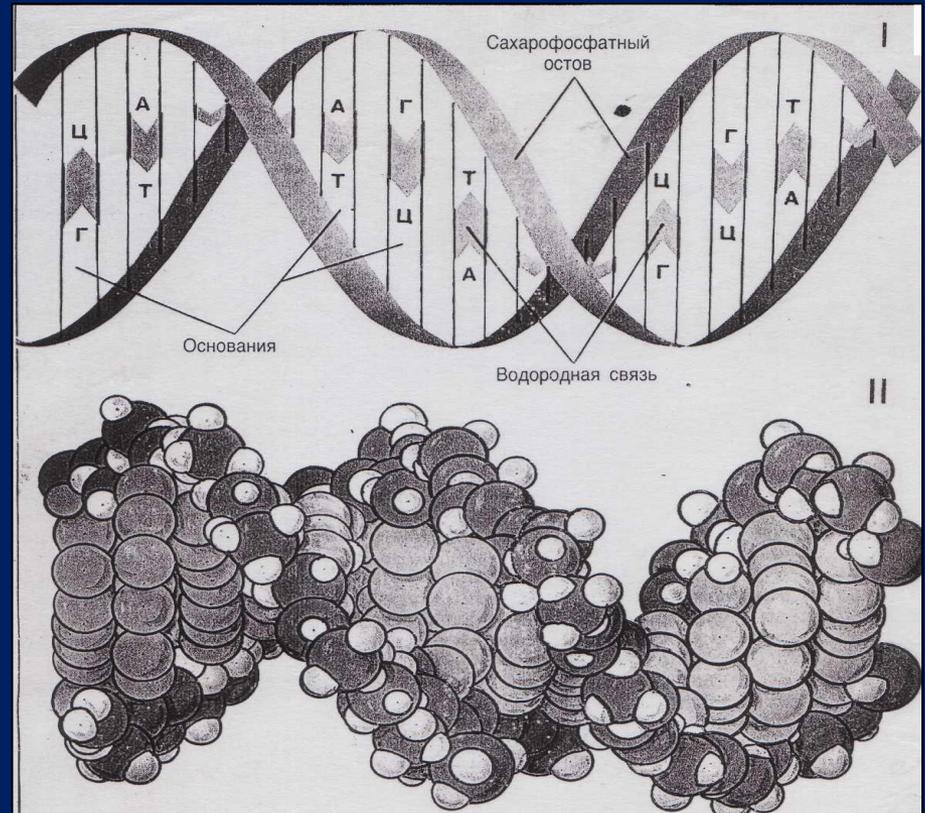


Генетика микроорганизмов. Биотехнология

Зав.кафедрой д.м.
н., профессор
Г.И.Чубенко

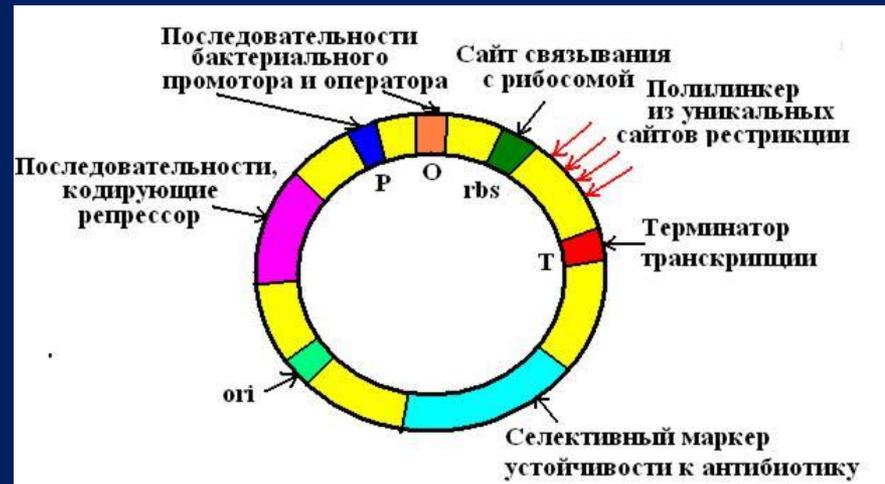


Генетика- наука о наследственности и изменчивости

Ген- фрагмент молекулы ДНК, контролирующий один признак или пептид .

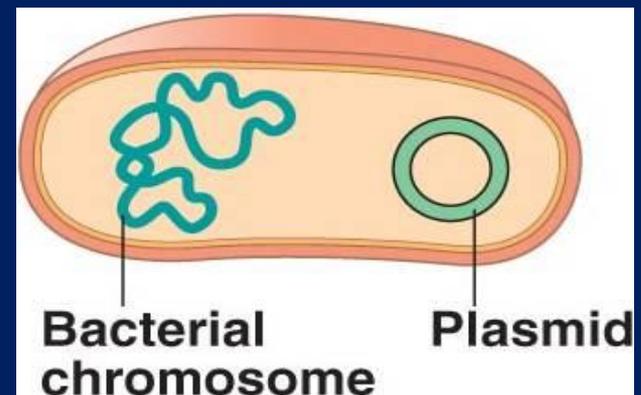
Генотип- совокупность всех генов данной особи.

Аллели - различные состояния одного и того же гена, располагающиеся в определенном локусе(участке) гомологичных хромосом и определяющие развитие одного какого-то признака.



Особенности бактерий как генетического объекта

- микроорганизмы имеют малые размеры, высокую скорость размножения,
- легко культивируются в искусственных условиях;
- гаплоидны, отсутствует явление доминантности;
- наличие половой дифференцировки - донорных и реципиентных клеток;
- наличие обособленных фрагментов ДНК (подвижные генетические элементы)

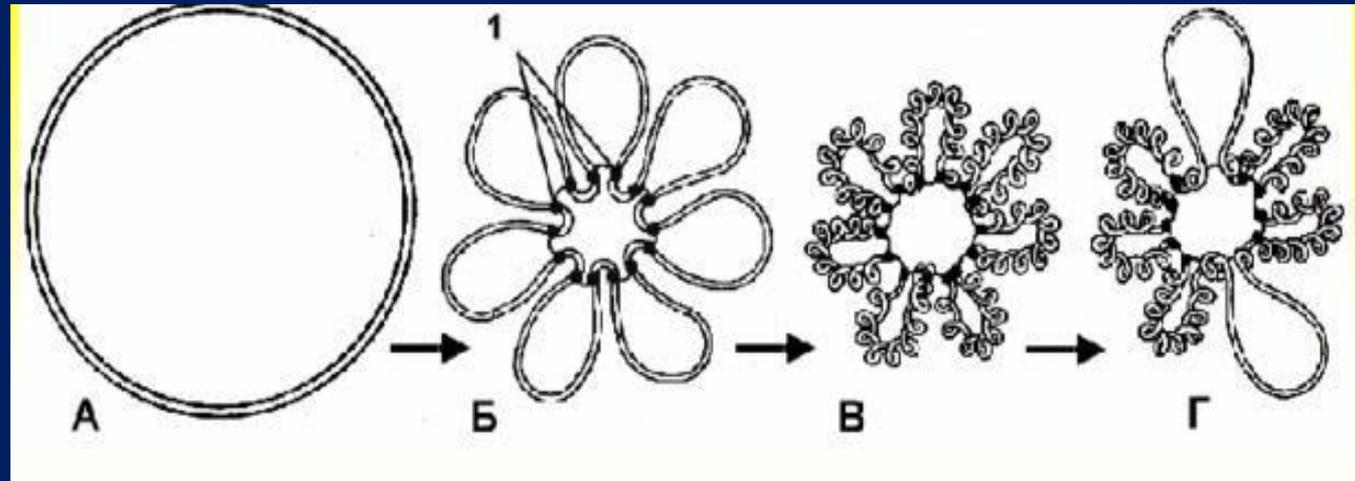


МАТЕРИАЛЬНАЯ ОСНОВА ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

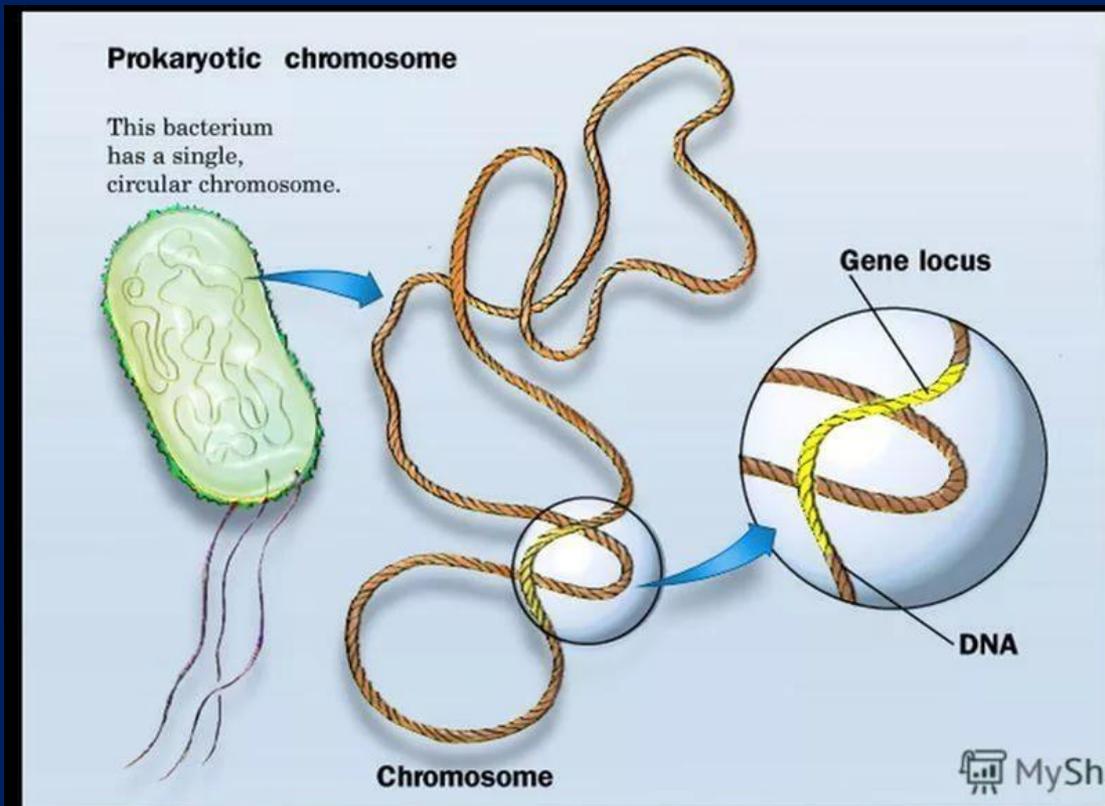
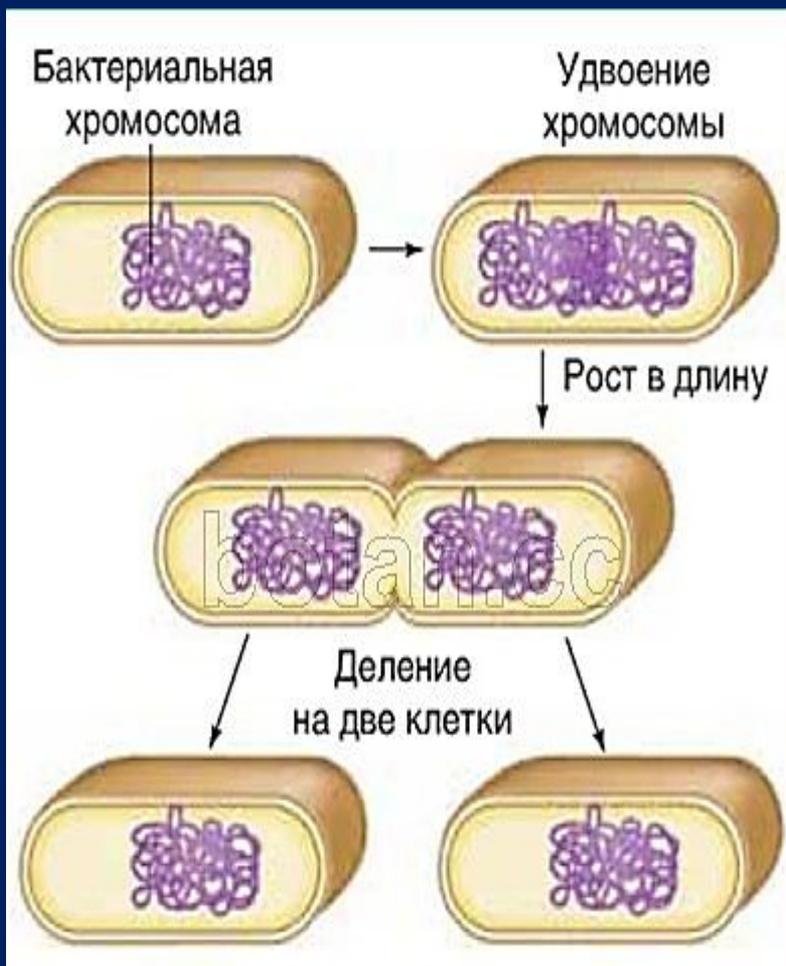


Отличительные особенности организации генома прокариот

- Высокое абсолютное число генов.
- Относительно высокое (70%) содержание структурных генов на имеющуюся ДНК.
- Организация генов в опероны – целостно транскрибируемые группы функционально родственных генов.
- Отсутствует интрон-экзонная структура – гены непрерывны.



Удвоение бактериальной хромосомы сопровождается делением клетки.



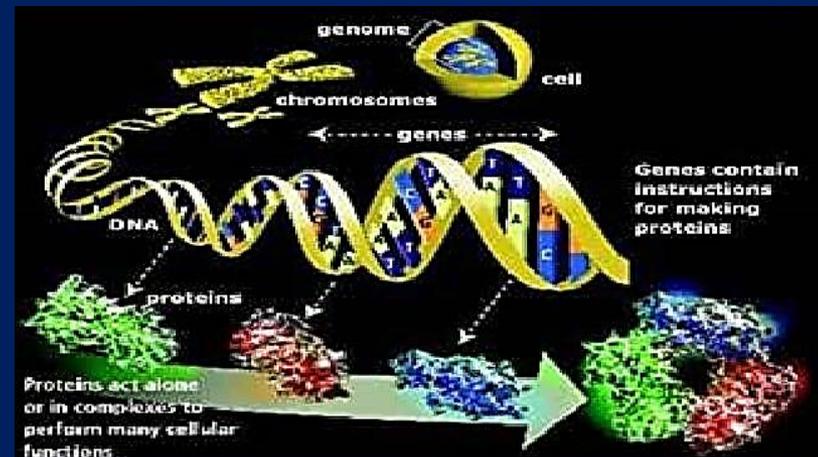
Этапы репликации ДНК

3 этапа: инициация, элонгация и терминация.

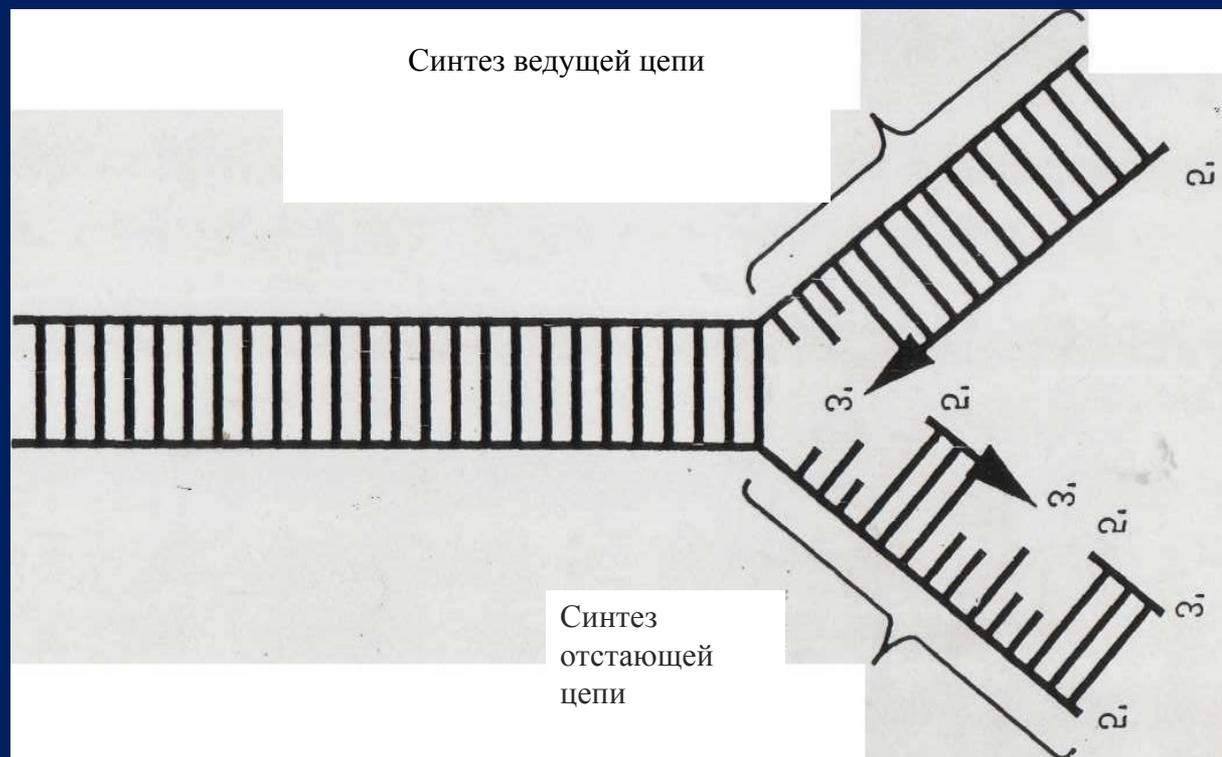
Репликация начинается в определенной точке *ori* (от англ. *origin*- начало) и происходит одновременно в двух противоположных направлениях.

В разделении матричных цепей ДНК участвуют ферменты: хеликаза и топоизомераза. Синтез новых цепей ДНК регулируется ДНК-полимеразой.

Образуется так называемая «вилка репликации».



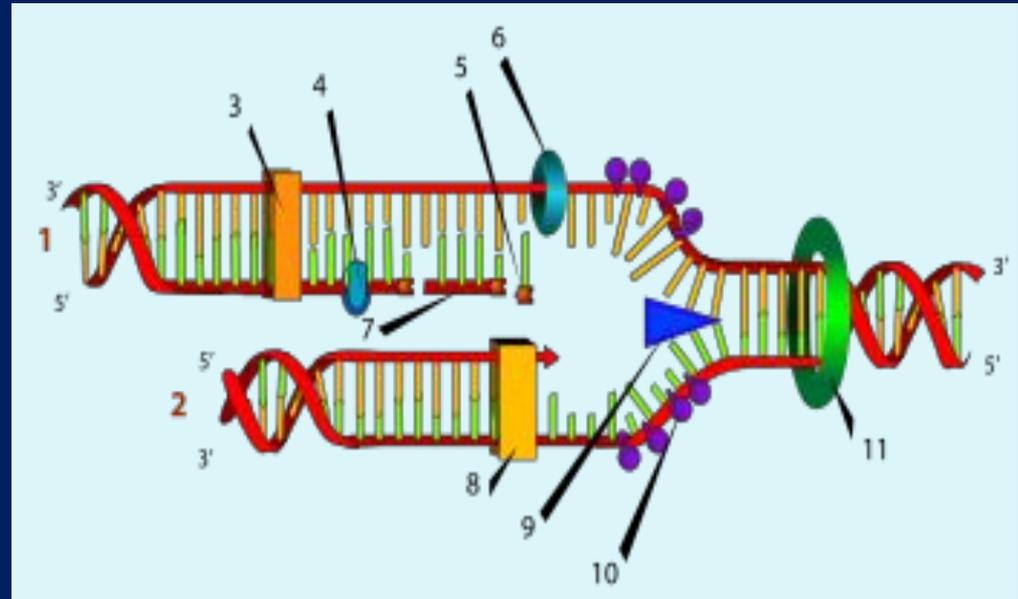
Одна из цепей достраивается последовательно.
Другая - достраивается ступенчато, посегментно,
фрагментами (Оказаки) по 1-2 тыс. нуклеотидов,
которые сшиваются ферментом ДНК-лигазой.



