестриктазой *EcoRI*:

EcoRI: 5'-G↓AATTC-3'
3'CTTAA↓G-5'

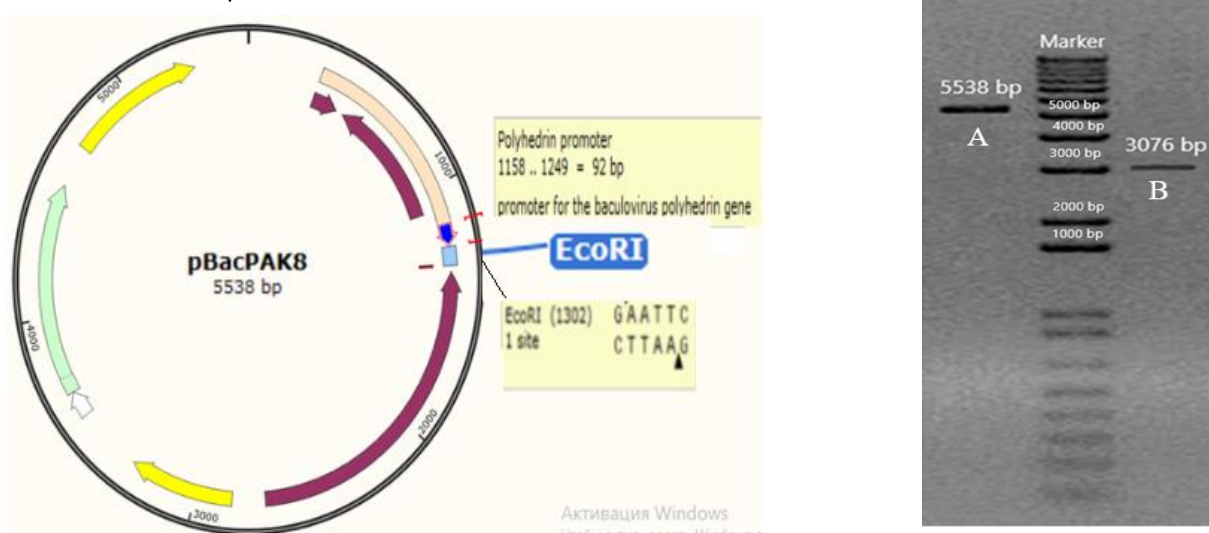


Рисунок 1. Физическая карта и рестрикционный анализ трансферного вектора *pVasPAK8*.

А. Линейная форма трансферного вектора *pVasPAK8* после обработки рестриктазой *EcoRI*;

В. кольцевая форма трансферного вектора *pVasPAK8*.

Результаты рестрикции были проанализированы в 0,8% ом агарозном геле и получена линейная форма трансферного вектора *pVasPAK8* размером 5538 п.н. (рис.1).

Для делеции ДНК гена MIS плазмидную ДНК pBs-Ac-polh-MIS обрабатывали ферментом EcoRI и получили соответствующий фрагмент ДНК (рис. 2).

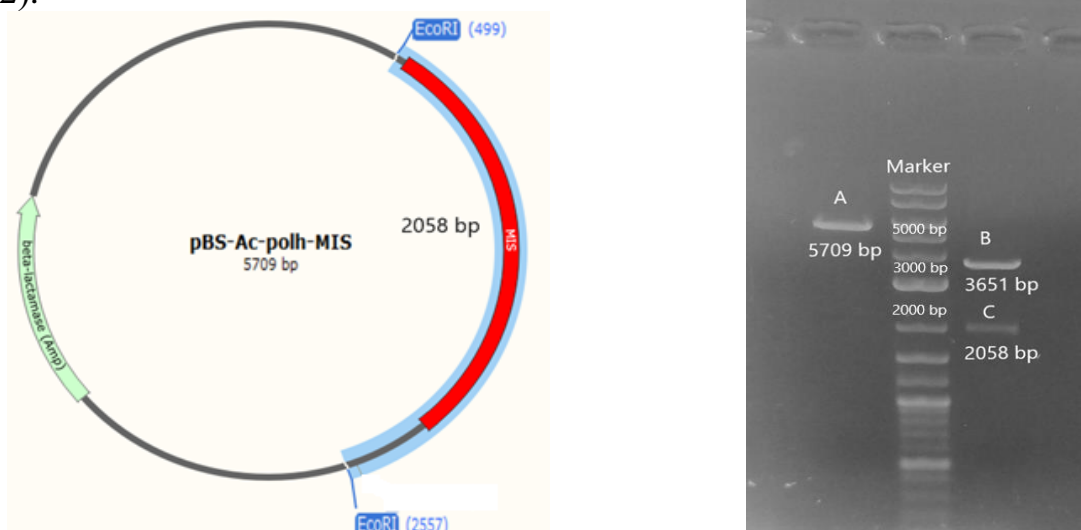


Рисунок 2. Гель-электрофорез плазмиды pBs-Ac-polh-MIS после обработки ферментом EcoRI.

Где, А- линейная форма плазмиды pBs-Ac-polh-MIS; В и С-фрагменты ДНК pBs-Ac-polh и гена MIS после обработки ферментом EcoRI.

Из рисунка 2 видно, что после обработки рестриктазой EcoRI линейной формы плазмиды pBs-Ac-polh-MIS образуется два фрагмента ДНК размером 3651 п.н. pBs-Ac-polh (В) и 2058 п.н. гена MIS (С). В результате ген MIS элюировали из 0,8% агарозного геля в гомогенном виде.

