

**ЁД ГЕННИ *PICHA PASTORIS* АЧИТҚИ ҲУЖАЙРАСИГА КЛОНЛАШ****О.Н. Аширов****Т.Х. Садуллаев****А.М. Ярилкаганова****А.М. Норматов****С.А. Сасмаков****Ш.С. Азимова**

ЎзР ФА Ўсимлик моддалари кимёси институти

Тошкент кимё-технология институти

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7441236>

**Аннотация.** Гепатит В вирусининг юза антигенини кодловчи S ген pPIC9 трансфер вектори орқали *Pichia pastoris* ачитқисига клонланди. Бунда pPIC9- S рекомбинант плазмидаси SacI рестриктаза ферменти билан кесилиб *Pichia pastoris* ачитқисига электропорация усулида киритилди. Ачитқи клонлари гистидинсиз озуқа муҳитда ўстирилиб селекция қилинди. Натижада *Pichia pastoris* ачитқисининг S сақловчи Mut<sup>+</sup> клонлари олинди.

**Калит сўзлар:** *Pichia pastoris*, рекомбинант ДНК, S ген, трансфер вектор, электропорация, рестрикция, трансформация

**КЛОНИРОВАНИЕ ЧУЖЕРОДНЫЙ ГЕН В ДРОЖЖЕЙ *PICHA PASTORIS***

**Аннотация.** Ген S, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В, клонирован в дрожжи *Pichia pastoris* с помощью трансферного вектора pPIC9. При этом рекомбинантную плазмиду pPIC9-S обрабатывали рестрикционным ферментом SacI и встраивали в дрожжи *Pichia pastoris* методом электропорации. Клоны дрожжей отбирали, выращивая без гистидиновой питательной среде. В результате были получены Mut<sup>+</sup> фенотипы *Pichia pastoris*, содержащие S ген.

**Ключевые слова:** *Pichia pastoris*, рекомбинантная ДНК, ген S, трансфер вектор, электропорация, рестрикция, трансформация.

**CLONING A FOREIGN GENE IN THE YEAST *PICHA PASTORIS***

**Abstract.** The S gene encoding the hepatitis B surface antigen was cloned into the yeast *Pichia pastoris* using the pPIC9 transfer vector. The recombinant plasmid pPIC9-S was treated with the restriction enzyme SacI and inserted into the yeast *Pichia pastoris* via electroporation. Yeast clones were selected by growing in a medium without histidine. As a result, Mut<sup>+</sup> phenotypes of *Pichia pastoris* containing the S gene were obtained.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, recombinant DNA, S gene, transfer vector, electroporation, restriction, transformation.

**Кириш**

*Pichia pastoris* ачитқи тизими ҳозирги кунда рекомбинант оқсилларни олишда кўп ишлатилаётган экспрессион тизимлардан бири ҳисобланади. Арзон озуқа муҳитда кўп биомасса йиғиши, эндотоксин ва пирогенларнинг йўқлиги, анчайин юқори рекомбинант оқсил синтези ва рекомбинант оқсилни озуқа муҳитга чиқариш хусусиятлари ушбу экспрессион тизимнинг асосий афзалликларидир [1-3]. Бугунги кунда *Pichia pastoris* экспрессион тизимида терапевтик ва саноат миқёсида ишлатиладиган 70 дан ортиқ оқсил маҳсулотлари бозорга чиқарилган [4].

*Pichia pastoris* экспрессия тизимдан фойдаланишнинг асосий мақсади сут эмизувчилар учун талаб қилинадиган ҳафталар ўрнига бир неча кун давом этувчи ферментация жараёни орқали юқори самарадор рекомбинант оқсиллар олишдан иборатдир. Бугунги кунда *P. pastoris* тизими орқали олинган биотехнология, фармацевтика, эмлаш, ҳайвонлар саломатлиги ва озик-овқат саноатидаги маҳсулотлар учун 160 дан ортиқ компанияларга лицензиялар берилган. Ушбу тизимда 500 дан ортиқ гетероген оқсиллар олинган бўлиб, ушбу оқсиллардан биринчиси 1996 йилда инсоннинг клиник синовларига киритилди ва ундан сўнг эса терапевтик оқсиллар ва антигенларнинг қўлланилиши бошланди [5-7].

