

MAQSADLI GENLARNI PICHIA PASTORIS ACHITQI HUJAYRAGA KIRITISH UCHUN ELEKTROKOMPETENT HUJAYRA TAYYORLASH

**M.R. Jumamurodova², O.N. Ashirov¹, T.X. Sadullayev¹,
A. M. Yarilkaganova¹, Sh.S. Azimova¹**

1. S.Yu. Yunusov nomidagi O‘simlik moddalari kimyosi instituti, Mirzo Ulug‘bek ko‘chasi 77, 100170, Toshkent, O‘zbekiston.
2. O‘zbekiston Milliy universiteti, 100174, Toshkent, O‘zbekiston.
jumamurodovam@gmail.com

Zamonaviy biotexnologiyada maqsadli genlarni mikroorganizmlarga kiritish jarayoni gen muhandisligining asosiy bosqichlaridan biridir. Buning uchun hujayralar begona DNKni o‘z ichiga qabul qila oladigan holatga, ya’ni kompetent holatga keltiriladi. Kompetent hujayralar tayyorlash usullari mikroorganizmlarning tabiiy yoki sun’iy genetik transformatsiyasini amalga oshirishda muhim ahamiyatga ega. Oddiy holatda bakteriya yoki boshqa hujayralar tashqi DNKni ichkariga o‘tkaza olmaydi, chunki ularning hujayra devori va membranasi himoya vazifasini bajaradi. Shuning uchun laboratoriyada hujayrani “kompetent”, ya’ni DNKni o‘tkaza oladigan holatga keltirish kerak bo‘ladi. Kompetent hujayra — bu gen muhandisligida ishlatiladigan maxsus tayyorlangan hujayra bo‘lib, unga maqsadli gen yoki plazmid DNK kiritish (transformatsiya qilish) mumkin. Genetik muhandislik va biotexnologiya sohasida olib borilgan ilmiy tadqiqotlar tahlili shuni ko‘rsatadiki, *Pichia pastoris* achitqi hujayrasi zamonaviy ekspression tizim sifatida ilm-fan va sanoatda keng qo‘llanilmoqda. Tadqiqotlarda ushbu mikroorganizmdan oqsil sintezida, ayniqsa, rekombinant oqsillarni ishlab chiqishda samarali platforma sifatida foydalanish imkoniyatlari keng yoritilgan [1]. Ba’zi manbalarda *Pichia pastoris* ning genetik tuzilmasi, uning oson boshqariladigan promotor tizimlari va yuqori darajadagi ekspressiya qobiliyati tahlil qilingan [2]. Shuningdek, tadqiqotchilar maqsadli genlarni ushbu hujayraga kiritish jarayonining bosqichlarini, xususan, vektorlar konstruksiyasi, transformatsiya metodlari va rekombinant klonlarni tanlab olish mexanizmlarini ilmiy jihatdan asoslab berganlar [3].

Materiallar va reaktivlar: *Pichia pastoris* X33 shtammi, YPD (1% li achitqi ekstrati, 2% li pepton, 2% li glyukoza), YPD agar (1% li achitqi ekstrati, 2% li pepton, 2% li glyukoza, 1.5% agar-agar), kolbalar, probirkalar, dazatorlar, sentrifuga, distillangan sovuq suv, 1M li sovuq sorbitol, stok buferi (1M sorbitol, 10mM Tris–HCl (pH 7.5), 40mM DTT (dithiothreitol)), sentrifuga.

Olingan natijalar va ularning muhokamasi: Kompetent hujayra uchun xoxlagan *Pichia pastoris* shtammlaridan foydalanish mumkin. Biz *Pichia pastoris* X33 shtammidan foydalandik. Petri chashkasidagi X33 shtammi yangi YPD agar chashkasiga ekiladi va 40 soat 30 °C da termostatda qoldiriladi. Chunki keying jarayon uchun hujayraning yosh bo'lishi muhim hisoblanadi. O'sib chiqqan hujayradan bir koloniya olinib 5ml YPD li ozuqa muhitiga ekiladi va shaker inkubatoridan 28-30 °C 12soat davomida o'stiriladi. Keyin o'sha probirkadagi kulturadan 200 mkl olinib 500 ml YPD muhitiga ekiladi u ham 12 soat davomida 28-30°C haroratda o'stiriladi. O'sgan achitqi kulturasini 50 ml'lik probirkalarga solinib, 15min davomida 4500 ay/min tezlikda 4°C da sentrifuga qilinadi. Supernatant olib tashlanadi va distillangan suv bilan 4-5 marta chayib olinadi, har bir chayishda sentrifuga qilinadi, supernatant olib tashlanib 4°C dagi toza suv solinadi. Oxirgi sentrifugadan olingandan keyin cho'kma usti to'kib tashlanadi va ustiga ustiga stok buferi solinib 30 minutga xona haroratida inkubatsiya qilinadi. Hujayra massasi yuqoridagi kabi sentrifuga qilinadi va supernatant olib tashlanadi. Cho'kma ustiga 40ml 1M suvuq sorbitol solinib vortex qilinadi va sentrifugada 4500 tezlikda 10 minut davomida cho'ktiriladi. Oxirgi bosqichda cho'kma ustiga 1-2 ml 1M sovuq sorbitol solinadi va shu bosqichlardan so'ng kompetent hujayraiz tayyor holatga keladi.

Xulosa: Maqsadli genlar transformatsiyasida kompetent hujayra tayyorlash muhim bosqichlardan biri xisoblanadi. Shuning uchun har bir bosqichni sterill holatda va to'g'ri bajarish muhim ahamiyat kasb qiladi va sof hujayra olishga yordam beradi.

Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati

1. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., & Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), 3376–3385.
2. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270.
3. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317.



GLOBAL SCHOLARS
SCIENTIFIC PUBLISHING