

Практическая работа 10  
Гетерогенная экспрессия в клетках  
дрожжей (*Saccharomyces*  
Преимущества, недостатки.  
*cerevisiae*)

1. Преимущества, недостатки гетерогенной экспрессии в клетках дрожжей
2. Методы и подходы к трансформации клеток дрожжей

3. Маркеры селекции (ауксотрофные и доминантные)

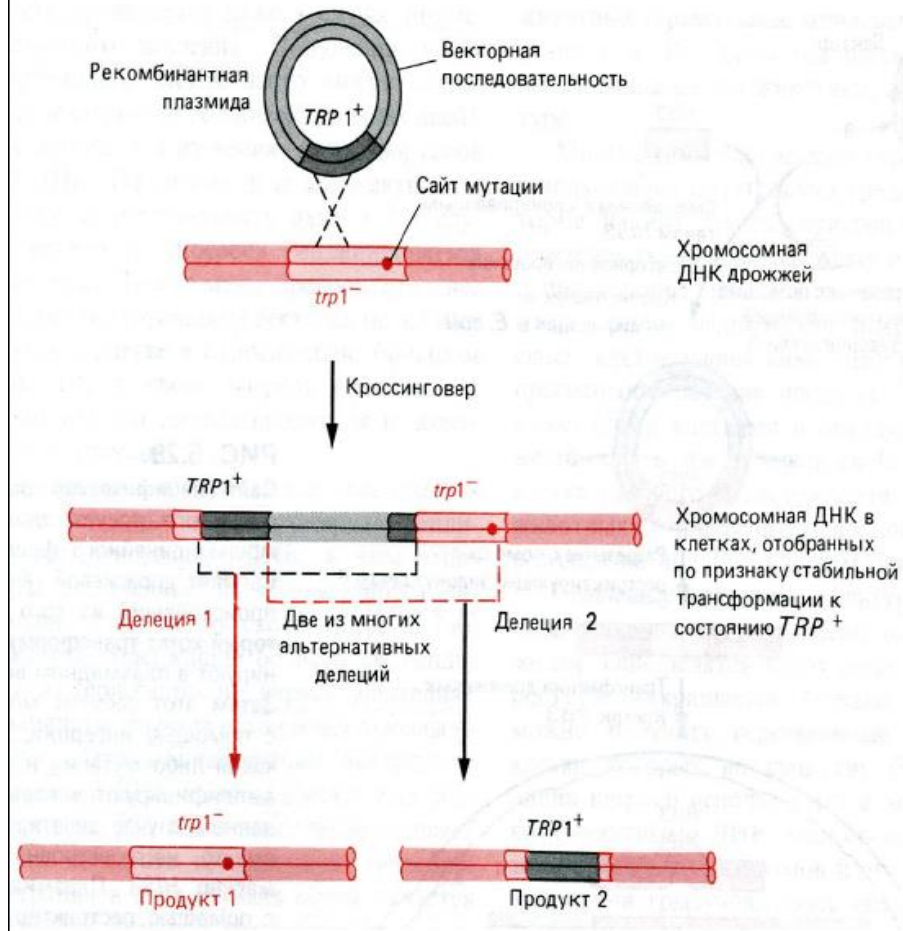
4. Векторы дрожжей (эписомальные и интегративные)

Дрожжевые векторы:

1. YIp интегративные
2. YEр эписомальные
3. YRp репликативные
4. YCр центромерные
5. YAC дрожжевые искусственные хромосомы

Селективные маркеры:  
URA3, LEU2, TRP1, HIS3

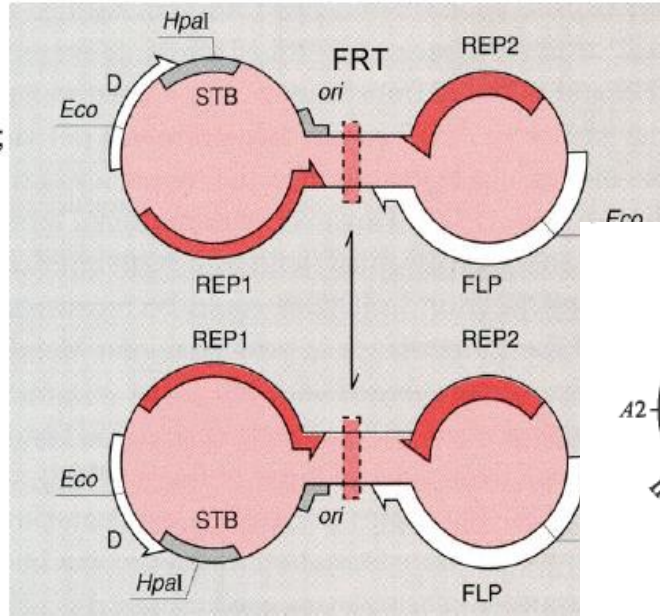
# 1. Интегративные плазмиды



## 2. Эписомальные плазмиды

### 2 мкм – плазида дрожжей (6318 bp);

ori – ориджин репликации;  
 REP1, REP2 – гены, участвующие в репликации,  
 D – локус амплификации (50-100 копий на клетку);  
 STB – локус, обеспечивающий равное  
 распределение плазмид между материнской и  
 дочерней клетками;  
 FLP – сайт-специфическая рекомбиназа.