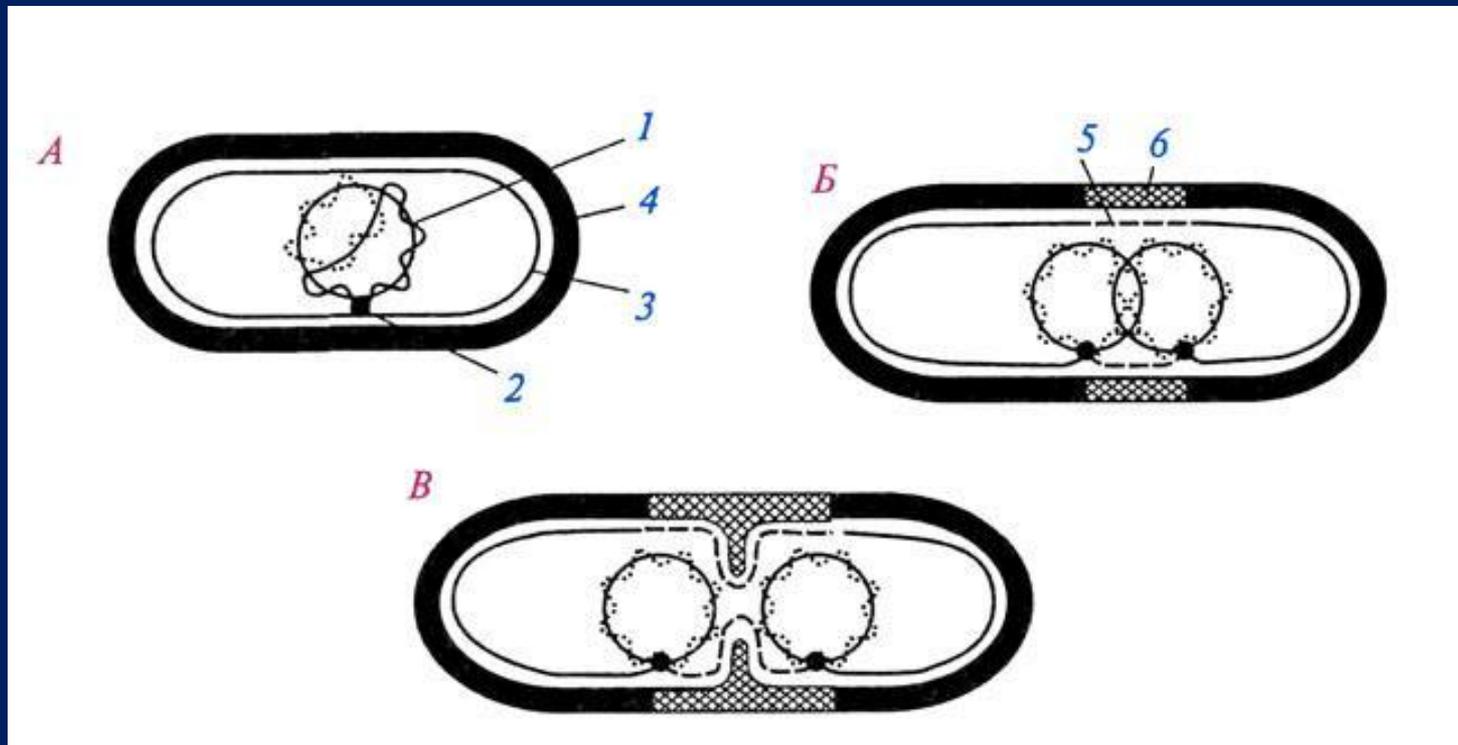
Синтез каждого фрагмента на отстающей цепи идет с участием ДНК-праймазы и затравочной РНК.

Затравочная РНК - короткая нить, длиной не более 10 нуклеотидов, комплементарная ДНК-матрице.

После того, как цепь ДНК начала синтезироваться, РНК-затравка удаляется, а брешь застраивается ДНК-полимеразой. Вновь синтезированный фрагмент сшивается с ранее синтезированным.

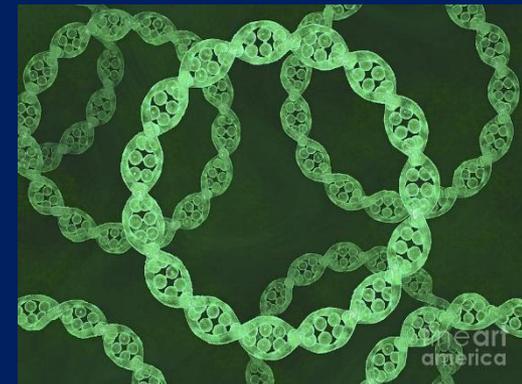
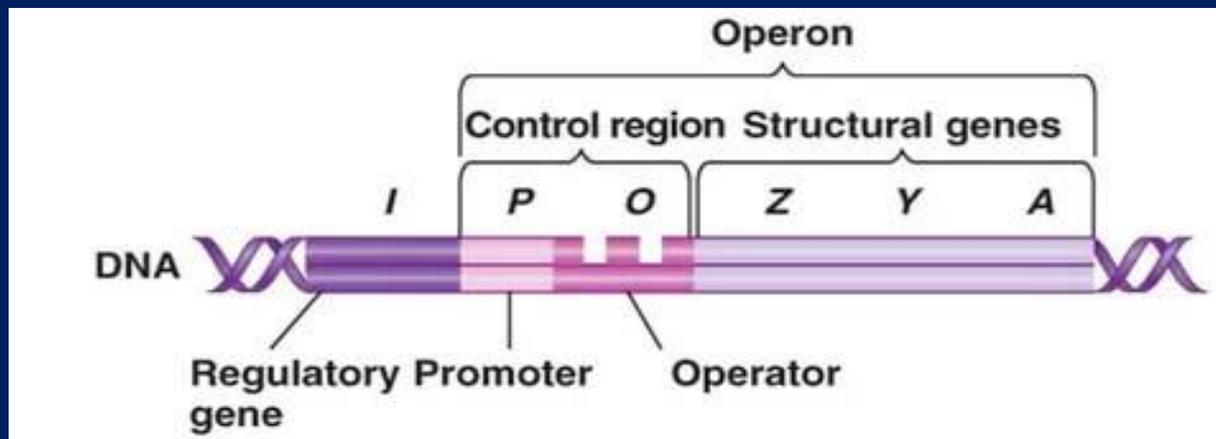


Пространственная организация участка прикрепления ДНК в зоне роста цитоплазматической мембраны и клеточной стенки обеспечивают растаскивание двух копий ДНК по дочерним клеткам.



Структурно-функциональная единица ДНК

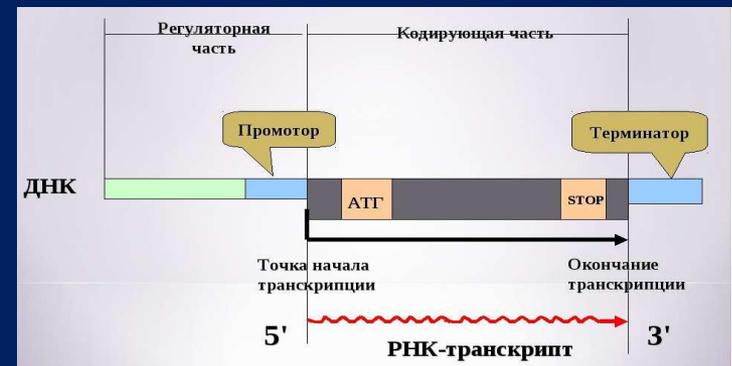
- Основной структурно-функциональной единицей ДНК является оперон.
- Оперон включает в себя группу структурных генов (цистронов), связанных друг с другом.
- Ген-оператор, управляет всей группой структурных генов, между ними находится специфический участок-промотор (регуляторный элемент с которым взаимодействует РНК- полимераза)



Регуляторные элементы:

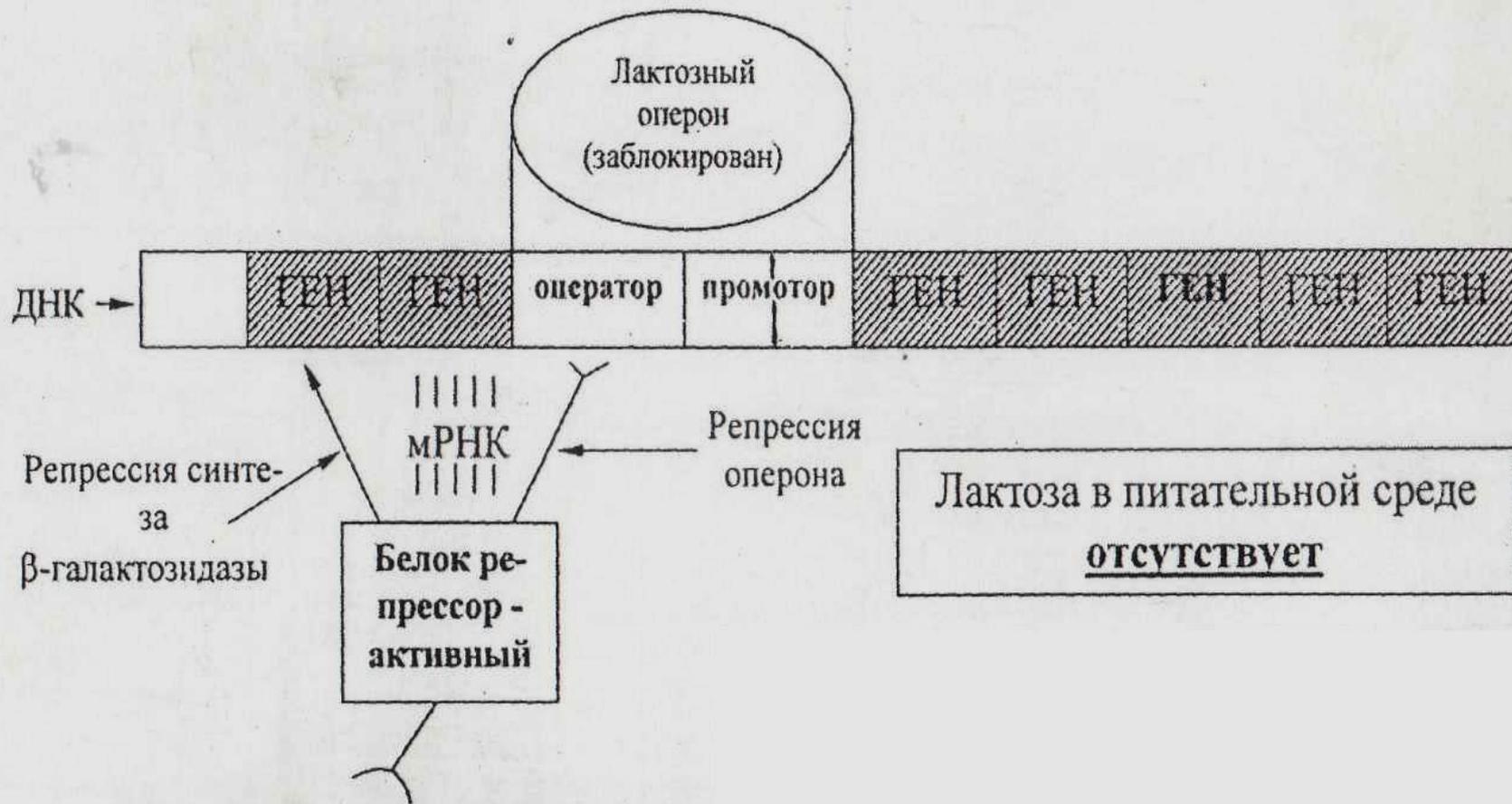
- Энхансер - генетический элемент, усиливающий транскрипцию оперона
- Аттенуатор - генетический элемент, ослабляющий работу оперона. Располагается между промоторным участком оперона и его первым структурным геном.

Каждый оперон функционирует как самостоятельная единица. Оперон или группа оперонов находится под контролем гена-регулятора. Такая структурно-функциональная единица называется регулон.



Организация работы оперона

- В обычных условиях ген-регулятор активен и в клетке наблюдается синтез белка-репрессора.
- Белок-репрессор имеет 2 активных участка. С одним - взаимодействует субстрат-индуктор (лактоза), а другим он присоединяется к гену-оператору и тем самым контролирует транскрипцию.
- Если в среде имеется лактоза, она связывается с участком репрессора, приводит к изменению его конформации и лишает способности блокировать ген-оператор. Репрессия оперона снимается и происходит активный синтез фермента.
- Если нет индуктора - оперон молчит, синтез м-РНК запрещен соответственно нет фермента.

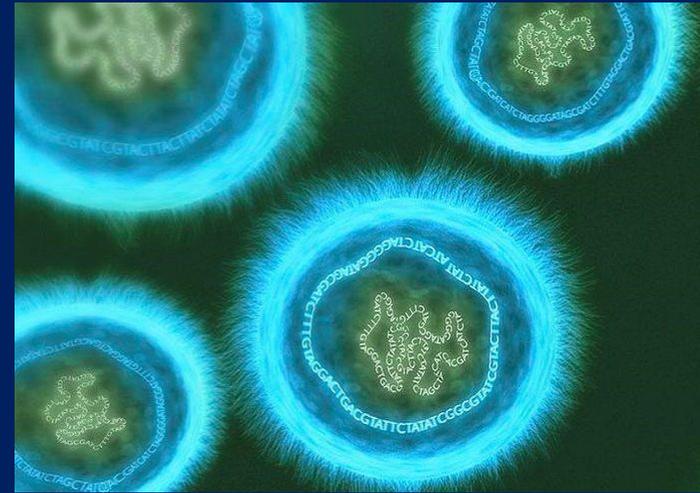


Внехромосомные генетические элементы

Представлены:

- плазмидами,
- транспозонами,
- вставочными элементами (инсерционными)
- умеренными или дефектными фагами.

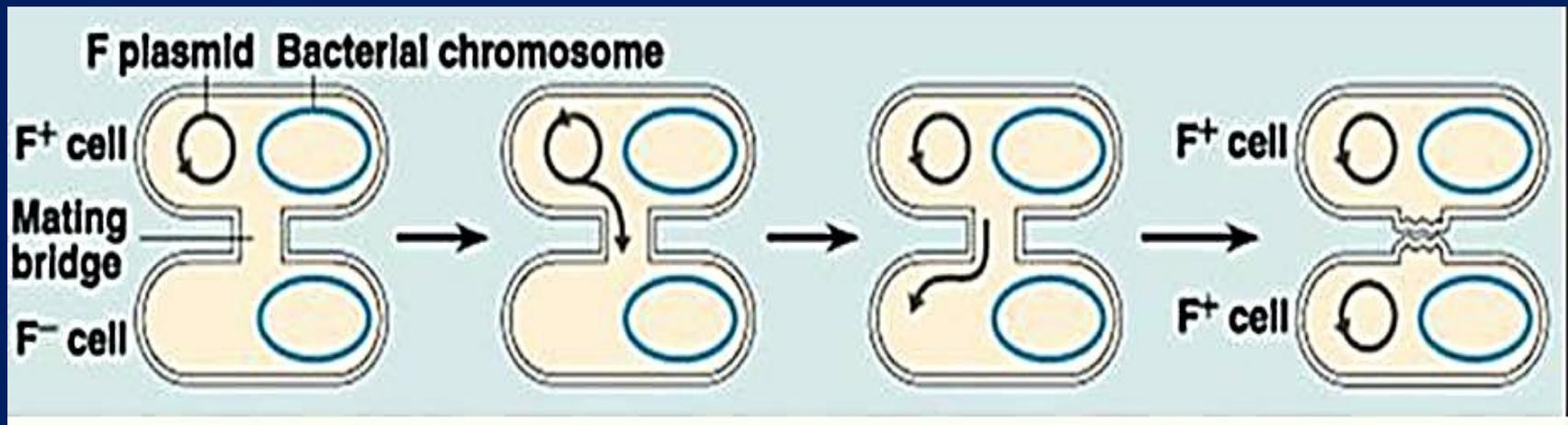
Подвижные генетические элементы придают бактериям селективные преимущества, позволяющие выжить в конкретных условиях.



Плазмиды

- подвижные генетические элементы, представленные замкнутой ДНК. Могут быть несвязанными с бактериальной хромосомой (автономные) или встроенными в ее состав - интегрированные.

Термин плазмиды введен в 1952 г. После открытия Ледербергом F- фактора.

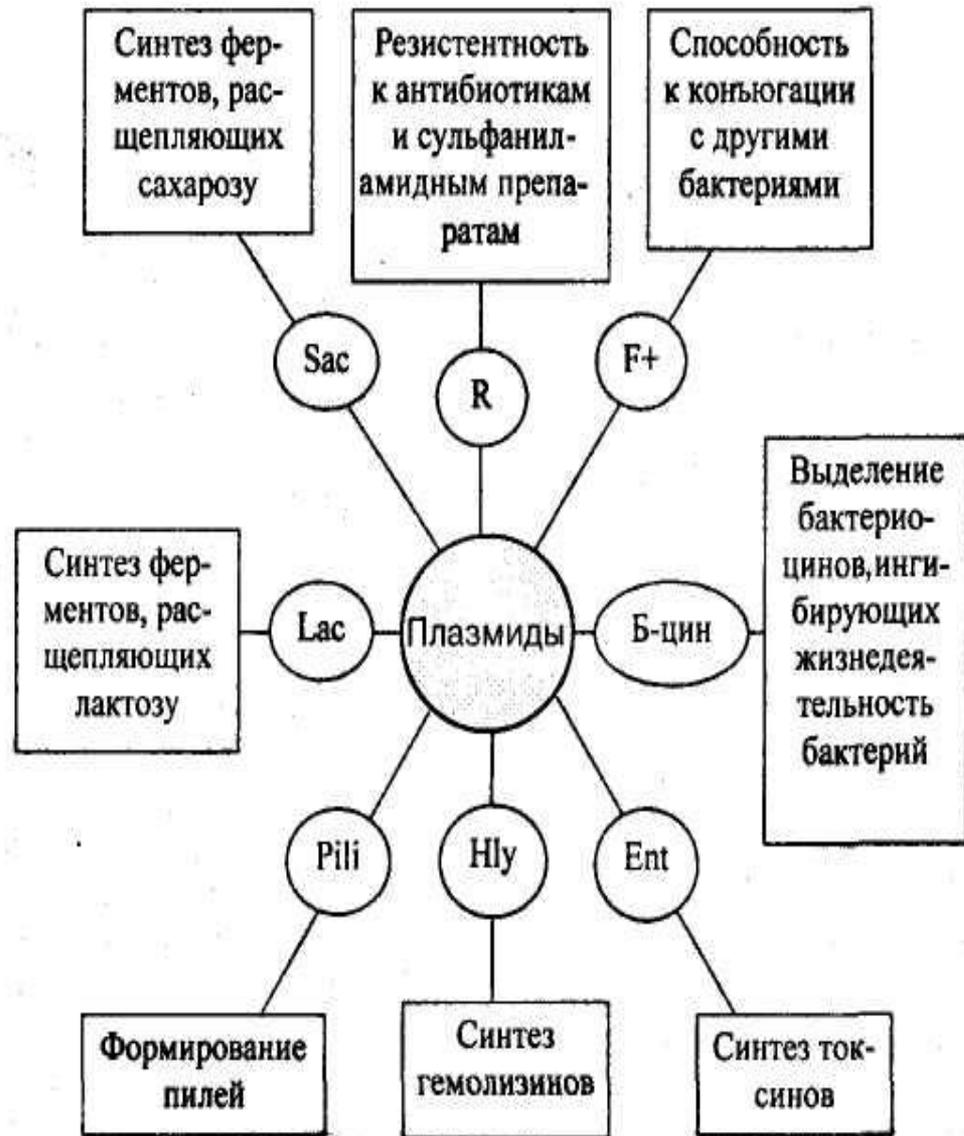


Функции плазмид

- регуляторная
- кодирующая

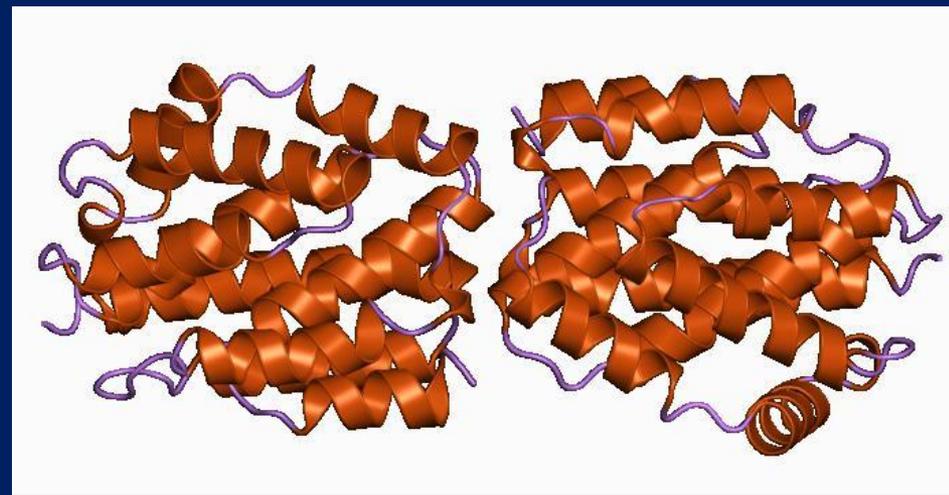
- Регуляторная функция состоит в компенсации нарушений метаболизма ДНК
- Кодирующая функция состоит во внесении в бактериальную клетку новой информации о которой судят по приобретенному признаку.

