

Vohidov Xushnut Tolib o'g'li
O'zR FA Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti
Email: vohidov.x@gmail.com

Xoliqov Asqar Farhod o'g'li
O'zR FA Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti
Email: asqarxoliqov01@gmail.com

Alimova Barno Xasanovna
O'zR FA Mikrobiologiya instituti yetakchi ilmiy xodimi, b.f.d.
Email: balimova@list.ru

Pulatova Ozodaxon Mansurovna
O'zR FA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, b.f.n.
Email: ozoda.pulatova67@gmail.com

Maxsumxanov Axmadjan A'zamxanovich
O'zR FA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, b.f.n.
Email: amakhsum@mail.ru

UDC 579.222+577.21

BAKTERIAL STREPTOKINAZA GENINI AJRATISH VA KLONLASH

Annotatsiya: Ushbu maqolada *Streptococcus pyogenes* bakteriyasidan streptokinaza genini ajratib olish, vektorga klonlash va uni *E. coli* XL1 hujayralariga transformatsiya qilish hamda olingan rekombinant streptokinaza faolligini aniqlash bosqichlari yoritilgan. Dastlab, β -gemolitik faollikka ega *S. pyogenes* izolyatlari tanlab olinib, MALDI-TOF MS yordamida identifikatsiya qilindi. Maxsus dizayn qilingan praymerlar yordamida streptokinaza geni PZR usuli bilan amplifikatsiya qilindi va pET28a⁺ plazmida vektoriga klonlandi. Olingan rekombinant pET28a⁺rSka vektor konstrukti *E. coli* XL1 va *E. coli* Rosetta DE3 hujayralariga transformatsiya qilindi. *E. coli* Rosetta DE3 ekspression tizimida rekombinant streptokinaza ekspressiyasi amalga oshirildi va faolligi qonli agarda gidroliz zonalarini hosil qilishi bo'yicha aniqlandi. Tadqiqot natijalari O'zbekistonda birinchi bo'lib rekombinant streptokinaza fermentini gen muhandisligi asosida olish imkoniyatlarini kengaytirish uchun xizmat qiladi.

Kalit so‘zlar: streptokinaza, ferment, polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR), klonlash, restriksion tahlil, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* XL1, *E. coli* Rosetta DE3, pET28a+ plazmida, one step cloning.

Вохидов Хушнут Толиб угли
Базовый докторант Института Микробиологии АН РУз
Email: vohidov.x@gmail.com

Холиков Аскар Фарход угли
Базовый докторант Института Микробиологии АН РУз
Email: asqarxoliqov01@gmail.com

Алимова Барно Хасановна
Д.б.н., ведущий научный сотрудник Института микробиологии АН РУз
Email: balimova@list.ru

Пулатова Озодахон Мансуровна
К.б.н., старший научный сотрудник Института микробиологии АН РУз
Email: ozoda.pulatova67@gmail.com

Махсумханов Ахмаджан Аъзамханович
К.б.н., старший научный сотрудник Института микробиологии АН РУз
Email: amakhsum@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И КЛОНИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА СТРЕПТОКИНАЗЫ

Аннотация: В данной статье описаны этапы выделения гена стрептокиназы из бактерий *Streptococcus pyogenes* и клонирования его в вектор, трансформация вектора в клетки *E. coli* XL1 и определения активности рекомбинантной стрептокиназы. Были отобраны изоляты *S. pyogenes* с β -гемолитической активностью и идентифицированы с помощью MALDI-TOF MS. Ген стрептокиназы был амплифицирован методом ПЦР с использованием специально разработанных праймеров и клонирован в плазмидный вектор pET28a⁺. Полученная рекомбинантная векторная конструкция pET28a⁺-rSka была трансформирована в клетки *E. coli* XL1 и *E. coli* Rosetta DE3. Экспрессия рекомбинантной стрептокиназы проводилась в экспрессионной системе *E. coli* Rosetta DE3, а её активность определялась по зонам гидролиза на кровяном агаре. Полученные результаты впервые в

Узбекистане демонстрируют возможность получения рекомбинантного фермента стрептокиназы на основе методов генной инженерии.

Ключевые слова: стрептокиназа, фермент, полимеразная цепная реакция (ПЦР), клонирование, рестрикционный анализ, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* XL1, *E. coli* Rosetta DE3, плазмида pET28a⁺, one step cloning .

Vokhidov Khushnut Tolib ugli

PhD student, Institute of Microbiology Academy of Sciences of Uzbekistan

Email: vohidov.x@gmail.com

Kholikov Askar Farhod ugli

PhD student, Institute of Microbiology Academy of Sciences of Uzbekistan

Email: asqarxoliqov01@gmail.com

Alimova Barno Khasanovna

Leading Researcher, Institute of Microbiology Academy of Sciences of
Uzbekistan

Email: balimova@list.ru

Pulatova Ozodakhon Mansurovna

Senior Researcher, Institute of Microbiology Academy of Sciences of
Uzbekistan

Email: ozoda.pulatova67@gmail.com

Makhsumkhanov Akhmadzhan Azamkhanovich

Senior Researcher, Institute of Microbiology Academy of Sciences of
Uzbekistan

Email: amakhsum@mail.ru

ISOLATION AND CLONING OF THE BACTERIAL STREPTOKINASE GENE

Annotation: This article describes the stages of the streptokinase gene isolation from *Streptococcus pyogenes*, its cloning into vector and transformation to *E. coli* XL1 cells, and determination of the recombinant streptokinase activity. Initially, *S. pyogenes* isolates with β -hemolytic activity were selected and identified using MALDI-TOF MS. The streptokinase gene was amplified using PCR with specially designed primers and cloned into the pET28a⁺ plasmid vector. The resulting recombinant vector construct was transformed into *E. coli* XL1 and *E.*

E. coli Rosetta DE3 cells. Recombinant streptokinase expression was performed using E. coli Rosetta DE3 expression system, and its activity was determined based on the formation of hydrolysis zones on blood agar. The results of the study serve to expand the possibilities of producing recombinant streptokinase enzyme through genetic engineering methods for the first time in Uzbekistan.