Во избежание «замыкания» трансферного вектора была проведена его обработка щелочной фосфатазой. Полученные молекулы ДНК лигировали в соотношении 1:10 (вектор и ген) с использованием фермента ДНК-лигазы Т4.

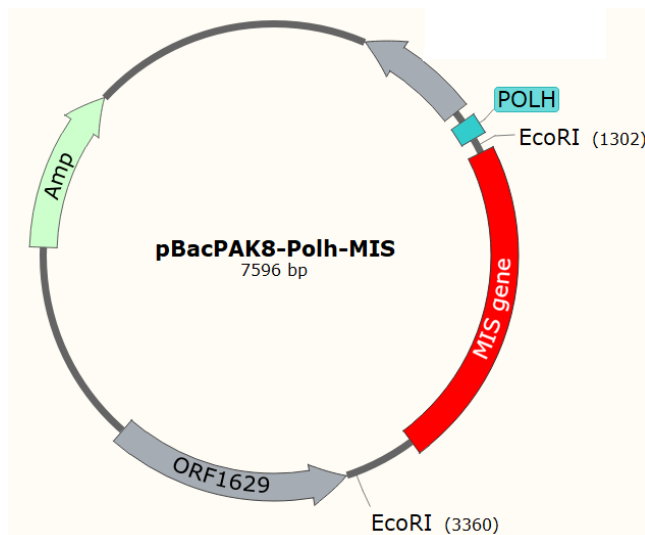


Рисунок 3. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pBacPAK8-polh-MIS, содержащий ген MIS.

После процесса лигирования была получена рекомбинантная плазмида pBacPAK8-polh-MIS, содержащая ген MIS. Далее рекомбинантную плазмиду трансформировали в клетки *Escherichia coli*.

Трансформация клеток *Escherichia coli* NEB-5 α рекомбинантной плазмидой pBacPAK8-polh-MIS и селекция полученных клонов

Клетки *Escherichia coli* NEB-5 α трансформировали лигазной смесью методом электропорации. Рекомбинантная плазида pBacPAK8-polh-MIS содержит гены устойчивости к ампициллину, поэтому в селективной среде с ампициллином (100 мкг/мл) растут только те клоны, которые содержат рекомбинантные плазмиды.

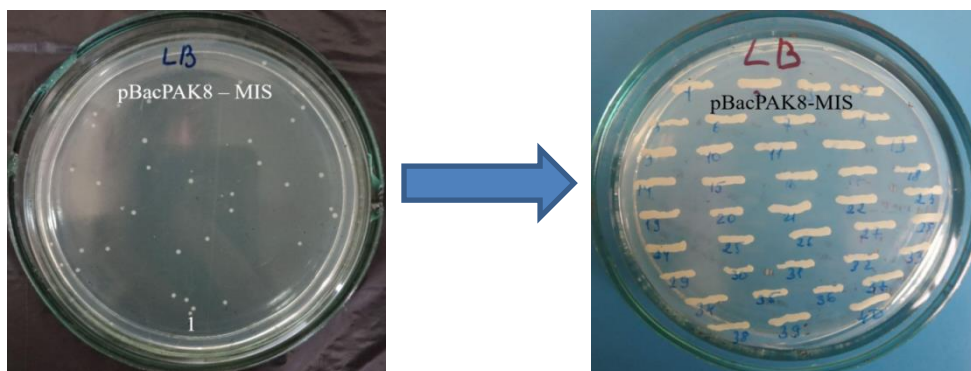


Рисунок 4. Отбор рекомбинантных клонов *E.coli* в среде агар LB, содержащий ампициллин

Трансформанты, выросшие на среде с ампициллином, отбирали для дальнейших исследований.

Анализ рекомбинантных клонов pBacPAK8-polh-MIS методом электрофореза

Рекомбинантную плазмиду pBacPAK8-polh-MIS, выделенную из клеток *E.coli*. подвергли рестрикционному анализу. При обработке исходной плазмиды pBacPAK8 (5538 п.н.) и рекомбинантной плазмиды pBacPAK8-polh-MIS рестриктазой *EcoRI* (G ↓ AATTC и CTTAA ↓ G), были получены фрагменты ДНК размером 5538 п.н. и 7596 п.н. (5538 п.н.+2058 п.н.), что, исходя из физических карт (см. рис. 1), соответствует ожидаемому размеру фрагментов ДНК (рис. 5).

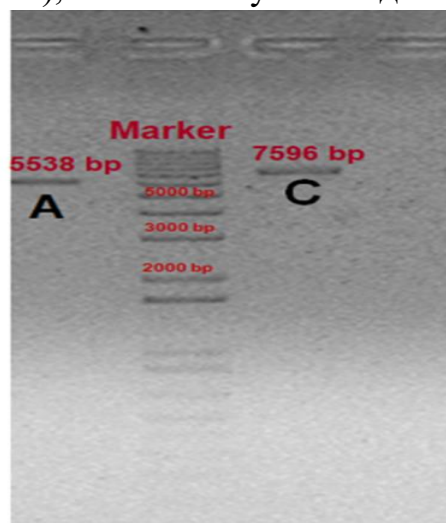


Рисунок 5. Результаты анализа линейных форм плазмид pBacPAK8 и pBacPAK8-polh-MIS.

