



MAQSADLI GENLARNI PICHIA PASTORIS ACHITQI HUJAYRASIGA KIRITISH JARAYONI BOSQICHLARI

**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

Annotatsiya. Ushbu ishda maqsadli genlarni *Pichia pastoris* achitqi hujayrasiga kiritish jarayoni, uning bosqichlari va biotexnologik ahamiyati yoritilgan. Tadqiqotda gen injiniringining zamonaviy yondashuvlari, xususan rekombinant DNK texnologiyasi, transformatsiya jarayonlari hamda ekspressiya tizimlarini yaratish mexanizmlari tahlil qilingan. Shuningdek, *Pichia pastoris* ni genetik modifikatsiya qilishda qo'llaniladigan vektorlar, promotorlar va seleksiya markerlarining roli ochib berilgan. Mazkur jarayonning farmatsevtika, oziq-ovqat sanoati va ferment ishlab chiqarish sohalaridagi amaliy ahamiyati ham yoritilgan.

Kalit so'zlar. *Pichia pastoris*, gen muhandisligi, transformatsiya, rekombinant DNK, ekspressiya tizimi.

Annotation. This work describes the process of introducing target genes into *Pichia pastoris* yeast cells, focusing on its stages and biotechnological significance. The study analyzes modern approaches to genetic engineering, including recombinant DNA technology, transformation procedures, and mechanisms of expression system development. The roles of vectors, promoters, and selection markers used in the genetic modification of *Pichia pastoris* are discussed in detail. The practical applications of this process in pharmaceuticals, food production, and enzyme industries are also highlighted.

Key words. *Pichia pastoris*, genetic engineering, transformation, recombinant DNA, expression system.





Аннотация. В работе рассматривается процесс внедрения целевых генов в клетки дрожжей *Pichia pastoris*, его основные этапы и биотехнологическое значение. Проанализированы современные методы генной инженерии, включая технологии рекомбинантной ДНК, процессы трансформации и создание экспрессионных систем. Подробно раскрыта роль векторов, промоторов и маркеров селекции, применяемых при генетической модификации *Pichia pastoris*. Также показано практическое значение данного процесса для фармацевтической, пищевой и ферментной промышленности.

Ключевые слова: *Pichia pastoris*, генная инженерия, трансформация, рекомбинантная ДНК, экспрессионная система.

Kirish. Zamonaviy biotexnologiyada genetik muhandislik usullarining jadal rivojlanishi turli organizmlarda, jumladan, achitqi hujayralarida maqsadli genlarni kiritish, ifodalash va o'zgartirish imkonini bermoqda. Shulardan biri bo'lgan *Pichia pastoris* turi hozirgi kunda eng samarali ekspression tizimlardan biri sifatida e'tirof etiladi. Ushbu achitqi mikroorganizmi o'zining genetik barqarorligi, yuqori darajadagi oqsil sintezi, eukariot tizimlarga xos posttranslyatsion modifikatsiyalarni amalga oshirish qobiliyati va oson o'sish sharoitlari bilan ajralib turadi. *Pichia pastoris* hujayralariga maqsadli genlarni kiritish jarayoni bir necha bosqichlardan iborat bo'lib, ularga gen konstruksiyasini yaratish, vektorlarni tayyorlash, transformatsiya qilish, rekombinant klonlarni tanlab olish hamda oqsil ifodalanishini nazorat qilish kiradi. Har bir bosqich o'zining aniq metodologiyasi va texnologik yondashuvlariga ega bo'lib, jarayonning yakuniy natijasiga bevosita ta'sir ko'rsatadi. Hozirgi kunda *Pichia pastoris* asosida ishlab chiqilgan ekspression tizimlar farmatsevtika, oziq-ovqat sanoati, biofarmatsevtika va ferment ishlab chiqarish sohalarida keng qo'llanilmoqda. Ayniqsa, murakkab oqsillar, vaksinalar va terapevtik fermentlarni ishlab chiqarishda ushbu tizimning afzalliklari yaqqol namoyon bo'lmoqda. Shu sababli, *Pichia pastoris* ni genetik modifikatsiya qilish jarayonini chuqur o'rganish, uning har bir bosqichida yuz beruvchi molekulyar o'zgarishlarni tahlil qilish va amaliy samaradorligini oshirish bugungi biotexnologik tadqiqotlarning dolzarb yo'nalishlaridan biri hisoblanadi. Mazkur yo'nalishda olib borilayotgan izlanishlar biologik faol moddalarning samarali sintezi, yuqori sifatli biopreparatlar ishlab chiqish hamda biotexnologik ishlab chiqarish jarayonlarini optimallashtirish uchun muhim ilmiy va amaliy asos yaratadi. Shu





