

March 2020

## Study of recombinant protein fractions from the *Bombyx mori* and *Pichia pastoris* using "native page" method

Abdurhakhmanov aloliddin

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

Sasmakov Sobirdjan

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

Khasanov Shuhrat

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

Ashirov Oybek

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

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

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

---

### Recommended Citation

aloliddin, Abdurhakhmanov; Sobirdjan, Sasmakov; Shuhrat, Khasanov; and Oybek, Ashirov (2020) "Study of recombinant protein fractions from the *Bombyx mori* and *Pichia pastoris* using "native page" method," *CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING*: Vol. 2020 : No. 1 , Article 12.

Available at: <https://uzjournals.edu.uz/cce/vol2020/iss1/12>

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](mailto:sh.erkinov@edu.uz).

## STUDY OF RECOMBINANT PROTEIN FRACTIONS FROM *THE BOMBYX MORI* AND *PICHIA PASTORIS* USING "NATIVE PAGE" METHOD

Jaloliddin ABDURHAKHMANOV (jaloliddin0919@mail.ru), Sobirdjan SASMAKOV (sasmakov@web.de),  
Shuhrat KHASANOV (sh.sh.hasanov@mail.ru), Oybek ASHIROV (oybek2425@mail.ru),  
Shakhnoz AZIMOVA (genlab\_icps@yahoo.com)  
Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan

We have studied the recombinant protein fractions of ~24-34 kDa obtained from *Bombyx mori* - silkworm larvae and yeast *Pichia pastoris*. Fractions, containing the recombinant proteins by gel-electrophoresis using the "Native PAGE" method, which allows for differentiation of proteins according to their natural (surface) charge and conformational properties were studied. The results showed that the recombinant protein fraction from *Bombyx mori* (~34 kDa) consisted of four components and fraction from *Pichia pastoris* (~24 kDa) consisted one component. The most optimal conditions for the "Native PAGE" - the main gel: Tris HCl (pH-8.8) 244 mM, Bis-Acrylamide 10%, TEMED 0.08%, APS 0.08%; concentration gel: Tris HCl (pH-6.8) 125 mM, Bis-Acrylamide 4%, TEMED 0.05%, APS 0.05% were found.

**Keywords:** Bombyx mori, Pichia pastoris, recombinant proteins, extract, gel filtration, sephadex, electrophoresis "Native PAGE", coomassie G-250

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗ *BOMBYX MORI* И *PICHIA PASTORIS* МЕТОДОМ НАТИВНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Жалолiddин Мирджамилевич АБДУРАХМАНОВ (jaloliddin0919@mail.ru),  
Собирджан Анарматович САСМАКОВ (sasmakov@web.de), Шуҳрат Шавкатович ХАСАНОВ (sh.sh.hasanov@mail.ru),  
Ойбек Норбой ўғли АШИРОВ (oybek2425@mail.ru), Шахноз Садықовна АЗИМОВА (genlab\_icps@yahoo.com)  
Институт химии растительных веществ, Ташкент, Узбекистан

Взучили фракции рекомбинантных белков с молекулярной массой ~24-34 кДа, выделенных из личинок тутового шелкопряда *Bombyx mori* и дрожжей *Pichia pastoris* методом гель-электрофореза. Для этого нами был использован метод "Native PAGE", который позволяет дифференцировать белки в соответствии с их естественным (поверхностным) зарядом и конформационными свойствами. Результаты показали, что выделенная фракция рекомбинантного белка массой ~34 кДа из *Bombyx mori* состояла из 4 компонентов, фракция из *Pichia pastoris* (~24 кДа) из 1 компонента. Было установлено, что наиболее оптимальными условиями для проведения "Native PAGE" являются - основной гель: Tris-HCl (pH-8,8) 244 мМ, Bis-Acrylamide 10%, TEMED 0,08%, APS 0,08%; концентрирующий гель: Tris-HCl (pH-6,8) 125 мМ, Bis-Acrylamide 4%, TEMED 0,05%, APS 0,05%.