Ачитқиларга асосланган барча биофармацевтика маҳсулотлари ҳозирги кунда АҚШ ва Европада *Sacharomyces cerevisia* тизимида ишлаб чиқарилади. Шунингдек, *P. pastoris*дан олинган рекомбинант гепатит В вакцинаси ва интерферон алфа Ҳиндистонда 1999 ва 2002 йилларда Shanta Biotech тамонидан сотилган ([www.shantabiotech.com](http://www.shantabiotech.com)). Шу каби, рекомбинант инсон инсулини Ҳиндистонда 2003 йилда тасдиқланган ва Shanta Biotech ва Biosan ([www.biosan.com](http://www.biosan.com)) қўшма корхонаси тамонидан сотила бошланган.

Бегона геннинг геном ДНК га интеграция жараёни *Saccharomyces cerevisiae* да бўлгани каби, вектор ва *Pichia pastoris* геноми томонидан ўхшаш кетма-кетликлар ўртасида гомологик рекомбинация натижасида содир бўлади [8]. *Pichia pastoris* га ДНКни киритишнинг асосан тўртта усули тарқалган бўлиб, улар қулайлик, трансформация тезлиги ва бошқа хусусиятлари билан фарқланади (1-жадвал).

1-жадвал

#### *P. pastoris* трансформация усулининг умумий хусусиятлари

Усуллар	Трансформация унуми/мкг ДНК	Қулайлиги	*Мултикопи интеграция
Сферопласт	10 <sup>5</sup>	Паст	Бор
Электропорация	10 <sup>5</sup>	Юқори	Бор
PEG1000	10 <sup>3</sup>	Юқори	Йўқ
LiCl	10 <sup>2</sup>	Юқори	Йўқ

\*- хужайра геномига бир неча нусха геннинг кириши.

Тўртта трансформация процедураларининг ҳар бири билан векторларни *P. pastoris* геномига киритиш мумкин. Сферопласт усули энг яхши ўрганилган бўлиб, унумдорлиги юқори ҳисобланади (~10<sup>5</sup>/мкг, днк), аммо агарли муҳитга экилгандан сўнг хужайраларнинг тикланиш даражаси анча паст ҳисобланади [9]. Қолган учта усул ёрдамида хужайралар агароза гелининг юзасида бузилмаган ёки бутун ҳолда сақланади ва хужайраларни экиш ва кейинги таҳлилларда ишлатишда қулайлик туғдиради. Бундан ташқари PEG 1000 ва LiCl усулларида трансформация унуми нисбатан паст ва мултикопи интеграция мавжуд эмас. Электропорация усулида бу каби камчиликлар кузатилмайди. Шу билан биргаликда бу усул осон, қулай ва арзон ҳисобланиб, ҳозирги кунда қўпчилик олимлар томонидан қўлланилаётган усул ҳисобланади [8].

#### Материал ва методлар

Тадқиқотларимизда *SacI* рестрикция ферменти (Invirtogen, АҚШ), GS115 *P. Pastoris* ачитки штамми (Invirtogen, АҚШ), pPIC9 трансфер векторлари (Invirtogen, АҚШ),

MD (1% глюкоза, 1X YNB, 1,5% агар-агар), RBD (1% глюкоза, 1X YNB, 1,5% агар-агар, 1M сорбитол) озуқа муҳитларидан фойдаланилди.

**Рестрикция жараёни.** Рестрикция ферменти *SacI* мос равишдаги 1X буферларда 1 мкг ДНК га 1 unit фермент ҳисобида олинади. Аралашма 37°C да 2-4 соат мобайнида инкубация қилинади. Жараённинг унуми электрофорез усулида текширилади.