Кодирование свойств бактериальных клеток плазмидами



Плазмиды широко распространены у микроорганизмов. Они могут передаваться внутри вида, между видами и даже между родами.

Плазмиды могут существовать в одной бактериальной клетке в нескольких копиях, но когда число копий достигает критической величины, клетка способна спонтанно утрачивать плазмиды.

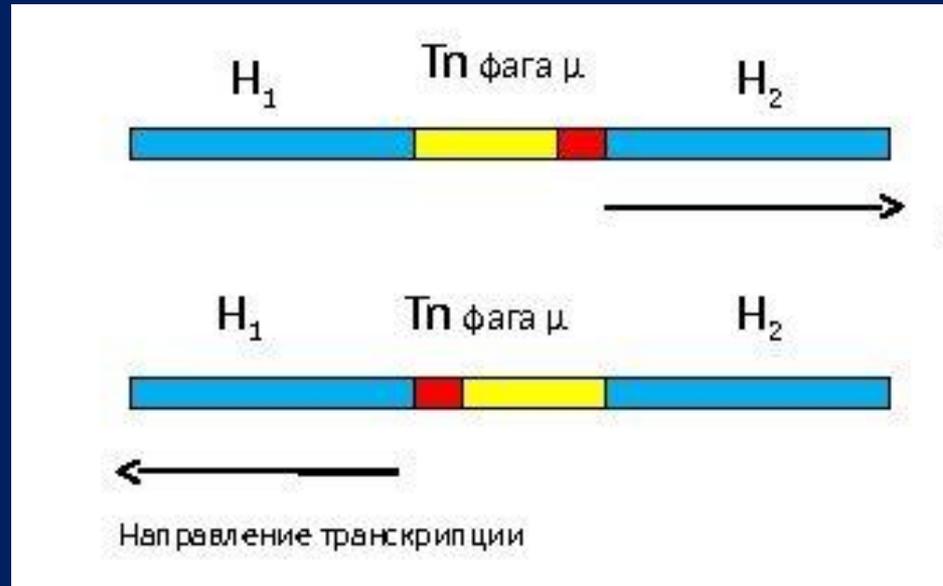


Классификация плазмид по свойствам, которыми они наделяет своих носителей

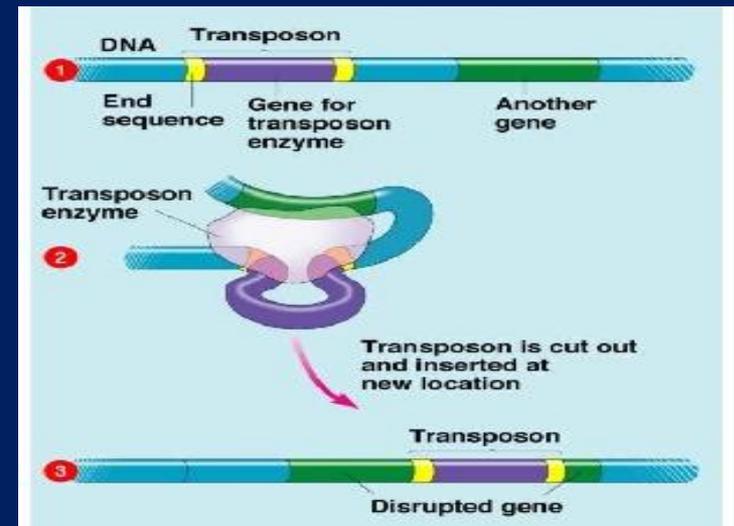
Категории	Свойства
F-плазмиды	Донорные функции
R-плазмиды	Устойчивость к лекарственным препаратам
Col-плазмиды	Синтез колицинов
Ent-плазмиды	Синтез энтеротоксинов
Hly-плазмиды	Синтез гемолизинов
Биодеградативные плазмиды	Разрушение различных органических и неорганических соединений, в том числе содержащих тяжелые металлы

Транспозоны

– нуклеотидные последовательности от 2000- до 20 000 пар нуклеотидов, несут дополнительную генетическую информацию, и информацию необходимую для своего собственного переноса (транспозиции) от одной хромосомы к другой либо между хромосомой и плазмидой.



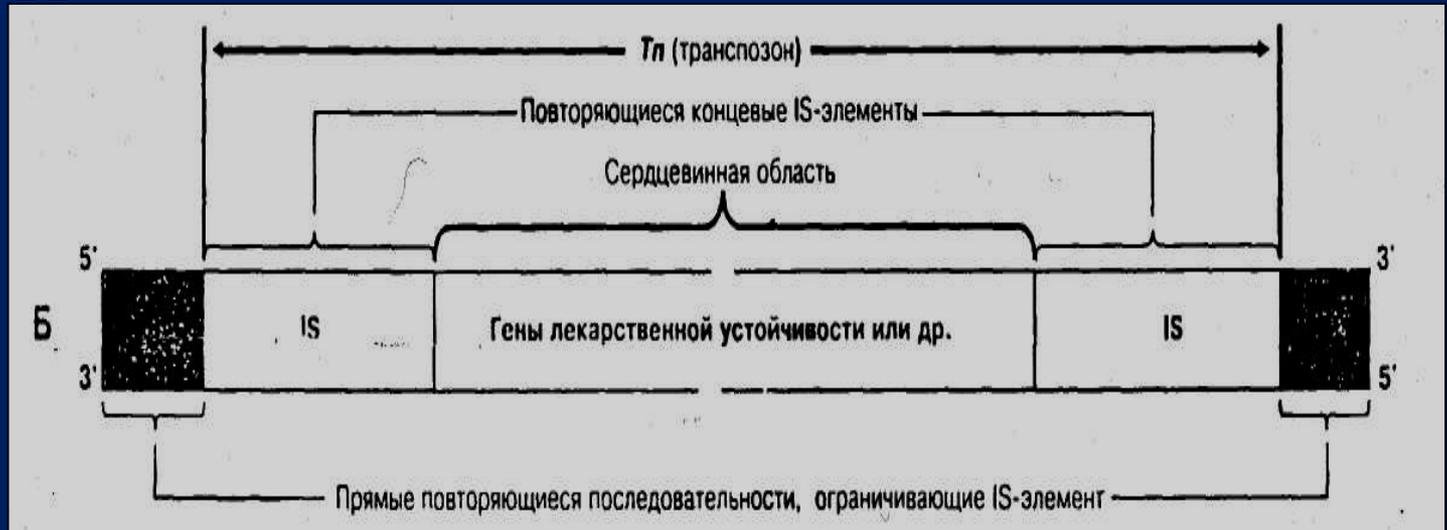
- Транспозоны могут находиться в свободном состоянии в виде кольцевой молекулы, неспособной к самостоятельной репликации и быть встроенными в бактериальную хромосому.
- Реплицируются транспозоны в составе бактериальной хромосомы.
- Новые копии транспозонов могут мигрировать в плазмиды и ДНК-фагов, которые их распространяют.
- Вызывают инактивацию генов в которые они встраиваются.



Транспозоны могут выполнять

- регуляторную
- кодирующую
- индуцируют мутации

Основной механизм перемещения - вырезание/встраивание. Имеют особые концевые структуры, которые являются маркерами и позволяют их различать от других фрагментов ДНК.



Вставочные элементы

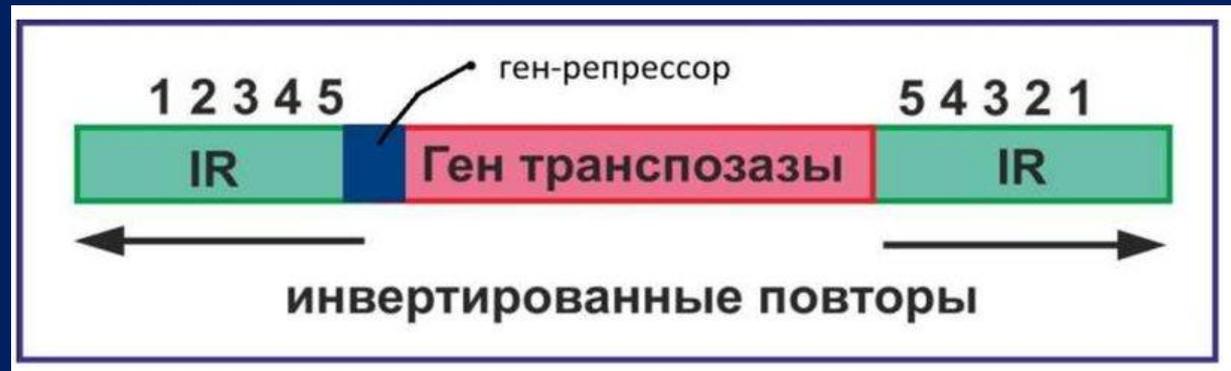
(IS-последовательности) представляют собой мигрирующие элементы величиной от 800-1400 пар оснований.

IS- последовательности содержат информацию необходимую только для их переноса в различные участки ДНК



Функции IS- последовательностей:

- координируют взаимодействие транспозонов, плазмид и умеренных фагов, как между собой, так и с хромосомой бактериальной клетки и обеспечивают их рекомбинацию
- вызывают инактивацию гена в который произошла интеграция IS- последовательности (выключение гена), либо регулирование работы подлежащих структурных генов бактерии –реципиента
- Индуцирование мутаций (типа делеций, инверсий и дупликаций) в 5-9 пар нуклеотидов при включении в бактериальную хромосому.



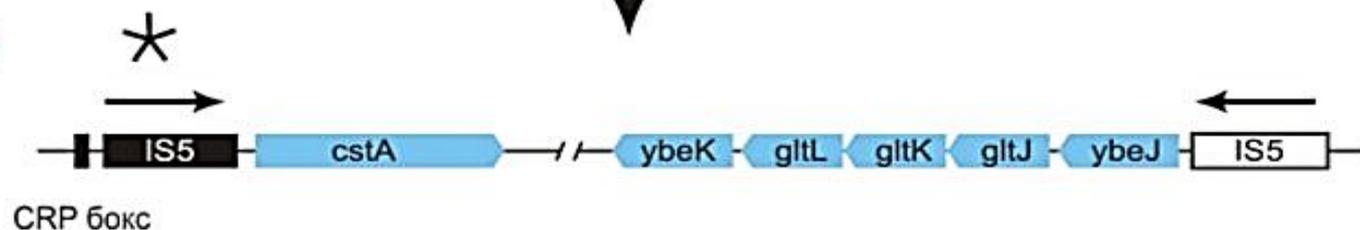
Исходный геном

A



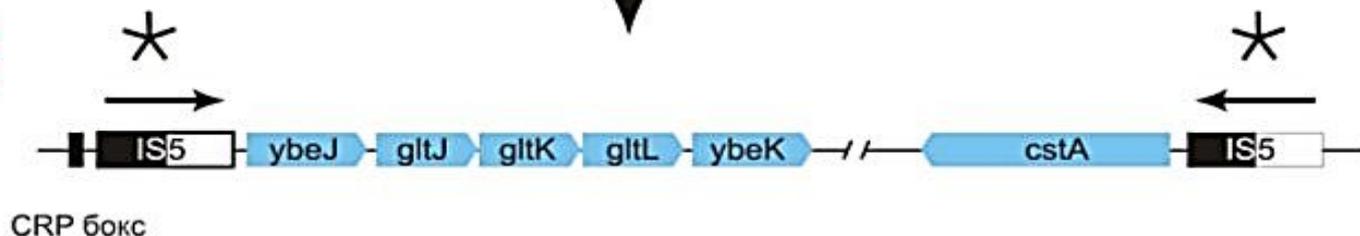
Внедрение новой копии Is5

B



Инверсия фрагмента, ограниченного двумя копиями IS5

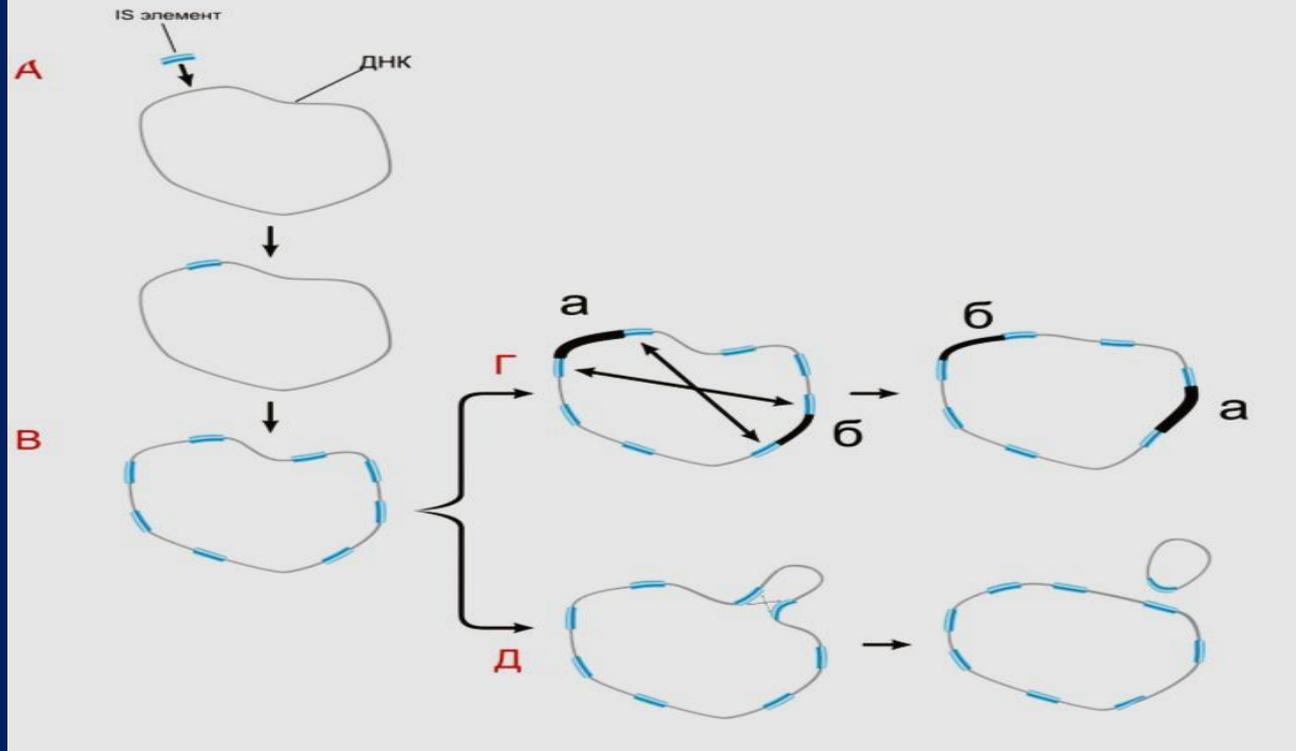
C



sgaA GASP мутант

Рис.6 Схема двухэтапной геномной перестройки, определяемой Is5

Геномные перестройки, стимулированные IS элементами

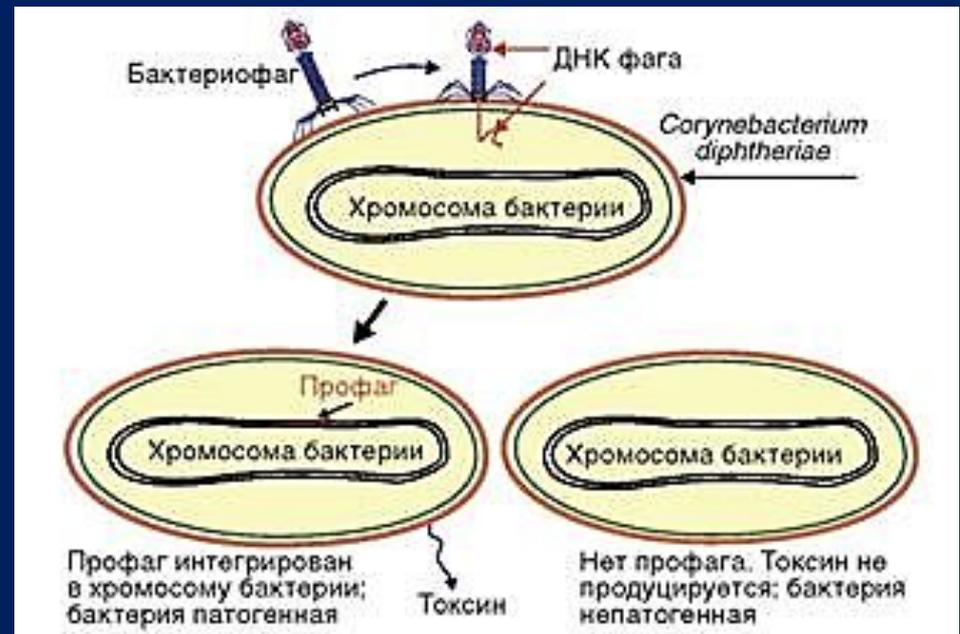


- А. Внедрение IS-элемента в геном;
- Б. Распространение IS-элемента в геноме за счет транспозиции;
- В. Реципрокные транслокации;
- Г. Делеции и образование плазмид

Умеренные и дефектные фаги

Встраиваясь в хромосому бактерии, фаги вызывают ее лизогенизацию, в результате чего бактерия может приобретать новые свойства. Изменчивость лизогенных бактерий связана либо с приобретением новых генов, либо с активацией «молчащих» генов бактерии-реципиента.

При этом может приобретаться свойство продукции токсинов.



Изменчивость микроорганизмов

- Фенотипическая
- Генотипическая



Наследственная изменчивость

связана с изменением последовательности нуклеотидов в ДНК, полной или частичной их утратой, структурной перестройкой генов.

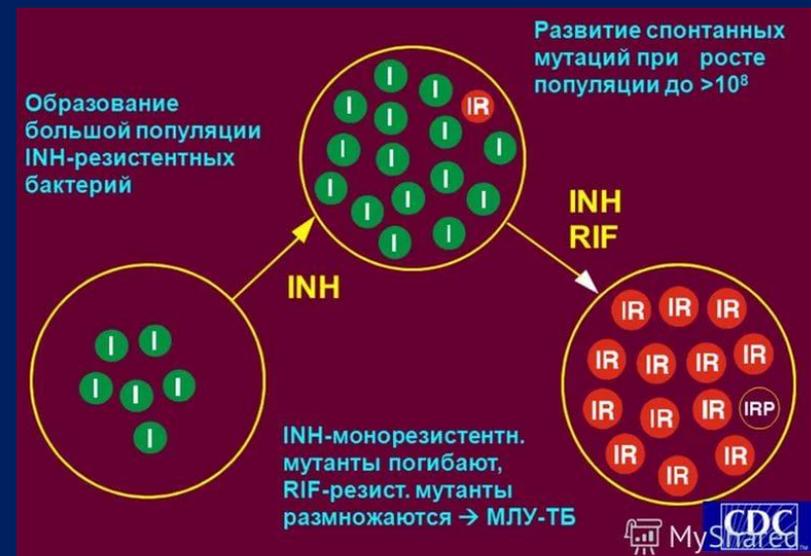
Виды наследственной изменчивости:

- Мутации
- Генетические рекомбинации
- S – R – диссоциации

Спонтанные мутации

проявляются в популяции в естественных условиях под влиянием невыясненных причин.

К их появлению приводят ошибки репликации, неправильное формирование комплементарных пар оснований. Примерная частота возникновения мутаций 1 на $10^6 - 10^7$ клеток. Спонтанные мутации могут определять благоприятные и неблагоприятные генетические изменения.



Индукцированные мутации возникают под влиянием конкретного события или воздействия.

Мутагены - вещества вызвавшие мутацию.

Мутагены могут быть:

- Физическими (температура, ионизирующая радиация, ультрафиолетовое облучение, высокочастотное электромагнитное излучение, ультразвук и т.д.);
- Химическими (аналоги оснований – бромурацил; алкилирующие соединения – азотистая кислота; интеркалирующие агенты – акридиновые красители и т.д.)

1.



