

June 2019

Gradient precipitation of recombinant proteins contained in silkworm larvae (*Bombyx mori*) with ammonium sulphate

Abdurhakhmanov Jaloliddin

Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, jaloliddin0919@mail.ru

Sasmakov Sobirdjan

Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, sasmakov@web.de

Khasanov Shuhrat

Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, sh.sh.hasanov@mail.ru

Ashirov Oybek

Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, oybek2425@mail.ru

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/cce>

 Part of the [Biochemical and Biomolecular Engineering Commons](#)

Recommended Citation

Jaloliddin, Abdurhakhmanov; Sobirdjan, Sasmakov; Shuhrat, Khasanov; and Oybek, Ashirov (2019) "Gradient precipitation of recombinant proteins contained in silkworm larvae (*Bombyx mori*) with ammonium sulphate," *CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING*: Vol. 2019 : No. 2 , Article 16. Available at: <https://uzjournals.edu.uz/cce/vol2019/iss2/16>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact sh.erkinov@edu.uz.

GRADIENT PRECIPITATION OF RECOMBINANT PROTEINS CONTAINED IN SILKWORM LARVAE (BOMBYX MORI) WITH AMMONIUM SULPHATE

Jaloliddin ABDURHAKHMANOV (jaloliddin0919@mail.ru), Sobirdjan SASMAKOV (sasmakov@web.de), Shuhrat KHASANOV (sh.sh.hasanov@mail.ru), Oybek ASHIROV (oybek2425@mail.ru), Farxod ESHBOEV, Shaxnoz AZIMOVA
Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan

We investigated the protein extract of silkworm larvae. For the first time, an extract containing proteins from silkworm larvae, obtained by fractional precipitation using ammonium sulfate, was studied. As a result of experiment is established, that solutions of ammonium sulfate with a concentration from 20% to 65% are optimal for the sedimentation of protein molecules with a mass in the range of 25 and 45 kDa. Optimal results of the study proposed to use in the process of purification of recombinant proteins.

Keywords: recombinant proteins, silkworm larvae, homogenate, supernatant, centrifugation, ammonium sulfate, SDS-PAGE.

ГРАДИЕНТНОЕ ОСАЖДЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ СОДЕРЖАЩИХСЯ В ТУТОВОМ ШЕЛКОПРЯДЕ (БОМБУХ МОРИ) С ПОМОЩЬЮ СУЛЬФАТА АММОНИЯ

Жалолiddин Мирджамильевич АБДУРАХМАНОВ (jaloliddin0919@mail.ru), Собирджан Анарматович САСМАКОВ (sasmakov@web.de), Шуҳрат Шавкатович ХАСАНОВ (sh.sh.hasanov@mail.ru), Ойбек Норбой ўгли АШИРОВ (oybek2425@mail.ru), Фарход ЭШБОЕВ, Шахноз Садықовна АЗИМОВА
Институт химии растительных веществ, Ташкент, Узбекистан

Впервые исследован экстракт, содержащий белки из личинок тутового шелкопряда, полученный фракционным осаждением с помощью сульфата аммония. В результате проведенных экспериментов было установлено, что растворы сульфата аммония с концентрацией от 20% до 65% являются оптимальными для седиментации белков личинок тутового шелкопряда с массой 25-45 кДа. Оптимальные результаты исследования предложено использовать в процессе очистки рекомбинантных белков.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, личинка тутового шелкопряда, гомогенат, супернатант, центрифугирование, сульфат аммония, SDS-ПААГ.

TUT IPAK QURTI (BOMBYX MORI) TARKIBIDAGI REKOMBINANT OQSILLARNI AMMONIY SULFAT TUZI YORDAMIDA GRADIENTLAB CHO'KTIRISH

Jaloliddin Mirjamilyevich ABDURAXMANOV (jaloliddin0919@mail.ru), Sobirdjan Anarmatovich SASMAKOV (sasmakov@web.de), Shuhrat Shavkatovich XASANOV (sh.sh.hasanov@mail.ru), Oybek Norboy o'g'li ASHIROV (oybek2425@mail.ru), Farxod ESHBOEV, Shaxnoz Sodiqovna AZIMOVA
O'simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O'zbekiston

Biz o'z tajribalarimizni tut ipak qurti lichinkalaridan olingan oqsilli ekstrakti o'rganishga qaratdik. Bunda ammoniy sulfat tuzi yordamida gradientlab cho'ktirish amaliyoti tut ipak qurti lichinkalaridan olingan oqsilli ekstrakt ustida ilk bor amalga oshirildi. Natijada, o'tkazilgan tajribalar davomida ammoniy sulfat tuzining konsentratsiyasi 20% dan 65% gacha bo'lgan oraliqdagi eritmalarini tut ipak qurti lichinkalari tarkibidagi 25-45 kDa og'irlikdagi reкомбинант oqsillarni cho'ktirish yo'li bilan ajratib olish uchun eng optimal ekanligi aniqlandi. Tadqiqot xulosasiga ko'ra erishilgan eng optimal natijalar reкомбинант oqsillarni toza holda ajratib olish texnologik jarayonlarida qo'llashga tavsiya etildi.