(А) фрагмент вектора pBacPAK8, (С) фрагмент рекомбинантной плазмиды pBacPAK8-polh-MIS.

Из вышеприведенных данных электрофореза можно сделать вывод, что рекомбинантная плазида pBacPAK8-polh-MIS содержит ген MIS.

ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pBacPAK8-polh-MIS.

Далее скрининг рекомбинантных клонов проводили методом ПЦР с использованием специфических праймеров на ген MIS, сконструированных на основе баз данных NCBI. Синтезированы 4 пары праймеров на 4 различных фрагмента ДНК гена MIS (таблица 1). Синтез праймеров проводили на синтезаторе ДНК/РНК “АСМ-2000” (БИОССЕТ/Россия).

Таблица 1

Структуры олигонуклеотидов (праймеров)

Код праймеров	Нуклеотидная последовательность праймеров 5'->3'	Tm °C	п.н.	Размер амплификата	
1	F_MIS-1F	ATGCGGGACCTGCCTCTCACCA	68.9	22	538
	R_MIS-538R	AGGCTCTGGGCACCCGGCAG	69.6	20	
2	F_MIS-538F	CTGCCGGGTGCCAGAGCCT	69.6	20	433
	R_MIS-971R	TCCGACAGGTTGACTAGGCCCT	63	22	
3	F_MIS-971F	AGGGCCTAGTCAACCTGTTCGGA	63	22	459
	R_MIS-1430R	TCTCGGGGATGAGTACGGAGCGCT	69.6	24	
4	F_MIS-971F	AGGGCCTAGTCAACCTGTTCGGA	63	22	719
	R_MIS-1690R	TCACCGGCAGCCACACTCGG	68.5	20	

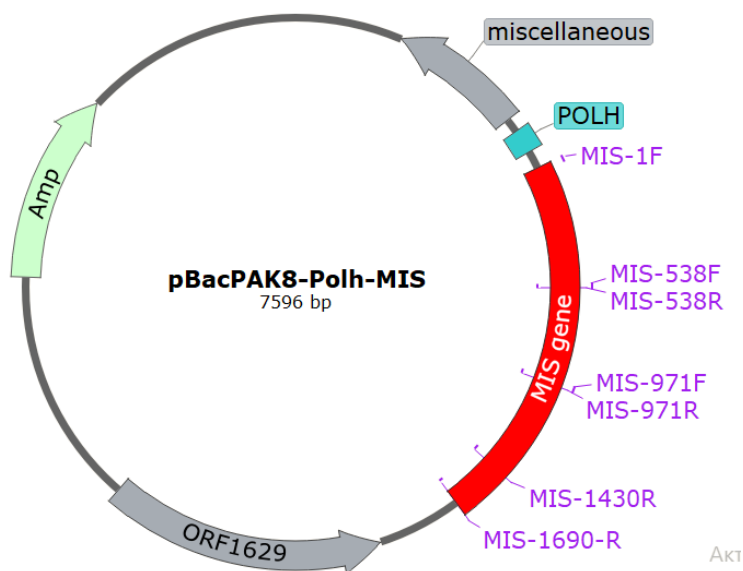


Рисунок 6. Генетическая карта плазмидной ДНК pBacPAK8-polh-MIS с отмеченным расположением праймеров для амплификации гена MIS

Синтезированные праймеры очищали методом гель-электрофореза в 25% ПААГ. ПЦР амплификацию проводили с праймерами, приведенными в таблице 1. Продукты амплификации анализировали с помощью гель-

электрофореза в 1% агарозном геле (рис. 7).

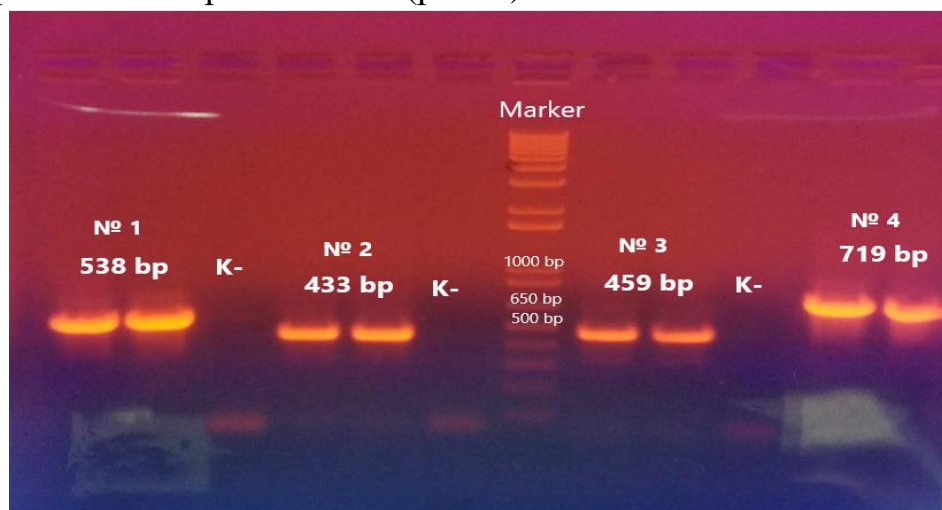


Рисунок 7. Результаты ПЦР анализа клонированной рекомбинантной плазмиды рВасРАК8-polh-MIS на содержание гена MIS с помощью разных праймеров.