ионизирующее излучение



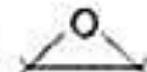
алкилирующие соединения

УФ-облучение

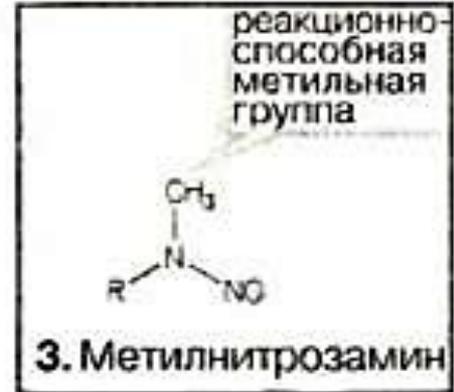
HNO_2

α, β, γ
X

$[\text{CH}_3^+]$



2. Димер тимина

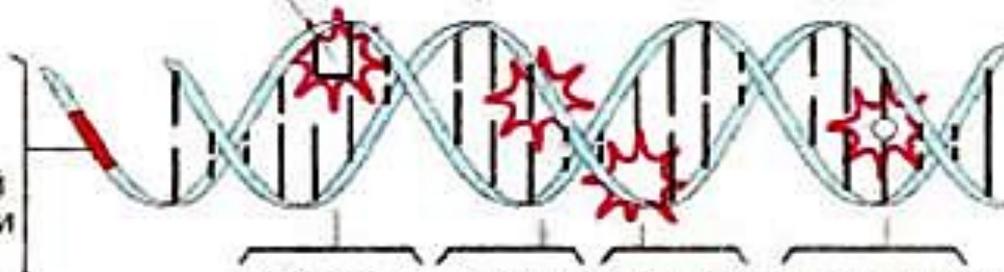


дезаминирование

радикалы

эпоксид

делеции или вставки из-за неправильной рекомбинации



образование пиримидиновых димеров

замена оснований
 $\text{C} \rightarrow \text{U}$
 $\text{A} \rightarrow \text{I}$

спонтанная потеря оснований

химическая модификация оснований



A. Мутагенные агенты

Типы мутаций:

- Мутация со сдвигом считывания, вставки или выпадения азотистых оснований.
- Хромосомные и генные мутации
- По направленности изменений, мутации могут быть прямые и обратные.
- По фенотипическим последствиям: нейтральные, условно-летальные, летальные.



S – R – диссоциации

Возникают после встраивания внехромосомных факторов наследования в бактериальную хромосому.

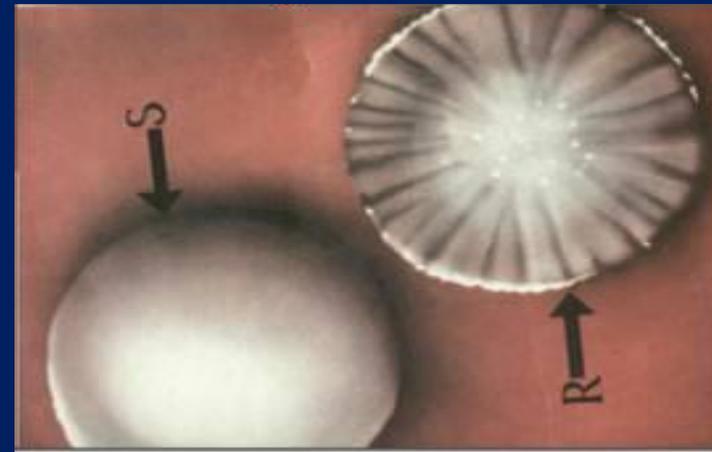
Образуется две формы бактериальных клеток, которые образуют разные колонии.

R – формы – шероховатая поверхность, неровные края;

S – формы – гладкая поверхность, ровные края.

- Для большинства бактерий вирулентные формы образуют S – колонии.

При диссоциации одновременно происходят изменение морфологии, биохимических, АГ свойств, патогенных свойств микроорганизмов.



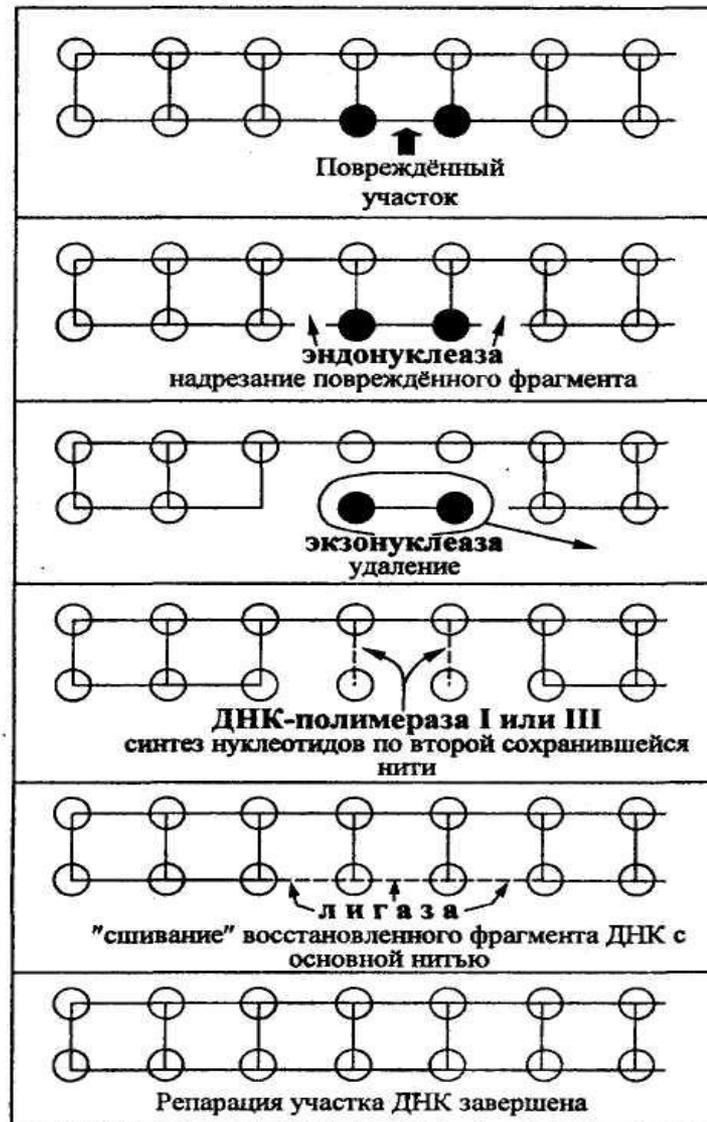
Репарации

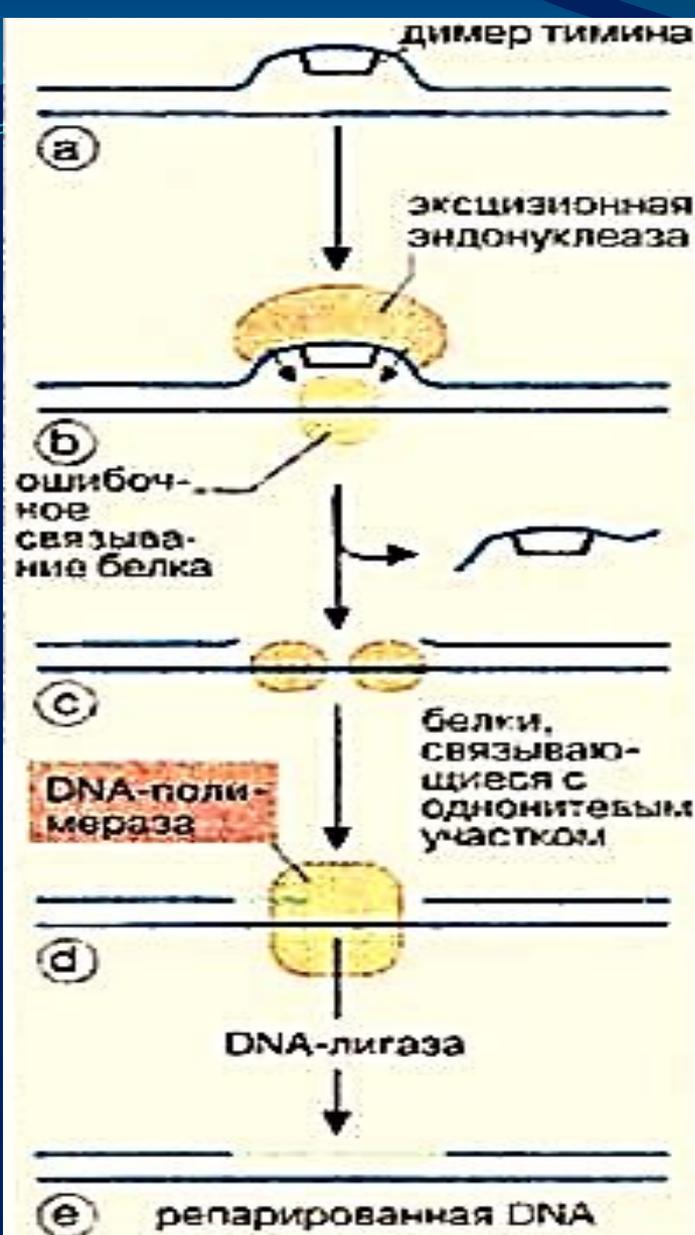
-специальные системы, восстанавливающие повреждения генетического материала.

Направления коррекции повреждений ДНК:

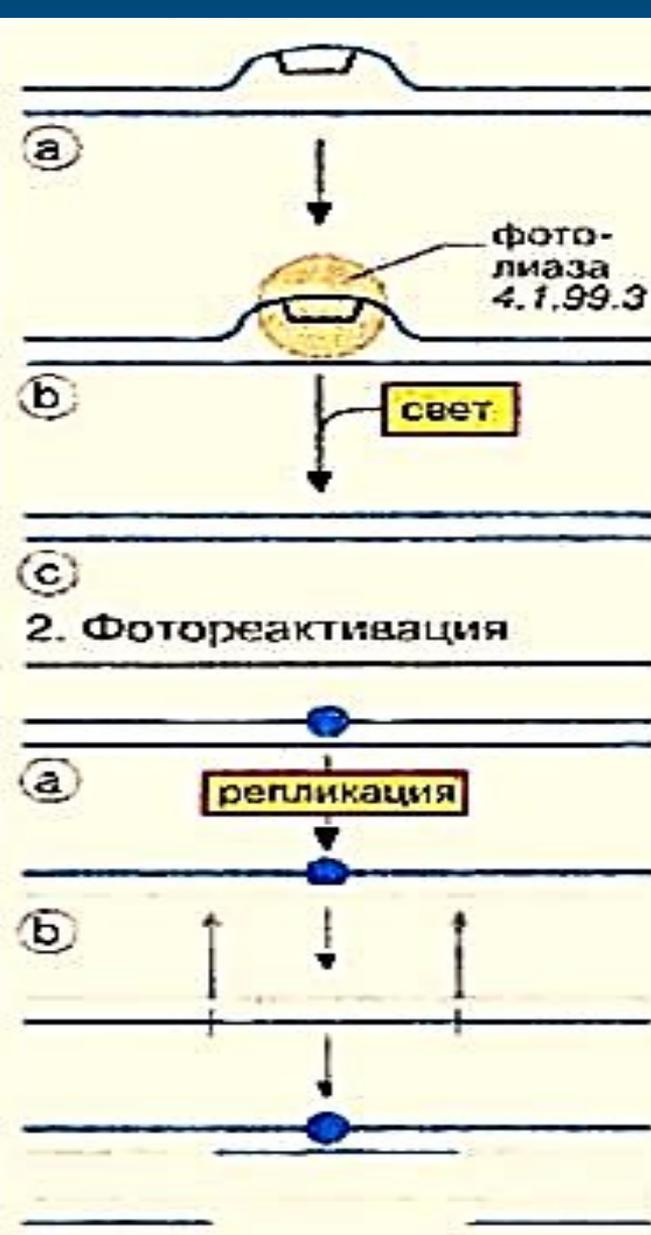
- Реверсия от поврежденной ДНК к исходной
- Эксцизия (выпадения) повреждений с последующим восстановлением исходной структуры
- Активация механизмов, обеспечивающих устойчивость к повреждениям (световая и темновая).

СХЕМА ПРОЦЕССА ДОРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО ФРАГМЕНТА





1. ЭКЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ
В. Механизмы репарации



3. РЕПАРАЦИЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ РЕКОМБИНАЦИИ

Генетические рекомбинации

Обмен генетическим материалом между отдельными особями в популяции клеток

В процессе генетического переноса участвуют бактерия – реципиент и бактерия – донор.

Типы рекомбинаций: Рекомбинация

Я

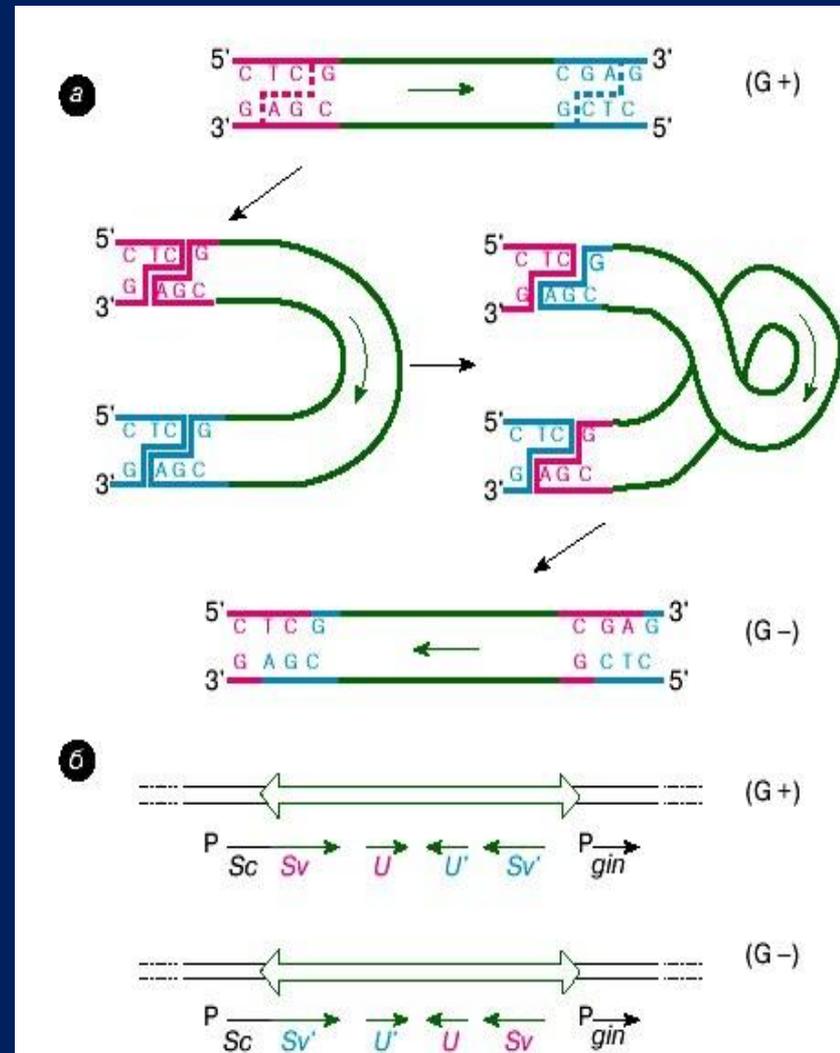
Законная

Незаконная

- Требуется наличия протяженных комплементарных участков ДНК в рекомбинируемых молекулах
- Происходит только между близкородственными видами
- Не требуется наличия протяженных комплементарных участков ДНК
- Происходит при участии Is-элементов, обеспечивающих быстрое встраивание в хромосому

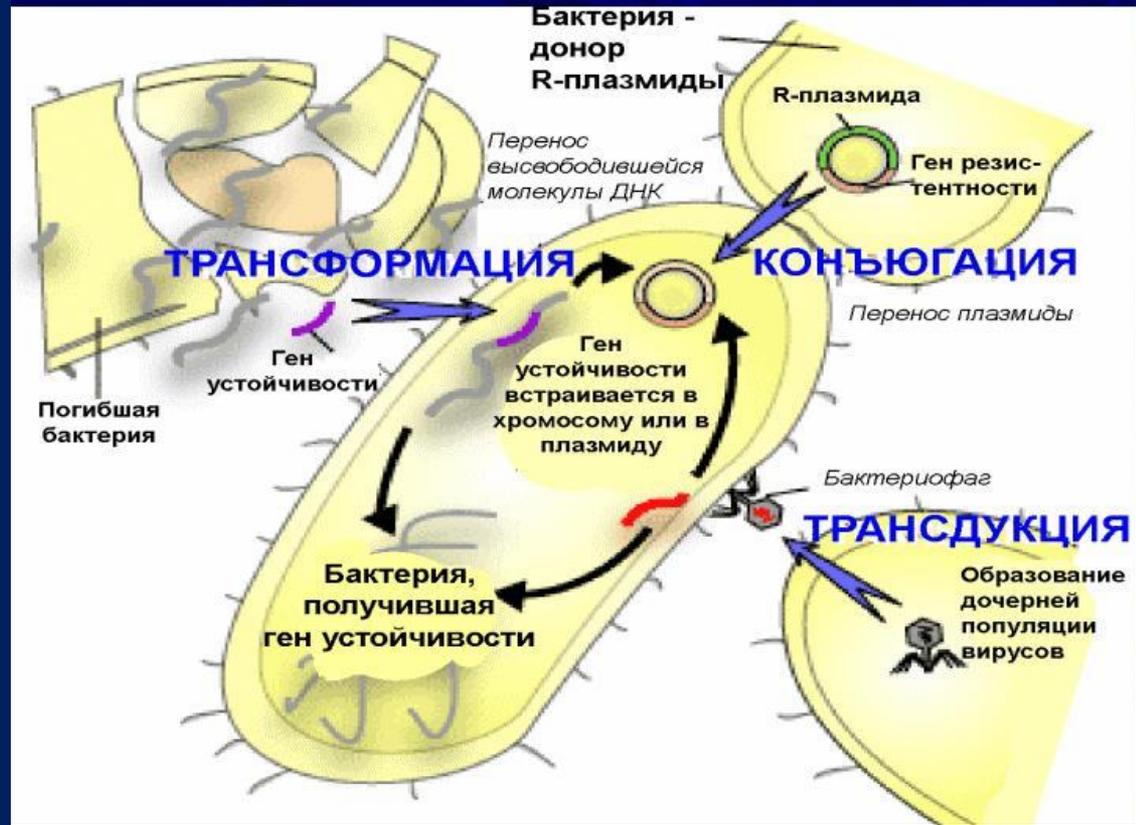
Типы рекомбинаций:

- общая или гомологическая рекомбинация, когда в структуре взаимодействующей ДНК есть гомологические участки;
- Сайт – специфическая рекомбинация. Эта рекомбинация происходит в строго ограниченных участках (сайтах) хромосомы



Механизмы генетических рекомбинаций

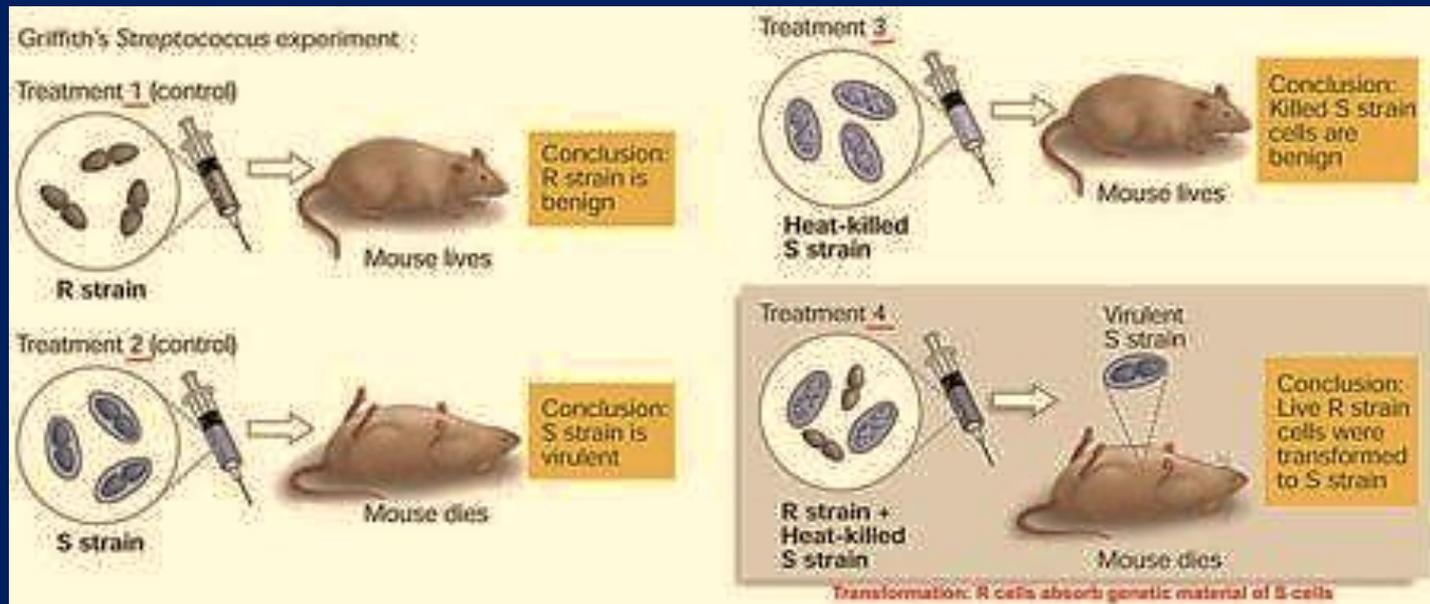
- Трансформация
- Трансдукция
- Конъюгация



Трансформация

- перенос генетического материала клетки донора, при котором реципиент захватывает из внешней среды фрагменты чужеродной ДНК.