**Ключевые слова:** Bombyx mori, Pichia pastoris, рекомбинантные белки, экстракт, гель-фильтрация, сефадекс, электрофорез "Native PAGE", куасси G-250

## *BOMBYX MORI* VA *PICHIA PASTORIS* TARKIBIDAGI REKOMBINANT OQSIL FRAKTSIYALARINI "NATIVE PAGE" ELEKTROFOREZ USULI YORDAMIDA O'RGANISH

Jaloliddin Mirdjamilevich 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), Shaxnoz Sodiqovna AZIMOVA (genlab\_icps@yahoo.com)  
O'simlik moddolari kimyosi instituti, Toshkent, O'zbekiston

Biz o'z tadqiqotlarimiz davomida *Bombyx mori* - tut ipak qurti va *Pichia pastoris* achitqilaridan ajratib olingan oqsil ekstraktlari tarkibidagi ~24-34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsillarni gel-elektroforez usulida o'rgandik. Buning uchun oqsillarni tabiiy (sirt) zaryadi va konformatsiyasi kabi hossalari ko'ra farqlash imkonini beruvchi "Native PAGE" metodidan foydalandik. *Bombyx mori* dan ajratib olingan ~34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsillar fraksiyasi 4 ta tarkibiy qismdan, *Pichia pastoris* dan ajratilgan ~24 kDa o'lchamli rekombinant oqsillar fraksiyasi esa 1 tarkibiy qismdan iborat ekanligi aniqlandi. "Native PAGE" uchun eng maqbul sharoitlar sifatida - asosiy gel: Tris HCl (pH-8.8) 244 mM, Bis-Acrylamide 10%, TEMED 0.08%, APS 0.08%; konsentrlavchi gel: Tris HCl (pH-6.8) 125 mM, Bis-Acrylamide 4%, TEMED 0.05%, APS 0.05% ekanligi aniqlandi.

**Kalit so'zlar:** Bombyx mori, Pichia pastoris, rekombinant oqsillar, ekstrakt, gel-filtratsiya, "Native PAGE" elektroforezi, sefadeks, coomassie G-250

### Kirish

SDS-PAGE (natriy dodetsil sulfati - poliakrilamid geldagi elektroforez) oqsillarni tahlil qilish uchun eng ko'p qo'llaniladigan gel elektroforetik usuldir. Shuni ta'kidlash lozimki, ushbu usul faqat denaturatsiyaga uchragan oqsillarni, ularning molekulyar massasiga ko'ra bir biridan ajratish yo'li bilan tadqiq etish imkonini beradi. Ba'zida tabiiy, denaturatsiyaga uchramagan oqsillarning biologik faolligini (masalan, ferment faolligi, retseptorlari ulanishi, antitana ulanishi va boshqalar) tahlil qilish kerak bo'ladi. Detergentlardan xoli bo'lgan "Native PAGE" gel elektroforez usulida oqsillar o'zlarining tabiiy konformatsiyalariga bog'liq holda gelda harakatlanadilar [1-3]. Oqsillarning gelda qarama - qarshi elektrod tomon migratsiyasi ikki omilga bog'liq bo'ladi: 1) pH ga bog'liq bo'lgan oqsilning umumiy sirt zaryadi (bunda pH ning qiymatini oqsilning aminokislotalar tarkibi va har qanday post-translatsion modifikatsiyalar, fosforlanish kabi

hossalar belgilaydi); 2) oqsilning gidrodinamik hajmli kichik yoki katta strukturalari. Misol uchun, ob'ekt sifatida o'xshash bo'lgan ikkita 64 kDa og'irlikdagi oqsil X (4 aspartat va glutamat aminokislotalarni o'z ichiga olgan) va oqsil Y (16 aspartat va glutamat aminokislotalarni o'z ichiga olgan) tanlab olinib, elektroforez jarayoni pH 7.0 ≤ sharoitda olib borildi deylik. Ushbu holatda oqsil Y gelda uzoqroq migratsiyalanadi. Buning sababi, ularning massalari bir xil bo'lsa ham oqsil Y ning nisbiy zaryadi oqsil X ning nisbiy zaryadidan to'rt barobar katta bo'lganidir. Yana shuni aytish mumkin, oqsillarning "Native PAGE" gelidagi elektroforetik harakati ularning konformatsiyasi bilan ham belgilanadi. O'z navbatida konformatsiyalar zaryadlari turli agregatlar (dimerlar va oligomerlar) yoki yanada zichlashgan strukturalar hosil qiladi va "Native PAGE" usuli bu tuzilmalarni ko'rish imkonini beradi [4-6].