В результате ПЦР анализа плазмидной ДНК рВасРАК8-polh-MIS получены амплификаты ожидаемых размеров, соответствующие разным участкам гена MIS, что в совокупности составляет 1683 п.н. Таким образом, было установлено, что в плазмидную ДНК рВасРАК8-polh-MIS клонирован полноразмерный ген MIS.

Определение ориентации клонированного гена MIS в рекомбинантной плазмиде

Далее определяли ориентацию клонированного гена MIS в рекомбинантной плазмиде рВасРАК8-polh-MIS. Для этого были синтезированы специфические праймеры со следующими структурами:

Forward primer: 5'- ТТГТТАААААТААСАГССАТТ -3' (из последовательности ДНК промотора гена полиедрин)

Reverse primer: 5'- ТСТААГСГССТАТГАГСА -3' (из структура гена MIS)

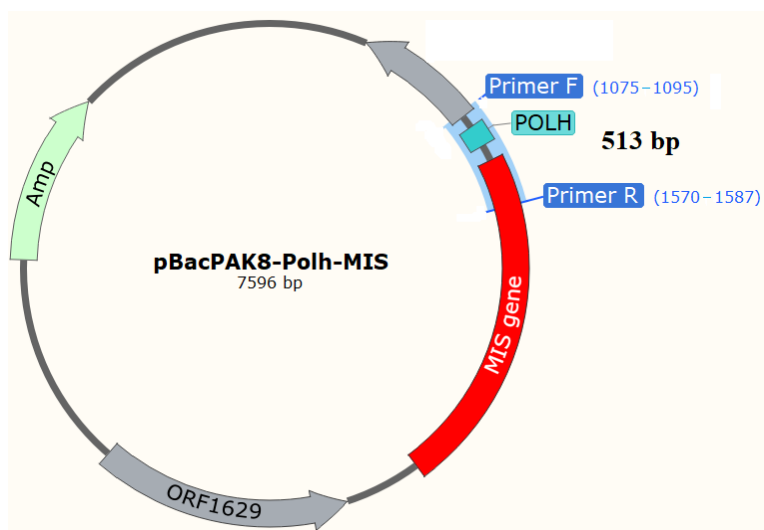


Рисунок 8. Генетическая карта плазмидной ДНК рВасРАК8-polh-MIS с отмеченным расположением праймеров для определения правильной ориентации гена MIS.

После ПЦР действительно выявили соответствующий амплификат нужного размера (513 п.н.) (см. рис. 9).

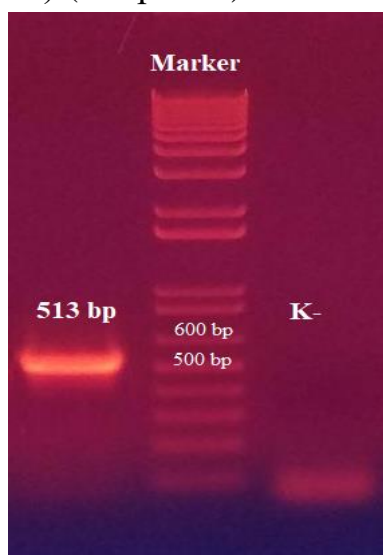


Рисунок 9. Результат ПЦР анализа для определения ориентации гена MIS.

Как видно из рисунка 9, фрагмент ДНК, амплифицированный с использованием синтезированных нами праймеров, соответствует теоретическому размеру – 513 п.н. Если бы ген MIS был расположен в неправильном направлении, то образовался бы амплификат размером - 1441 п.н. вместо 513 п.н.

Следовательно, на основании вышеполученных результатов можно сделать вывод, что целевой ген MIS клонирован в правильном направлении в рекомбинантной плазмиде *pVasPAK8-polh-MIS*.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК гена MIS в рекомбинантной плазмиде pVasPAK8-polh-MIS.

Методом секвенирования определена последовательность нуклеиновых кислот гена MIS в рекомбинантной плазмиде *pVasPAK8-polh-MIS*.

5' ATGCGGGACCTGCCTCTCACCAGCCTGGCCC
TAGTGCTGTCTGCCSTGGGGGCTCTGCTGGGGACTGAGGCCCTCAGAGCAGAGGAG
CCAGCTGTGGGCACCCAGTGGCCTCATCTTCCGAGAAGACTTGGACTGGCCTCCAGGC
ATCCCAACAAGAGCCTCTGTGCCTGGTGGCACTGGGCAGGACAGCAATGGCAGCAG
CTCCCCCCTGCGGGTGGTGGGGGCTCTAAGCGCCTATGAGCAGGCCTTCTGGGGG
CGTGCAAGAGGGCCCCGCTGGGGCCCCCGAGACCTGGCCACCTTCGGGGTCTGCAACA
CCGGTGACAGGAGGCTGCCTTGCCCTCTCTACGGCGGCTGGGGGCTGGCTGCGG
GACCCCTGGGGGGCAGCCGCTGGTGGTCCCTACACCTGGAGGAAGTGACCTGGGAGCC
AACACCCTCGCTGAGGTTCCAGGAGCCCCCGCTGGAGGAGCTGGCCCCCAGAGC
TGGCGCTGCTGGTGCTGTACCCTGGGCTGGCCCTGAGGTCACCTGTGACGAGGGCTG
GGCTGCCGGGTGCCAGAGCCTCTGCCCCCTCCCGAGACACCCGCTACCTGGTGTAG
CGGTGGACCGCCCTGCGGGGGCCTGGCGCGGCTCCGGGCTGGCCTTGACCCCTGCAG
CCCCGCGGAGAGGACTCCCCTGGCTGAGTACCGCCCCGGCTGCAGGCACTGCTGTTCCG
CGACGACCACCCTGCTGTTACACGGATGACCCCGGCCCTGCTCCTGCTGCCGCGGTC
CGAGCCCCGCGCCGCTGCCTGCGCACGGCCAGCTGGACACCGTGCCCTTCCC GCCGCC
CAGGCCATCCGCGGAACTCGAGGAGTCCCACCCAGCGCAGACCCCTTCTGGAGA
CGCTCACGCGCCTGGTGCAGGCGCTGCGGGTCCCCCGGCCCGGCTCCGCGCCGC