jihatdan, *Pichia pastoris* hujayrasiga maqsadli genlarni kiritish jarayonining bosqichlarini tizimli o'rganish, ularning samaradorlik darajasini baholash va yangi texnologik yondashuvlarni ishlab chiqish biotexnologiyaning kelajakdagi rivoji uchun muhim ahamiyat kasb etadi.

Adabiyotlar tahlili. 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]. Ayrim ilmiy ishlar *Pichia pastoris* asosida ishlab chiqilgan ekspression tizimlarning sanoat miqyosidagi qo'llanilishini, ularning farmatsevtika, biofarmatsevtika va oziq-ovqat sohalarida yuqori samaradorlik ko'rsatganini qayd etadi [4]. Bundan tashqari, ilmiy adabiyotlarda *Pichia pastoris* tizimida ishlatiladigan promotorlar, seleksiya markerlari va signal peptidlarning oqsil ifodalanishiga ta'siri, ularning molekulyar darajadagi o'zaro bog'liqligi keng o'rganilgan [5]. Xorijiy manbalarda ushbu achitqi turida posttranslyatsion modifikatsiyalar, masalan, glikozillanish jarayonlari eukariot tizimlarga yaqin kechishi sababli, murakkab terapevtik oqsillar ishlab chiqarishda *Pichia pastoris* ning afzalliklari alohida ta'kidlangan [6]. Shu bilan birga, mahalliy tadqiqotlarda ham ushbu mikroorganizmdan foydalanish imkoniyatlari, uning genetik transformatsiyasini takomillashtirish, seleksiya tizimlarini soddalashtirish va biotexnologik jarayonlarning samaradorligini oshirishga qaratilgan ilmiy yondashuvlar yoritilgan [7]. Mazkur adabiyotlar tahlili shuni ko'rsatadiki, *Pichia pastoris* hujayralariga maqsadli genlarni kiritish va ularning ifodalanishini boshqarish mexanizmlari biotexnologiya rivojida asosiy ilmiy yo'nalishlardan biri bo'lib, u yuqori samarali biopreparatlar va innovatsion biofarmatsevtik mahsulotlar yaratishda muhim ahamiyat kasb etadi.





Materiallar va usullar. Mazkur tadqiqotda *Pichia pastoris* achitqi hujayrasiga maqsadli genlarni kiritish jarayonining bosqichlarini o'rganish uchun genetik muhandislikning zamonaviy laboratoriya usullari, molekulyar biologiya texnikalari va biotexnologik tahlil metodlari qo'llanildi. Tadqiqot materiali sifatida *Pichia pastoris* GS115 shtammi va maqsadli genni o'z ichiga olgan rekombinant DNK konstruktsiyasi tanlandi. Gen konstruktsiyasini yaratish bosqichida plazmid vektorlardan, xususan pPIC9S va pGAP seriyali vektorlardan foydalanildi, ular *Pichia pastoris* hujayralarida yuqori darajada ifoda beruvchi promotorlar – AOX1 yoki GAP promotorlari bilan ta'minlangan. Genetik materialni vektorga kiritish uchun restriksion fermentlar yordamida kesish va ligatsiya reaksiyalari amalga oshirildi, so'ngra olingan konstruktsiyalar bakterial hujayralar (odatda *Escherichia coli*) orqali ko'paytirildi. Keyingi bosqichda vektor DNKsi maxsus tayyorlangan *Pichia pastoris* hujayralariga transformatsiya usuli orqali kiritildi. Transformatsiya qilishda elektr impulsi yordamida hujayra membranasini vaqtinchalik o'tkazuvchan holatga keltiruvchi elektroporatsiya metodi qo'llanildi, bu esa maqsadli genning hujayra genomiga integratsiyasini ta'minladi. Transformatsiyadan so'ng hujayralar antibiotik (masalan, zeosin) yordamida seleksiya jarayonidan o'tkazilib, rekombinant klonlar tanlab olindi. Tanlab olingan koloniyalar PCR (polimeraza zanjir reaksiyasi) orqali tekshirilib, genning muvaffaqiyatli kiritilgani molekulyar darajada tasdiqlandi. Shuningdek, transformatsiyalangan hujayralarda maqsadli oqsilning ifodalanish darajasi SDS-PAGE elektroforezi va Western blot tahlili yordamida baholandi. Tadqiqot jarayonida har bir bosqichning samaradorligi nazorat qilinib, transformatsiya sharoitlari (DNK miqdori, hujayra zichligi, elektroporatsiya kuchlanishi va regeneratsiya muhiti) optimallashtirildi. Olingan ma'lumotlar asosida *Pichia pastoris* da gen ekspressiyasining barqarorligi, oqsil sintezi darajasi hamda tizimning biotexnologik samaradorligi aniqlanib, jarayonni takomillashtirish bo'yicha tavsiyalar ishlab chiqildi. Shu tarzda qo'llanilgan materiallar va usullar maqsadli genlarni *Pichia pastoris* hujayralariga kiritish, ularning integratsiya mexanizmini tushuntirish va ifoda jarayonining samaradorligini oshirishga ilmiy asos yaratdi.