"Native PAGE" usulida oqsillarni bo'yash

uchun "Coomassie G-250" bo'yog'i keng qo'llanilib, uning sezuvchanlik darajasi 100 ng oqsilni tashkil qiladi [7]. Bundan tashqari kumush asosidagi bo'yoqlar ham mavjud bo'lib, ularning sezuvchanlik darajasi Coomassie G-250 bo'yog'iga nisbatan 100 karra ko'proqdir. Ammo bunday bo'yoqlar nisbatan qimmat reaktivlar hisoblanib, ushbu hol ularning keng qo'llanilishiga to'sqinlik qiladi [8-9].

### Tadqiqot usullari

Biz o'z tajribalarimizni ~24-34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsillarni saqlovchi *Bombyx mori* - tut ipak qurti va *Pichia pastoris* achitqilaridan ajratilgan oqsil ekstrakti ustida olib bordik. Tadqiqot ishimizning maqsadi tut ipak qurti va *Pichia pastoris* achitqilarining oqsilli ekstrakti tarkibidagi tabiiy (sirt) zaryadi va konformatsiyasi kabi hususiyatlarga ko'ra mos ravishda ~34 va ~24 kDa og'irlikdagi oqsil fraksiyalari nechta tarkibiy qismdan iborat ekanligini (gomogenligini) aniqlashdan iboratdir. Tadqiqot natijalari yuqorida keltirilgan o'lchamdagi rekombinant oqsil fraksiyalarini individual, toza holatda ajratib olishning texnologik jarayonida muayan bir turdagi xromatografiya usullaridan (sefadeks asosidagi gel-filtratsiya, ion almashinuvchi va hakoza) foydalanish yoki foydalanmaslik to'g'risida hulosani taqdim etadi. Belgilangan maqsadga erishish uchun quyidagi vazifalar amalga oshirildi:

*Bombyx mori* - tut ipak qurtlari dastavval suyuq azotda muzlatilib, so'ng gomogenizatorida (Potter S Homogenizer, Sartorius AG) maydalanadi. Maydalanган tut ipak qurtlari SDS, EDTA va PMSF tutuchi pH-7.8 bo'lgan tris-HCl buferida 1:5 nisbatda (xujayra:bufer) 4 °C ostida 4 soat davomida magnitli aylantirgich yordamida gomogenlanadi. Hujayralarning to'liq parchalanishi va oqsillarning maksimal darajada eritmaga o'tishi uchun gomogenatni dezintegratorida (marka: UZDN-1) 22 kHz chastotali ultratovush bilan 1 daqiqa davomida ushlab turiladi (jarayon muz hammomida olib boriladi). Shundan so'ng tut ipak qurtlarining gomogenati 4 °C harorat ostida 2300 g tezlanishda 30 daqiqa sentrifugalanadi va supernatant ajratib olinadi.

Keraksiz bo'lgan yuqori molekulyar massali oqsillardan qutilish maqsadida supernatantga 2,59 g ammoniy sulfat tuzi 20% eritma xosil qilish uchun doimiy aralashtirish yo'li bilan bo'laklab solinadi va 2 soat davomida +4 °C xaroratda saqlanadi. Bu yerda bo'laklab solinayotgan tuzning xar bir bo'lagi to'liq erib ketishi kerak ekanligiga e'tibor qaratish lozimdir. Eritma 3500 g tezlanish bilan +4 °C harorat ostida 30 daqiqa davomida sentrifugalanadi va supernatant ajratib olinadi. So'ng kerakli oqsilni (25-45 kDa og'irlikdagi) tutuvchi fraksiyani ajratib olish uchun supernatantga 5,98 g ammoniy sulfat tuzidan doimiy aralashtirish davomida bo'laklab solinadi va 65% eritma hosil qilinadi. Eritma 6000 g tezlanish bilan +4 °C harorat ostida 30 daqiqa davomida sentrifugalanadi va cho'kma ajratib olinadi. Ajratib olingan cho'kma 5 ml miqdordagi PBS pH-7.4 buferi (1.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5.2

mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl) bilan eritiladi.