Kalit so'zlar: reкомбинант oqsillar, tut ipak qurti lichinkalari, gомогенат, супернатант, sentrifugalash, ammoniy sulfat, SDS-PAAG.

Kirish

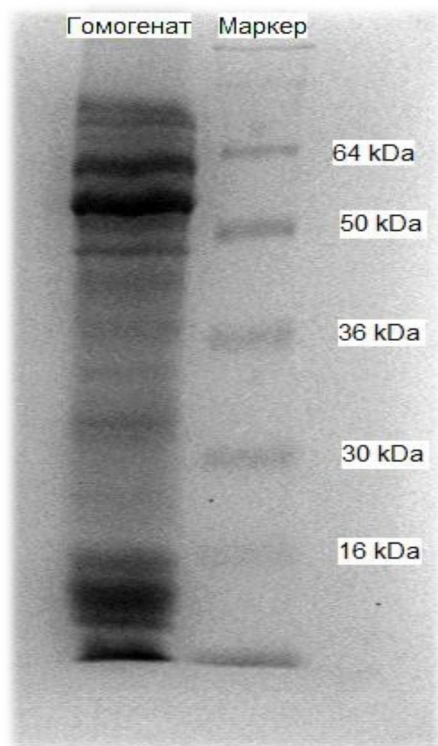
Oqsillarni ishqoriy va ishqoriy yer metall tuzlari yordamida, cho'ktirib fraksiyalanganda ular odatda o'z nativ xossalari saqlab qoladi.

Oqsillarni cho'ktirishda qo'llaniladigan tuzlarning samaradorligi ularning eruvchanligi va to'yinish darajasi kabi fizik xossalari bilan xarakterlanadi. Ular orasidan tannarxi arzon, hamda effektiv bo'lgan sulfatlar, fosfatlar, natriy sitrat, kaliy sitrat va ammoniy sitratlarni sanab o'tish mumkin. Ushbu tuzlar yordamida oqsil eritmalarida yuqori konsentrlangan tuzli eritmalar hosil qilinadi. Turli tezlanishli sentrifugalash yo'li bilan kerakli bo'lgan ma'lum o'lchamdagi oqsil eritmalarining tuzli cho'kmalari olinadi.

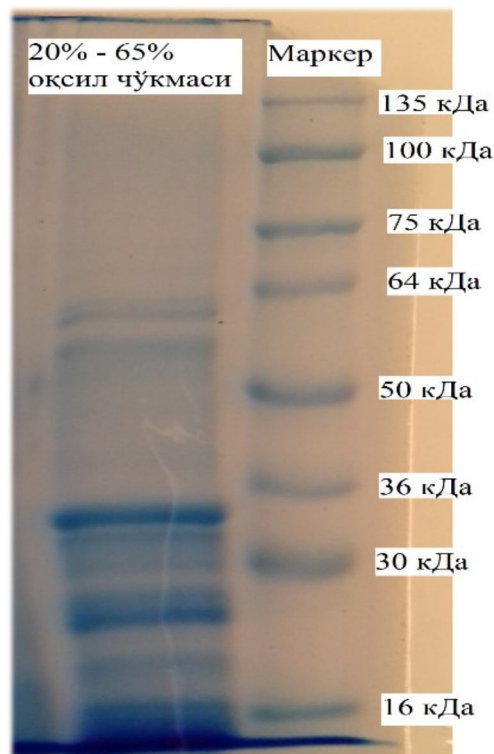
Bunda sentrifugalash effektivligi erituvchining zichligi bilan oqsil cho'kmasining zichligi orasidagi farq bilan belgilanadi. Zichliklar orasidagi tafovut qancha katta bo'lsa effektivlik shuncha yuqori bo'ladi. Shundan so'ng dializ yoki gel-filtratsiya usuli bilan oqsil cho'kmasidan tuzlar ajratib olinadi va kerakli oqsil eritmaga o'tadi, ushbu holatda oqsilning biologik faolligini saqlanib qolishiga erishiladi [1, 2].