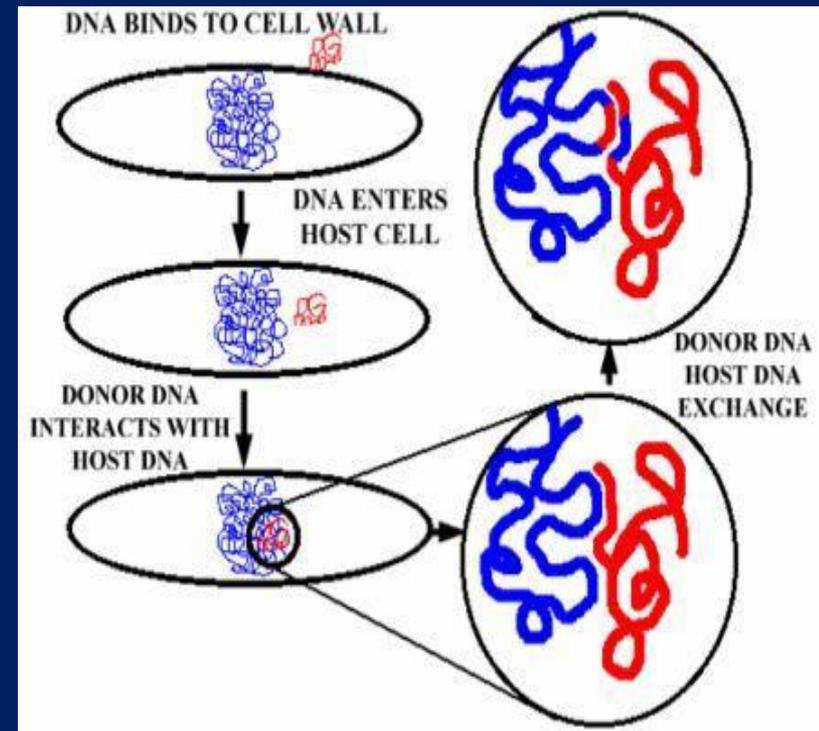
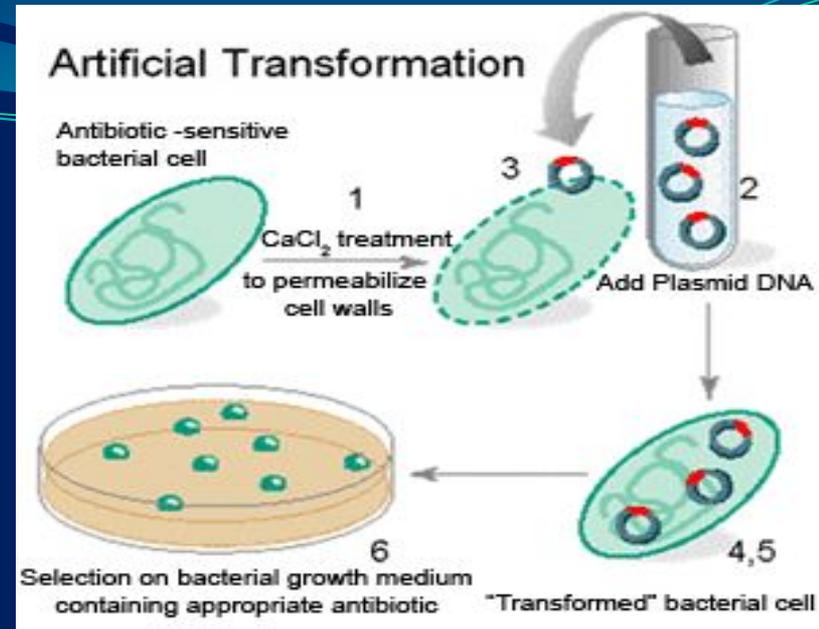
При трансформации рекомбинация происходит если ДНК бактерий родственны друг другу. Впервые явление трансформации описал Гриффитс (1928 г.).



● Индуцированная трансформация происходит при добавлении к культуре бактерий очищенной ДНК, признаки которых стремятся передать исследуемой культуре.

Эффективность трансформации зависит от физиологического состояния клеток – реципиентов. Они должны находиться в состоянии компетентности.

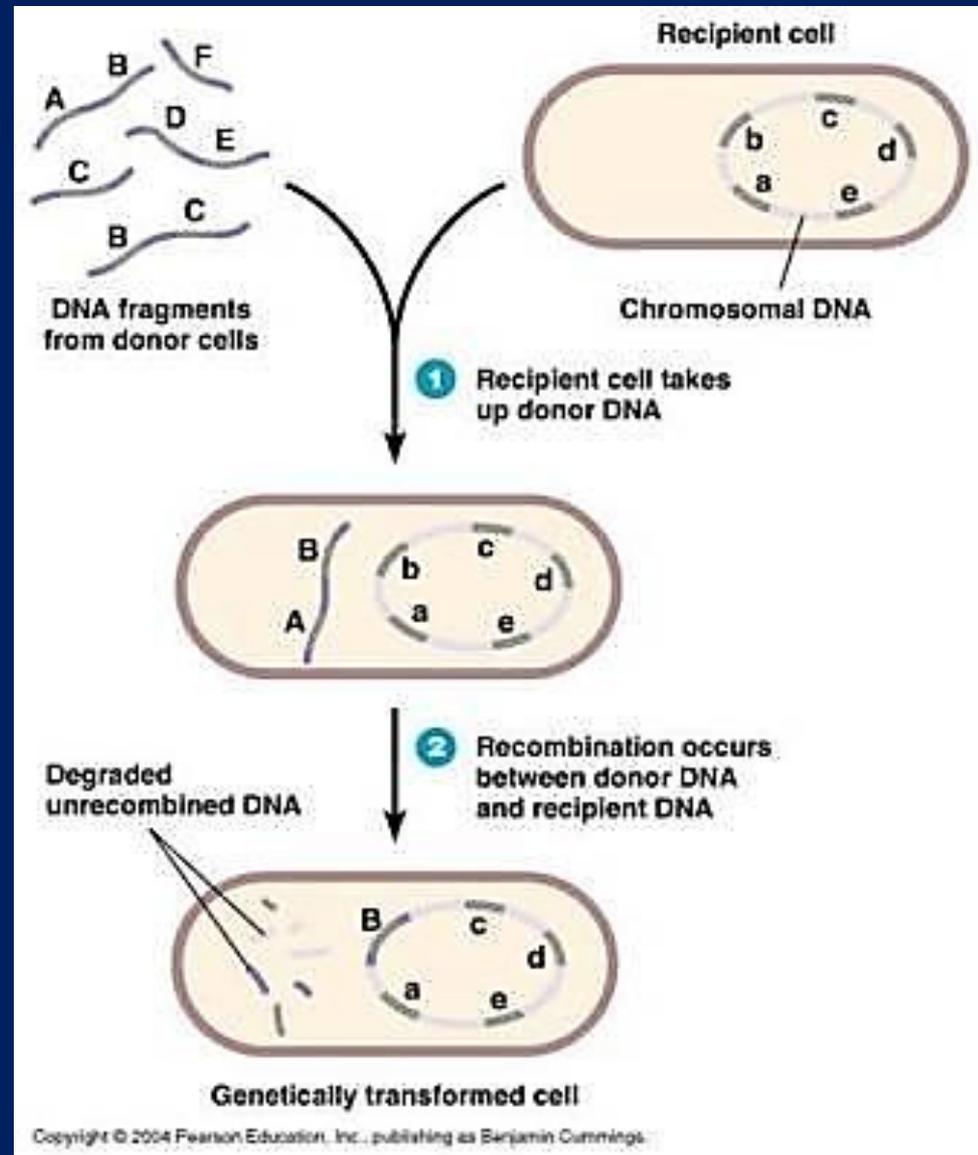
Состояние компетентности часто совпадает с логарифмической фазой роста.



Фазы трансформации:

- 1) адсорбция ДНК - донора на клетке реципиента;
- 2) проникновение ДНК внутрь клетки-реципиента;
- 3) соединение ДНК с гомологичным участком хромосомы реципиента с последующей рекомбинацией.

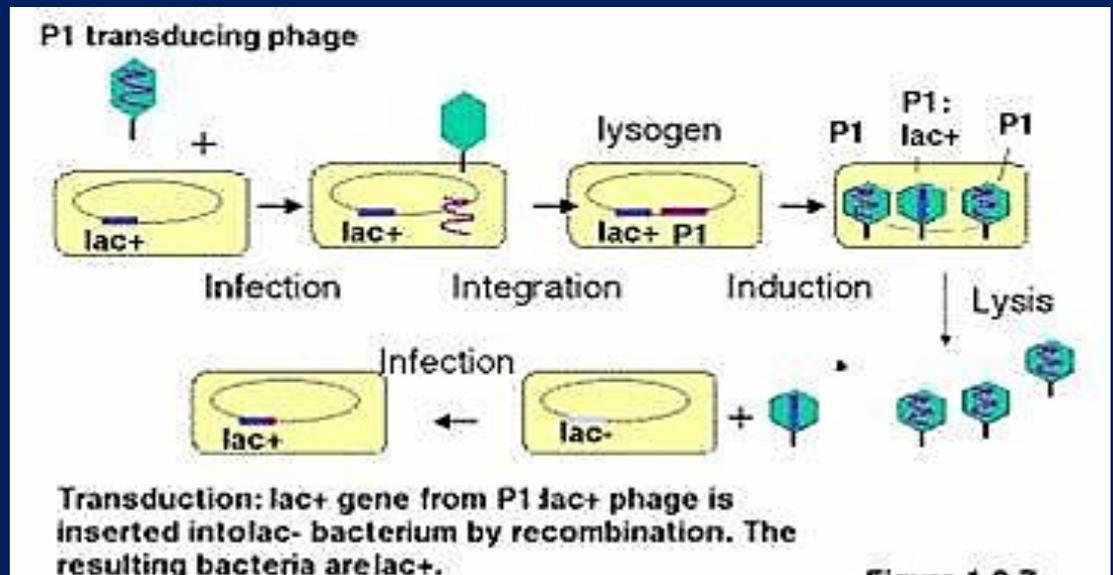
Чем выше степень гомологии, тем эффективнее трансформация



Трансдукция

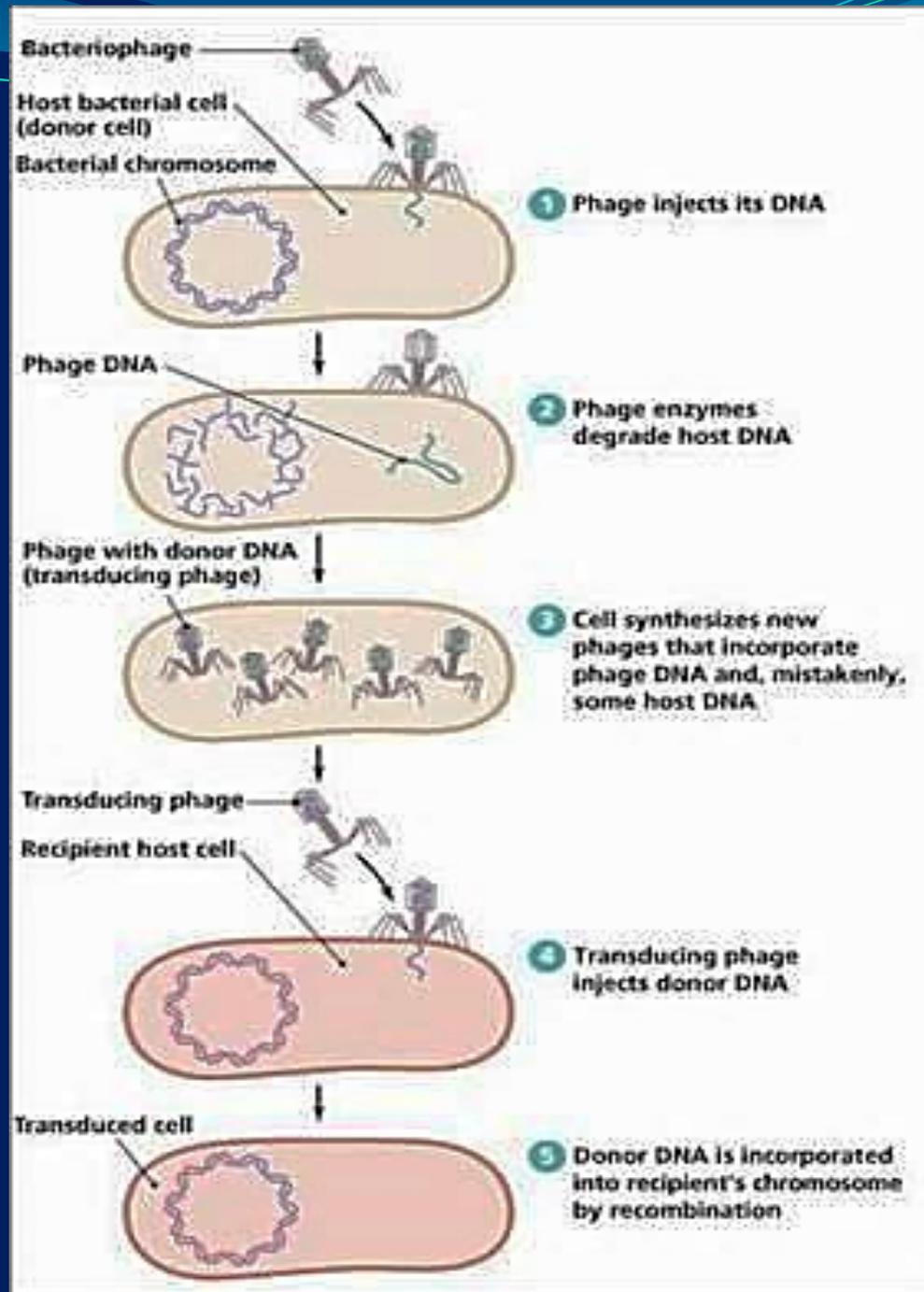
- передача ДНК от бактерии - донора к бактерии – реципиенту при участии бактериофага.

Различают специфическую, неспецифическую и abortивную трансдукцию.



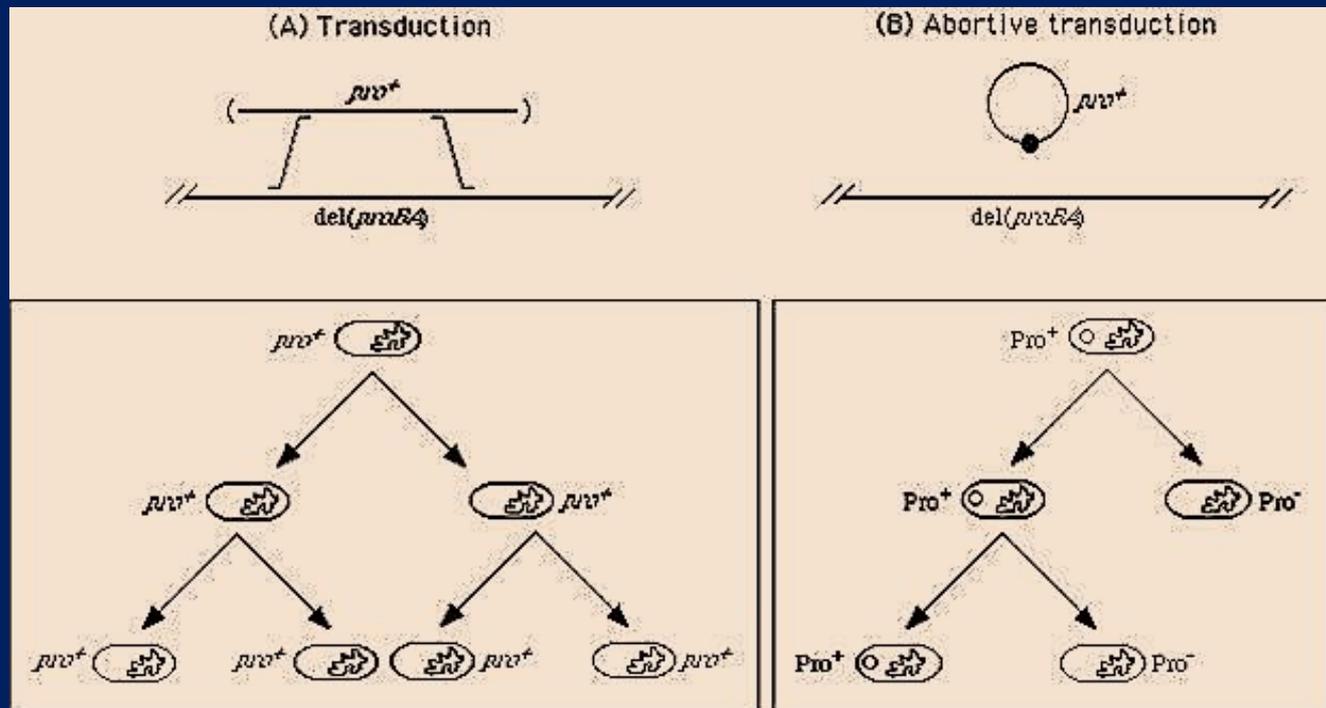
- Специфическая – перенос определенного фрагмента ДНК донора, только в определенные участки ДНК реципиента.

- Неспецифическая - случайный перенос фрагментов ДНК от одной бактериальной клетки к другой. Обусловлена включением ДНК донора в головку фага, дополнительно к его геному или вместо генома фага (дефектные фаги).



Абортивная трансдукция,

- когда фрагмент ДНК, привнесенный фагом не вступает в рекомбинацию и не реплицируется, но с него считывается информация о синтезе соответствующего продукта.
- при которой перенесенный материал передается только одной из двух дочерних клеток.



Конъюгация

- перенос генетического материала из клетки в клетку при их непосредственном взаимодействии.
- Донорами являются клетки, несущие F-плазмиду, а не имеющие плазмиды являются реципиентами

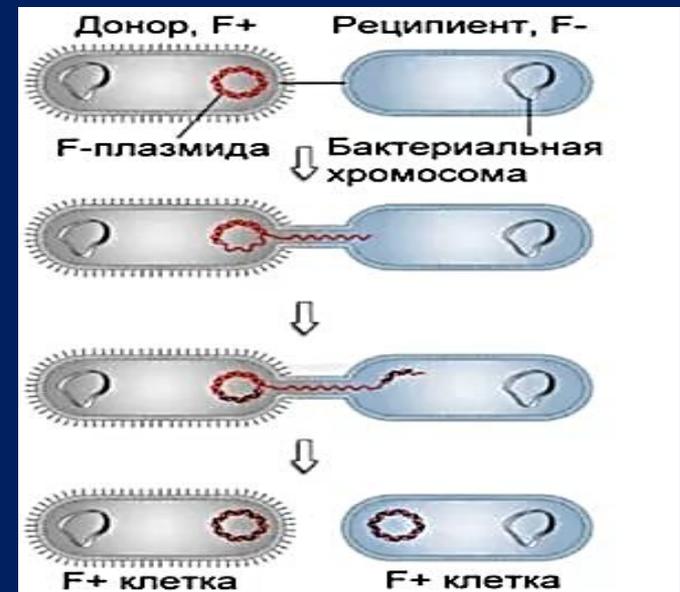
Процесс конъюгации у бактерий впервые был обнаружен Джошуа Ледербергом и Эдвардом Тейтумом в 1946 г.



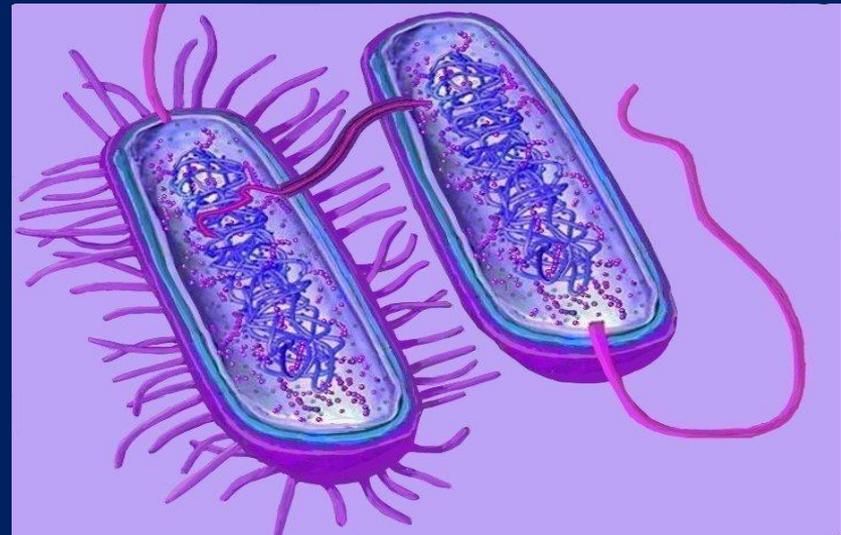
При взаимодействии F “+” клетки с F “-” клеткой половой фактор передается независимо от хромосомы донора, с частотой 100% и реципиентные клетки становятся F “+”.

