



**ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА
КАФЕДРАСЫ**

**ДӘРІС 6. *S.CEREVISIAE* АШЫТҚЫ КЛЕТКАЛАРЫНЫҢ ГЕНДІК-
ИНЖЕНЕРИЯЛЫҚ ЖҮЙЕСІ**

**Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.**

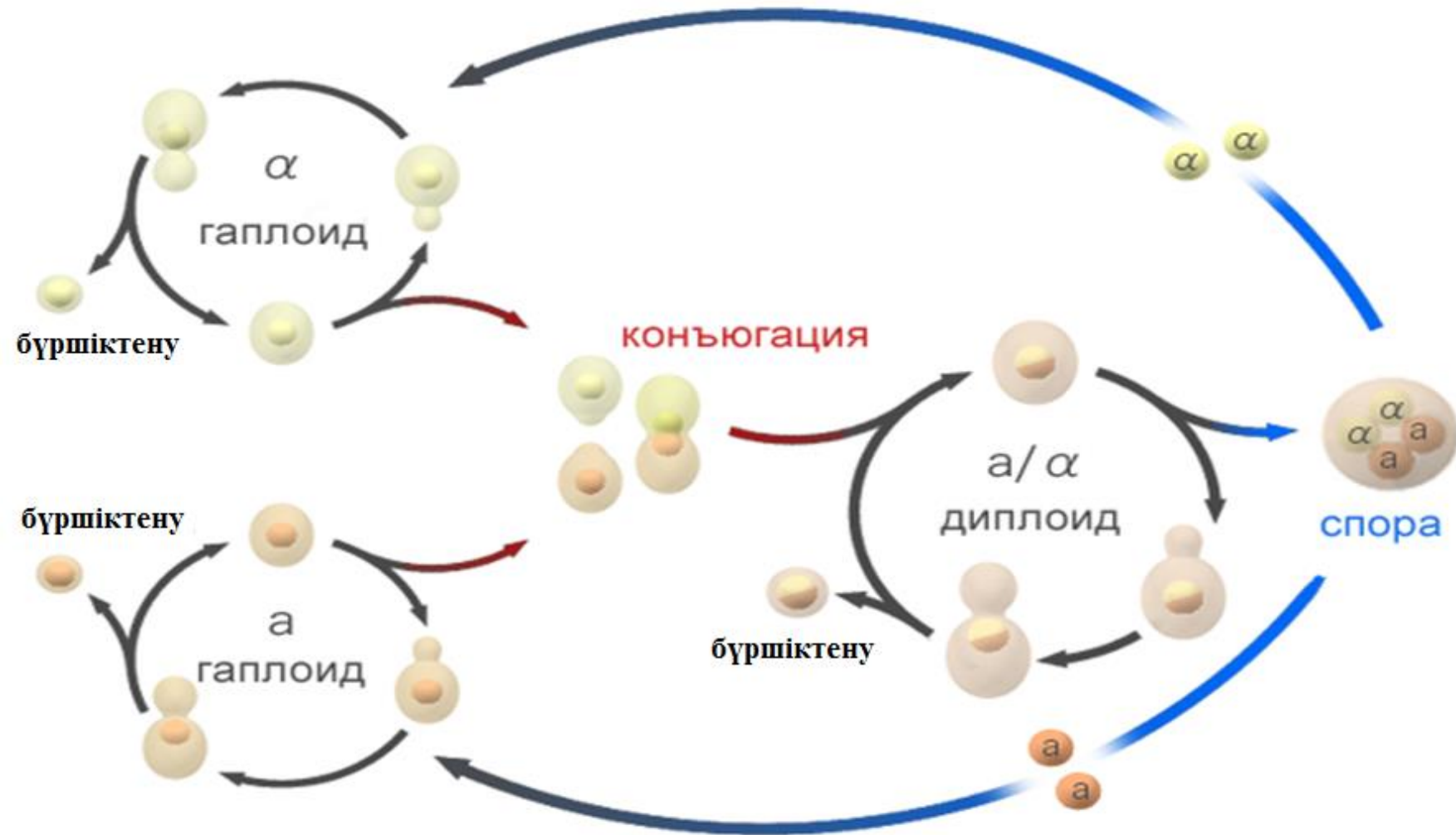
Жоспар:

- Сахаромицет - ашытқыларының генетикалық ұйымдасуы.
- Ашытқы клеткасының көбеюі
- Ашытқы клеткаларының плазмидалық трансформациясы.
- *S. cerevisiae* молекулалық векторлары:
- Интеграция векторлары.
- Клондаушы векторлар.
- Жасанды УАС хромосомасы.

Ашытқы жасушалары келесі себептер бойынша қолданылады:

- Ашытқылар - генетикасы мен физиологиясы жақсы зерттелген, ашытқы геномы толығымен секвенирленген бір клеткалы эукариоттар, оларды зертханалық жағдайда және биореакторларда өсіруге болады.
- Табиғи ашытқы плазмидаларын векторлық молекулалар ретінде пайдалануға болады
- Ашытқы жасушаларында ақуыздардың аминқышқылдарының қалдықтарының трансляциядан кейінгі модификациялары (гликозилдену, -S-S- көпірлер түзілуі және т.б.) эукариоттардағыдай жүзеге асырылады.
- Тазарту процесін жеңілдететін ортаға гетерологиялық ақуыздарды секрециялауға қабілетті
- Тамақ өнеркәсібінде қолданылады және қауіпсіз микроорганизмдер ретінде танылады