25-45 kDa og'irlikdagi oqsillarni tutuvchi fraksiyani xromatografiya usuli yordamida (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare) tuzsizlantirish. Bunda gradientlab cho'ktirish usuli yordamida ajratib olingan 25-45 kDa og'irlikdagi oqsillarni tutuvchi fraksiya kolonkaga (HiPrep 26/10 Desalting, Matrix: Sephadex G-25 Fine) 8 ml/daq oqim tezligi bilan yuklanadi. Ishchi bufer (50 mM Tris-HCl pH-8.5) yordamida 11 ml/daq (~130 cm/h) oqim tezligi bilan tuzsizlantirish jarayoni olib boriladi. Jarayon davomida kolonka ichidagi bosim 0.3 MPa (3 bar) dan oshib ketmasligi kerak bo'ladi.

Tuzsizlantirilgan namunadan ~34 kDa og'irlikdagi oqsillarni kolonkali xromatografiya (gel-filtratsiya) usuli yordamida ajratib olish (HiLoad 26/600 Superdex 75 pg, GE Healthcare).

Mazkur bosqichda kolonkali xromatografiya (gel-filtratsiya) usuli yordamida ~34 kDa og'irlikdagi oqsillarni ajratib olinadi. Bunda ishchi bufer sifatida borat buferidan (8.9 mM NaOH, 45.5 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH-9,3) foydalaniladi. Oldindan ishchi bufer bilan muvofiqlashtirilgan kolonkaga 7,5 ml namuna (25-45 kDa og'irlikdagi oqsillarni tutuvchi tuzsizlantirilgan fraksiya) 2,5 ml/daq oqim tezligi bilan yuklanadi va xuddi shu sharoitda fraksiyalash jarayoni olib boriladi. Jarayon davomida kolonkadagi bosim 0.34 MPa (3.4 bar) ni tashkil etadi va fraksiyalar (peak and volume fractionation) xajm va cho'qqilar soniga nisbatan (~2 ml dan) yig'ib boriladi. Ushbu bosqichning yakunida ~34 kDa og'irlikdagi oqsillarni tutuvchi fraksiyalar birlashtirildi va serin asosidagi proteazalar ingibitori hisoblangan PMSF reaktividan 2 mM miqdorda qo'shib +4 °C harorat ostida saqlanadi.

*Pichia pastoris* achitqi hujayralaridan rekombinant oqsillarni ajratib olish [11] keltririlgan standart usul yordamida, hujayra qobiqlarini 0.5 mm shisha sharchalar yordamida yorish va oqsillarni tegishli buffer eritmalarida ekstraksiyalash orqali amalga oshirildi.

Tut ipak qurtlaridan ajratib olingan ~34 kDa va *Pichia pastoris* achitqilaridan ajratilgan ~24 kDa og'irlikdagi oqsillar fraksiyasini "Native PAGE" elektroforez usuli yordamida tadqiq etish.

Ushbu bosqichda o'rganilayotgan ob'ektlarga nisbatan "Native PAGE" metodining eng optimal sharoitlari aniqlandi. Unga ko'ra ikki qatlamli poliakrilamid gelining tarkibi quyidagichadir:

#### Asosiy gel

Tris HCl (pH-8.8) 244 mM;  
Bis-Acrylamide 10%;  
TEMED 0.08%;  
APS 0.08%;

#### Konsentrllovchi gel

Tris HCl (pH-6.8) 125 mM;  
Bis-Acrylamide 4%;  
TEMED 0.05%;  
APS 0.05%.