Keywords: streptokinase, enzyme, polymerase chain reaction (PCR), cloning, restriction analysis, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli XL1*, *E. coli Rosetta DE3*, *pET28a⁺* plasmid, one-step cloning.

Kirish

Hozirgi vaqtda dunyo aholisi orasida yurak-qon tomir kasalliklari bilan kasallanish holatlari ortib bormoqda. Jahon sogʻliqni saqlash tashkilotining (JSST) maʼlumotlariga koʻra, 2019-yilda 17,9 million kishi aynan yurak-qon tomir kasalliklari oqibatida vafot etgan boʻlib, ularning taxminan 85%ida oʻlim sababi miokard infarkti yoki insult boʻlgan. Yurak-qon tomir kasalliklariga bogʻliq oʻlimlarning 3/4 qismi past va oʻrta daromadli mamlakatlar hissasiga toʻgʻri keladi [1]. Masalan, Oʻzbekistonda 2024-yilda qayd etilgan oʻlim holatlarining 57,6% qon aylanish tizimi kasalliklariga toʻgʻri kelgan [2].

Yurak-qon tomir kasalliklarining ortishi turli omillar bilan bogʻliq boʻlishi mumkin, biroq oʻlim holatlarining yuqoriligiga dori vositalarining yetishmasligi yoki ular narxining yuqoriligi muhim omil sifatida koʻrsatilmoqda. Trombolitik faollikka ega boʻlgan dori vositalari yurak-qon tomir kasalliklarini davolashda muhim ahamiyatga ega. Ular orasida eng samaralilaridan biri — streptokinaza fermenti boʻlib, u oʻtkir miokard infarktini davolashda uzoq vaqt davomida keng qoʻllanib kelinadi va JSSTning asosiy dori vositalari roʻyxatiga kiritilgan. Shu sababli, ushbu fermentning rekombinant shaklini olish va Oʻzbekistonda ishlab chiqarishni yoʻlga qoʻyish dolzarb masala hisoblanadi.

Streptokinaza hayvonlar yoki insonlarning yuqori nafas yoʻllarida kasallik chaqiruvchi, β -gemolitik faollikka ega boʻlgan baʼzi *Streptococcus* avlodiga mansub bakteriyalar tomonidan sintez qilinadigan fermentdir.

Odam plazminogeni – bir zanjirli, 790 ta aminokislotadan iborat bo‘lgan glikoprotein hisoblanadi. U plazminning proferment shakli bo‘lib, faol plazmin holida fibringa bog‘lanadi va uni qonda eruvchan bo‘laklarga parchalaydi [3].

Plazminogen aktivatorlariga to‘qima tipidagi plazminogen faollashtiruvchisi, urokinaza, streptokinaza misol bo‘ladi. Bulardan to‘qima tipidagi plazminogen faollashtiruvchisi va urokinaza odam organizmida tabiiy holatda hosil bo‘ladi. Streptokinaza esa β -gemolitik faollikka ega bo‘lgan streptokokklar tomonidan sintez qilinadi. Streptokinaza molekulyar massasi 47 kDa, 440 ta aminokislotadan iborat, fibrinolitik va trombolitik fermentdir. Streptokinaza o‘zi proteolitik faollikka ega emas, u qondagi plazminogen bilan 1:1 nisbatda kompleks hosil qiladi va shu kompleks proferment plazminogendagi Arginin 560 – Valin 561 aminokislotalar orasidagi peptid bog‘ini uzib, faol plazminga aylantiradi [4].

Streptokinaza genini *Streptococcus* avlodiga mansub bakteriyalardan ajratib olish, har xil vektorlarga klonlash, *E. coli* shtammlarida ekspressiya qilish bo‘yicha bir qator ilmiy izlanishlar olib borilgan. Masalan, *S. pyogenes* bakteriyasidan ajratilgan gen pGEM®-3Zf(+) vektoriga klonlanib, *E. coli* BL21(DE3) shtammida ekspressiya qilingan [5]. Shuningdek, *S. equisimilis* H46A shtammidan olingan streptokinaza geni pGEX-4T-2 vektoriga kiritilib, *E. coli* BL21(DE3) ning turli shtammlarida ekspressiya qilingan [6]. *S. pyogenes* DT7 shtammidan ajratilgan gen pET22b vektoriga klonlanib, *E. coli* BL21(DE3) hujayralarida ekspressiya qilingan [7]. Bundan tashqari, *S. equisimilis* dan olingan gen pQE30 vektorida *E. coli* M15 hujayralarida, *S. pyogenes* shtammlaridan olingan gen esa pPICZ A vektoriga klonlanib, eukaryotik tizim — *Pichia pastoris* da ekspressiya qilingan [8, 9].