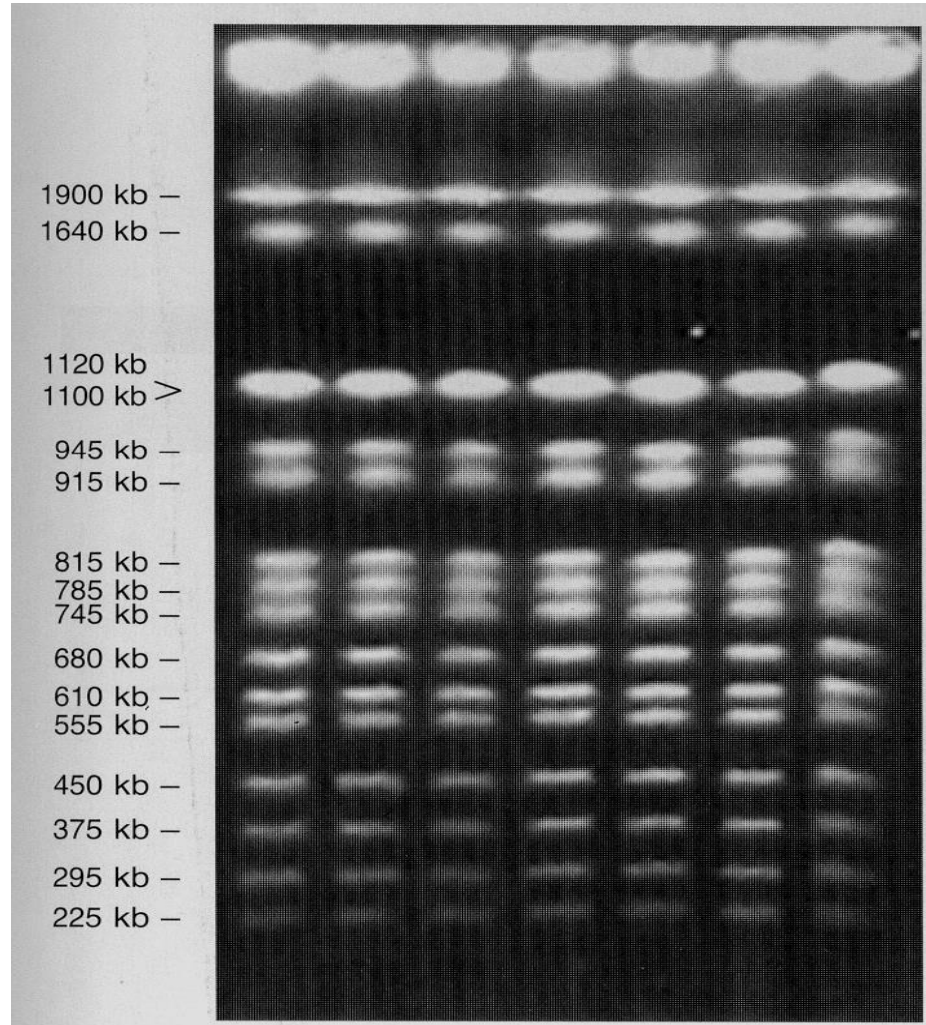
Saccharomyces cerevisiae тіршілік циклі



Бүршіктену- жыныссыз жолмен көбею
қолайлы жағдайда іске асады

Жыныстық жолмен көбею
Қолайсыз жағдайда іске асады

Saccharomyces cerevisiae генетикалық аппараты



**16 ядролық хромосомасы
(сызықты):**

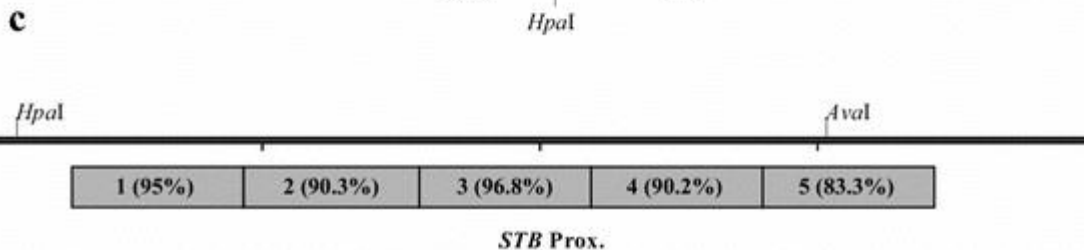
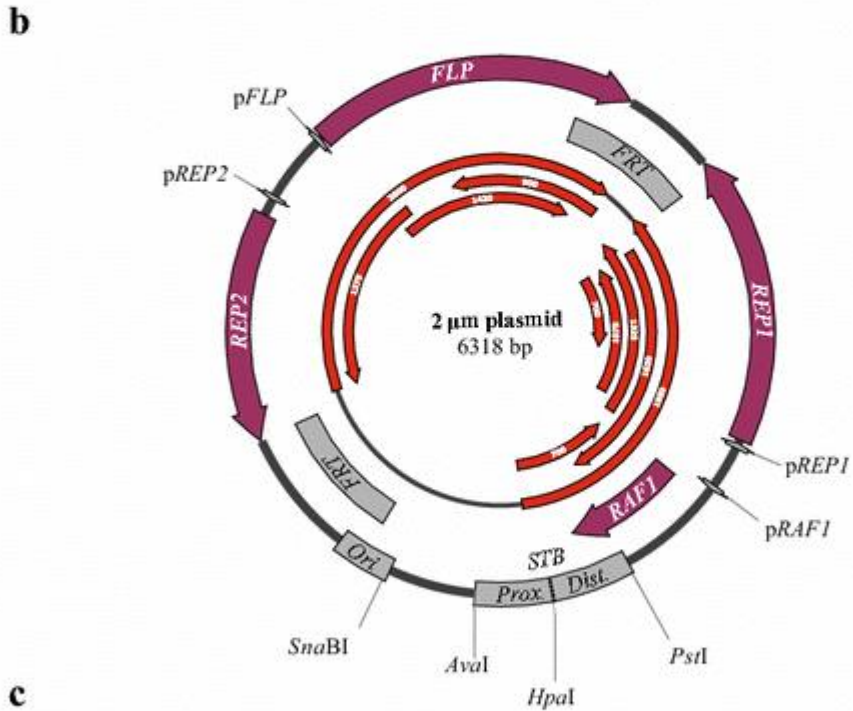
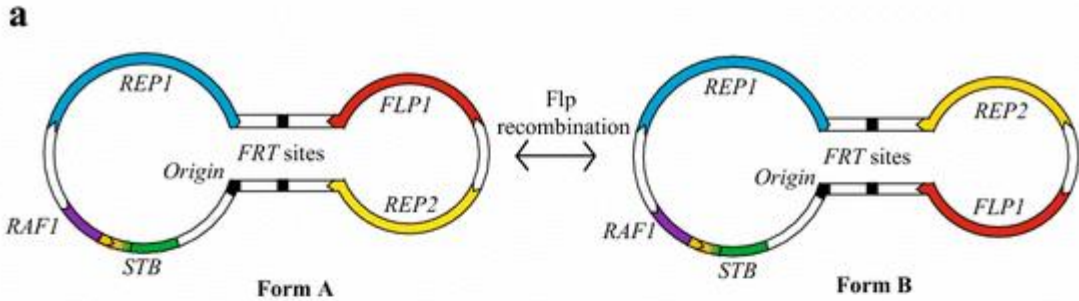
**Митохондриялық
хромосома:
Сақиналы 25 μ m
75 kb (10-40 көшірме)**

**2 μ плазмида Scp1:
6318 b (30-200 көшірме)**

Ашытқы геномының құрылымы

Хромосома	Ұзындығы м.ж.н.	Қайталаным мөлшері (т.п.н.)	Қайталаным типi	ORF саны	tPHK гендерi	кяPHK гендерi
**	230	-	-	107	4	1
II	813	-	-	429	13	3
III	315	-	-	174	10	4
IV	1554	8+14	2(ENA2)+ 2(Y')	825	28	3
V	577	-	-	296	20	6
VI	270	-	-	135	10	0
VII	1091	-	-	575	36	7
VIII	589	26	13(CUP1)	292	11	2
IX	440	-	-	233	10	2
X	745	-	-	390	24	6
XI	666	-	-	336	16	4
XII	2352	1260+14	140(pДНК+ 2(Y')	554	21	8
XIII	924	-	-	493	21	10
XIV	784	-	-	423	14	6
XV	1091	-	-	576	20	12
XVI	948	-	-	502	17	6
Барлығы	13392	1323	-	6340	275	80

Плазмида Scp1 (2μ) 6318 bp



- Қос тізбекті сақиналы
- Криптикалық плазмида
- 6318 ж.н. тұрады
- Ядрода орналасқан
- Гапloidты клеткадағы көшірмесі 30-200
- IR- инвертирленген қайталанымдар
- ori –репликацияның басталу нүктесі

EcoRI



Маркерлік гендері

<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	Фермент
ARG4	<i>argH</i>	Аргининосукцинатлиаза
HIS3	<i>hisB</i>	Имидазоглицерофосфатдегидратаза
LEU2	<i>leuB</i>	β-изопропилмалатдегидрогеназа
TRP1	<i>trpAB</i>	Триптофансинтетаза
TRP5	<i>trpC</i>	Индолилглицерофосфатсинтетаза
URA1	<i>pyrD</i>	Дигидрооротатдегидрогеназа
URA2	<i>pyrB</i>	Аспартат-транскарбамилаза
URA3	<i>pyrF</i>	Оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза
GAL1	<i>galK</i>	Галактокиназа

Векторлық маркерлер

- Векторлық маркерлер ретінде ең кең таралған гендер - LEU2, HIS4, TRP1, URA3.
- URA3 әсіресе ыңғайлы, өйткені бұл ген үшін мутантты және мутантты емес аллельдерді таңдау жүйесі бар, сондықтан векторды сақтаған және жоғалтқан жасушаларды таңдауға болады.
- Сонымен қатар, жабайы типтегі штамдарды трансформациялауға болатын доминантты мутациясы бар векторлар да қолданылады: гигромицин В-ге төзімділік (Кастер және басқалар, 1984),
- левомецетин (Хадфилд және басқалар, 1986),
- мысқа (Хендерсон және т.б.) соавт., 1985),
- метатрексатқа, сульфометуронметилге (Кейси және басқалар, 1988), антибиотик G418 төзімділік маркерлік гендері
- Мұндай маркерлер өнеркәсіптік штамдарды трансформациялау үшін әсіресе пайдалы.

Шаттл-векторлар

Ашытқы геномында оперондар жоқ, олар РНҚ полимераза­ларының үш түрімен транскрипцияланады.

Saccharomyces cerevisiae әдетте клондау және экспрессия үшін қолданылады.