1-jadval. Pichia pastoris achitqi hujayrasiga maqsadli genlarni kiritish jarayonining asosiy bosqichlari

Bosqich nomi	Amalga oshiriladigan jarayon	Maqsad	Kutilayotgan natija
Gen konstruktsiyasini yaratish	Maqsadli genni vektorga joylashtirish, restriksion fermentlar va ligaza fermentlari yordamida DNK rekombinatsiyasi	Ifoda uchun mos ekspression vektor yaratish	Rekombinant plazmid konstruktsiyasi tayyorlanadi
Vektor klonlanishi	E. coli hujayralarida rekombinant plazmidni ko'paytirish	Vektor nusxalarini ko'paytirish va tahlil uchun saqlash	Ko'p miqdorda toza plazmid DNK olinadi
Transformatsiya	Elektroporatsiya yo'li bilan vektor DNKni Pichia pastoris hujayrasiga kiritish	Genning hujayra genomiga integratsiyasini ta'minlash	Transformatsiyalangan hujayralar olinadi
Seleksiya	Antibiotik yordamida rekombinant klonlarni tanlab olish	Faqat genni muvaffaqiyatli qabul qilgan hujayralarni ajratish	Barqaror transformantlar tanlanadi
Ifoda tahlili	SDS-PAGE va Western blot yordamida oqsil ifodalanishini aniqlash	Maqsadli oqsilning sintez darajasini aniqlash	Ifodaning samaradorligi baholanadi

Yuqoridagi jadval Pichia pastoris achitqi hujayrasiga maqsadli genlarni kiritish jarayonining barcha bosqichlarini izchil tarzda yoritib beradi. Jadvalda har bir bosqichda bajariladigan asosiy amallar, ularning maqsadi hamda kutilayotgan natijalari ko'rsatilgan bo'lib, bu jarayonning umumiy tuzilmasini to'liq ifodalaydi. Avvalo, gen konstruktsiyasini yaratish bosqichi tadqiqotning boshlang'ich nuqtasi bo'lib, unda





maqsadli gen ifoda uchun mos ekspression vektorga joylashtiriladi. Keyingi bosqichda bu vektor bakterial hujayralarda ko'paytiriladi va toza DNK shaklida olinadi. Transformatsiya jarayoni eng muhim bosqichlardan biri hisoblanib, unda genetik material *Pichia pastoris* hujayrasiga elektroporatsiya orqali kiritiladi. Shundan so'ng seleksiya bosqichida antibiotik yordamida faqat genni muvaffaqiyatli qabul qilgan transformantlar tanlab olinadi. Yakuniy bosqichda esa ifoda tahlili o'tkazilib, maqsadli oqsilning sintez darajasi baholanadi. Jadval mazmuni shuni ko'rsatadiki, ushbu jarayonning har bir bosqichi o'zaro chambarchas bog'langan bo'lib, ularning ketma-ket va to'g'ri bajarilishi gen muhandisligi tajribalarining muvaffaqiyatini belgilaydi.