Интеграция F плазмиды в состав бактериальной хромосомы приводит к разрыву одной из нитей ДНК, что обеспечивает возможность ее переноса в реципиентную клетку.

F – плазида определяет не только точку начала переноса, но и направление передачи хромосомы от донорской клетки к реципиентной.



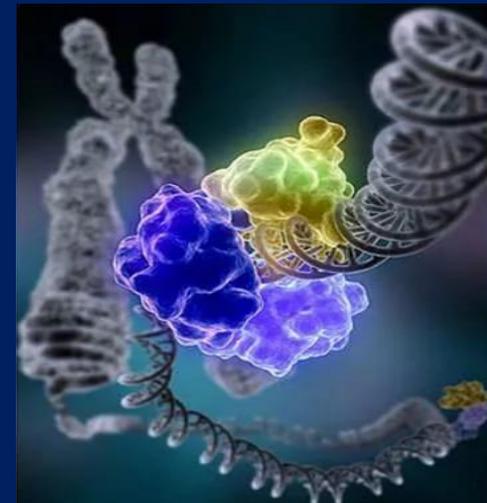
- Первый этап конъюгации – прикреплении клетки-донора к реципиентной клетке с помощью половых ворсинок (sex pili). Образование между клетками конъюгационного мостика, через который из клетки донора в клетку реципиента передается F-фактор и другие плазмиды.
- При переносе бактериальной хромосомы происходит разрыв цепей при помощи эндонуклеазы.
- Одна нить ДНК через конъюгационный мостик проникает в клетку – реципиента, где сразу достраивается до двунитевой структуры. Оставшаяся в клетке доноре нить ДНК, также достраивается комплементарно.



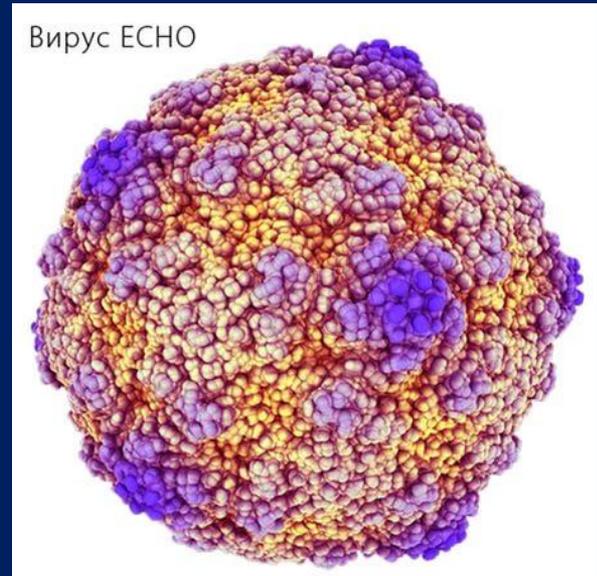
Генетика вирусов

Характеристика вирусных популяций

- Высокая численность популяции увеличивает вероятность мутаций
- Быстрая смена поколений
- Гаплоидность и бесполой способ размножения
- Малая емкость генома и отсутствие повторяющихся генов
- Непрерывность в динамике эпидемического процесса
- Хорошо адаптированы к внешним условиям



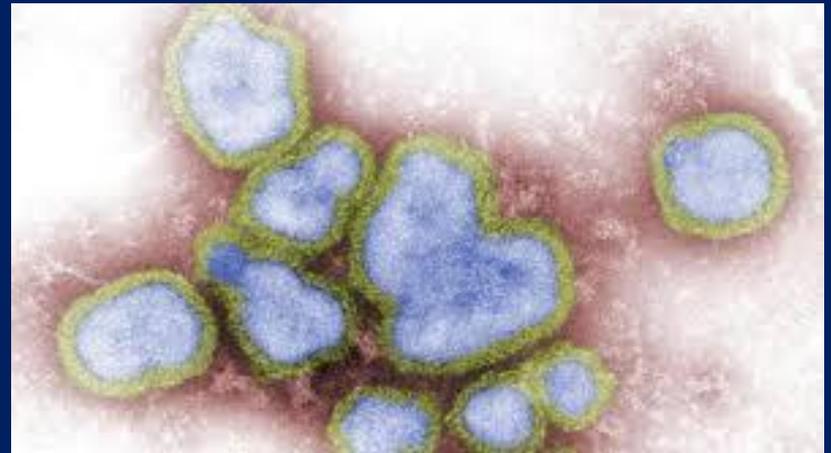
- Ненаследуемые изменения у вирусов связаны с особенностями клетки хозяина и проявляются изменением химического состава суперкапсида, в следствие включения в ее состав липидов и углеводов тех клеток хозяина в которых происходит их репродукция.



Фенотипическое смешивание

при смешанном заражении клеток несколькими вирусами, если часть потомства одного вируса приобретает свойства обоих вирусов, но генотип их остается неизменным.

Например, РНК одного вируса, заключено в капсид другого



Мутации

У вирусов возникают во время репликации их нуклеиновых кислот.

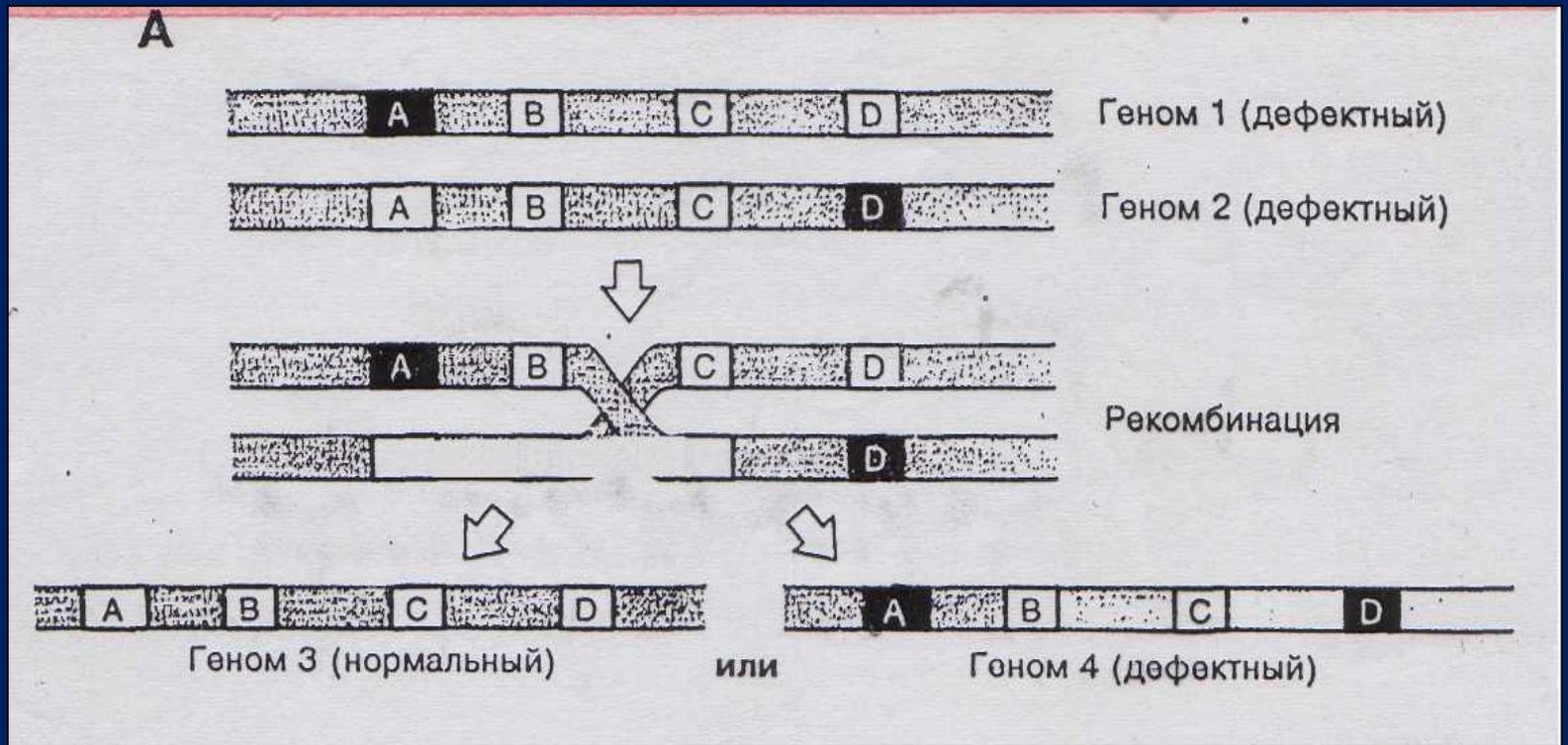
Мутанты вирусов фенотипически различаются по строению бляшек, которые они образуют в культуре клеток, по чувствительности к температуре, АГ-свойствам белков капсида.



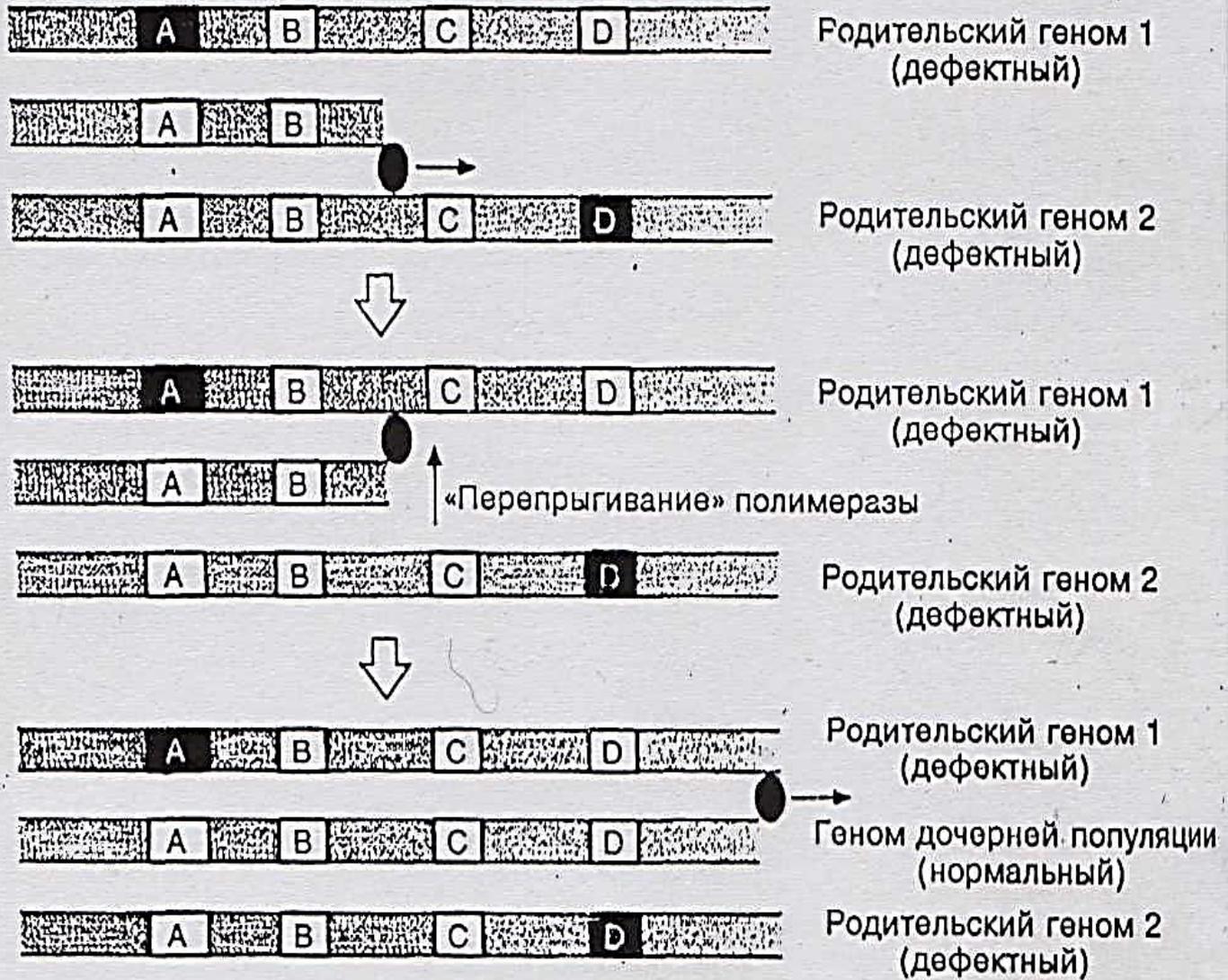
- Вирусы способны и к генетическим рекомбинациям.

При одновременном заражении двумя вирусами чувствительной клетки - хозяина их свойства могут меняться. Особенно часто наблюдается у вирусов имеющих фрагментированный геном.

- Генетическая реактивация - перераспределение генов, когда у родственных вирусов инактивированы разные гены. При их взаимодействии могут образовываться полноценные вирусные геномы, с множественной их активацией. Наблюдается процесс у рео-, рокс- вирусов и др.

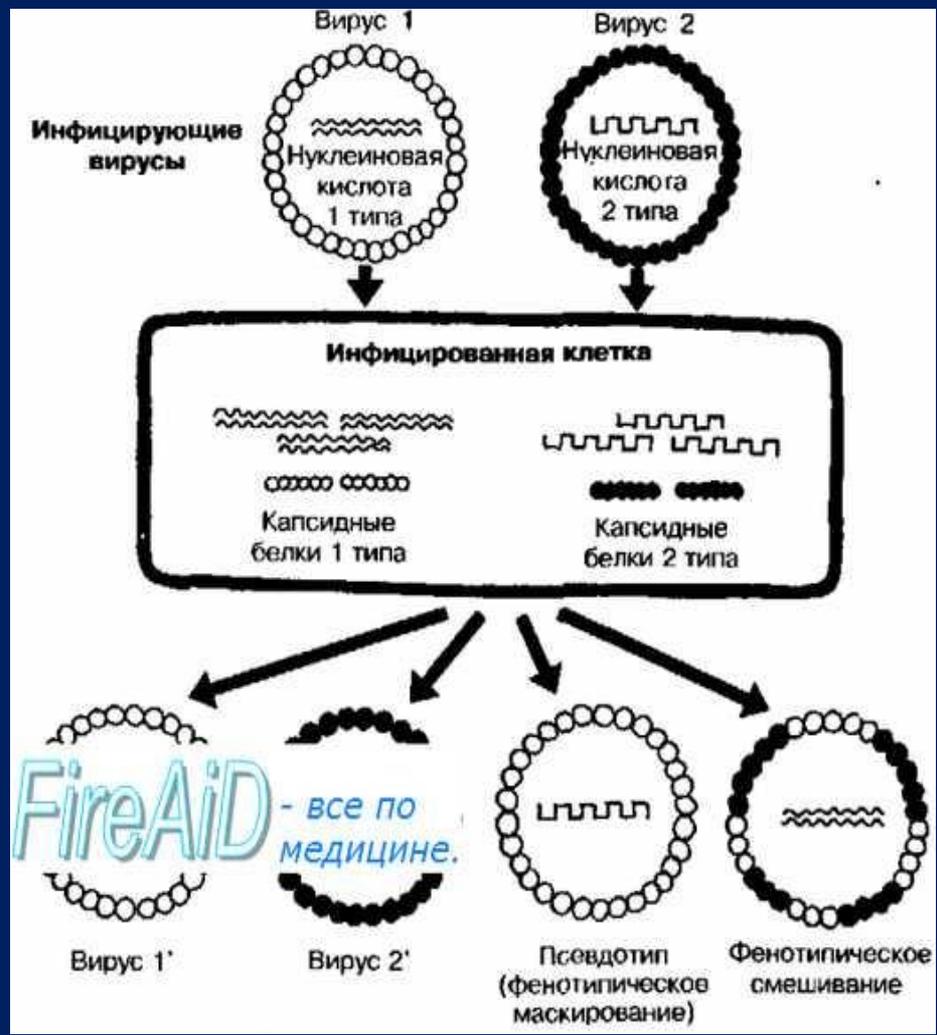


Б



Рекомбинация ДНК- (А) и РНК-содержащих (Б) вирусов

● когда белки кодируемые геном одного вируса, способствуют репродукции другого вируса. Функциональное взаимодействие двух дефектных вирусов. При этом один вирус восполняет генетический дефект другого. Комплементация не сопровождается обменом нуклеиновых кислот между молекулами данных вирусов. Описана у многих вирусов: аденовирусы и онкогенный вирус SV₄₀.



Интерферирующие взаимодействия

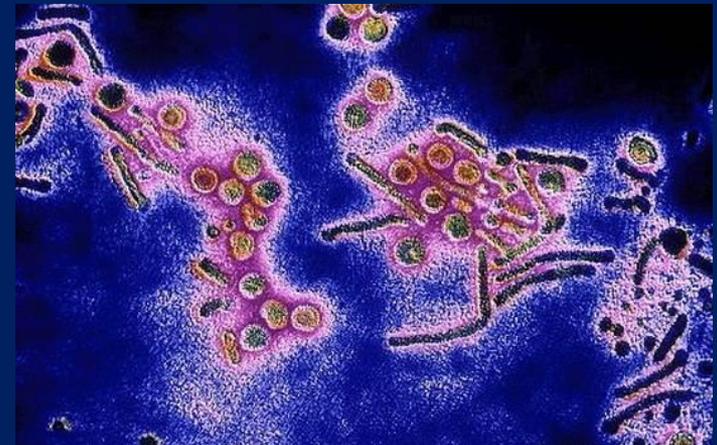
- Состояние невосприимчивости к вторичному заражению клетки уже инфицированной вирусами

Интерференция может быть:

- Гетерологической
- гомологической



- Гетерологическая интерференция. Инфицирование одним вирусом полностью блокирует возможность репликации другого вируса в пределах одной клетки. Связан с угнетением адсорбции другого вируса (блокирование или разрушение рецепторов)
- Гомологическая интерференция. При инфицировании клетки дефектным и полноценным вирусом (помощником). Дефектный вирус способен вмешиваться в репродукцию и образовывать дефектные интерферирующие частицы (ДИ)



Биотехнология

Βίος- жизнь, τέχνη- искусство, λόγος- наука
Термин БИОТЕХНОЛОГИЯ впервые использовал
К. Эреки в 1919 г.

- это использование наук о природе и инженерных наук применительно к биосистемам для получения полезных для человека продуктов и услуг.



Направления биотехнологии:

- сельскохозяйственное: производство кормовых дрожжей, добавок, комбикормов, средств защиты растений и животных;
- медицинское: производство бактериальных и вирусных препаратов, витаминов, гормонов, ферментов, антибиотиков и др. средств для диагностики заболеваний, иммуностропных средств;
- промышленное: в геологии, металлургии и т.д. ;
- экологическое: очистка сточных вод и т.д., дегградация нефтепродуктов и т.д.

Медицинская биотехнология

Иммунобиологическая биотехнология изучает способы и методы конструирования, биотехнологию получения, стандартизации и оценки свойств иммунобиологических препаратов.

Фармацевтическая- способы и методы конструирования, биотехнологию получения, стандартизации и оценки свойств лекарств (антибиотиков, ферментов, витаминов и др.)



- Иммуногенетическая биотехнология связана с производством вакцин нового поколения для профилактики инфекционных заболеваний человека и животных. Это вакцины против гепатита людей, ящура животных и др.
- Особое значение приобрела задача разработки генно-инженерных методов радикального лечения наследственных болезней.



Объект исследования

- Биобъект
 - Целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм, либо изолированные клетки и мультиферментные системы



Биообъект,
осуществляющий полный
синтез целевого продукта,
называется продуцентом.



Бактерии - продуценты

представители родов:

- Acetobacter - превращают этанол в уксусную кислоту;
- Bacillus - получение ферментов и средств защиты растений;
- Clostridium- сбраживание сахаров в ацетон, этанол, бутанол.
- Pseudomonas- получение витамина B12;
- Streptomyces - получение антибиотиков и др.

Клетки животных или растений.

Из них извлекают широкий ассортимент сложной и ценной продукции (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противоопухолевые, сердечные средства, ферменты);
используют для выращивания в них вирусов с целью получения вакцин и диагностических препаратов.