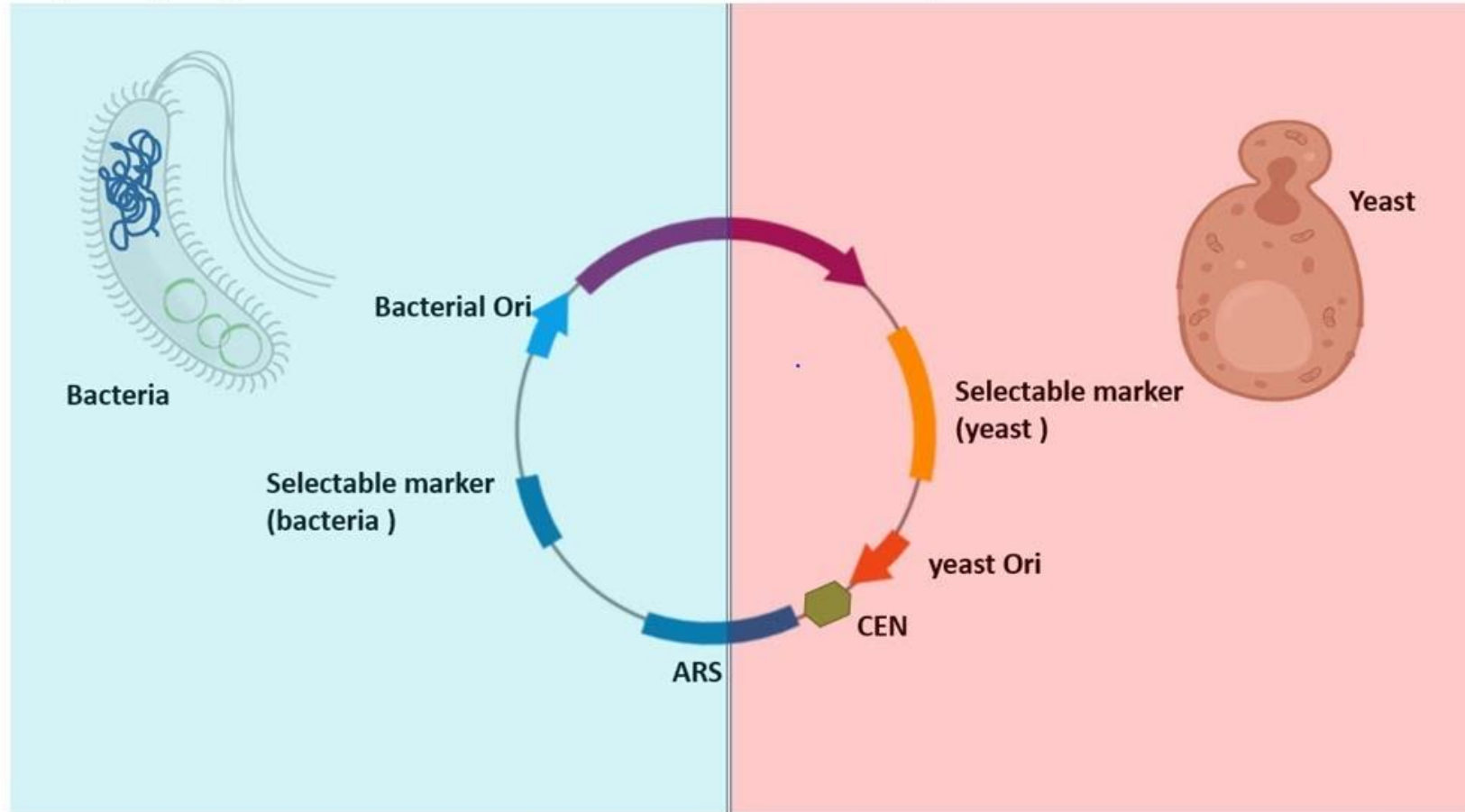
Рекомбинантты ДНҚ молекулалары бар ашытқы клондардың скринингін жүргізу оңай. Дегенмен ашытқы жасушаларынан векторлық молекулалардың едәуір мөлшерін таза күйде бөліп алу қиын. Сондықтан

ашытқы клеткаларында ДНҚ фрагменттерін клондау кезінде құрамында ашытқы мен бактериялық плазмидалардың ори сайттарының болуына байланысты ашытқы мен бактерияларда тәуелсіз репликациялауға қабілетті шаттл-векторлар қолданылады.

Ашытқылардан векторлар мен рекомбинантты ДНҚ бөлу екі кезеңде жүзеге асырылады.

Алдымен трансформацияланған ашытқыдан жалпы ДНҚ бөлініп алынады, содан кейін онымен *E. coli* жасушалары трансформацияланып және селективті белгілері негізінде шаттл векторлары бар клондар таңдалады.

A **shuttle vector** is a plasmid engineered in a way so that it can propagate in two different host species



Молекулалық векторлар

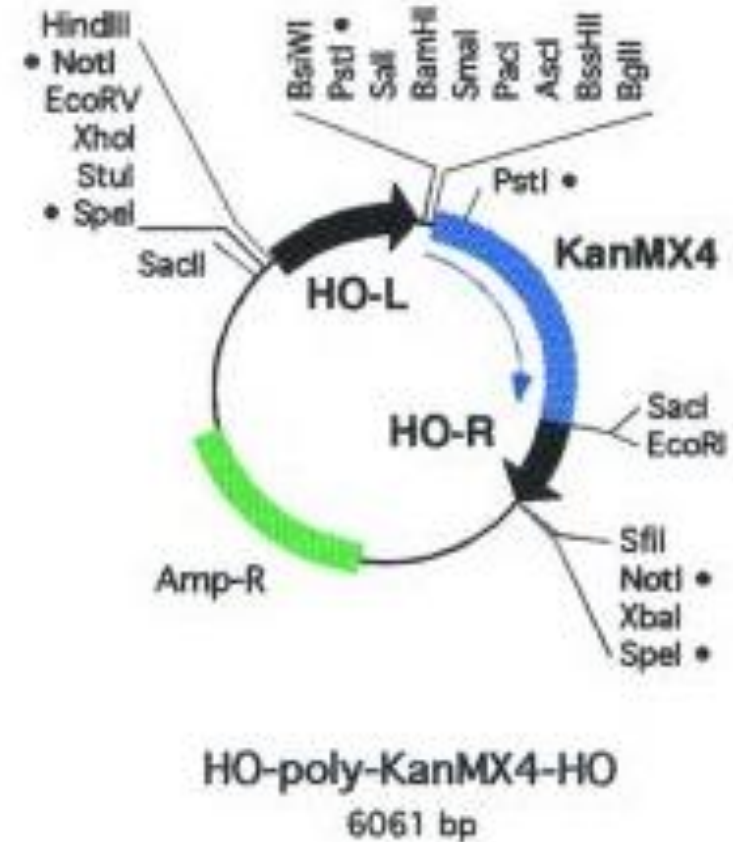
- Ашытқы интеграциялық плазмидтері (YIp)
- Ашытқы эписомалық плазмидтері (YEр)
- Ашытқы репликациялық плазмидтері (YRp)
- Ашытқы центромералық плазмидтері (YCP)
- Ашытқы жасанды хромосомалары (YAC)

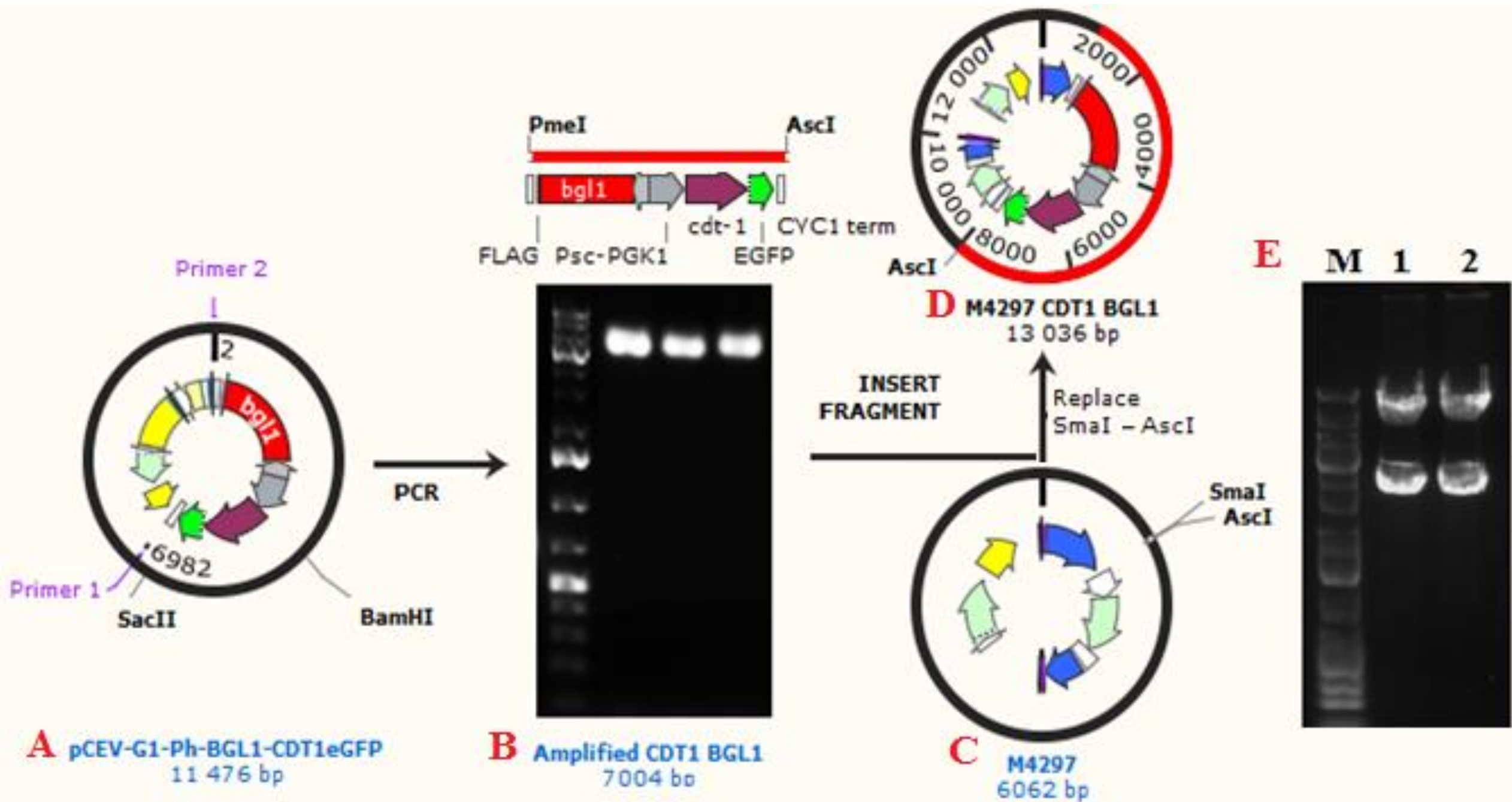
I. Ашытқы интеграциялық плазмидтері (ҮІр)