Bundan tashqari, sintetik yo‘l bilan olingan va kodon optimizatsiyasi orqali takomillashtirilgan streptokinaza genlari asosida ham ekspressiya tizimlari yaratilgan. Jumladan, bunday genlar pET-3a va pET21b vektorlariga klonlanib, rekombinant oqsil *E. coli* BL21(DE3) shtammlarida ekspressiya qilingan [10, 11]. Bu tadqiqotlar rekombinant streptokinazaning prokariot va eukariot ekspressiya tizimlarida samarali ekspressiya bo‘lishini ko‘rsatadi.

Ushbu tadqiqot ishining maqsadi mahalliy *Streptococcus* avlodiga mansub bakteriya izolyatidan streptokinaza fermenti genini izlash, PZR amplifikatsiya qilish, maqbul vektorga klonlash va olingan plasmida konstruktida faol rekombinant streptokinaza geni ekspressiyasini o'rganishdan iboratdir.

Tadqiqot metodologiyasi

Bakteriya shtamlari va o'stirish sharoitlari: *Streptococcus pyogenes* izolyatlari klinik bakterial ekuvlari namunalaridan ajratib olingan va 5% qon qo'shilgan tripton soyali agar (TSA) ozuqa muhitida 35-37 °C haroratda o'stirilib, qonli agarda hosil qilgan gemoliz zonasi bo'yicha tanlab olingan.

E. coli XL1 kompetent hujayralari klonlash maqsadida qo'llanilgan va ular Luria–Bertani (LB) ozuqa muhitida o'stirilgan. Rekombinant oqsilni ekspressiya qilish uchun LB ozuqa muhitida ishlab chiqaruvchining tavsiyalari asosida o'stirilgan *E. coli* Rosetta DE3 shtammlaridan foydalanilgan.

Kimyoviy moddalar va reaktivlar: ClonExpress II One step cloning kit, FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit, FastPure Plasmid Mini Kit (Vazyme, Xitoy) to'plamlaridan va restriktazalardan *NdeI*, *BamHI*, DreamTaq PCR Master Mix (Thermofisher, AQSH) foydalanilgan.

Bakteriyalarni skrining qilish: *S. pyogenes* izolyatlarini ajratish uchun 5% qon qo'shilgan Tripton soyali agar (TSA) muhitiga klinik namunalar ekildi. Ozuqa muhitida β -gemolitik faollik namoyon qilgan koloniyalar birlamchi seleksiyada saralandi va qayta TSA+qon muhitiga ko'chirib ekildi. Ikkinchi seleksiya bosqichida esa eng yuqori gemolitik zonaga ega bo'lgan alohida o'sgan koloniyalar tanlab olindi. Ajratilgan bakterial izolyatlar yorug'lik mikroskopida, 1000× kattalashtirilib mikroskopik tahlil qilindi, MALDI-Tof mass spektrometrida identifikatsiya qilindi.

DNK amplifikatsiyasi va plazmida konstruksiyasi: *S. pyogenes* izolyatlaridan Marmur usuli [12] bilan bakteriyaning genom DNK si ajratib olindi. SnapGene dasturi [13] yordamida quyidagi maxsus praymerlar ishlab chiqildi va Integrated DNA Technologies (Belgiya) [14] tomonidan sintez qilib yetkazib berildi:

Primer-F1	5'-CGAGGCATATGATGAAAAATTACTTATCTTTTGGGAT-3'
Primer-R	5' AATGGATCCGCTTGCTTTTTTTTGTTCAGT '3
Ska for2 infusion	5' CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAAAATTACTTATC TTT '3
Ska rev2 infusion	5' ACGGAGCTCGAATTCGGATCCGCTTGCTTTTTTTTGTTCAG T '3

Primer-F1 va Primer-R juftligi streptokinaza genini PZR yordamida ko'paytirish uchun mo'ljallangan. Ska for2 infusion va Ska rev2 infusion praymerlari esa ClonExpress II One Step Cloning Kit yordamida genni plazmida vektoriga klonlash maqsadida ishlab chiqilgan bo'lib, ushbu praymerlar tarkibida vektorning restriktaza bilan ishlov berilgach hosil bo'ladigan DNK uchlariga komplementar ketma-ketliklar mavjud.

PZR jarayoni quyidagi jadvalda ko'rsatilgan ma'lumotlar asosida amalga oshirilgan:

1 sikl	Dastlabki denaturatsiya:	95 °C	5 daqiqa
Takrorlanuvchi sikllar (30 marta):	Denaturatsiya:	95 °C	30 soniya
	Annealing (bog'lanish):	55°C	30 soniya
	Uzaytirish (elongatsiya):	72°C	100 soniya
1 sikl	Yakuniy elongatsiya:	72°C	5 daqiqa
	Saqlash harorati:	12°C	∞

Dastlab bakteriyadan ajratib olingan genom DNK asosida Primer-F1 va Primer-R praymerlari yordamida PZR amalga oshirildi. Olingan PZR mahsulotidan klonlash uchun zarur bo'lgan gen fragmenti tayyorlash maqsadida, unga Ska for2 infusion va Ska rev2 infusion praymerlari bilan qo'shimcha PZR bajarildi. Bu bosqichda ClonExpress II klonlash tizimi uchun mos keluvchi uchlari bo'lgan gen amplifikoni olindi.