GCC**TGG**CC**CTGG**ATCC**GGAC**GC**CGTGG**CC**GGCTT**CC**CCG**CAG**GGCCT**AG**TC**AA**CC**CT**GT**
 C**GG**AC**CCCC**G**CGG**CG**CTGG**AG**CC**CT**ACT**CG**ACGG**CG**AGG**AG**CCC**G**CTG**CT**GCTG**CT**G**
 CT**GAGG**CCC**ACTG**CG**CC**ACC**ACCG**GG**GAT**CC**TG**CG**CCCC**CT**G**CA**CGA**CCCC**AC**GT**C**
GGCG**CCGTGGG**CC**ACGG**CC**CTGG**CG**CGCC**G**CGTGG**CT**GCTGA**ACT**GCA**AG**CGG**CG**G**
 CT**GCCG**AG**CTG**CG**GAAG**CC**TCCC**GG**TCTG**CC**TCC**GG**CC**AC**AG**CCCC**GCTG**CT**GG**CG**C**
GCCT**GCTCG**CG**CTCTG**CCC**AGGA**GG**CCCC**GG**CGG**CC**TCCG**CG**AT**CCCC**CTG**CG**AG**CG**C**
TGCT**GCT**CC**TGAAGG**CG**CTG**CAG**GG**CC**TG**CG**CGTGG**AG**TGG**CG**GGG**CG**GGG**AT**CCG**
 CG**CGGG**CC**GGGT**CG**GG**CAC**AGCG**CAG**CG**CG**GGGG**CC**ACCG**CC**GCC**GAC**GGG**CC**GT**
GCGCG**CTG**CG**CGAG**CT**CAG**CG**TAG**AC**CTCC**CG**CCGA**CG**GTCC**GT**ACT**CA**T**CCCC**G**
AGACC**TACC**AG**GCCA**ACA**ATTG**CC**AGGG**CG**TGTG**CG**CTGG**CC**T**CAG**TCCG**AA**CCG**
AACCCC**CG**CT**ACGG**CA**ACC**AC**GTGG**T**GCTG**CT**GCTGA**AG**ATG**CAG**GG**CCCC**GTGG**GG**C**
 CG**CCCTGG**CG**CG**CCC**AC**CT**GCTG**CG**TG**CCC**ACC**CG**CTAC**CG**GGG**CA**AG**CT**GCT**CA**T**
CAGCC**TGT**CG**GAGG**AA**CG**CA**T**CAG**CG**CG**CA**CC**AC**GT**G**CCC**AA**CA**TGGT**GG**CC**ACC**G**
AGTGTGGCT**G**CC**GGTGA** - 3' A-209; T-240; C-641; G-593;

Нуклеотидную последовательность секвенированного гена MIS сравнивали с базой данных NCBI. В результате было установлено, что нуклеотидная последовательность гена MIS, которую мы клонировали, полностью совпадает с последовательностями из базы данных NCBI.

Котрансфекция вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* дикого типа и рекомбинантной плазмидной ДНК рVasPAK8-polh-MIS в клетки *Bombyx mori* (BMN1).

Гомологичную рекомбинацию между плазмидной ДНК рVasPAK8-polh-MIS и геномной ДНК вируса VmNPV проводили *in vitro* в клеточной линии *Bombyx mori* BMN1. Клеточная культура *Bombyx mori* BMN1 поддерживается путём субкультивирования на среде Grace's для культур клеток насекомых с 10 % инактивированной эмбриональной бычьей сывороткой. Котрансфекцию клеточной линии *Bombyx mori* BMN1 проводили с помощью липосомального реагента Metafectene PRO (Biontech, Германия), с последующей прямой оценкой эффективности экспрессии непосредственно в живых клетках методом количественного ПЦР (RT-PCR).

Для трансфекции было использовано от 0.5 до 2 мкг плазмидной ДНК рVasPAK8-polh-MIS и вирусной ДНК бакуловируса дикого типа и одинаковое количество клеток (6×10^4 клеток/мл). В таблице 2 показаны оптимальные соотношения требуемого реагента Metafectene PRO, плазмидной и вирусной ДНК.

Таблица 2

Подбор оптимальных условий трансфекции клеток *Bombyx mori* BMN1

Оптимальное количество ДНК для трансфекции			
Количество плазмидной ДНК	0.5 мкг	1.0 мкг	2.0 мкг
Количество вирусной ДНК	0.5 мкг	1.0 мкг	2.0 мкг
Оптимальное количество трансфецирующего реагента			
Metafectene PRO	5 мкл	10 мкл	15 мкл
Оптимальное соотношение			
ДНК	трансфецирующий реагент Metafectene PRO		
3 мкг	10 мкл		

В результате установлена линейная зависимость количества трансфицированных клеток от количества трансфицирующего реагента и определены оптимальные методы трансфекции, при которых специфически увеличивается проницаемость клеточной мембраны VMN1 для ДНК вируса.