ҮІр интегративті векторлары ашытқы хромосомасына гомологиялық рекомбинация жолымен бөгде ДНҚ фрагментін интеграциялауға енгізуге арналған.

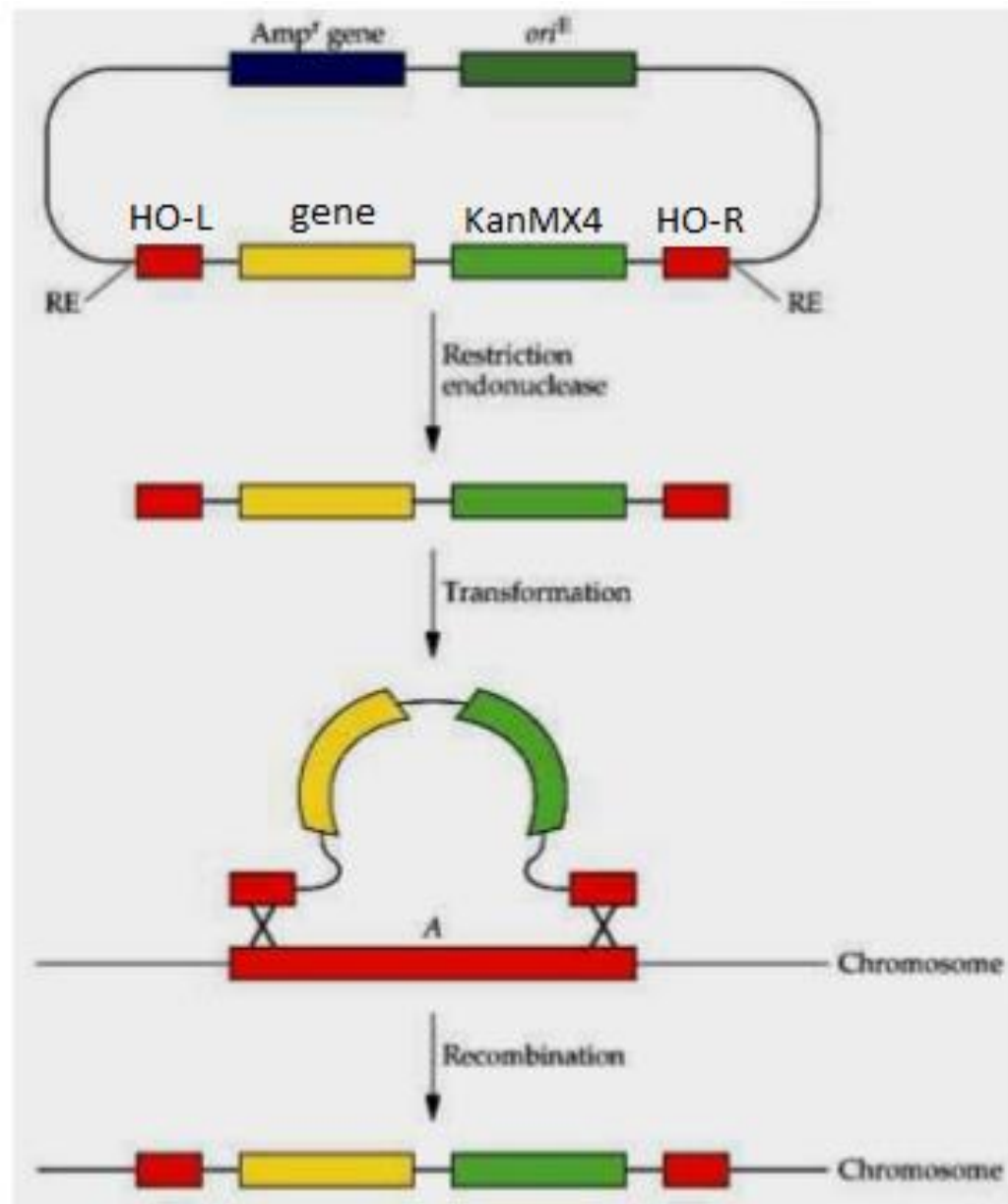
Трансформация тиімділігі төмен, бірақ оны плазмиданы сызықтық күйге айналдыру арқылы 1000 есе арттыруға болады

ҮІр өте тұрақты, клеткаға негізінен бір копия енеді, бірақ кейбір трансформанттарда бір геномға 5 копия жетуі мүмкін.