Шатл-векторы:

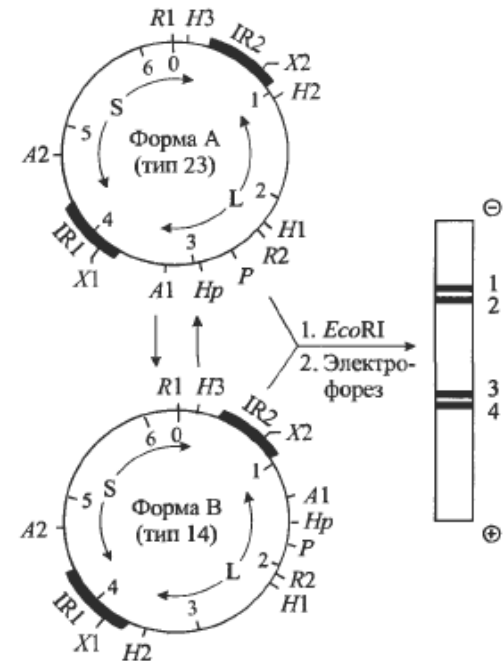
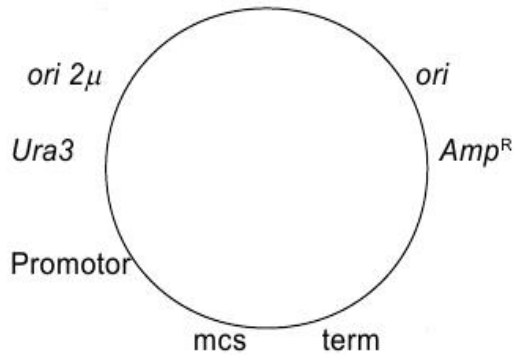


Рис. 12.3. Структура двух форм плазмиды Scp1 *S. cerevisiae*.

Сайты расщепления рестриктазами: R1, R2 — EcoRI;  
 H1, H2, H3 — HindIII; A1, A2 — Aval; P — PstI;  
 Hp — HpaI; X1, X2 — XbaI. Цифры внутри круга  
 обозначают расстояние (тип) от R1 по часовой стрелке

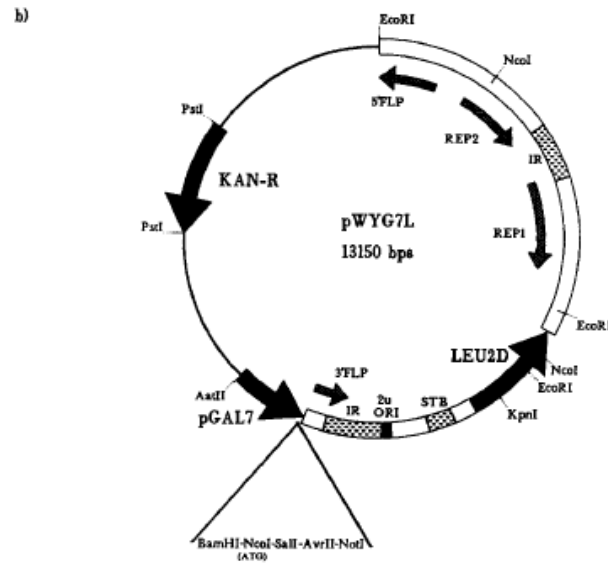
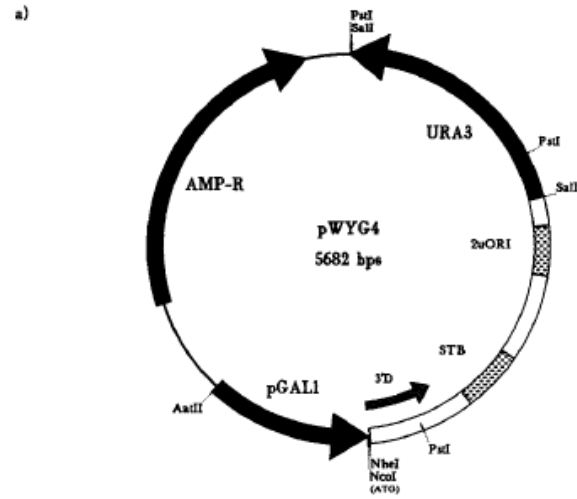


Figure 1.  $2\mu$ -based expression vectors for *S.cerevisiae* based on galactose-inducible promoters. (a) pWYG4 has the  $2\mu$  ORI-STB elements, the GAL1 promoter, and the  $2\mu$  D gene terminator; an NcoI cloning site containing the ATG is used to insert foreign genes. (b) pWYG7L has intact  $2\mu$  ORI, STB, REP1 and REP2, the GAL7 promoter, and uses the FLP terminator; foreign genes are inserted in the polylinker with their 5' ends at the BamHI or NcoI site.