Vektor sifatida pET28a+ plazmidasidan foydalanilgan. Plazmida *NdeI* va *BamHI* restriktazalari bilan 2 soat 37 °C haroratda inkubatsiya qilindi va chiziqli shaklga o'tgan plazmida agarozda gelidan Gel DNA Extraction Mini Kit bilan tozalandi va klonlashda foydalanildi.

Klonlash: ClonExpress II One step cloning kit yordamida amalga oshirildi. Kesilgan pET28a(+) plazmidasi va PZR mahsuloti ClonExpress II One Step Cloning Kit tavsiyalariga muvofiq reaktivlar bilan aralashtirildi. Aralashma 37°C da 30 daqiqa davomida inkubatsiya qilindi. Olingan genetik konstrukt *E. coli* XL1 kimyoviy kompetent hujayralariga "heat shock" usulida transformatsiya qilindi.

Transformatsiyadan so'ng o'sib chiqqan *E. coli* XL1 koloniyalari kanamitsin antibiotigi (50 µg/ml) qo'shilgan 5 ml LB ozuqa muhitiga inokulyatsiya qilindi va 37 °C da, sheyker-inkubatorida 200 ayl/daq tezlikda, tun davomida inkubatsiya qilindi. Inkubatsiyadan keyin hujayralardan plazmid DNK FastPure Plasmid Mini Kit yordamida ajratib olindi. Olingan plazmidalarni tekshirish maqsadida PZR o'tkazildi hamda *NdeI* va *BamHI* restriktaza fermentlari yordamida kesib ko'rildi.

Rekombinant oqsil ekspressiyasi: Klonlash natijasida o'sib chiqqan *E.coli* XL1 alohida koloniyalardan tanlab olinib, 5 ml 50 µg/ml kanamitsin saqlovchi LB suyuq muhitiga inokulyatsiya qilindi va 37 °C da, 200 ayl/daq tezlikda tun davomida o'stirildi. Hosil bo'lgan birlamchi inokulyatdan 1 ml olinib, 100 ml 50 µg/ml kanamitsinli LB ozuqa muhitiga inokulyatsiya qilindi. Bu suspenziya 37 °C da, 200 ayl/daq tezlikda o'stirilib, hujayralar optik zichligi $OD_{600} = 0,6$ ga yetguncha inkubatsiya qilindi. Hujayralar optik zichligi $OD_{600} = 0,6$ ga yetganda, rekombinant oqsil ekspressiyasini induksiya qilish uchun izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) qo'shildi va uning yakuniy konsentratsiyasi 0,1 mM ga yetkazildi. Induksiya 30 °C da, 200 ayl/daq tezlikda 4 soat davomida amalga oshirildi.

Rekombinant oqsilni tozalash: Inkubatsiyadan so'ng hujayralar 6 000 ayl/daq tezlikda, 10 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, cho'kma shaklida yig'ib olindi. Olingan hujayralar 10 ml 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl tarkibli lizis buferida suspenziya qilindi. Eritmaga yakuniy konsentratsiyasi 1 mg/ml ga

yetakzilib lizotsim qo'shildi va aralashma xona haroratida 30 daqiqa davomida inkubatsiya qilindi. So'ngra hujayra devorini parchalash uchun ultratovushli gomogenizator yordamida 15 daqiqa davomida (3 sek ultratovush/4 sek pauza sikllarida) gomogenizatsiya qilindi. Hosil bo'lgan lizat Ni-NTA (nikel-affin xromatografiyasi) usuli yordamida turli konsentratsiyadagi imidazol eritmalari bilan yuvilib, rekombinant oqsil tozalab olindi.

SDS-PAGE: Hujayralar gomogenizatsiyasidan so'ng olingan lizat, Ni-NTA usulida olingan oqsilning har xil fraksiyalari analiz qilish uchun 12% li SDS-PAGE gelidan foydalanildi va gel Coomassie brilliant blue G-250 bo'yog'ida bo'yaldi.

Faollik testi: Tozalab olingan oqsil fraksiyalari qonli agarda streptokinaza faolligi tekshirib ko'rildi. Bunda 5% qon qo'shilgan agarli ozuqadagi chuqurchalarga rekombinant oqsilning imidazoldagi eritmalari 100 mkl dan quyildi va 37 °C 12 soat davomida inkubatsiya qilindi va faolliklari hosil qilgan rangsiz maydon yuzasiga qarab xulosa qilindi

Olingan natijalar va muhokamasi

Izolyatlar qonli ozuqa muhitda β -gemolitik faolliklariga ko'ra tanlab olindi. Bunda zanjirsimon joylashuvga ega kokk shaklidagi bakterial hujayralar aniqlandi [15] (1-rasm). Tanlab olingan bakteriyalar MALDI-Tof mass spektrometrida identifikatsiya qilinganda ularni *S. pyogenes* ekanligi aniqlandi. Natijada streptokinaza produtsenti bo'lgan *S. pyogenes* bakteriyasi ajratib olindi.