Kerakli reaktivlarni tayyorlash. Bis-Akrilamid eritmasi (30%): 30 g akrilamid va 0,8 g bis-

*Elektroforez bufferi (ishchi buffer), pH-8,3*

Reaktivlar	Ishchi eritma	Asosiy eritma	1000 ml
Tris OH	25 mM	121,1 g/M	3g
Glicine	192 mM	75,05 g/M	14,4g
Suv		mQ	1000 ml gacha

*Namuna bufferi*

Reaktivlar	Ishchi eritma	Asosiy eritma	4 ml
Tris-HCl pH 6.8	62,5 mM	0,5 M	0,5 ml
Bromofenol eritmasi	0,012%	0,1%	0,5 ml
Gliserol	25%	100%	1 ml
Suv		mQ	2 ml

*Oqsil bo'yog'i*

Reaktivlar	Ishchi eritma	Asosiy eritma	100 ml
Coomassie Blue R250	0.25%	qattiq	0,25g
Etanol	25%	100%	25 ml
Uksus kislotasi	25%	100%	25 ml
Suv		mQ	50 ml

*Bo'yog' yuvuchi buffer*

Reaktivlar	Ishchi eritma	Asosiy eritma	500 ml
Uksus kislotasi	10%	100%	50 ml
Etanol	10%	100%	50 ml
Suv	80%	mQ	400 ml

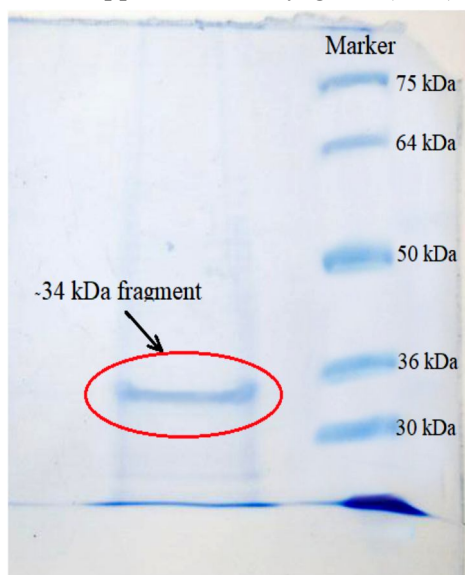
akrilamid reaktivlari 100 ml distillangan suvda eritiladi va filtrlanadi. Bu eritmani +4 °C haroratda bir necha oy davomida saqlash mumkin [10].

Elektroforez jarayonini BIO-RAD (AQSH) firmasining «Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell» jihozida olib bordik. Ikki maxsus oyna bo'laklarini (83x102 va 73x102 mm<sup>2</sup>) bir-biridan qalinligi 1 mm bo'lgan plastik qismlar bilan ikki yon tarafidan va pastdan maxsus rezina bilan ajratib, qisqichlar yordamida ularni mahkamladik. Ikkita bir-biriga siqib mahkamlangan oynalar orasida hosil bo'lgan bo'shliqqa avval asosiy gelni (10%), so'ng

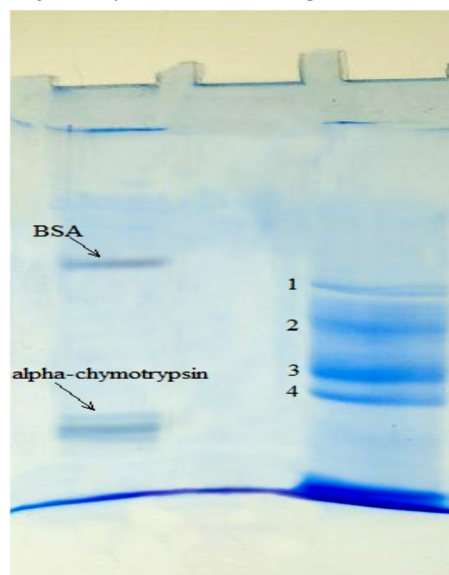
konsentrovchi gelni (4%) quyidik. Gel qatlamlarini quyishda har bir qatlamning polimerizatsiyasi to'liq sodir bo'lganligiga ishonch hosil qilgandan keyin navbatdagi bosqichga o'tish kerakligiga e'tiborni qaratish lozim. Konsentrovchi gelni quygandan so'ng qisqa fursatda grebyonka (gelda namunalarni yuklash uchun mo'ljallangan maxsus quduqchalar hosil qiluvchi jihoz) o'rnatildi va +4-6 °C haroratda 15-20 daqiqa saqlandi.