**Рекомбинант плазмидаларнинг *P. pastoris* ҳужайраларига трансформацияси.** Тайёр пробиркадаги ҳужайраларга 1-5 мкг занжир ҳолатига келтирилган ДНК қўшилади, 0.2 см кюветага жойланади ва муз ҳаммомида 5 мин давомида ушланади. Electroporator 2510 (Eppendorf company) курилмаси 1.5 kV га созланиб, кювета жойланади ва “pulse” тугмаси икки марта босилади. Жараён тугаганлиги ҳақидаги сигналдан сўнг секинлик билан 1 мл 1M сорбитол қўшилади. Суюқлик кюветадан янги 2 мл пробиркага олиниб, 30°C да 1 соат давомида тебранишсиз инкубация қилинади. Суюқликдан 100-500 мкл олиниб, янги тайёрланган RDB агар ликопчасининг юза қисмига махсус ясалган ясси шиша найча ёрдамида суриб шимдирилади. *Pichia pastoris* GS115 HIS4 гени бўйича мутацияга учраганлиги сабабли колониялар гистидинсиз муҳитда ўса олмайдилар. Ҳужайрадаги *his4* гени вектор плазмидидаги натив HIS4 гени билан алмаштирилганлиги сабабли, колонияларни селекция қилиш мақсадида гистидинсиз озуқа муҳитида (RDB) ўстирилди. Ликопчалар колониялар ҳосил бўлгунга қадар 2-3 кун, 30°C да инкубация қилинди.

#### Олинган натижалар ва уларнинг муҳокамаси

***pPIC3.5-S* ва *pPIC9-S* рекомбинант плазмидаларини *Pichia pastoris* ҳужайрасига интеграция қилиши (киритиши).** Тадқиқотимизнинг асосий мақсади гепатит В вирусининг юза антигени S оксилени кодловчи генини *Pichia pastoris* ҳужайрасига *pPIC9* тансфер вектори орқали киритишдан иборат. Бунинг усун халқасимион шакилдаги ДНК махсус рестриктазалар билан кесилиб чизиксимон ҳолатга олиб келиниши керак. *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, USA) маълумотларига кўра рекомбинант плазмидаларни чизиксимон (линейный) ҳолга келтиришда ишлатилган рестриктаза ферментларининг турига қараб Mut<sup>+</sup> ва Mut<sup>S</sup> каби фенотиплар олинади (2-жадвал).

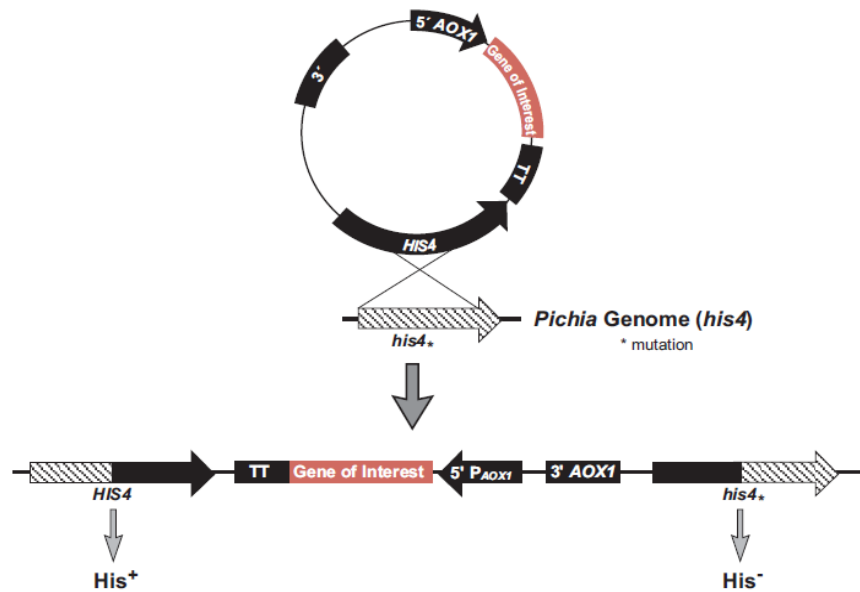
2-жадвал

#### Олинган фенотипларнинг рестриктаза ферментларига боғлиқлиги

Рестриктаза ферменти	Интеграция соҳаси	Фенотип
<i>Sal I</i> ва <i>Stu I</i>	<i>his4</i> бўйича	His <sup>+</sup> Mut <sup>+</sup>
<i>Sac I</i>	5' AOX1 қисми бўйича	His <sup>+</sup> Mut <sup>+</sup>
<i>Bgl II</i>	AOX1 бўйича алмашиниш.	His <sup>+</sup> Mut <sup>S</sup>