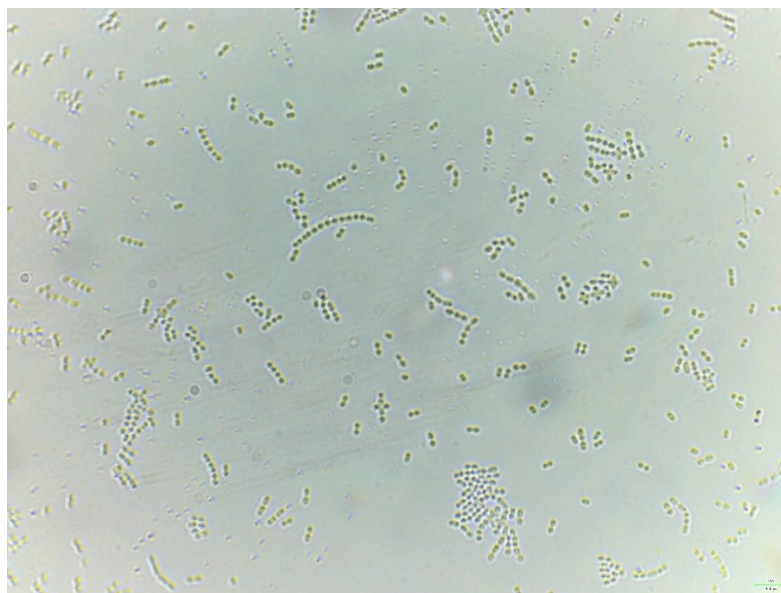
S. pyogenes bakteriyasidan ajratib olingan genom DNK asosida Primer-F1 va Primer-R yordamida PZR amalga oshirildi. Natijada uzunligi $\approx 1\,400$ juft nukleotid (bp) bo'lgan PZR mahsuloti olindi (2-rasm). Bu boshqa adabiyotlarda keltirilgan streptokinaza genlari uzunliklaridan ~ 1.3 Kbp [16], ~ 1.2 Kbp [9], ~ 1.2 Kbp [7] bir oz farq qilishini ko'rsatdi.

Olingan PZR mahsulotidan klonlash uchun zarur bo'lgan gen fragmenti tayyorlash maqsadida, unga Ska for2 infusion va Ska rev2 infusion praymerlari bilan qo'shimcha PZR bajarildi. Bu bosqichda ClonExpress II klonlash tizimi

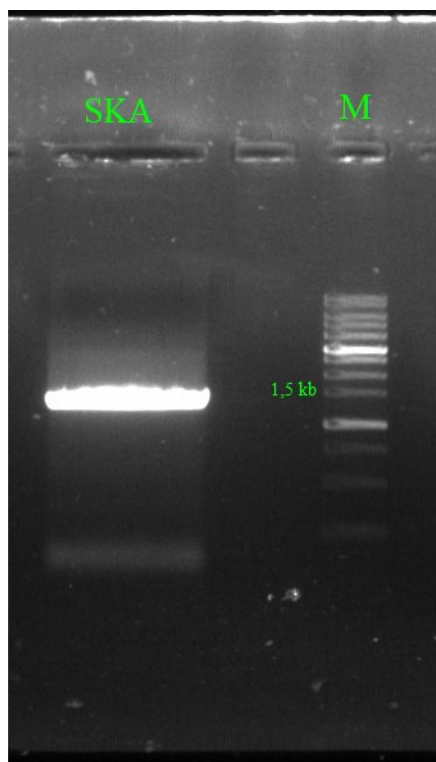
uchun mos keluvchi uchlariga ega bo'lgan, uzunligi ~ 1.4 Kbp bo'lgan gen amplifikoni olindi (3-rasm).

S. pyogenes bakteriyasidan ajratib olingan genom DNK asosida Primer-F1 va Primer-R yordamida PZR amalga oshirildi. Natijada uzunligi $\approx 1\,400$ juft nukleotid (bp) bo'lgan PZR mahsuloti olindi (2-rasm). Bu boshqa adabiyotlarda keltirilgan streptokinaza genlari uzunliklaridan ~ 1.3 Kbp [16], ~ 1.2 Kbp [9], ~ 1.2 Kbp [7] bir oz farq qilishini ko'rsatdi.

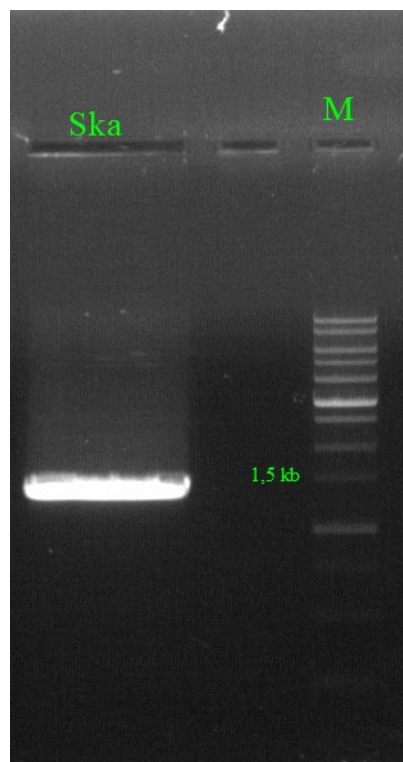
Olingan PZR mahsulotidan klonlash uchun zarur bo'lgan gen fragmenti tayyorlash maqsadida, unga Ska for2 infusion va Ska rev2 infusion praymerlari bilan qo'shimcha PZR bajarildi. Bu bosqichda ClonExpress II klonlash tizimi uchun mos keluvchi uchlariga ega bo'lgan, uzunligi ~ 1.4 Kbp bo'lgan gen amplifikoni olindi (3-rasm).



1-rasm. *S. pyogenes* hujayralari yorug'lik mikroskopidagi tasviri (x1000 Kattalashtirilgan).