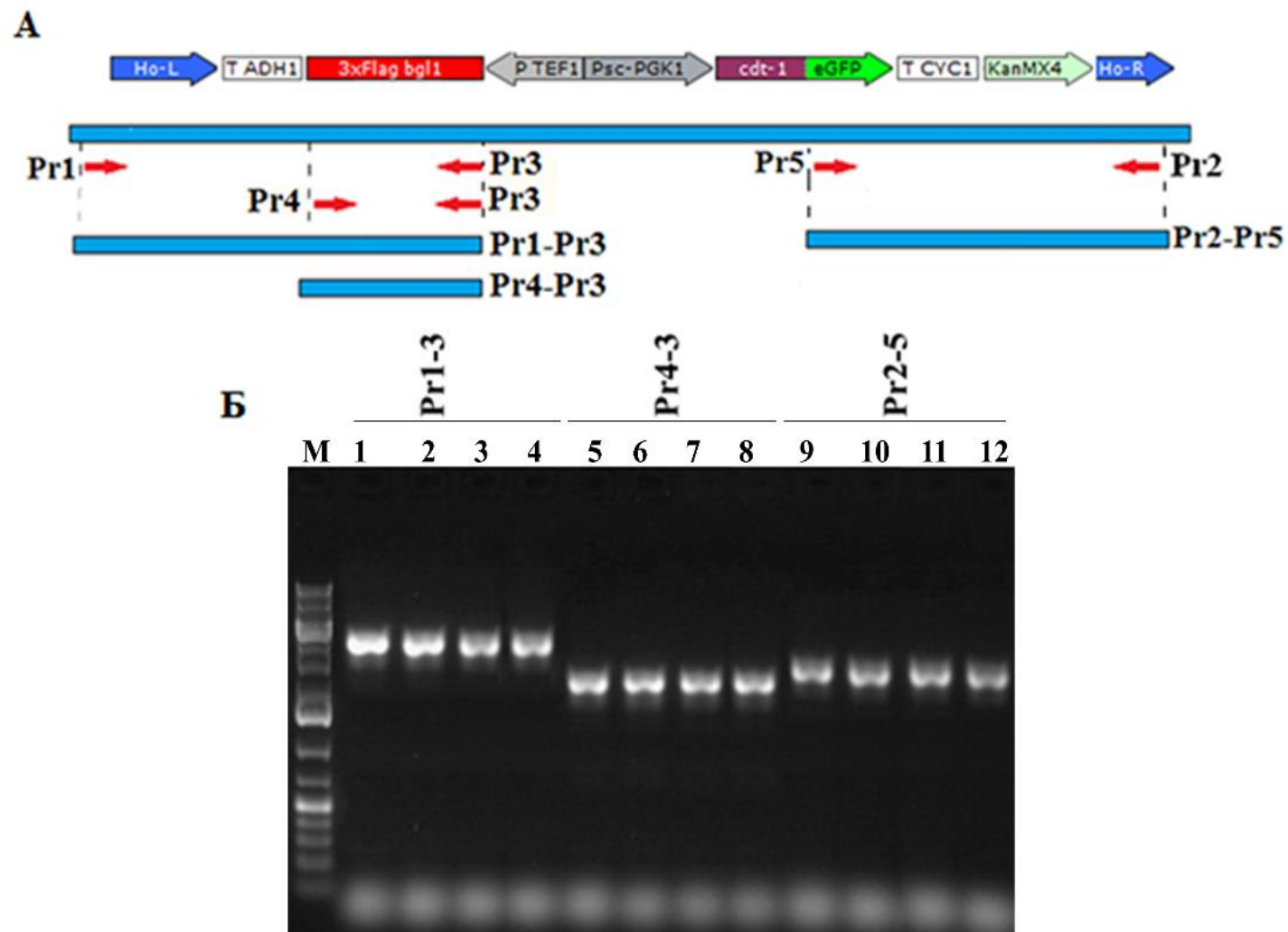




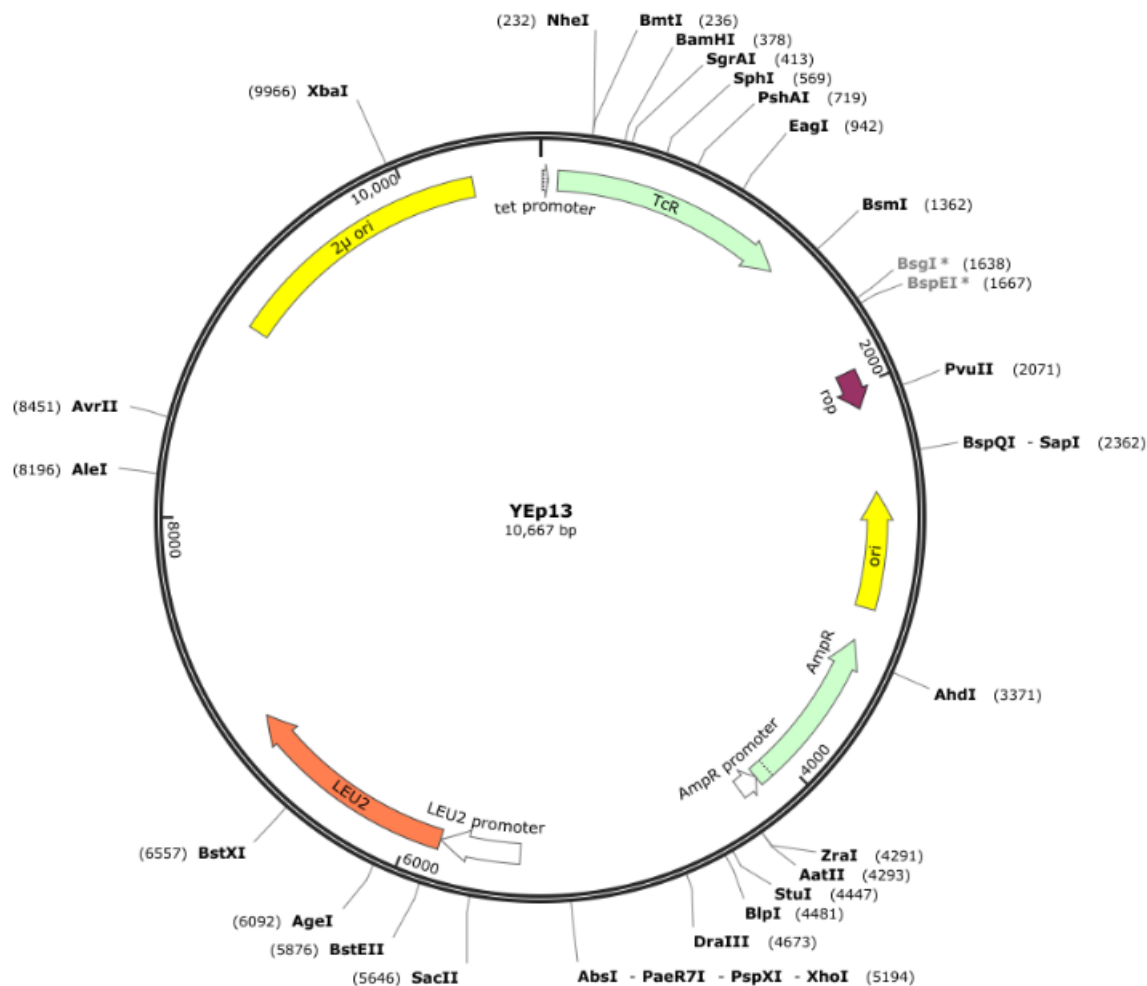
Гомологиялық рекомбинация жолымен геномға интеграциялану схемасы



Интеграция нәтижесін талдау



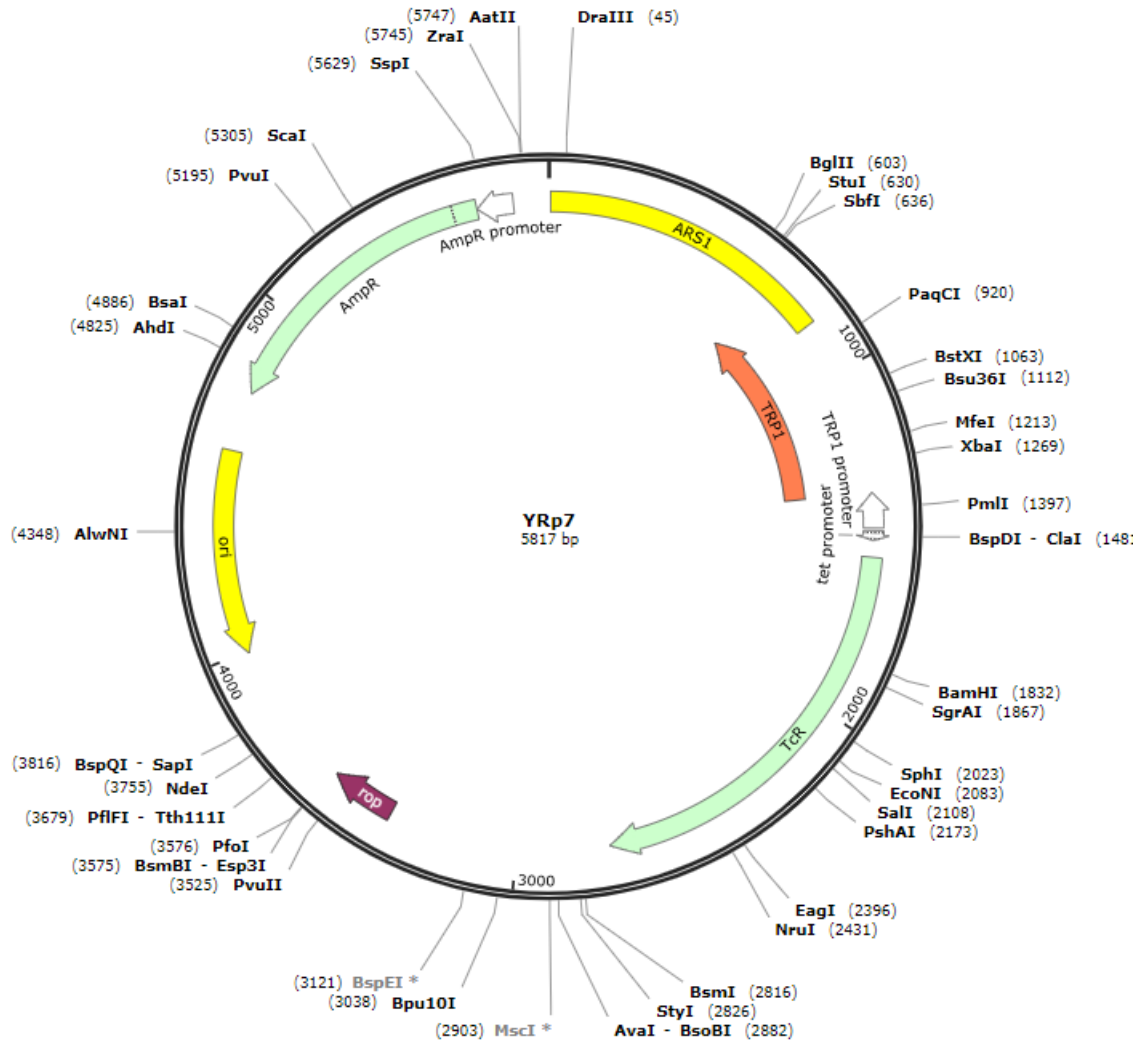
II. Ашытқы эписомалық плазмидтері (ҮЕр)



ҮЕр векторлары (2 мкм плазмида репликаторымен) ҮІр-ге қарағанда тұрақтылығы төмен және клеткада көп көшірме санына ие болады.