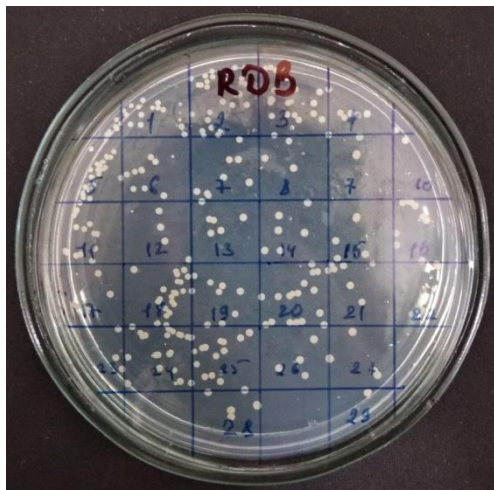
Биз *P. pastoris*нинг Mut<sup>+</sup> фенотипини олиш мақсадида *pPIC9-S* рекомбинант плазмидани *SacI* рестриктаза ферменти билан кесиб чизиксимон ҳолга келтирдик. Мазкур фермент билан ишлов бериш орқали асосий углерод манбаи ва мақсадли геннинг инициатори бўлган метанолни юқори даражада утилизация хусусиятли Mut<sup>+</sup> фенотипи ҳосил бўлади. *Pichia pastoris* GS115 штаммида гистидиннинг синтезига жавоб берувчи гистидинол дегидрогеназа гени (*his4*) мутация қилинган. Натижада мазкур штаммлар

гистидинсиз озуқа муҳитда ўса олмайдилар. Тадқиқот доирасида ишлатилаётган трансфер векторлар натив HIS4 генини сақлайди. Рекомбинант плазмидалар *Pichia pastoris* хужайрасига киритилганда S ген билан биргаликда мазкур HIS4 гени ҳам рекомбинацияга учрайди. Натижада хужайрадаги мутация қилинган *his4* ген натив HIS4 ген билан алмашинади ва рекомбинант хужайралар гистидинсиз озуқа муҳитда ўсиш қобилиятига эга бўладилар (1-расм).



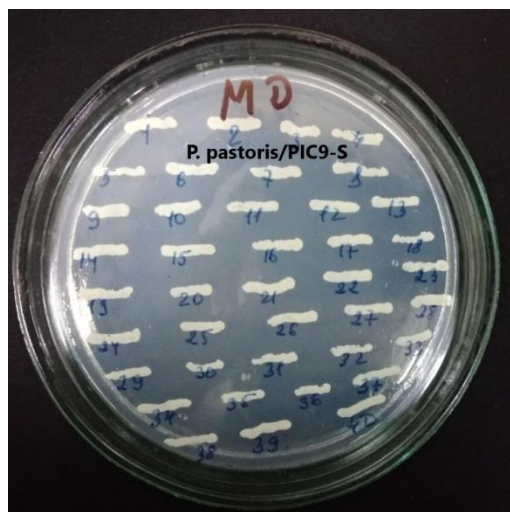
1-расм. *Pichia pastoris* ачитқи геномига бегона геннинг кириш жараёни (гомологик рекомбинация).

Шу сабабдан ҳам трансформация жараёнидан сўнг хужайралар гистидинсиз селектив озуқа (RDB) муҳитда 30 °C да 3-7 кун давомида ўстирилди (2-расм).