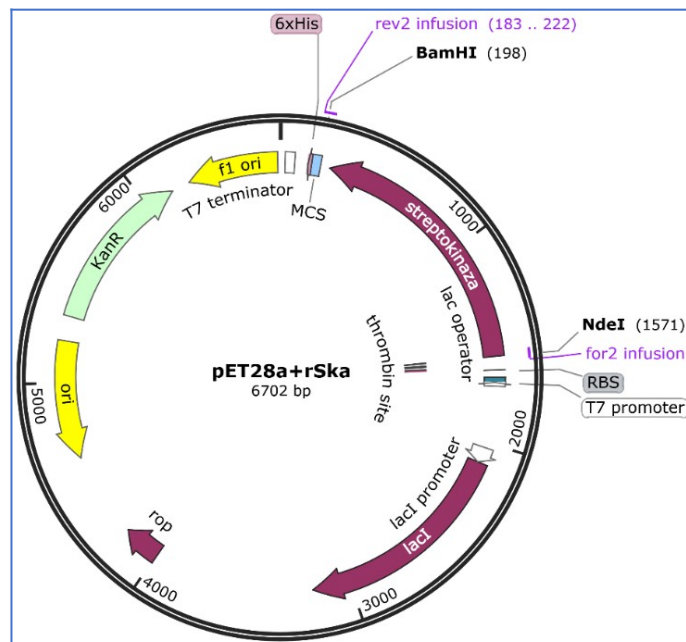
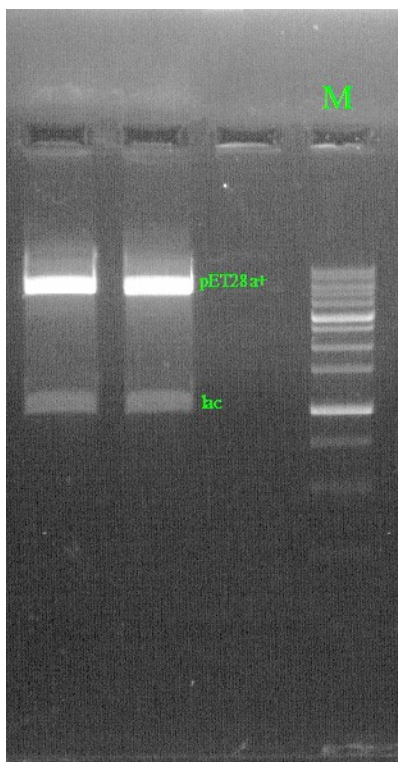


2-rasm. Ska – Streptokinaza geni
Primer-F1 va Primer-R bilan PZR
qilingan;
M – DNK marker



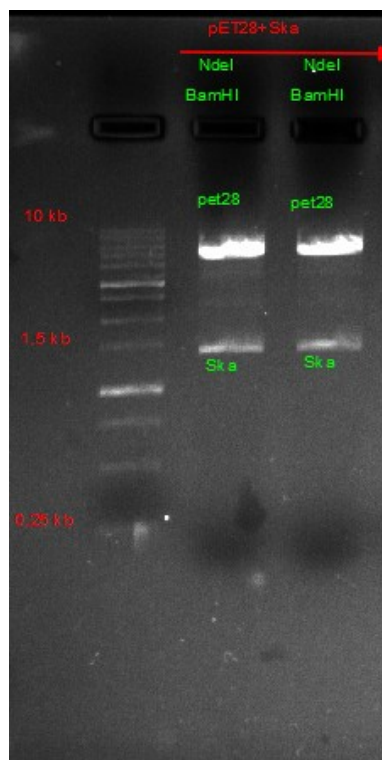
3-rasm. Ska – streptokinaza geni Ska
for2 infusion va Ska rev2 infusion
praymerlari bilan PZR qilingan;
M – DNK marker

E. coli XL1 hujayralardan tozalab olingan plazmidalar rekombinant oqsil ekspressiyasini aniqlash maqsadida *E. coli* Rosetta DE3 hujayralariga tranformatsiya qilindi. Ushbu shtammning rekombinant oqsil ekspressiyasiga moslashgan *E.coli* ning boshqa shtammlaridan farqi uning hujayralarida *E. coli* bakteriyalari uchun kamyob bo'lgan AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA kodonlarni tashuvchi tRNK tizimi joylashgan plazmida mavjuddir [18]. Shuning uchun Rosetta DE3 shtammlarida *E. coli* ekspressiya tizimida kam uchraydigan kodonli oqsillarni ham ko'p miqdorda ekspressiya qilish mumkin.