Oxirgi yillarda turli xil biologik faol reкомбинант oqsillarni bakulovirus/hashorat ekspressiya tizimida olish uchun tut ipak qurti lichinkalaridan "biofabrika" sifatida samarali foydalanilmoqda. Ushbu tizimning afzalligi shundan iboratki, mazkur tizimda olinadigan reкомбинант oqsillarning funktsional hususiyatlari tabiiy analoglaridan deyarli farq qilmaydi. Sintezlanayotgan oqsilning unumi bevosita uning ekspressiyasida foydalanilayotgan genetik konstruksiyalar va "biofabrikalar" deb nomlanuvchi replikatsiya manbalariga bog'liqdir [3-6]. Tut ipak qurtlarini qisqa muddatda (20 kun ichida 0,5 mg dan 4-5 g gacha massa yig'a olishi) va unchalik qimmat bo'lmagan sharoitda yetishtirish imkoniyati, mazkur lichinkalardan "bioreaktor" sifatida foydalanib, atrof-muhitga zarar yetkazmagan holda yuqori unum bilan reкомбинант oqsillarni sintez qilish imkoniyatini beradi [7, 8].

Tadqiqotning asosiy maqsadi tut ipak qurtida sintezlangan umumiy oqsillar tarkibidan ma'lum o'lchamdagi reкомбинант oqsillarni ammoniy sulfat tuzi yordamida gradientlab cho'ktirishning optimal sharoitlarini aniqlashdan iboratdir.



1-rasm. Tut ipak qurtidan ajratib olingan oqsilli ekstraktning (gomogenat) PAAG elektroforezi.



2-rasm. Gomogenatdan 20-65% foizli ammoniy sulfat tuzi yordamida ajratib olingan oqsil fraksiyalarining PAAG elektroforezi.

Tadqiqot usullari

Tadqiqot quyidagi ketma – ketlikda bajarildi:

Dastlab 4 g og'irlikdagi tut ipak qurti lichinkalari (*Bombyx mori*) suyuq azotda muzlatiladi va "Sartorius – Potter S" markali gomogenizatorida maydalaniladi. Maydalangan massaga 1:5 nisbatda (1 g biomassa: 5ml bufer) ya'ni 20 ml pH-7.8 bo'lgan 0.1M Tris-HCl buferi qo'shiladi. Ushbu bufer (gomogen bufer) ning tarkibi quyidagicha:

- 0.1M Tris, pH 7,4;
- 0,10% natriy laurilsulfat tuzi (SLS);
- 0,09% etilendiamintetrauksus kislotalasi (EDTA);
- 2mM fenilmetilsulfonil ftorid (PMSF).

Bu yerda SLS - natriy laurilsulfat tuzi sirt faol modda, EDTA - etilendiamintetrauksus kislotalasi metalloproteazalar ingibitori, PMSF - fenilmetilsulfonil ftorid esa serin proteazalar ingibitori bo'lib hisoblanadi. Hujayralarning to'liq yorilishi va rekombinant oqsillarni eritmaga maksimal miqdorda o'tishi uchun gomogenatga UZDN-1 markali dezintegrator yordamida 22 kHz chastota ostida 1 daqiqa davomida ultratovush bilan ishlov berildi (jarayon muz xammomida olib borildi). Shundan so'ng 4 soat davomida +4 °C xarorat ostida magnitli aralastirgichda inkubatsiya qilinadi. Gomogenat 30 daqiqa davomida 4500 tez/daq tezlanish bilan +4°C temperaturada sentrifugalandi va supernatant ajratib olindi. Ajratib olingan ushbu supernatant keyingi bosqichlarda ammoniy sulfat tuzining turli xil foizli eritmalarida (10% - 50%; 15% - 50%; 15% - 55% va h.) cho'ktirib tozalash jarayonlaridan o'tkazildi.

Natijalar va muhokama

Oqsillarni gradientlab cho'ktirishda qo'llaniladigan tuzlar o'zaro taqqoslab o'rganilganda ammoniy sulfat o'zining ba'zi afzalliklari bilan ajralib turadi. Ammoniy sulfatning eruvchanligi 0-30 °C temperatura oralig'ida deyarli o'zgarmaydi. Uning suvdagi to'yingan eritmasining konsentratsiyasi 4 M tashkil qiladi. Ushbu to'yingan eritmaning zichligi 1,235 g/sm³, eritmadagi oqsillar agregatining zichligi esa 1,29 g/sm³ ni tashkil etadi. Bundan ko'rinadiki turli tezlanishli sentrifugalash yordamida bunday oqsillar agregatini osonlik bilan cho'ktirib olish mumkin bo'ladi. Ammoniy sulfat kimyoviy jihatdan toza holda keng tarqalgan va shu sababli ham arzon reaktiv hisoblanadi. Ba'zi hollarda unga temir kabi og'ir metallar aralashgan bo'ladi va bunday kirlanishlarning darajasi 1/1000000 tashkil etib, cho'ktirish jarayonidagi biokimyoviy faollikka hech qanday ta'sir o'tkazmaydi. Ma'lumki, oqsillarni ajratib olish jarayonidagi fraksiyalash bosqichi, oqsil faolligini yuqori darajada saqlanib qolishi va uning tozalik darajasi o'rtasidagi mutanosiblikni ta'minlashga qaratilgan optimal yechimlarga ega bo'lishi lozimdir. Oqsillarni ammoniy sulfat yordamida fraksiyalash boshqa usullarda bo'lmagan muhim bir afzallikka ega, ya'ni bu tuz oqsillarning parchalanishini oldini olib, uning barqarorligini ta'minlaydi. Ammoniy sulfat tuzining 2-3 M eritmasidagi oqsillar cho'kmasi yoki kristallarining suspenziyalari uzoq yillar davomida barqarorligini yo'qotmaydi va proteoliz, hamda bakteriyalar ta'siridan holi bo'ladi. Tuzlar bilan oqsilni cho'ktirishda oqsilning tabiati, tuzlarning konsentratsiya-