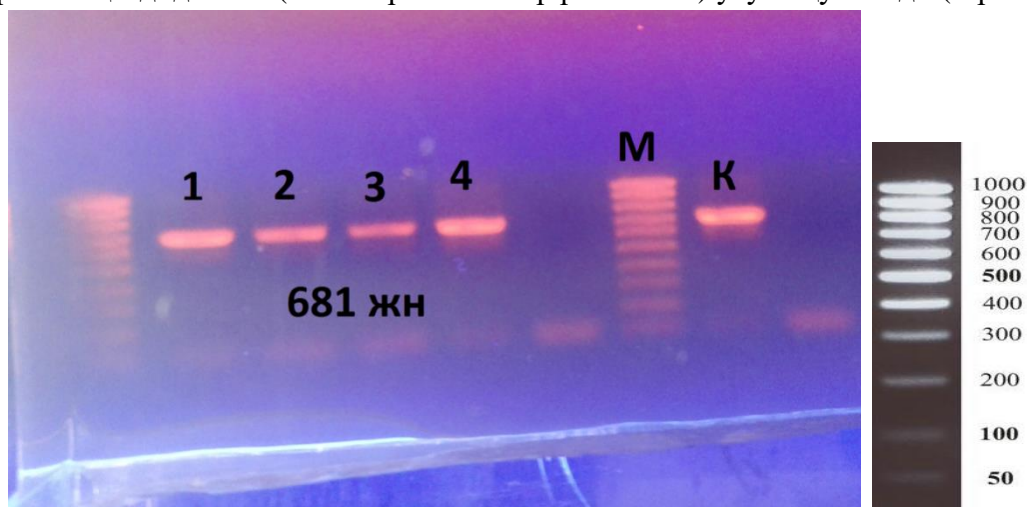
2-расм. pPIC9-S рекомбинант плазмидаси асосида олинган *Pichia pastoris* колонияларининг гистидинсиз селектив озуқа муҳитида ўстириш.

Ҳар бир катакчаларга ажратилган колониялардан биттадан олиниб, кейинги жараёнлар учун янги тайёрланган гистидинсиз MD муҳитига қайта экилди (3-расм).



3-расм. рPIC9-S рекомбинант плазмидаси асосида олинган *Pichia pastoris* колонияларининг гистидинсиз селектив MD озуқа муҳитига қайта экилиши.

Юқоридаги иккала MD муҳитига қайта экилган штаммларнинг барчаси 10мл суюқ MD муҳитига экилиб, 30 °C да тун давомида инкубация қилинди. Барча ўсган култураларнинг оптик зичлиги спектрофотометрнинг 600нм тўлқин узунлигида ўлчанди. Улар ичидан 4 та энг юқори оптик зичлик намоён этганлари танлаб олинди. Шундан сўнг ачитқи хужайрасидан геном ДНК си ажратилди ва киритилган геннинг мавжудлигини текшириш мақсадида ПЗР (полимераза занжир реакцияси) усули қўлланди (4-расм).



4-расм. 1% агароза гелидаги ПЗР натижалари.

Бунда: 1-4 танлаб олигнган ачитқиларнинг ДНК фрагментлари; М-маркер; К-мусбат намуна.

Олинган натижалардан шуни хулоса қилиш мумкинки, танлаб олинган 4 та *P. pastoris* рекомбинант штаммларининг барчаси ўз таркибида мақсадли S генини тутиши ва киритилган геннинг ўлчами 681 жн (жуфт нуклеотид) эканлиги аниқланди. Мусбат намунада сифатида S ген сақловчи рекомбинант плазида фойдаланилди. Шундан сўнг, яққа ҳолдаги рекомбинант штамми гистидинсиз MD агар муҳитига қайта штрихлаб экилди.

Шундай қилиб, Гепатит В вирусининг юза S (HBsAg) оқсилени кодловчи S-ген, рPIC9-S рекомбинант плазмидалари орқали *Pichia pastoris* хужайрасига киритилди ва Mut<sup>+</sup> фенотипи олинди.

## REFERENCES

1. B. Gasser, R. Prielhofer, H. Marx, M. Maurer, J. Nocon, M. Steiger, V. Puxbaum, M. Sauer, D. Mattanovich. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.* 8, 191 (2013).
2. M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98, 5301 (2014).
3. S.C. Spohner, H. Quitmann, P. Czermak. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 202, 118 (2015).
4. <http://www.pichia.com/science-center/commercialized-products/>
5. Research Corporation Technologies, Arizona, personal communication; [www.rctech.com](http://www.rctech.com).
6. Cregg J.M, et al. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. // *Mol. Biotechnol.* 2000. – V. 16(1) – P. 23–52.
7. Gerngross TU. Advances in the Production of Human Therapeutic Proteins in Yeast and Filamentous Fungi. // *Nat. Biotech.* 2004. – V. 22(11). – P. 1409–1414.
8. Julien, C. Production of humanlike recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Bio Process Int.* 2006. – V. 4. – P. 22-33.
9. Sreekrishna K, et al. High-Level Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. // *Biochem.* 1989. – V. 28(9). P. 4117–4125.