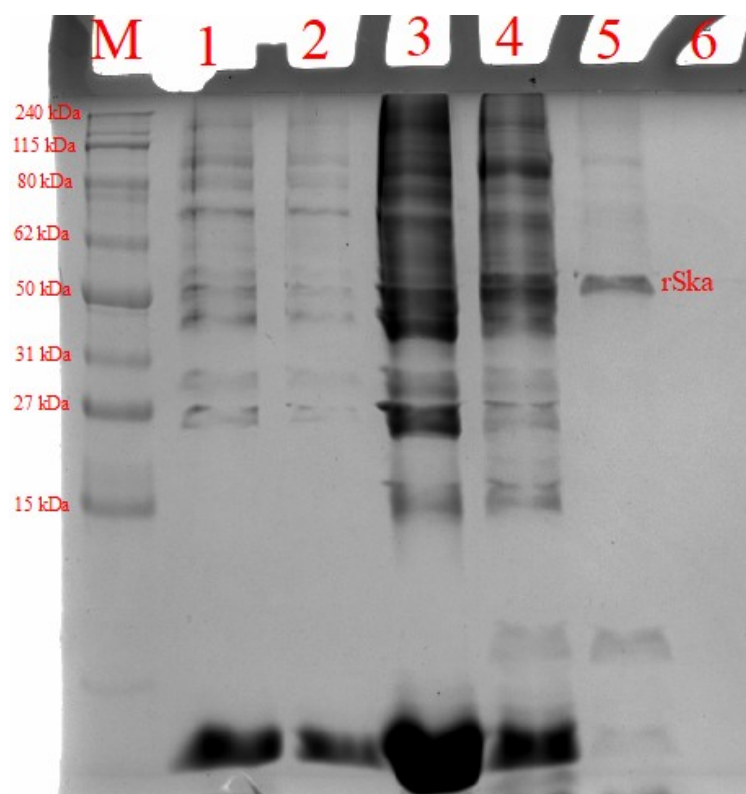
4-rasm. pET28a+Lac konstruktini
NdeI va *BamHI* restriktazalari
 bilan ishlov berib vektorni
 klonlashga tayyorlash:
 lac- laccaza geni;
 pET28a+ - chiziqli shaklga
 o'tgan plazmida;
 M – DNK marker

5-rasm. Klonlash natijasida olingan
 rekombinant pET28a+rSka vektor konstrukt.



6-rasm. *NdeI* va *BamHI* restriktazalari bilan kesilgan rekombinant pET28a+rSka vektor konstrukti.

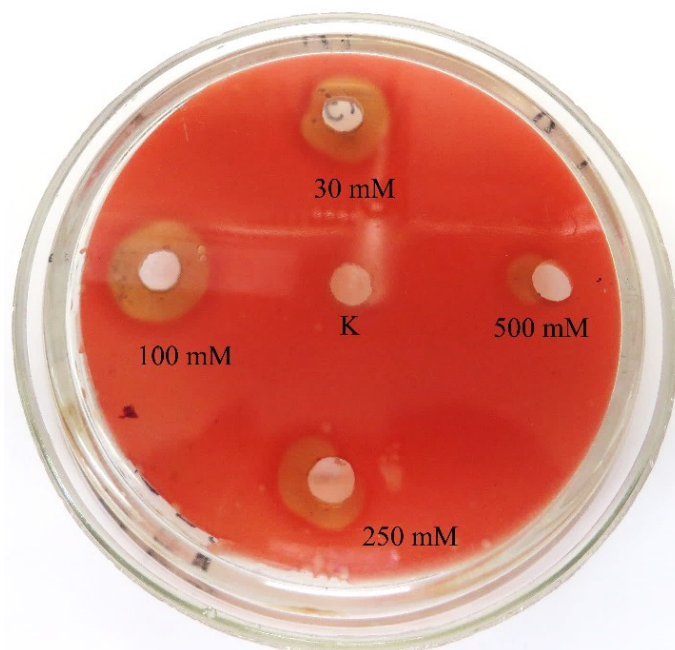
pET28a+rSka vektor konstrukti transformatsiyasidan so'ng *E.coli* Rosetta DE3 hujayralari IPTG qo'shib induksiya qilindi. Natijada *E.coli* Rosetta DE3 hujayralari sentrifuga yordamida (10 000 ayl/min tezlikda) yig'ib olindi, ultratovushli gomogenizator bilan lizis qilindi va sentrifuga yordamida lizat supernatanti ajratib olindi. So'ngra ajratib olingan lizat supernatantidan rekombinant oqsil (rSka) Ni-NTA xromatografiyasi yordamida tozalandi . tozalangan oqsil fraktsiyasi SDS-PAGE gelida tahlil qilindi. Yuqoridagi tajribalar natijasida tozalab olingan rekombinant streptokinazaning molekulyar massasi 50 kDa dan yuqori ekanligini 7-rasmda ko'rishimiz mumkin. Bu Snapgene dasturida simulyatsiya qilingan nazariy rekombinant streptokinaza molekulyar massasiga (52.3 kDa) juda yaqin ekanligini ko'rishimiz mumkin.



7-rasm. Rekombinant streptokinazani Ni-NTA affin xromatografiyasi usulida tozalangan fraktsiyalarining 12%-li SDS-PAGE gelidagi tahlili:

1. Lizat supernatanti,
2. Ni-NTAga bog‘lanmagan fraktsiya,
3. 30 mM imidazol eritmasi bilan yuvilgan fraktsiya,
4. 100 mM imidazol eritmasi bilan yuvilgan fraktsiya,
5. 250 mM imidazol eritmasi bilan yuvilgan fraktsiya,
6. 500 mM imidazol eritmasi bilan yuvilgan fraktsiya,

Tozalab olingan rekombinant streptokinaza faolligini aniqlash maqsadida 30, 100, 250, 500 mM konsentratsiyali imidazol eritmalari bilan yuvib olingan oqsil fraktsiyalari qonli agarda tekshirib ko‘rildi (8-rasm). Natijada rekombinant streptokinaza ning 100 mM imidazoldagi eritmasi bilan yuvilgan fraktsiyasida faollik boshqa fraktsiyalarga nisbatan yuqoriligini ko‘rishimiz mumkin.