Селективті жағдайда популяциядағы плазмиданы жоғалтқан жасушалардың үлесі 30-50% құрайды (эногенді 2 мкм плазмиданы сақтайтын сiг + штамдарында). Клеткадағы ҮЕр көшірме саны 25-100 дейін жетеді. Одан да жоғары көшірме санына ие плазмидаларын алуға болады - 150 копияға дейін.

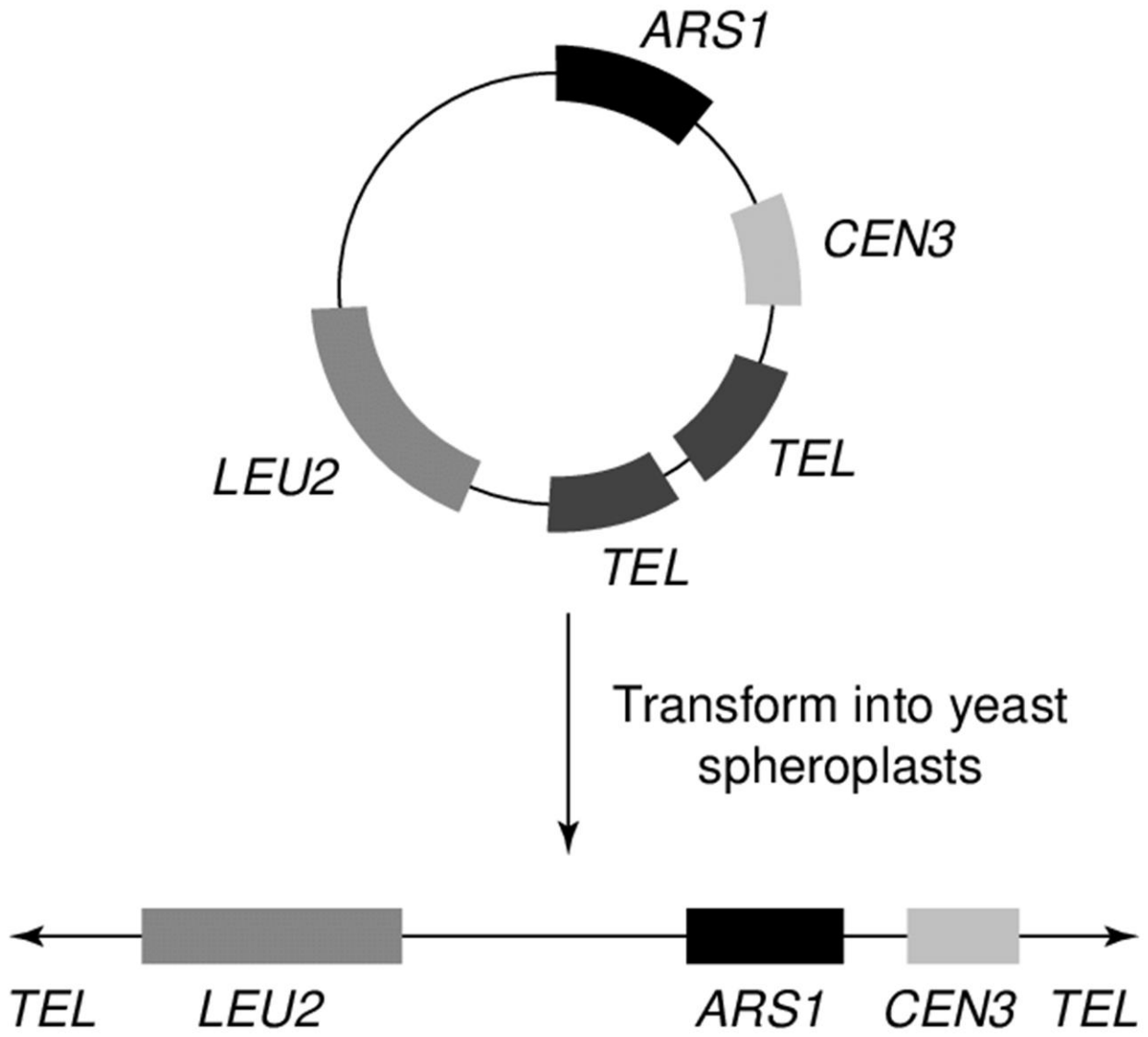
III. Ашытқы репликациялық плазмидтері (YRp)



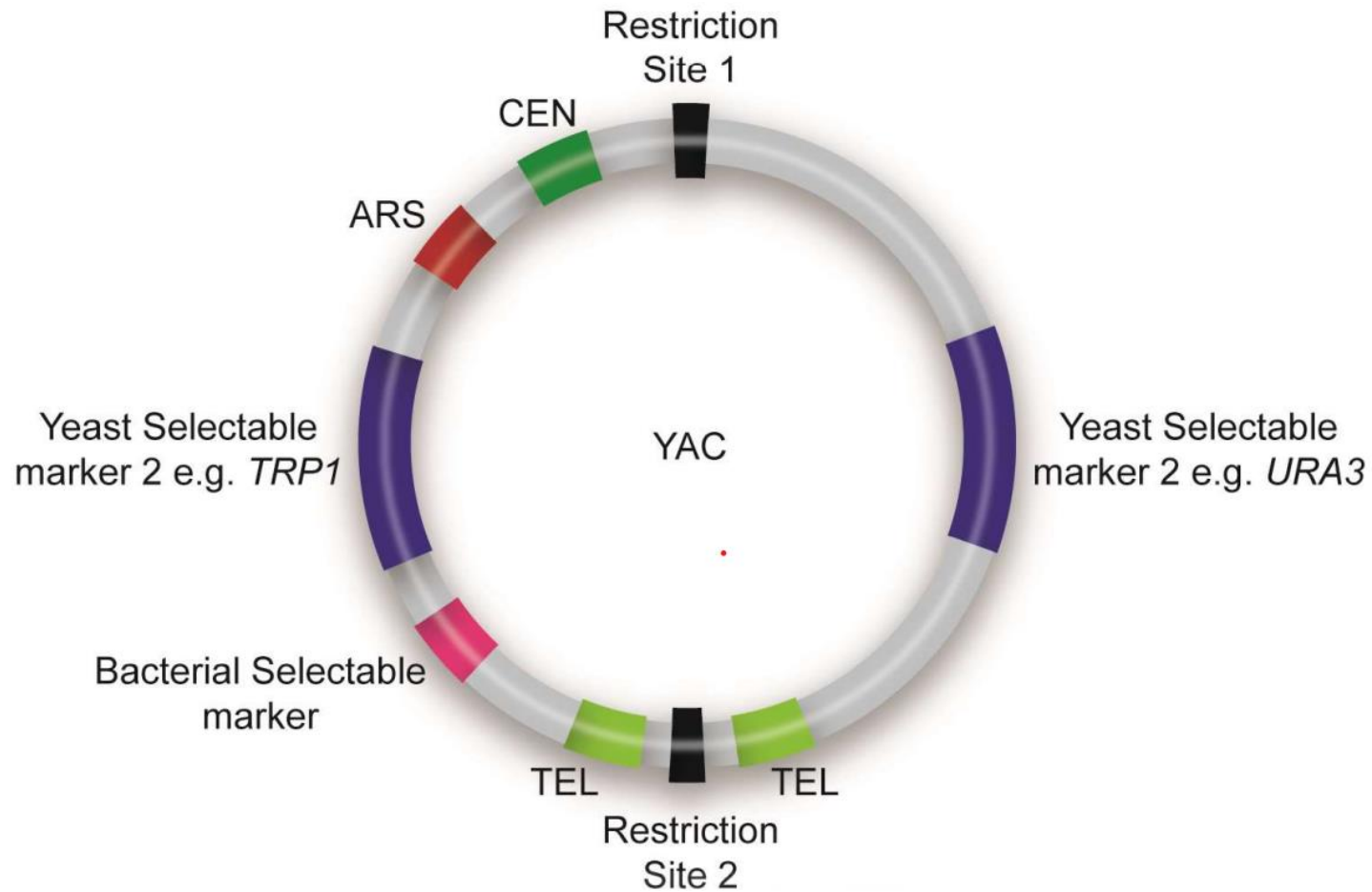
YRp векторы YRp векторлары (хромосомалық репликаторлармен) YRp-ге қарағанда тұрақтылығы төмен және көптеген көшірмелерде болады. Селективті жағдайда популяциядағы плазмиданы жоғалтқан жасушалардың үлесі 75-90% құрайды. Сонымен қатар, жасушаларда 20-50 данадан астам YRp көшірмесі кездеседі. Одан да жоғары көшірме санына ие плазмидаларын алуға болады - 150 данаға дейін.