*Namunani tayyorlash va uni yuklash.* Namunalar Tris-HCl pH-7.4 buferida eritiladi va konsentrasiyalari 3 mg/ml qiymatga olib kelinadi. Ushbu namunadan 20 mkl olib toza probirkalarga solinadi va uning ustiga 7 mkl namuna buferidan qo'shiladi. Ushbu tayyorlangan namuna geldagi maxsus quduqchalarga yuklanadi. Bunda bir quduqchaga yuklangan oqsil miqdori 60 mkg ni tashkil etadi.

*Elektroforez jarayonining borishi.* Elektroforez jihoziga ikki oynalar orasidagi gelni maxsus qisqichlar yordamida mahkamlanadi. Shundan so'ng jihozning yuqorigi va pastki kameralari elektroforez buferi bilan to'ldiriladi va namunalar gelga yuklanadi. Namunalar konsentrovchi gelda bir qatorga tizilib, asosiy gelga o'tgunga qadar -40 mA tok kuchi bilan va jarayon yakunlangungacha -80 mA tok kuchi bilan jarayon olib boriladi [7]. Elektroforez jarayoni namuna buferining bo'yog'i gelning tag qismiga kelganda to'xtatiladi. Ehtiyotkorlik bilan gelni oynalardan ajratib olinadi va maxsus shisha kameraga joylanadi. Unga 10 ml miqdorda 10% TXU (trixloruksus kislotasi) eritmasidan qo'shiladi va 5 daqiqa ushlab turiladi. Shundan so'ng 10% TXU eritmasi to'kib tashlanib, 10-20 ml oqsil bo'yog'idan qo'shiladi va 100-120 daqiqa davomida saqlanadi. Yakuniy bosqichda oqsil bo'yog'i to'kib olinadi va bo'yog' yuvuchi buffer yordamida gelda namunalar ko'ringunga qadar (doimiy tebratib turgan holda) yuviladi. Natijalar Dot-Blot jihozi yordamida rasmga olinadi.



1-rasm. Bombyx mori dan gel-filtratsiya (AKTA Pure 150L, Column: HiLoad 26/600 Superdex 75 µg) usuli yordamida ajratilgan rekombinant oqsilning SDS-PAGE tahlili.



2-rasm. Gel-filtratsiya (AKTA Pure 150L, Column: HiLoad 26/600 Superdex 75 µg) usuli yordamida tut ipak qurtidan ajratilgan - 34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsilning "Native-PAGE" tahlili.

### **Olingan natijalar va ularning muhokamasi**

Tajribalar davomida tut ipak qurti lichinkalaridan (*Bombyx mori*) va *Pichia pastoris* achitqi hujayralaridan ajratib olingan rekombinant oqsillar “native PAGE” usuli yordamida tadqiq etildi. Tadqiqotlar gel-filtratsiya (AKTA Pure 150L, Column: HiLoad 26/600 Superdex 75 pg) usuli yordamida tozalangan ~ 24-34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsillar ustida olib borildi. Dastlab tozalangan oqsillarni “SDS-PAGE” usuli yordamida o'rgandik. Natijada, ajratilgan rekombinant oqsil fraksiyalari *Bombyx mori* uchun ~ 34 kDa (1-rasm), *Pichia pastoris* uchun esa ~ 24 kDa og'irlikda ekanligi tasdiqlandi.