Идентификация и очистка рекомбинантных клонов бакуловируса rVtnNPV-MIS, экспрессирующих ген MIS.

Для отбора и очистки рекомбинантных клонов *rVtn-polh-MIS* от бакуловирусов дикого типа использовали метод выделения изолированных вирусных колоний *Plaque assay*. В результате было отобрано наибольшее количество вирусосодержащих колоний, экспрессирующих целевой ген. Далее каждый отобранный рекомбинантный вирусный клон подвергали трёхстадийной очистке с использованием метода предельного разведения TCID50 для достижения генетической гомогенности вирусных клонов и для определения количества рекомбинантных вирусов. Вирусные стоки содержащие максимальное количество рекомбинантных колоний использовали для заражения культуры клеток тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Для определения концентрации рекомбинантного вируса в приготовленных вирусных стоках проводили РТ-ПЦР анализ (рис. 10).

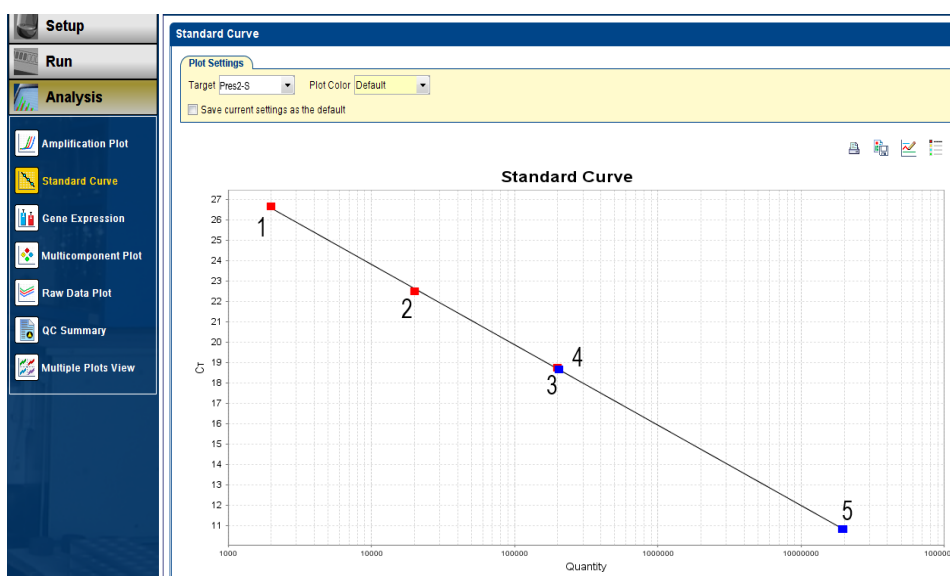


Рисунок 10. Результаты анализа РТ-ПЦР на содержание MIS

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.

Таким образом, после анализа изолированных колоний на RT-PCR было отобрано необходимое количество вирусного стока. Установлено, что концентрация исходного рекомбинантного вируса, необходимого для заражения клеточных линий *Bombyx mori*, составляет $C = 2 \times 10^6$ копий / мл.

Экспрессия целевого белка MIS в культуре клеток *Bombux mori* (BMN1).

Зараженные рекомбинантным бакуловирусом *rBm-polh-MIS* клетки *Bombux mori* культивировали на питательной среде Grace's содержащей 10 - 15% ФБС (фетальную бычью сыворотку) в интервале температур + 22°C + 26°C. После 7 дневного инкубирования клетки осаждали центрифугированием и определяли экспрессию целевого белка методами электрофореза в ПААГ и иммуноблота.

Характеристика рекомбинантного белка MIS (электрофорез в ПААГ, Иммуноблот).

Гель-электрофорез белка MIS проводили в денатурирующих условиях в 10% ПААГ. Как видно из рисунка 11, молекулярная масса рекомбинантного белка MIS (А) составляла 70 кДа, что соответствует литературным данным - молекулярной массе мономеров, рассчитанной на основе аминокислотной последовательности.

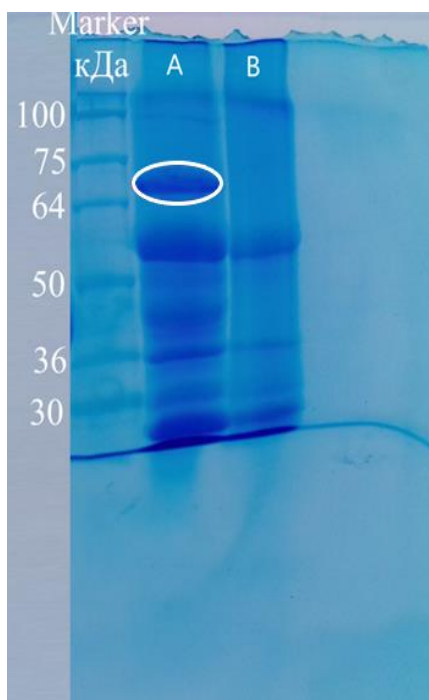


Рисунок 11. Электрофорез белка MIS в 10% ПААГ.