IV. Ашытқы центромералық плазмидтері (ҮСР)

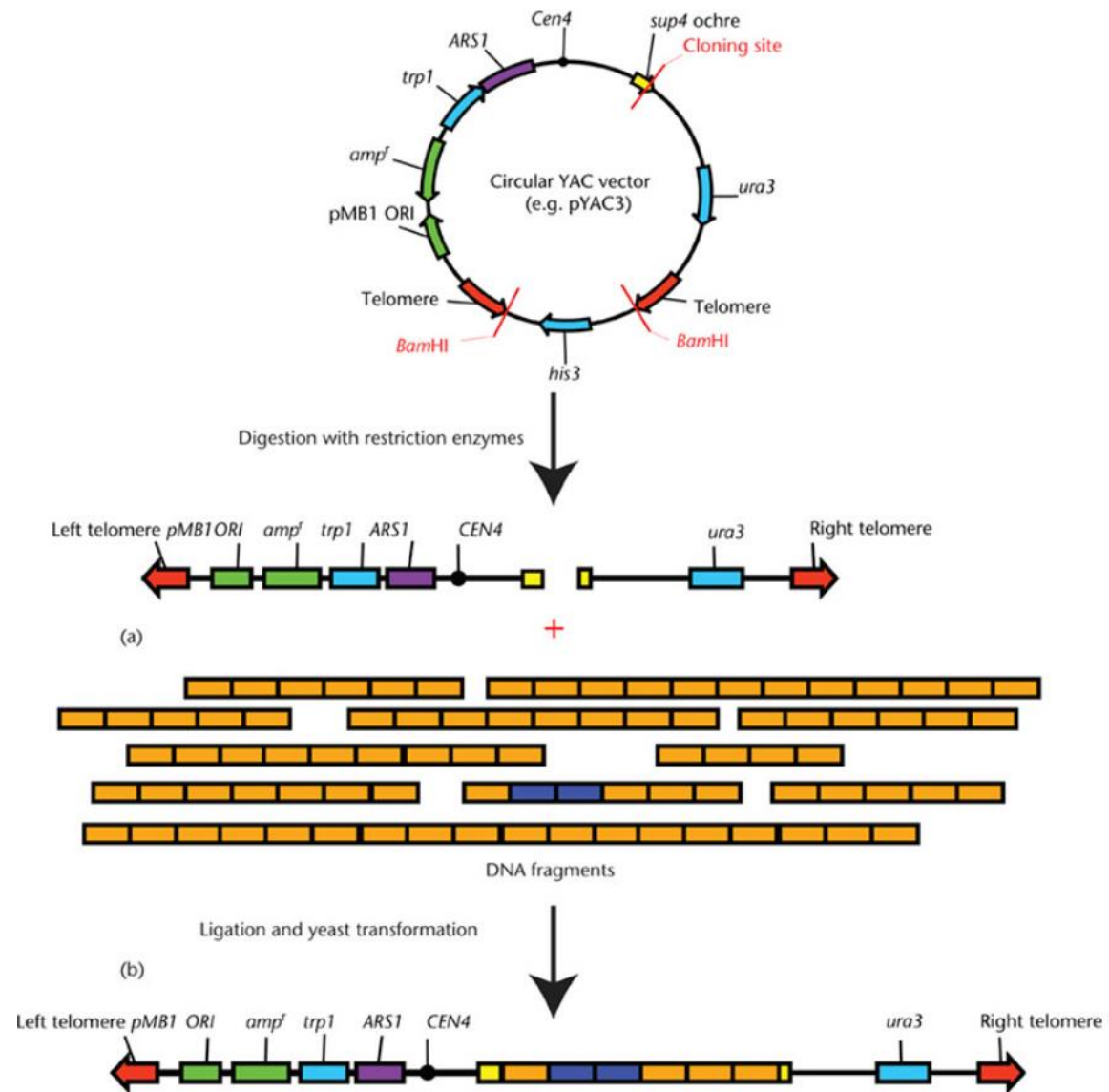
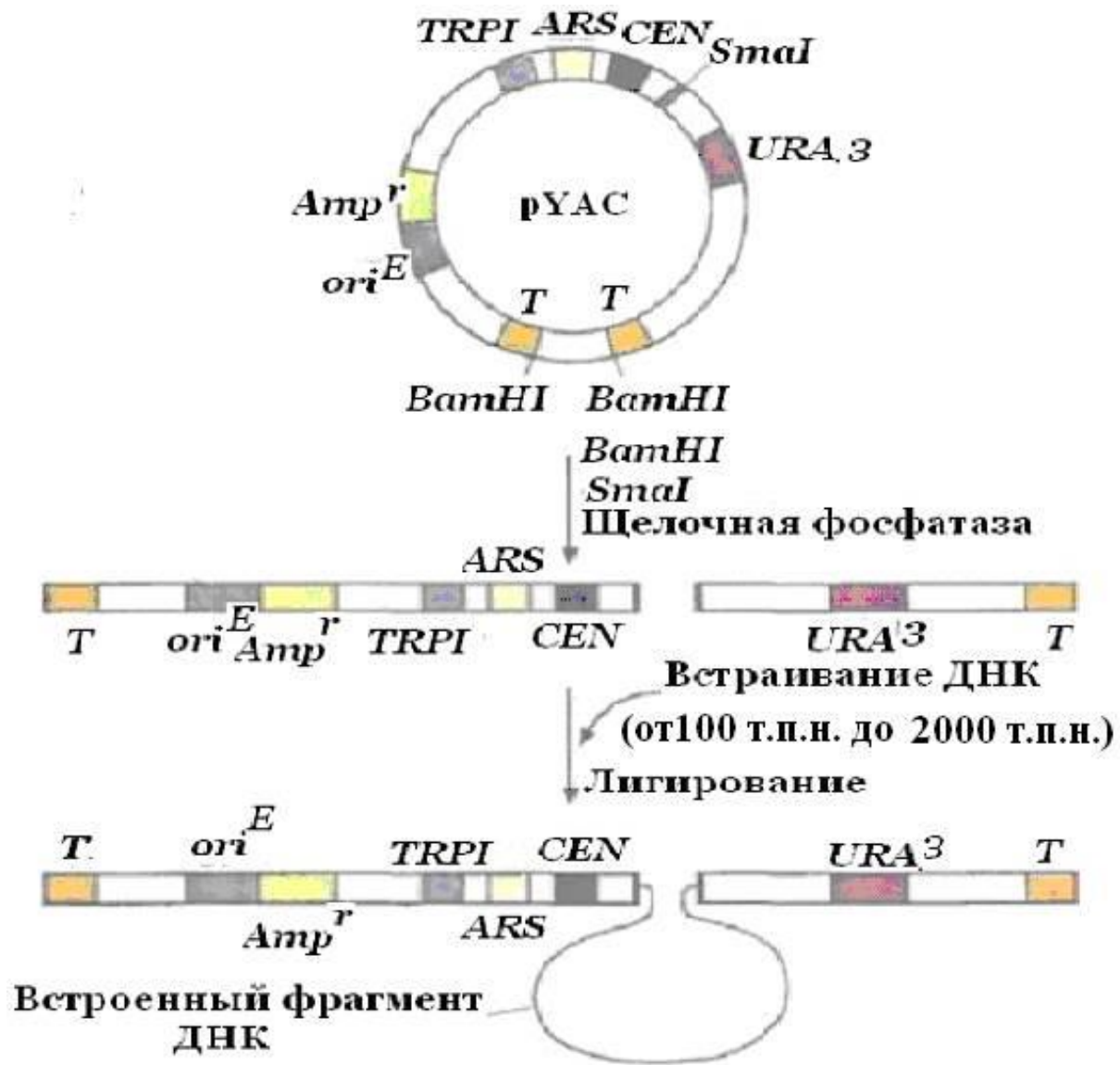
ҮСр векторы Ашытқы центромерлері бар ҮСр векторлары. Селективті жағдайда жасушалардың 85-95% -ында ҮСр сақталады. Көптеген жасушаларда плазмиданың бір данасы бар, популяцияның 15-20% -ында екі данасы бар. ҮСр көшірме санының көбеюі жасуша үшін улы.



Ашытқы жасанды хромосомалары (ҮАС)



ҮАС векторлары геномның үлкен (500 кб-тан жоғары) фрагменттерін клондау мүмкіндігін береді. Олар жоғары эукариоттардың гендер банктерін құру үшін пайдаланылды: адамдар, дрозифила және т.б. Осы векторларды қолдану геномның физикалық картасын жасау мен сиквенсін едәуір жеңілдетеді, хромосомалардың үлкен элементтерін (мысалы, центромерлер) клондау және хромосомалардың белгілі бір аймақтарындағы клондалған гендерді оқшаулайды мүмкіндігін береді.