Типы биотехнологических производств

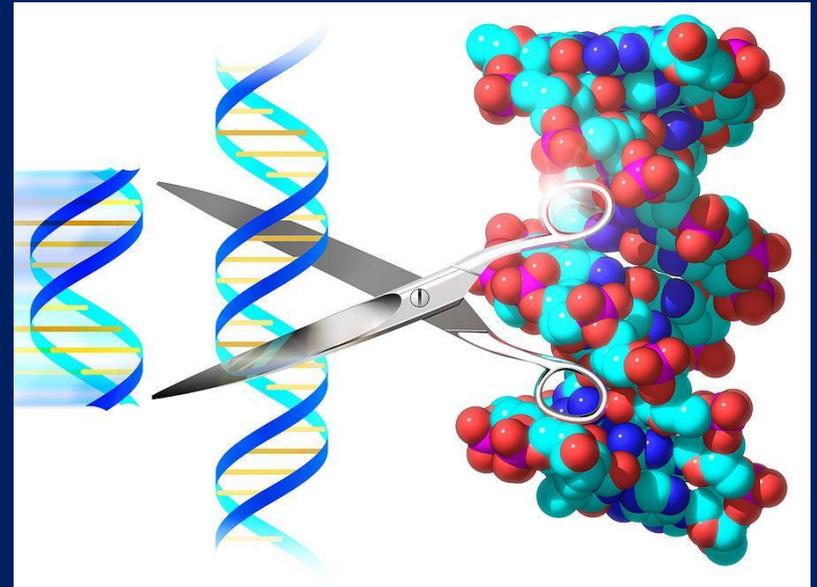
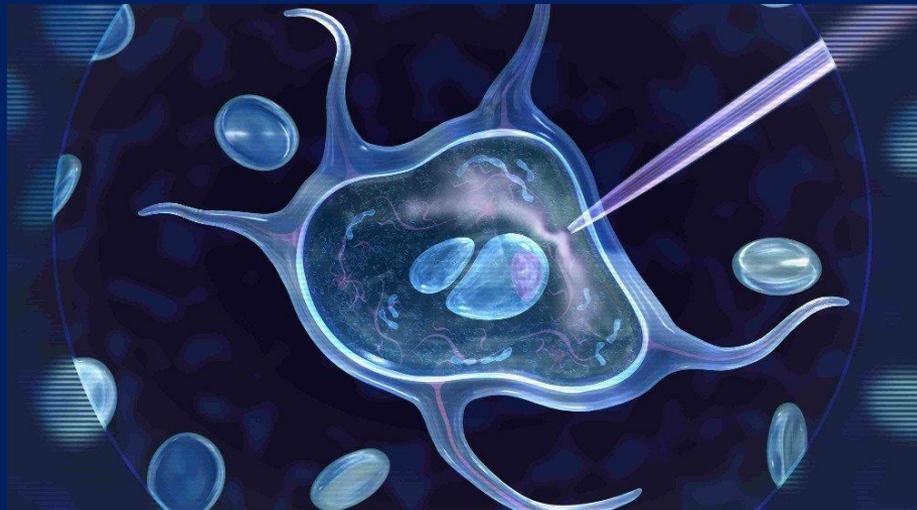
- Использование живой или инактивированной биомассы (закваски, получение пекарских дрожжей, эубиотиков и др.);
- Получение продуктов микробного синтеза (антибиотики, аминокислоты, витамины, ферменты, гормоны и др.);
- Производства основанные на процессах брожения и гниения (утилизация отходов, производство спиртов, органических кислот, растворителей и др.);
- Производства основанные на клеточной инженерии и технологии клонирования.



Прогресс биотехнологии в дальнейшем будет определяться развитием генной, клеточной и эмбриогенетической инженерии.

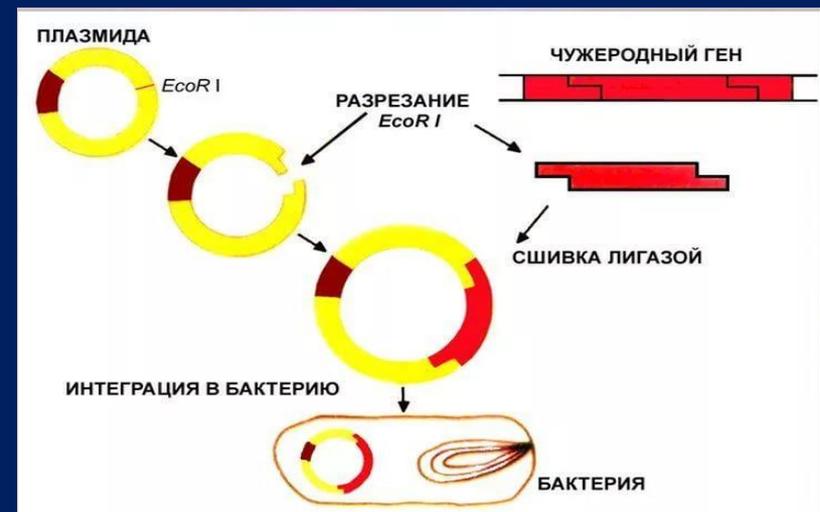


Генная инженерия- совокупность приемов и методов связанных с целенаправленным конструированием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы



Механизмы конструирования рекомбинантной ДНК

- Обработка ферментами- рестриктазами (более 200 ферментов) донорной и реципиентной ДНК (гидролиз) в заданном участке
- Разрезание (линейно или ступенчато).
- Сшивание участков ДНК с помощью фермента полинуклеотид-лигазы в одну рекомбинантную.
- Упаковка рекомбинантной ДНК в вектор (плазмиду, умеренный фаг, вирусы животных)
- Введение в клетку



Трансгенезом называется встраивание чужих генов растениям и животным.

- генетически модифицированные источники пищи (трансгенные соя, рапс, кукуруза, картофель, табак).
 - встроены гены *Agrobacterium tumefaciens*, кодирующий синтез фермента, придающего нечувствительного к гербициду глифосфату);
 - устойчивость к насекомым-вредителям придает ген Bt-токсина, выделенный из ДНК *Bacillus thuringiensis tenebrinis*.

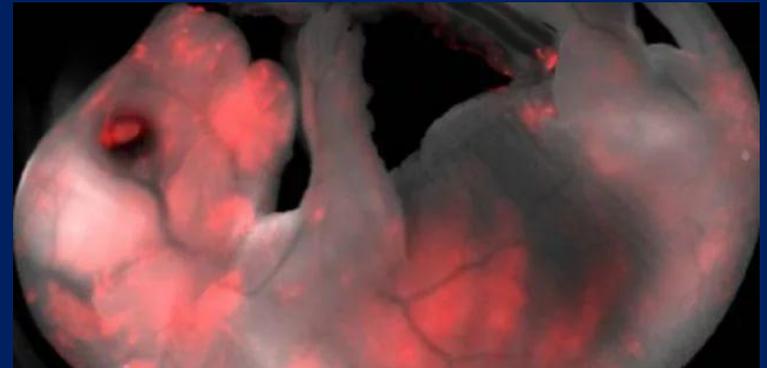
Трансгенные животные

- Животные в геном которых интегрируют чужеродные гены, называют трансгенными.

В 1980 г. Дж.Гордон с сотр. показали возможность трансформации мыши путем введения в пронуклеус ее оплодотворенной яйцеклетки рекомбинантных молекул, содержащих ген тимидинкиназы вируса герпеса.

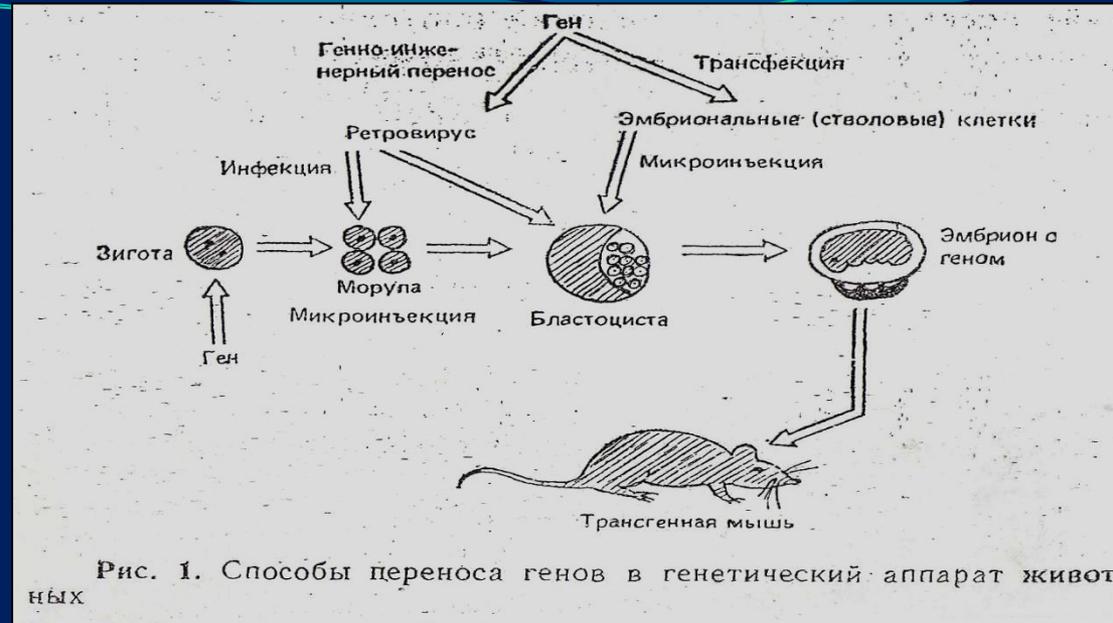
- В 1985 г. получены трансгенные кролики Р.Хаммером и Т.Бремом.

Несколько позднее - овцы, свиньи.



В клетки животных гены вводятся:

- при добавлении в среду для культивирования;
- В виде микроинъекций в оплодотворенную зиготу;
- Путем инфицирования зиготы ретровирусами



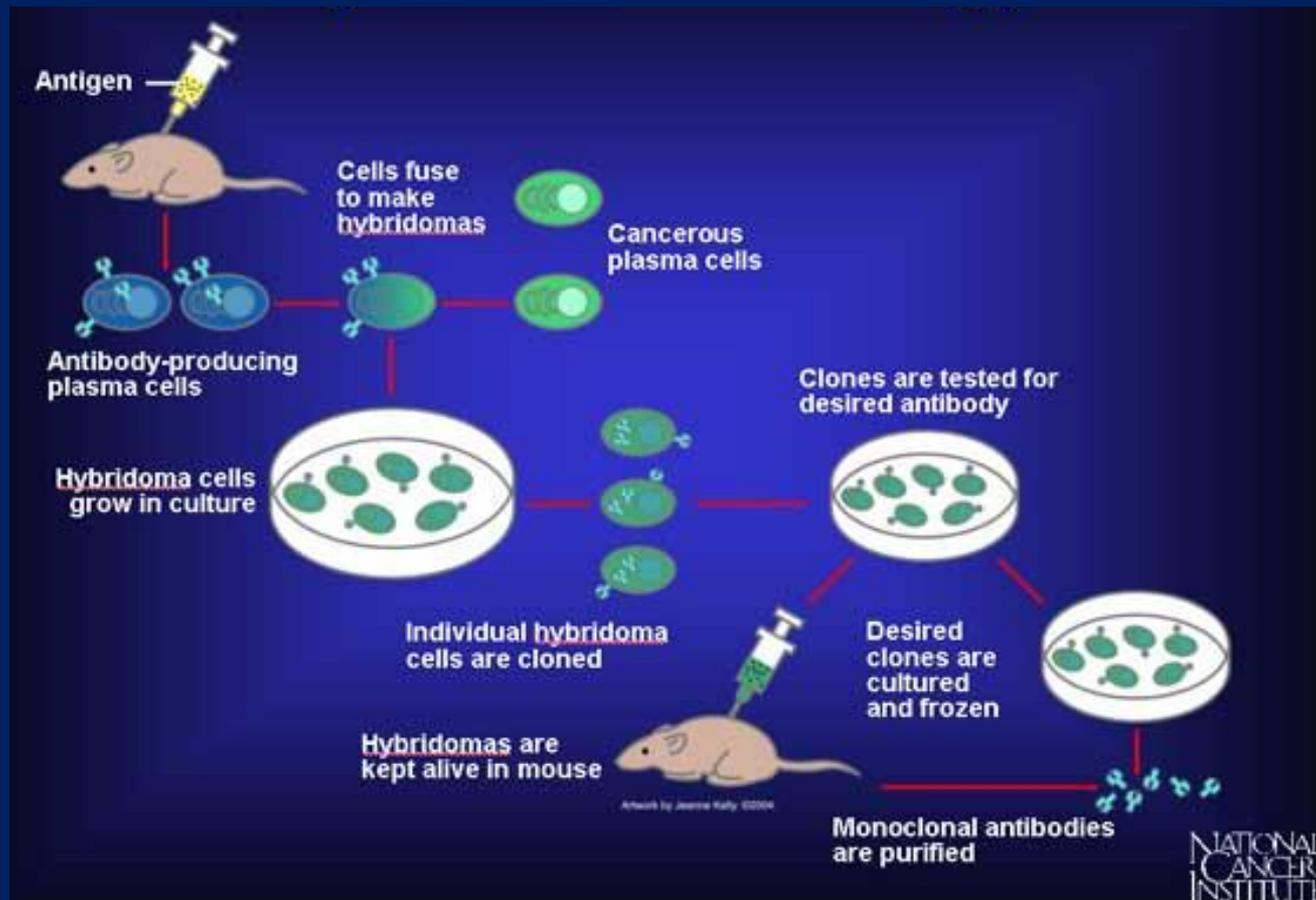


Клеточная инженерия-
метод конструирования
клеток нового типа на
основе их
культивирования,
гибридизации и
реконструкции
(гибридомная технология)

Гибридная технология

Важнейшим этапом в развитии биотехнологии стало создание гибридомы

(Д.Келлер, Д.Мистейн – 1975 г. Нобелевская премия)



Основана на получении гибридных клеток

- В- лимфоцитов, стимулированных конкретным антигеном
- Миелоидных (опухолевых клеток), способных к неограниченному размножению в искусственных условиях

Такая клетка не только быстро размножается, но и продуцирует антитела к данному антигену (высокой специфичности).

Такие АТ, полученные от одной родоначальной клетки получили название **моноклональных**.

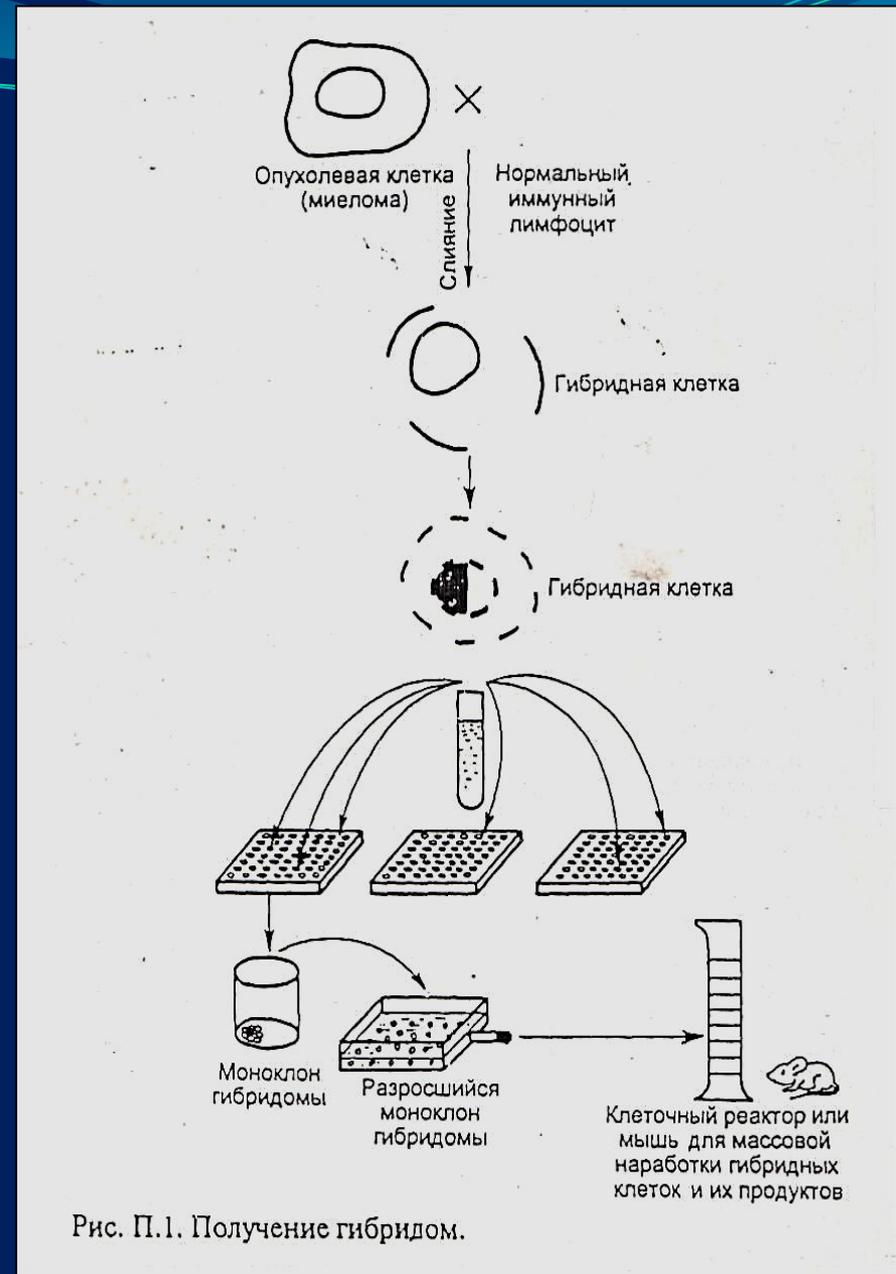
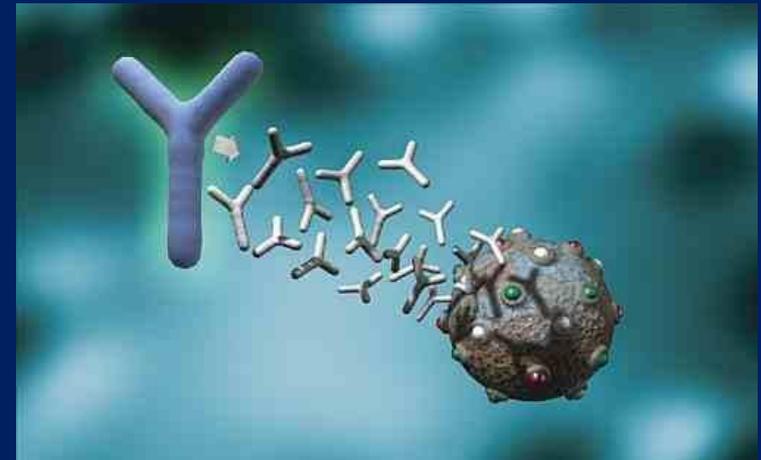
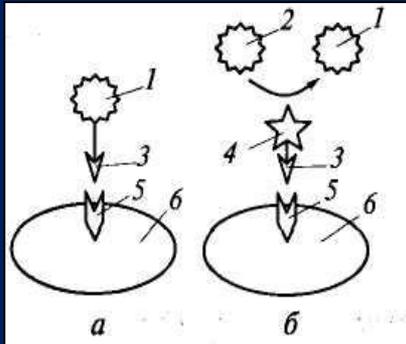


Рис. П.1. Получение гибридом.

Моноклональная технология применяется:

- Для диагностики:
 - инфекционных заболеваний
 - аутоиммунных заболеваний
 - опухолевых заболеваний
 - неинфекционных и аллергических заболеваний и др.
- для изучения строения и функций различных молекул (например клеточных рецепторов).
- Для терапии:
 - генотерапия
- Модуляции иммунного ответа



Области применения моноклональных антител

Диагностика	Терапия	Технология	Научные исследования
<p>1. Иммунохимические анализы биологических жидкостей, клеток организма, микроорганизмов, вирусов и т.д.</p> <p>2. Иммуногистохимические методы.</p> <p>3. Иммуноцитинграфия опухолей.</p> <p>4. Типирование групп крови и тканей</p>	<p>1. Воздействие на определенные клеточные популяции.</p> <p>2. Влияние на иммунные регуляторные механизмы с помощью антител к лимфокинам.</p> <p>3. Иммунорегуляция с помощью антиидиотипических антител.</p> <p>4. Направленный транспорт лекарств с помощью моноклональных антител.</p> <p>5. Элиминация токсинов, иммуноглобулинов из класса IgE</p>	<p>1. Идентификация молекул.</p> <p>2. Очистка клеток, несущих специфический антиген</p>	<p>1. Исследование этиологии и патогенеза различных заболеваний.</p> <p>2. Исследование системных и межсистемных механизмов регуляции.</p> <p>3. Создание новых лекарственных средств и биопрепаратов</p>

Клеточная технология

стволовые клетки

Открыты в 1981 г. М.

Эвансом

(у мышей).