Yuqoridagi tahlil natijalari, ajratilgan rekombinant oqsil fraksiyalari o'zining tabiiy zaryadi va ikkilamchi tuzilishi kabi hossalari ko'ra gomogen ekanligini ko'rsatmaydi. Shundan kelib chiqib oqsillarni tabiiy zaryadi va ikkilamchi tuzilishi kabi hossalari ko'ra farqlashga imkon beruvchi “Native PAGE” usulini qo'llagan holda olingan rekombinant oqsil namunalari tahlil qildik. Tajribalar davomida tanlab olingan ob'ektlarga nisbatan “Native PAGE” usulining eng optimal sharoitlari (10 ml uchun) aniqlandi:

- Asosiy gel: Tris HCl (pH-8.8) 244 mM; Bis-Acrylamide 10%; TEMED 0.08%; APS 0.08%;
- Konsentrlavchi gel: Tris HCl (pH-6.8) 125 mM; Bis-Acrylamide 4%; TEMED 0.05%; APS 0.05%

ekanligini aniqladik.

Tadqiqotlarimiz davomida ma'lum o'lchamdagi oqsil markerlar sifatida *BSA* va *alpha-chymotrypsin* standart oqsillaridan foydalandik. Tahlil natijalariga ko'ra tut ipak qurti lichinkalari tarkibidan ajratib olingan ~ 34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsil namunasi tabiiy zaryadi va ikkilamchi tuzulishi kabi hossalari ko'ra 4 tarkibiy qismdan iborat ekanligi (2-rasm) va *Pichia pastoris* achitqisidan olingan namuna faqat 1 tarkibiy qismdan iboratligi tasdiqlandi.

### **Xulosa**

Tadqiqot davomida oqsil namunalari “Native PAGE” tahlili *Bombyx mori* – tut ipak qurtlaridan gel-filtratsiya (Superdex 75 pg, HiLoad 26/600) usuli yordamida ajratib olingan ~ 34 kDa og'irlikdagi rekombinant oqsillar fraksiyasi 4 ta tarkibiy qismdan, *Pichia pastoris* achitqilaridan ajratilgan ~ 24 kDa o'lchamli rekombinant oqsillar fraksiyasi esa 1 tarkibiy qismdan iborat ekanligini ko'rsatdi. Kerakli rekombinant oqsillarni toza holda ajratib olish uchun ushbu fraksiyalarni sefadeks asosidagi gel-filtratsiyadan tashqari, ion almashinuvchi yoki boshqa turdagi xromatografiya usullaridan foydalan holda ajratish taqozga etiladi.

### **REFERENCES**

1. Wilson K, Walker J., *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology/ 7th Edition* [Electrophoretic techniques] Cambridge University Press, 2010. 762 p.
2. Scopes Robert K. *Protein Purification (principles and practice) Third Edition* [Electrophoretic Analysis] New York, Springer-Verlag Inc., 1994. 381 p.
3. Philip L. R. Bonner, *Protein Purification* [Monitoring the purity of protein solutions]. New York, Taylor & Francis, 2007. 190 p.
4. John M. Walker, *The Protein Protocols Handbook: Second Edition*. NEW JERSEY, Humana Press Inc. 2002. 1172 p.
5. Westermeier R., *Electrophoresis in Practice/ 4th Edition* [Native PAGE in Amphoteric Buffers]. New York, Wiley– Blackwell, 2005. 406 p.
6. Osterman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinykh kislot [Research methods for proteins and nucleic acids.]. Moscow, Nauka, 1981. 288 p.
7. Ian M. Rosenberg, *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques Second Edition*. Boston, Birkhäuser, 2005. 520 p.
8. Ladner C.L., Yang J., Turner R.J., Edwards R.A. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analyt. Biochem.*, 2004. vol. 326, no. 1, 13–20 pp. doi:10.1016/j.ab.2003.10.047.
9. John M. Walker, *The Protein Protocols Handbook: Second Edition* [Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels by Silver Staining] Humana Press Inc. 2002. 1172 p.
10. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p. (Russ. ed. Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh., *Molekulyarnoye klonirovaniye: Laboratornoye rukovodstvo*. Moscow, Mir Publ., 1984. 480 p.
11. *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*. User Guide. Publication Number MAN0000012, Carlsbad, USU, Life Technologies Corporation, 2014. 100 p.