Ашытқы молекулалық векторларының компоненттері				
	YIp	YEp	YRp	YCp
E. Coli гендері мен сегменттері				
ori, bla, tet	+	+	+	+
Ашытқы гендері мен сегменттері				
URA3; HIS3; LEU2; TRP1; LYS2	+	+	+	+
leu2-d	0	+	+	0
2 μ m; 2 μ m-ori REP3	0	+	0	0
ARS1; ARS2; ARS3	0	0	+	+
CEN3; CEN4; CEN11	0	0	0	+
Қожайын клеткаларының маркерлері (ашытқы)				
ura3-52; his3- Δ 1; leu2- Δ 1; trp1- Δ 1; lys2-201 и пр.	+	+	+	+
Тұрақтылығы	++	+	+	+

Ашытқы клеткаларын трансформациялау әдістері

I. Ca^{2+} және ПЭГ бар ортада протопластардың құйылысуы нәтижесінде трансформациялау.

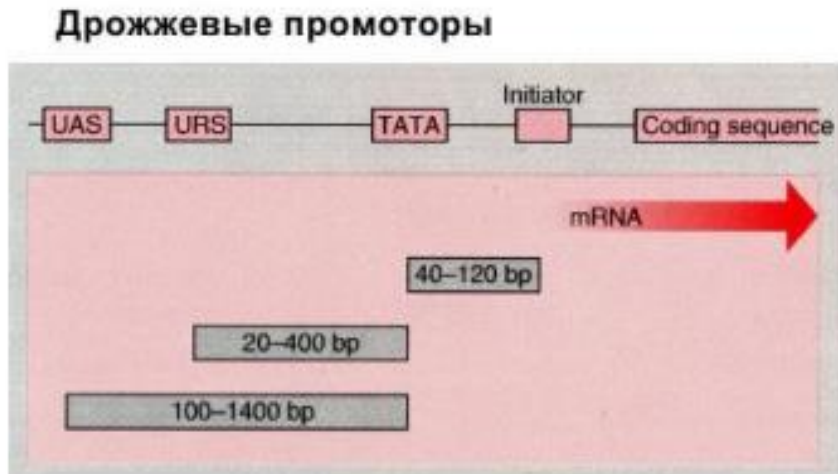
II. Li^+ және ПЭГ бар ортада ашытқы клеткаларын трансформациялау.

III. CaCl_2 бар ортада шок көмегімен ашытқы клеткаларының компетенттілігін индукциялау.

IV. Электропорация.

V. Биобаллистика.

Ашытқылардағы экспрессияны оңтайландыруға алғашқы қадам - бұл промотерді таңдау

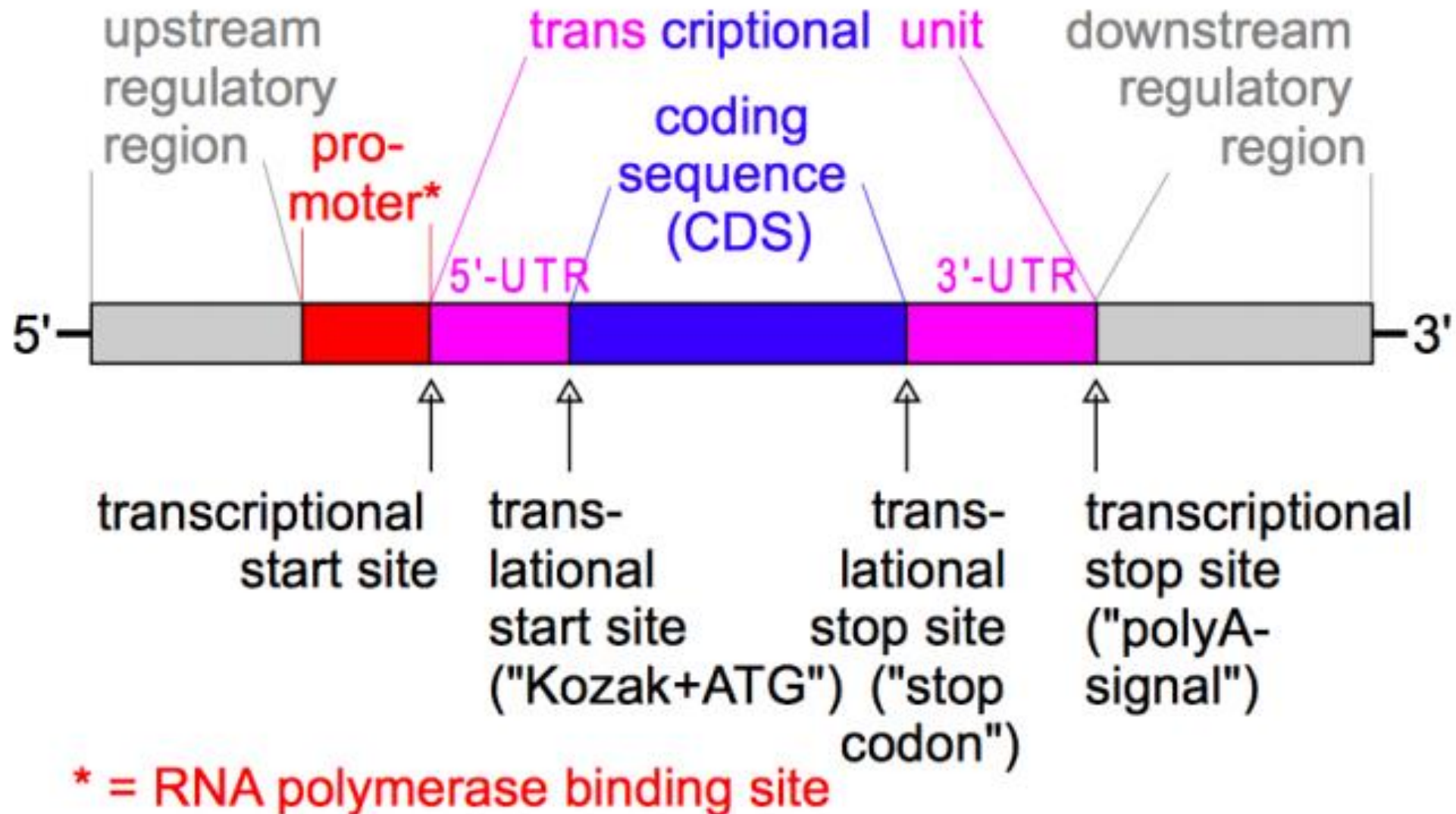


Трансляция:

5' – Cap-----A₃ NN ATG G₄-----

- ТАТА бокс старт кодоннан алшақ орналасқан (40-120 ж.н.)
- Ашытқы промоторлары 100-1000 ж.н активаторларымен бірге жұмыс істейді.
- Ұзындығы 1кб-қа дейінгі ұзын реттегіш ауданнан тұрады
- Конститутивті промотерлер: алкоголь дегидрогеназы, триозды фосфатдегидрогеназа
- Индуцибельді промотор -Галактоза катаболизмі гендерінің промоторлары
- Полиаденилдену транскриптің 3'-үшына өте жақын жүзеге асады

Эукариотты гендердің ұйымдастырылуы



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

- Тиімді экспрессияның қажетті шарты - мақсатты геннің транскрипциясын қамтамасыз ететін ашытқы геномының реттеуші элементтері - промоторлар мен терминаторларды дұрыс таңдау. Барлық ашытқы промоутерлерінде үш маңызды элемент бар - активтендіру тізбегі (UAS), TATA элементі және инициатор элементі. Кешенді ұйымдастырылған промоутерлерде бірнеше UAS және TATA элементтері және теріс реттеу сайттары болуы мүмкін. Гликолиз ферментінің гендерінің промоторлары- алкоголь дегидрогеназы I (ADH1), фосфоглицераткиназа (PGK) және глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAP) ең белсенді болып табылады. Олар глюкозаның қосылуымен реттеледі, бірақ индукция деңгейі шамалы, бұл олардың қолданылуын шектейді. Ең күшті қатаң реттелетін промоутерлер - галактоза метаболизмінің GAL1, GAL7 және GAL10 гендерінің промоторлары. Бұл промоторлар галактозаны қосқанда 1000 есе жылдам индукцияланады және индукция жағдайында қоректік ортадан шығарылуы керек глюкозамен қатты репрессияланады. Басқа ыңғайлы реттелетін промоутерлер - фосфаттық аштықтан туындаған қышқыл фосфатаза (PHO5) генінің промоторы, жылу соққысы ақуыз гендерінің терморегуляцияланған промоторлары және мыс ионының индукциясы бар CUP1 промоторы.

Пайдаланылган әдебиеттер

- 1) Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск, 2006. – 304с.
- 2) Б.Глик, Дж.Пастернак Москва,2002
«Молекулярная биотехнология»
- 3) Буряченко С.В. Молекулярная генетика дрожжей сахаромецетов. монография