## Репликативные (3) и центромерные (4) плазмиды

### **YRp:**

ARS – autonomously replicating sequence;

1-20 копий на клетку;

Нестабильность (ассоциированы с материнской клеткой).

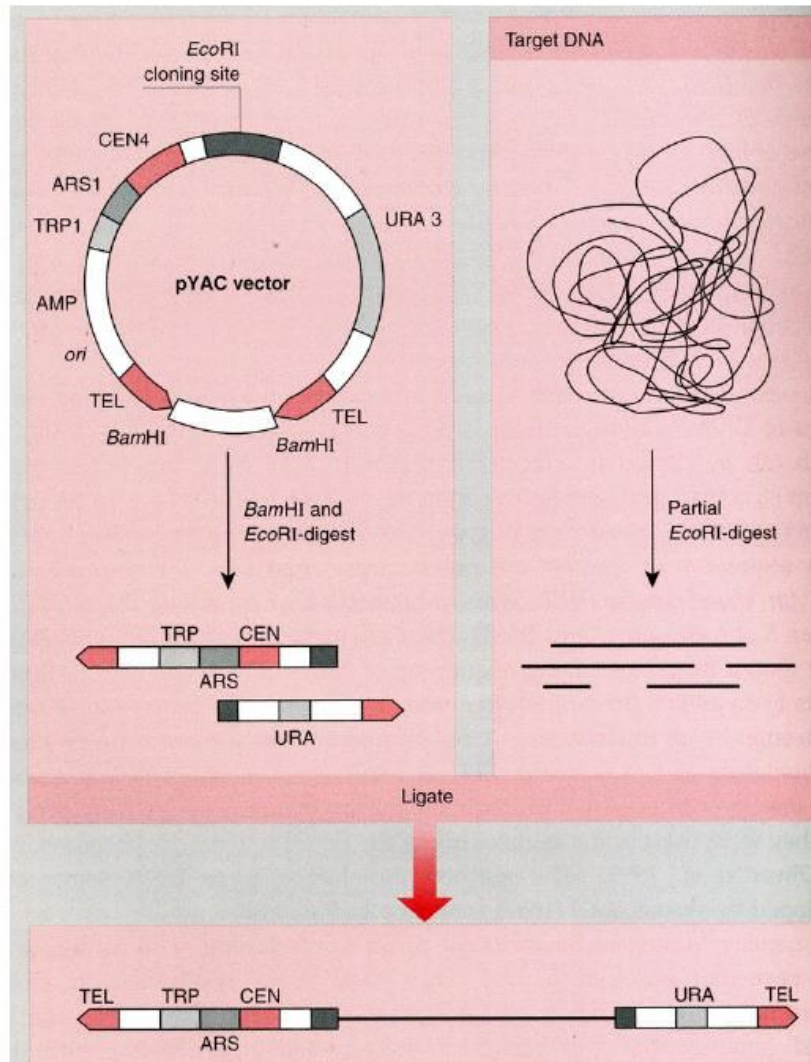
### **YCp:**

CEN – центромерные участки;

1-2 копии на клетку;

Стабильность (при мейозе сегрегация по Менделю).

# УАС'и



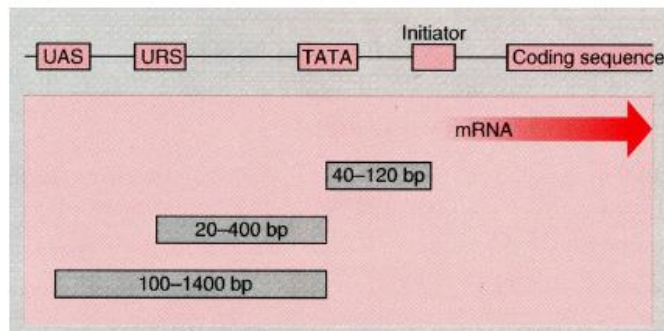
- TEL-теломеры;
- 1-2 копии на клетку;
- Стабильность возрастает с длиной вставки.



# 5. Промоторы и терминаторы дрожжей

## Экспрессия в клетках дрожжей

### Дрожжевые промоторы



Трансляция:

5' – Cap-----A<sub>3</sub> NN ATG G<sub>4</sub>-----

Промотор	сила	регуляция
PGK (фосфоглицераткиназный)	4+	20-кратная индукция глюкозой
GAL1 (галактокиназный)	3+	1000-кратная индукция галактозой (репрессия глюкозой)
PHOS (кислой фосфатазы)	2+	200-кратная репрессия фосфатом
ADH (алкогольдегидрогеназный)	2+	конститутивный
CUP1 (металлотинеиновый)	+	20-кратная индукция ионами меди
MET25 (метиониновый)	+	регулируется концентрацией метионина

6. Факторы, нарушающие экспрессию рекомбинантного белка в клетках дрожжей

7. Секреция рекомбинантных белков при гетерогенной экспрессии в клетках дрожжей

8. Другие виды дрожжей используемые для экспрессии