А. Гомогенат клеток *Bombux mori* (BMN1), содержащих белок MIS. **В.** Гомогенат исходных клеток *Bombux mori* (BMN1).

Далее мы исследовали гомогенат клеток, содержащих белок MIS методом иммуноблота. Для иммуноблотинга использовали коммерческий набор «Monoclonal Antibody to Anti-Mullerian Hormone (AMH) (Cloud-Clone Corp. Cat. MAA228Hu22)» (Рис. 12).

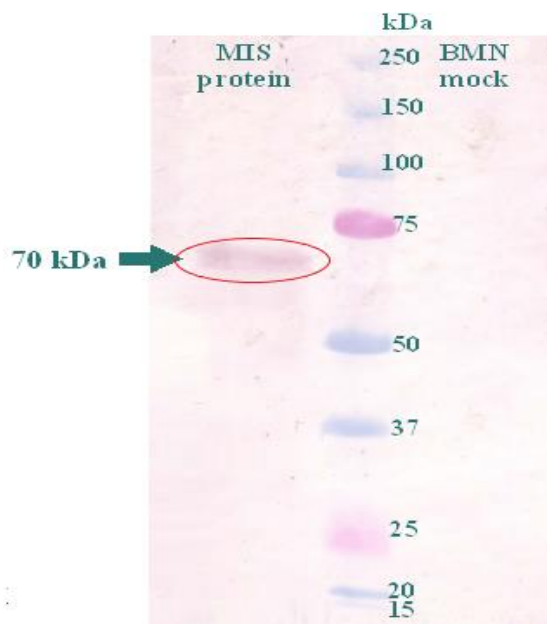


Рисунок 12. Иммуноблот белка MIS.

Как видно из рисунка 12, экспрессированный в культуре клеток *Bombyx mori* рекомбинантный белок MIS проявляет антигенную специфичность относительно моноклональных антител к человеческому белку MIS.

Таким образом, установлено, что экспрессированный в культуре клеток *Bombyx mori* рекомбинантный белок MIS имеет молекулярную массу 70 кДа (мономер) и проявляет антигенную специфичность белка MIS.

Выводы

1. Впервые клонирована новая рекомбинантная плазмида pVasPAK8-polh-MIS, кодирующая MIS - Ингибирующую субстанцию Мюллера в бакуловирусах / клетках насекомых *Bombyx mori*.
2. Определена нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК MIS гена.
3. Получен новый рекомбинантный бакуловир гVmNPV-MIS на основе рекомбинантной плазмиды pVasPAK8-MIS и ДНК вируса ядерного полиэдрома *Bombyx mori* путем ко-трансфекции в клетки *Bombyx mori* (BMN1).
4. Впервые получена экспрессия рекомбинантного белка MIS в культурах клеток *Bombyx mori* (BMN1).
5. Установлено, что полученный рекомбинантный белок MIS имеет молекулярную массу 70 кДа и обладает антигенной специфичностью.

**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

KHASANOV SHUKHRAT SHAVKAT UGLI

**EXPRESSION OF THE PROTEIN MIS - INHIBITING SUBSTANCE
OF MUELLER IN THE EXPRESSION SYSTEM «BACULOVIRUSES -
INSECT CELLS»**

**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/B418 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: **Ismailov Zafar Fayzullayvich**
Doctor of biological sciences, assistant Professor

Mukhamedov Rustam Sultanovich
Doctor of biological sciences, Professor

Leading organization: **Institute of Bioorganic chemistry**

The defense of the dissertation will take place on «28» December 2020 at 10⁰⁰ 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: microbio@academy.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: Expression of the recombinant protein MIS - Mueller's Inhibiting Substance in the baculovirus / *Bombyx mori* insect cell system.

The objects of the research work: Wild-type *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus DNA wtBmNPV, *Bombyx mori* (BMH1) cell culture, pBacPAK8 transfer vector.

Scientific novelty of the research work:

for the first time, a new recombinant plasmid pBacPAK8-polh-MIS, encoding MIS - Muller's Inhibitory Substance was cloned in *Bombyx mori* baculoviruses / insect cells.

cotransfection of wild-type *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and recombinant plasmid DNA pBacPAK8-polh-MIS into *Bombyx mori* cells (BMN1) was conducted.

identification and purification of recombinant clones of baculovirus rBmNPV-MIS, that expressing the target gene were carried out.

first time, the expression of the recombinant MIS protein was obtained in *Bombyx mori* (BMN1) cell cultures.

it was shown that PAGE electrophoresis and immunoblotting of the obtained recombinant MIS protein has an appropriate molecular weight and exhibits high antigenic specificity.

Implementation of the results: Based on scientific results, obtained as a result of studying the expression of the recombinant protein MIS - Mueller's inhibitory substance in the baculovirus / *Bombyx mori* insect cell system:

isolated recombinant baculovirus clones *rBmNPV-polh - MIS* 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 16, 2020 No. 4 / 1255-789). 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 *rBmNPV-polh - MIS* baculovirus registered in the database of the National collection of pathogenic microorganisms of the World center of microorganisms микроорганизмов (World Data Center for Microorganism, National Collection of Phytopathogenic Microorganisms, 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.

in the project under the number Ф-А-2018-012 "Creation of initial breeding material for breeding resistant silkworm lines to nuclear polyhedrosis", the recombinant rBmNPV-MIS baculovirus, based on the nuclear polyhedrosis virus *Bombyx mori*, was used to determine the silkworm varieties resistant to baculovirus (Reference of the Association "Uzbekipaksanoat" dated March 10, 2020 No. 2-3 / 624). As a result, it became possible to supply varieties of silkworm

larvae resistant to the nuclear polyhedrosis virus for silkworm breeding.