8-rasm. Qonli agarda rSka oqsil faollik testi
K – negativ kontrol (30 mM imidazol eritmasi)

rSka oqsilining imidazolning 30, 100, 250, 500 mM konsentratsiyali
eritmalaridagi fraktsiyalari

Xulosa

Shunday qilib, ushbu tadqiqotda *Streptococcus pyogenes* izolyatlari β -gemolitik faolligiga asoslanib ajratib olindi va ularning identifikatsiyasi MALDI-TOF mass-spektrometriya usuli yordamida aniqlandi. Tanlab olingan shtammlardan streptokinaza geni maxsus dizayn qilingan praymerlar orqali PZR usuli bilan muvaffaqiyatli amplifikatsiya qilindi. Olingan gen fragmenti pET28a⁺ ekspression vektoriga klonlandi va ClonExpress II One Step Cloning texnologiyasi orqali rekombinant konstrukt hosil qilindi. Mazkur konstrukt *E. coli* XL1 hujayralariga transformatsiya qilinib, streptokinaza genini tashuvchi vektor liniyasi yaratildi va ushbu hujayralardan tozalab olingan pET28a+rSka vektor konstrukti *E. coli* Rosetta DE3 shtammiga transformatsiya qilindi, IPTG bilan induksiya qilinib ekspressiya qilindi hamda rekombinant streptokinaza oqsili xo'jayin hujayralari lizatidan tozalab olindi va faolligi aniqlandi. Ushbu tadqiqotlar natijasi streptokinazani rekombinant usulda biosintez qilish imkoniyatlarini kengaytiradi,

keyingi bosqichlarda oqsilni ko'p miqdorda ekspressiya qilish va tozalash uchun asosli platforma bo'lib xizmat qiladi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Cardiovascular diseases (CVDs).
[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Accessed 16 Jul 2025
2. 2024-yil. <https://stat.uz/uz/default/press-relizlar/50245-2024-yil>. Accessed 16 Jul 2025
3. Collen D, Stump DC, Gold HK (1988) Thrombolytic Therapy. *Annu Rev Med* 39:405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.39.020188.002201>
4. Reddy KNN (1988) Streptokinase - Biochemistry and Clinical Application. *Enzyme* 40:79–89. <https://doi.org/10.1159/000469149>
5. Hameed AK, Al-Hayawi AY, Buniya HK (2022) Cloning and expression of native streptokinase in *E. coli* BL21(DE3). *ijhs* 8406–8412. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS4.10582>
6. Reza NM, Mohammad H M, Mohammad B, Mahmood C (2007) Cloning and Overexpression of Active Recombinant Fusion Streptokinase: A New Approach to Facilitate Purification. *Pakistan J of Biological Sciences* 10:2146–2151. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.2146.2151>
7. Nguyen SLT, Quyen DT, Vu HD (2014) Highly Effective Renaturation of a Streptokinase from *Streptococcus pyogenes* DT7 as Inclusion Bodies Overexpressed in *Escherichia coli*. *BioMed Research International* 2014:1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/324705>
8. Keramati M, Roohvand F, Aslani MM, Khatami S (2013) Screening, Cloning and Expression of Active Streptokinase from an Iranian Isolate of *S. equisimilis* Group C in *E. coli*. *Iran J Basic Med Sci* 16:
9. Assiri AS, El-Gamal BA, Hafez EE, Haidara MA (2014) Production of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* isolate and its potential for thrombolytic therapy. *Saudi Medical Journal* 35:1482
10. El-Dabaa E, Okasha H, Samir S, et al (2022) Optimization of high expression and purification of recombinant streptokinase and in vitro evaluation of its thrombolytic activity. *Arabian Journal of Chemistry* 15:103799. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103799>
11. Aghaeepoor M, Akbarzadeh A, Kobarfard F, et al (2019) Optimization and high level production of recombinant synthetic Streptokinase in *E. coli* using

Response Surface Methodology Optimization and High Level Production of Recombinant Synthetic Streptokinase in *E. coli* Using Response Surface Methodology. IJPR. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100636>

12. Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* 3:208-IN1. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)
13. LLC GB SnapGene | Software for everyday molecular biology. <https://www.snapgene.com/>. Accessed 16 Jul 2025
14. Integrated DNA Technologies. In: IDT. <https://www.idtdna.com/page>. Accessed 16 Jul 2025
15. Spellerberg B, Brandt C (2022) Laboratory Diagnosis of *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci). In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA (eds) *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, 2nd ed. University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City (OK)
16. Buniya HK, Murugan V, Thangadurai C (2014) Cloning and expression of hybrid streptokinase towards clot-specific activity. *Journal of Microbiological Methods* 98:84–88. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.01.006>
17. Caballero AR, Lottenberg R, Johnston KH (1999) Cloning, Expression, Sequence Analysis, and Characterization of Streptokinases Secreted by Porcine and Equine Isolates of *Streptococcus equisimilis*. *Infect Immun* 67:6478–6486. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.12.6478-6486.1999>
18. Rosetta(DE3) Competent Cells - Novagen Sigma-Aldrich. https://www.sigmaaldrich.com/UZ/en/product/mm/70954?srsId=AfmBOooEucrep_hxUzDd2ClRdtFOdkDqohI-0g9p0hw_ILN9NGqqmjd. Accessed 17 Jul 2025