si, hamda eritmaning pH va harorati kabi parametrlari muhim ahamiyatga ega hisoblanadi [9, 10]. Tajribalarimiz davomida oqsil namunalarini ammoniy sulfat tuzi yordamida gradientli cho'ktirish amaliyoti bajarildi. Bunda, aralashmani dastlab yuqori molekulyar oqsillardan qutulish uchun 20% li $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eritmasi bilan, so'ngra kerakli massaga ega bo'lgan oqsillarni (25-45 kDa) ajratish uchun 65% li $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eritmasi bilan cho'ktirish eng optimal miqdorlar ekanligi aniqlandi. Cho'ktirib olingan namunalar ikki xil usulda tuzsizlantirildi: sephadex G-25 yuklangan kolonka orqali o'tkazish yoki maxsus membranali xaltachalar yordamida dializlash orqali. Olingan namunalar poliakrilamid gelidagi (PAAG) elektroforez usuli yordamida tahlil qilindi (1- va 2- rasmlar).

Xulosa

Tajribalarimiz davomida ammoniy sulfat tuzi yordamida gradientlab cho'ktirish amaliyoti tut ipak qurti lichinkalaridan (*Bombyx mori*) olingan oqsilli ekstrakt ustida ilk bor amalga oshirildi.

Natijada tut ipak qurti lichinkalarida sintezlangan 25-45 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsillarni ajratib olish uchun ammoniy sulfat tuzining 20% dan 65% gacha bo'lgan oraliqdagi eritmaları yordamida cho'ktirish eng maqbul ekanligi aniqlandi.

Tadqiqot xulosasiga ko'ra erishilgan eng optimal natijalar rekombinant oqsillarni toza holda ajratib olish texnologik jarayonlarida qo'llashga tavsiya etildi.

REFERENCES

1. Scopes R.K. *Protein Purification: principles and practice* [Separation by Precipitation] New York, Springer-Verlag, 1994, 422 p.
2. Остерман Л.А. *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот*. [Methods for the study of proteins and nucleic acids]. Moscow, Nauka, 1981. 286 p.
3. Lee J.M, Mon H., Banno Y., Iiyama K., Kusakabe T. *Bombyx Mori* strains useful for efficient recombinant protein production using a baculovirus vector. *Japan Journal of Biotechnol Biomaterial*. 2012, February. doi: 10.4172/2155-952X.S9-003
4. Kajikawa M., Sasaki K., Wakimoto Y., Toyooka M., Motohashi T., et al. Efficient silkworm expression of human GPCR (nociceptin receptor) by a *Bombyx mori* bacmid DNA system. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009, 385: 375-379 pp. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463790>
5. Honjo E, Shoyama Y, Tamada T, Shigematsu H, Hatanaka T, et al. Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor alpha chain and interleukin-13 receptor alpha1 chain by a silkworm-baculovirus system. *Protein Expr Purif*. 2008, vol. 60, no. 1, pp. 25-30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467124>
6. Lihoradova O.A., Bachurina E.Yu., Azimova Sh.S. Biosynthesis of the Recombinant Middle Surface Antigen of the Human Hepatitis B Virus in Silkworm Larvae. *Molecular Biology*, 2004, no. 4. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3AMBIL.0000037014.85886.fc>
7. Motohashi T, Shimojima T, Fukagawa T, Maenaka K, Park E.Y. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 326: 564-569 pp. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596136>
8. Kajikawa M., Sasaki-Tabata K., Fukuhara H., Horiuchi M., Okabe Y., et al. Silkworm Baculovirus expression system for molecular medicine. *Japan Journal of Biotechnol Biomaterial*. 2012, March. doi: 10.4172/2155-952X.S9-005.
9. Ahmed H. *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*. US, CRC Press, 2005. 410 p.
10. Keith W., John W. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. New York, Cambridge University Press, 2010. 756 p.