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 97 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Азимова Ш.С. Бакуловирусная система экспрессии, как безопасная и эффективная система для получения рекомбинантных белков // *Universum: химия и биология*: – № 6(60), pp 13-17.

2. Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, С.А. Сасмаков, Ж.М. Абдурахманов, Ш.С. Азимова. Ҳашарот хужайраларини паст ҳароратли муҳитда узоқ муддат сақлашнинг оптимал шароитларини танлаш // *FarDU Ilmiy xabarlar*, № 6-2019, pp 29-32.

3. Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Азимова Ш.С. Выбор оптимальных условий культивирования клеток насекомых для использования в биотехнологии // *Химия и химическая технология*, № 3-2019, pp 74-77.

4. Sh.Sh. Xasanov, O.N. Ashirov, S.A. Sasmakov, J.M. Abdurahmonov, F.B. Eshboev, Sh.S. Azimova. MIS - (Myuller Ingibirlovchi Substansiyasi) inson saratonini davolashdagi roli va rekombinant rbmnpv- mis bakulovirus klonlarini identifikatsiyalash usullari // *Samarqand davlat univerisiteti axborotnomasi 2020-yil, 3-son (117). 145-148 betlar*

II часть (II бўлим, II part)

5. Ф.Эшбоев., Ж. Абдурахманов О. Аширов, Ҳасанов Ш.Ш., Ш. Азимова. Рекомбинант рВасРАК-8-GFP плазмид ДНК сини идентификация қилиш // Генетика, геномика ва биоинформатиканинг долзарб муаммолари ва истиқболлари. Илмий-амалий конференция. Тошкент, 5 май 2017 й. 248-249 бетлар.

6. Ф. Эшбоев., Ж. Абдурахманов., О. Аширов, Ҳасанов Ш.Ш., С. Икрамов, А. Махнев, С.Сасмаков, Ш. Азимова Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК рВасРАК-8-EGFP-зеленый флуоросцентный белок в бакуловирусах // Мустақиллик йилларида Ўзбекистон таълим тизими: ислохотлар, ютуқлар ва истиқболлар.

7. Ҳасанов Ш.Ш. Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Юсупова Э.Г., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С Котрансфекция ДНК трансферного вектора и ДНК вируса ядерного полиэдрома дикого типа WTBMNPV в клетки *bombyx mori* bmn1 для проведения гомологичной рекомбинации // Труды республиканской научной и научно-технической конференции «XXI век – век интеллектуальной молодёжи» С. 166-167

8. Ж.М.Абдурахманов., Ҳасанов Ш.Ш., О.Н.Аширов, С.А.Икрамов, С.А. Сасмаков Ш.С. Азимова Tut ipak qurti lichinkalaridan (*Bombyx mori* larvae) rekombinant oqsillar olisch uchun «biofabrika» sifatida foydalanish // Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг ривожланишида ёш олимлар ўрни” мазвусидаги илмий ва илмий-техник анжуман материаллари.

9. Ҳасанов Ш.Ш., Ж.М. Абдурахманов.,О.Н. Аширов, С.А. Сасмаков Э.Г. Юсупова, Ш.С. Азимова *Bombyx mori* BMN1 hujayralarida gomologik rekombinatsiyani amalga oshirish uchun transfer vector va virus DNK miqdorlarining optimal nisbati // “Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг ривожланишида ёш олимлар ўрни” мавзусидаги илмий ва илмий-техник анжуман материаллари.

10. Ҳасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Ж.М. Абдурахманов, О.Н. Аширов, Ш.С. Азимова Ҳашарот ҳужайра линияларини узок муддатли сақлашнинг оптимал шароитлари // *Научно-практическая конференция молодых учёных «Актуальные проблемы химии природных соединений», посвящённой 110-летию академика С.Ю.Юнусова.* 19 марта, Ташкент. С.52

11. S. Sasmakov, Ҳасанов Ш.Ш. J. Abdurhakhmanov, 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.* pp 26.

12. Ҳасанов Ш.Ш. С.А.Сасмаков, Ж.М Абдурахманов О.Н Аширов, Ш.С. Азимова Керакли генни экспрессияловчи рекомбинант rVmNPV- MIS бакуловирус клонларини тозалаш // Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни Тошкент-2019 pp 174

13. Ҳасанов Ш.Ш., С.А. Сасмаков, Ж.М. Абдурахманов,О.Н. Аширов, Ф.Б. Ешбоев, А.А.Махнев, Г.А. Пиякина, Ш.С.Азимова *Spodoptera exigua* ва *Lymantria dispar* ҳашоратларининг ҳужайра линияларини кўпайтиришнинг оптимал шароитларини аниқлаш // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси, 5 декабрь 2018 й, Тошкент. Конференция материаллари.

14. Ҳасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Мюллер ингибирловчи субстанциясининг инсон саратонини даволашдаги биологик роли // БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ МУАММОЛАРИ - 2020 ИЛМИЙ КОНФЕРЕНЦИЯ МАТЕРИАЛЛАРИ 22 май 2020 йил pp 141.

15. 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 pVacPAK8-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.