Tadqiqot muhokamasi. O'tkazilgan tadqiqotlar natijalarining tahlili shuni ko'rsatdiki, maqsadli genlarni *Pichia pastoris* achitqi hujayrasiga kiritish jarayoni bir necha omillarga bog'liq bo'lib, har bir bosqichning to'g'ri bajarilishi yakuniy natijaning samaradorligini belgilaydi. Avvalo, gen konstruksiyasini to'g'ri tanlash va mos promotor tizimidan foydalanish maqsadli oqsilning ifoda darajasiga bevosita ta'sir ko'rsatadi. AOX1 promotoridan foydalanilgan holatlarda metanol induksiyasi orqali oqsil ishlab chiqarish sezilarli darajada oshgani kuzatildi, bu esa *Pichia pastoris* ning metilotrof xususiyatidan samarali foydalanish imkonini berdi. Biroq ba'zi hollarda, doimiy ifoda beruvchi GAP promotorining qo'llanilishi ishlab chiqarish jarayonini soddalashtirgan va metanolga bo'lgan ehtiyojni bartaraf etgan. Transformatsiya bosqichida elektroporatsiya parametrlari muhim rol o'ynadi: elektr impulsi kuchi va davomiyligi optimal diapazonda saqlanganda, gen integratsiya samaradorligi yuqori natija berdi. Hujayra regeneratsiyasi uchun tanlangan oziqlantiruvchi muhit ham transformatsiyalangan koloniyalarning o'sish sur'atiga sezilarli ta'sir ko'rsatdi. Tanlab olingan rekombinant klonlarda PCR tahlili orqali genning muvaffaqiyatli kiritilgani molekulyar darajada isbotlandi, bu esa transformatsiya jarayonining to'g'ri tashkil etilganini ko'rsatadi. Oqsil ifodalanishini baholash jarayonida SDS-PAGE natijalari asosida maqsadli oqsilning kutilgan molekulyar massaga ega bo'lgani, Western blot tahlili esa ifoda qilingan oqsilning spesifikligini tasdiqladi. Shuningdek, tadqiqot davomida transformatsiya samaradorligini oshirish uchun hujayra zichligi, DNK miqdori va regeneratsiya davrini optimallashtirish bo'yicha eksperimental tajribalar o'tkazildi. Olingan ma'lumotlarga ko'ra, DNKning yuqori konsentratsiyasi yoki elektr impulsi kuchining ortiqcha qo'llanilishi hujayralarning nobud bo'lishiga olib kelgan,





bu esa optimal parametrlarni aniqlash zarurligini ko'rsatgan. Barcha bosqichlarning chuqur tahlili *Pichia pastoris* tizimining genetik transformatsiya uchun ishonchli va mos platforma ekanligini tasdiqladi.

Xulosa. O'tkazilgan tadqiqotlar natijalariga ko'ra, *Pichia pastoris* achitqi hujayrasi maqsadli genlarni kiritish va ularni yuqori darajada ifoda qilish uchun eng istiqbolli ekspression tizimlardan biri ekanligi aniqlandi. Gen konstruksiyasini to'g'ri tanlash, mos promotorlardan (AOX1 yoki GAP) foydalanish hamda transformatsiya sharoitlarini optimallashtirish oqsil sintezi samaradorligini sezilarli darajada oshiradi. Elektroporatsiya usuli orqali genning hujayra genomiga integratsiyasi yuqori aniqlik bilan amalga oshirildi va transformatsiyalangan klonlarda barqaror ifoda kuzatildi. Olingan natijalar *Pichia pastoris* tizimi nafaqat laboratoriya darajasida, balki sanoat miqyosida ham rekombinant oqsillar ishlab chiqarishda samarali platforma sifatida foydalanilishi mumkinligini tasdiqlaydi. Shu bilan birga, tadqiqot davomida aniqlangan optimal sharoitlar gen muhandisligi va biotexnologiya sohasida keyingi ilmiy izlanishlar uchun amaliy ahamiyat kasb etadi.

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.
4. Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119–138.





5. Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66.
6. Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2013). *Pichia pastoris*: Protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiology*, 8(2), 191–208.
7. Karimov, A. B., & Alimova, D. S. (2021). Biotexnologiyada *Pichia pastoris* achitqisidan foydalanish imkoniyatlari. *O‘zbekiston Biotexnologiya Jurnal*i, 3(1), 56–62.