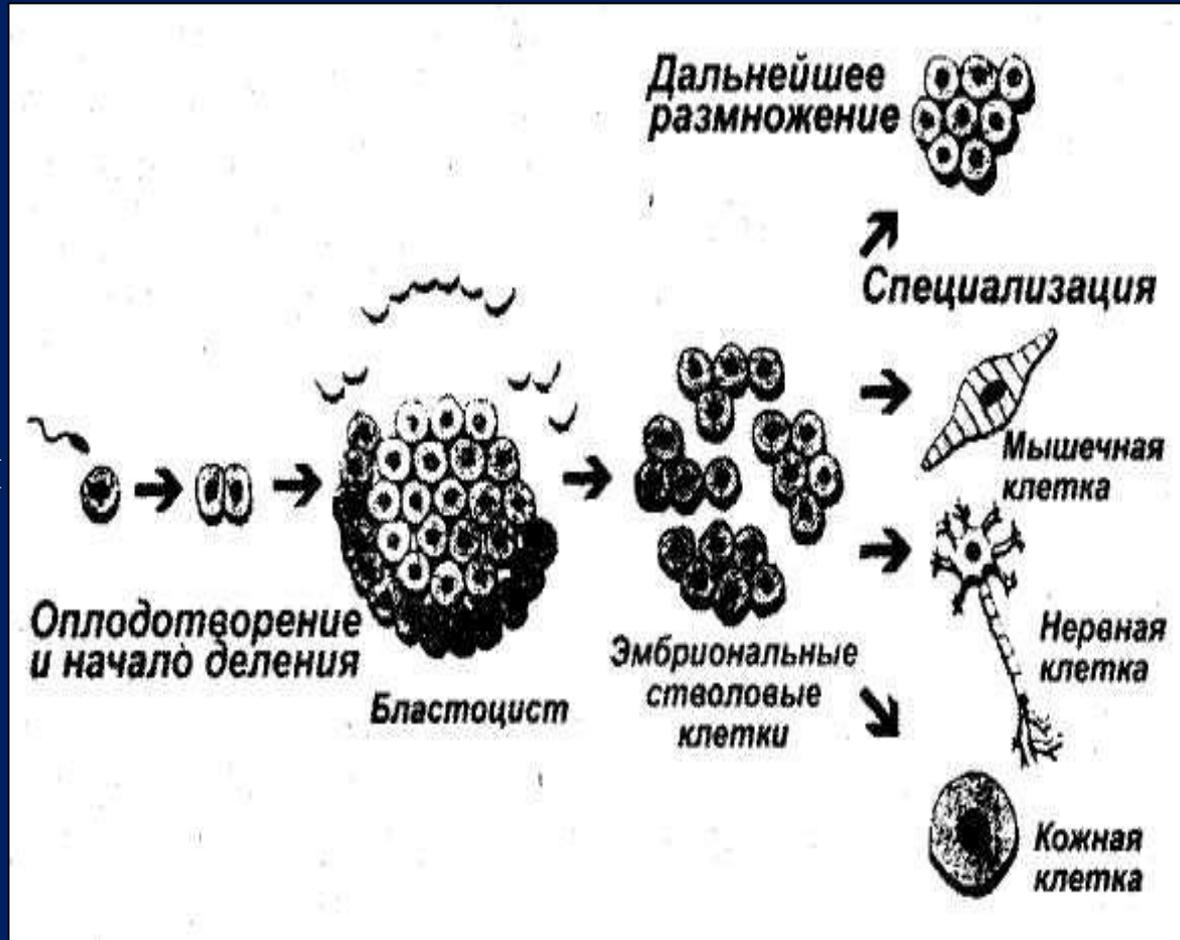
В 1998 г. Дж. Томпсон и

Д. Беккер – выделили

линии человеческих

эмбриональных

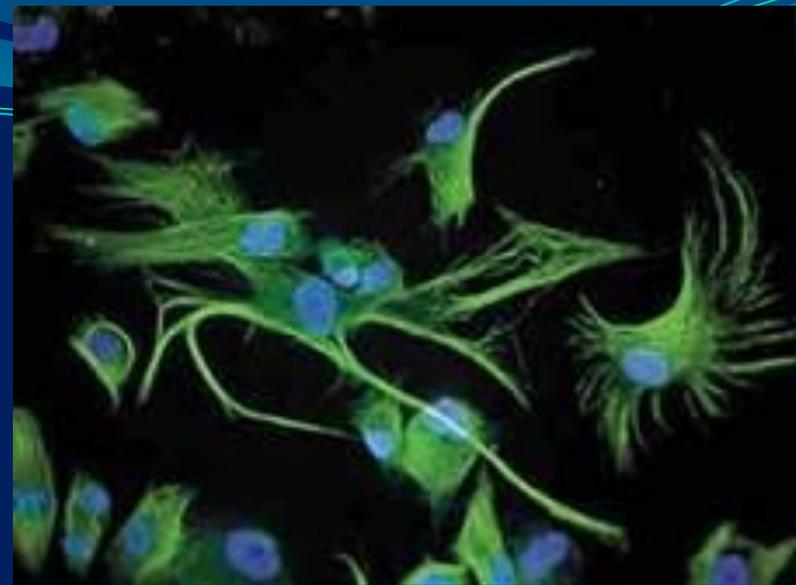
стволовых клеток.



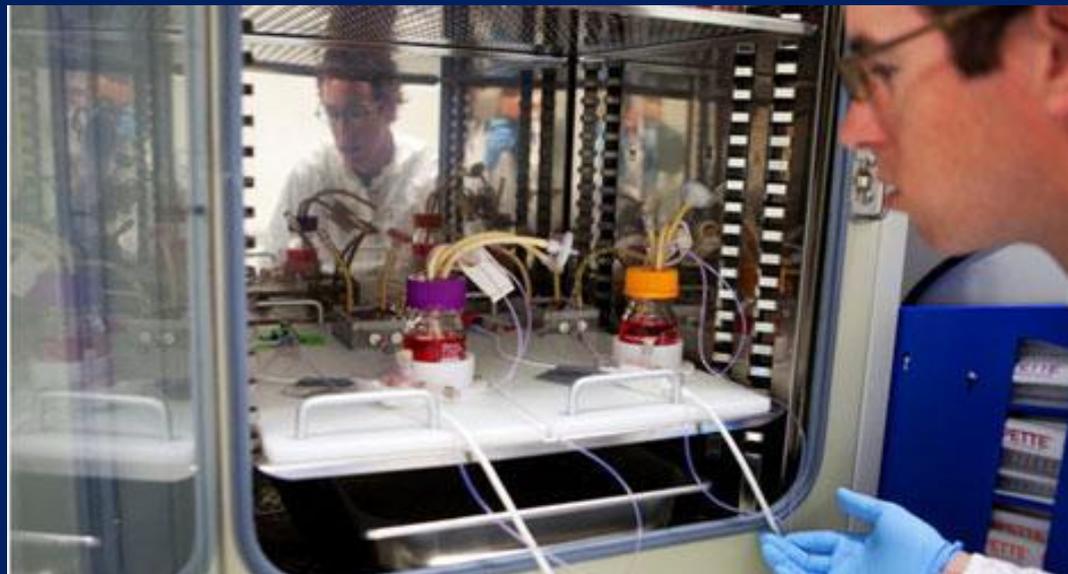
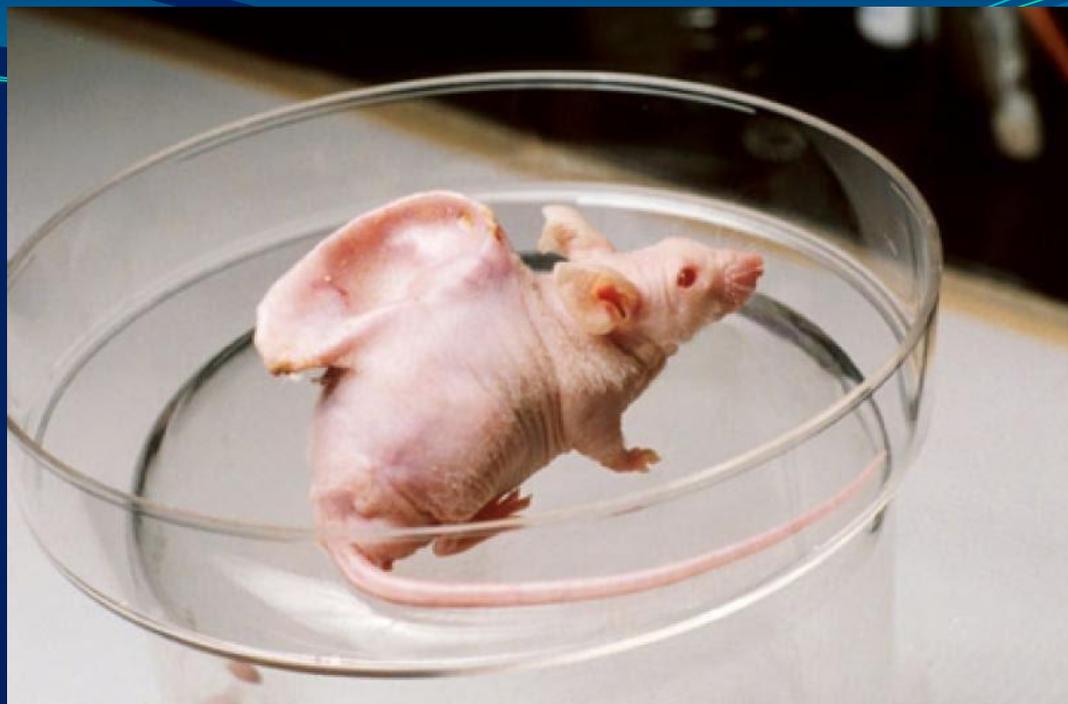
- Генетическая информация в стволовой клетке находится в «нулевой точке» отсчета. Клетка еще не имеет специализации и не начала выполнять программу размножения.

- Эмбриональные стволовые клетки могут принять любую программу и превратиться в один из 150 возможных типов зародышевых клеток.

- Клонирование органов из стволовой клетки (мочевого пузыря, легкие, печень)



Биопринтинг-
технология
трехмерной
биопечати органов
из аутологичных
клеток.



Эмбриогенетическая инженерия

- Перестройка генома- реконструкция эмбрионов путем клонирования.
- генно-инженерные методы радикального лечения наследственных болезней.



Типы генотерапии

- *ex vivo*- пораженные клетки выделяют из организма человека, инкубируют с вектором, а затем вновь вводят в организм (онкогематология);

In situ- вектор с необходимым набором генов вводят непосредственно в пораженные ткани (муковисцидоз, опухоль);

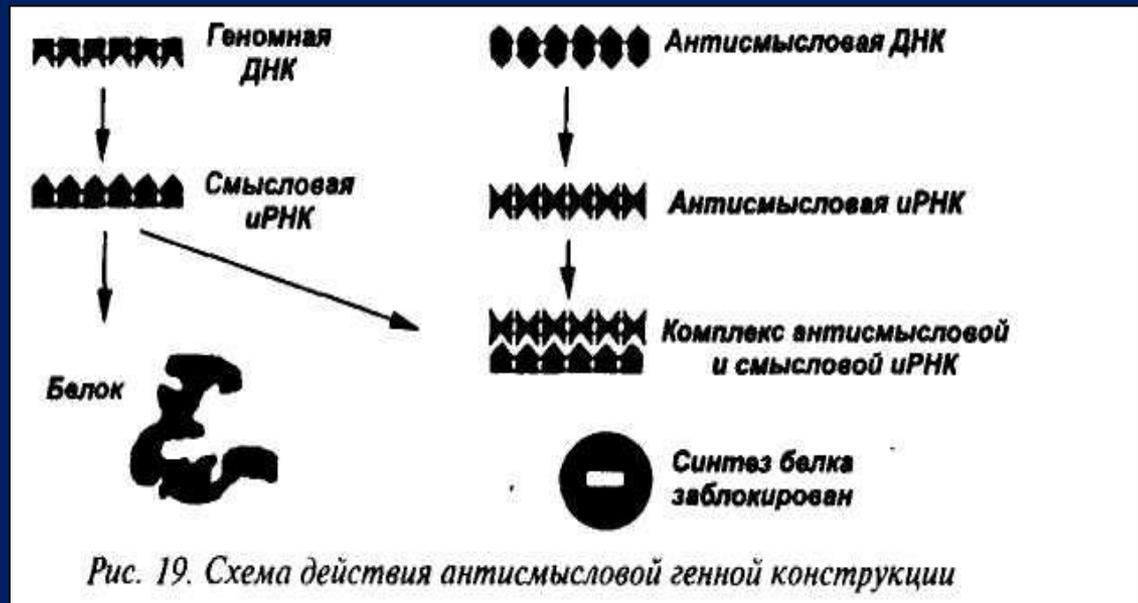


Баллистическая трансфекция- основана на обстреле органов и тканей частицами тяжелых металлов (золото, вольфрам), покрытых плазмидной ДНК. Такие частицы приносят гены непосредственно в ядра клеток (заболевания кожи и хряща).

Избирательная инактивация гена

- «адресное» разрушение гена, («антисмысловая» блокировка гена или производимой им РНК), позволяющая вывести из строя любой ген внутри клетки.

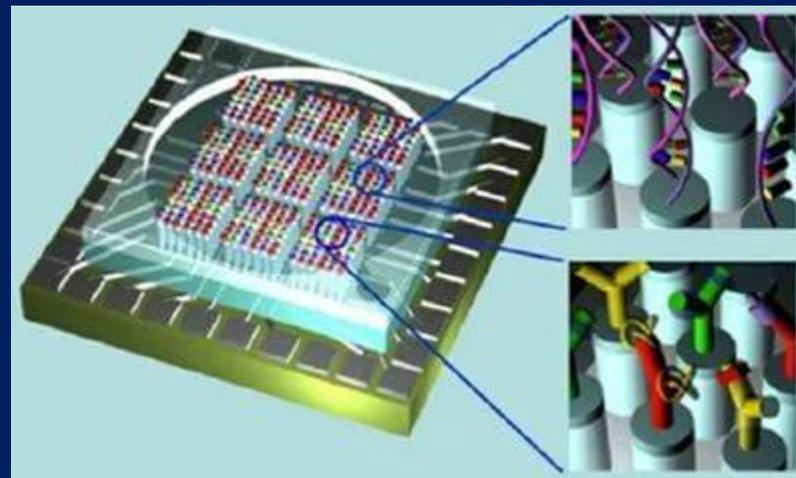
Этот процесс известен также как «нокаутирование» (от англ. *to knock out*, сбивать с ног), а модифицированные организмы — как нокаутные.



Биосенсоры, биочипы

В 1975 г. Э.Саузерн- использовал меченную нуклеиновую кислоту, иммобилизованную на плотной основе.

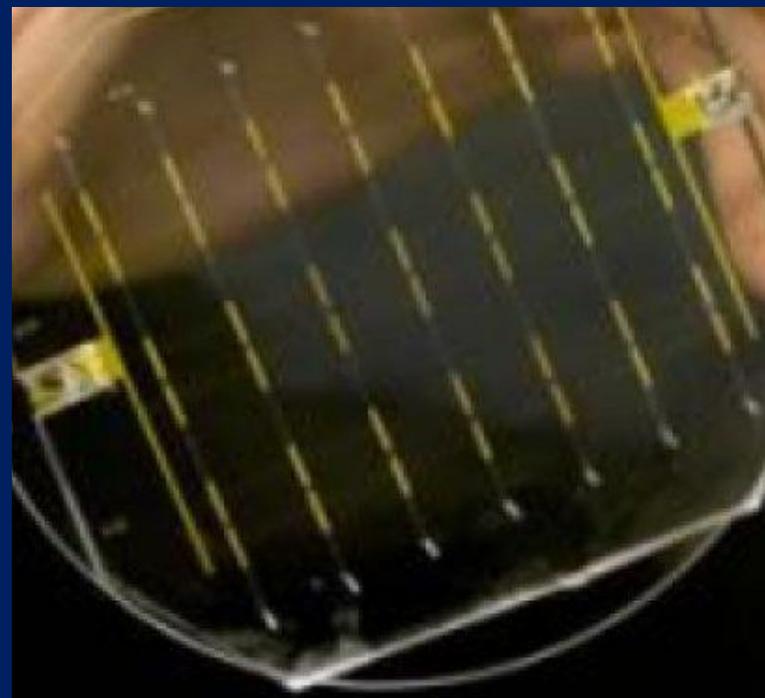
У нас в стране иммобилизация ДНК проводится на плотной основе (кварц, нейлон, микрогели), а биосенсоры изготавливаются с 1988 года.



Иммобилизованные биообъекты

Под иммобилизацией понимают связывание биообъекта с нерастворимым носителем при сохранении его функциональной активности

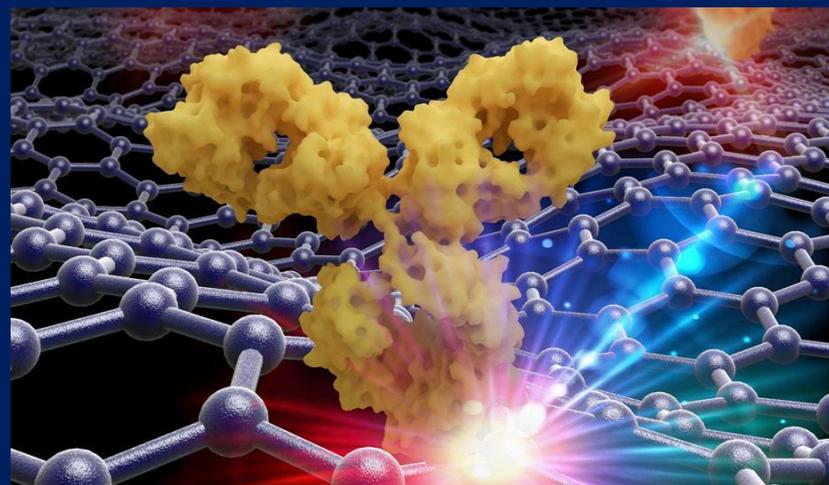
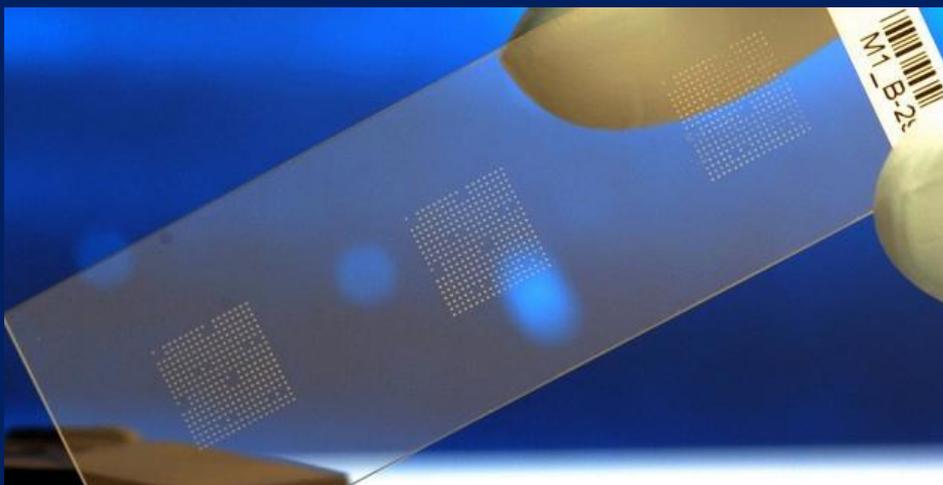
- фермента
- Белка (инженерная энзимология)
- Целых клеток



Основной принцип работы биосенсоров- взаимодействие комплементарных цепей нуклеиновых кислот .

Происходит взаимодействие ДНК-мишени с иммобилизированной пробой и последующая регистрация данного взаимодействия.

Плотность нанесения на основу копий олигонуклеотидов на площади $1,28 \text{ см}^2$ составляет от 50 000 до 1 000 000. Такие высокоплотные матрицы называют ДНК-чипами.

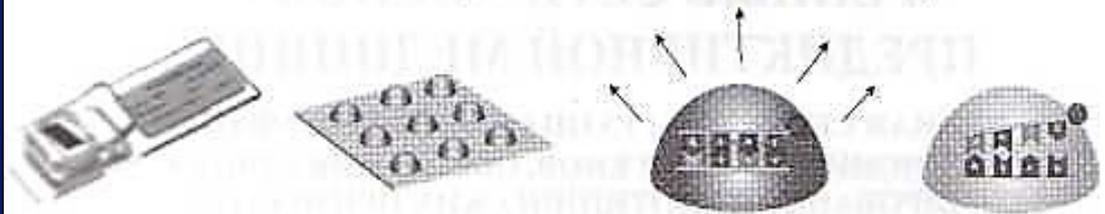


Технология биочипов

Применяется:

- Для выявления инфекционных агентов и их антибиотикоустойчивых форм
- Выявления полиморфизма по единичным нуклеотидам
- Экспрессии генов

Биологические микрочипы на основе гидрогеля

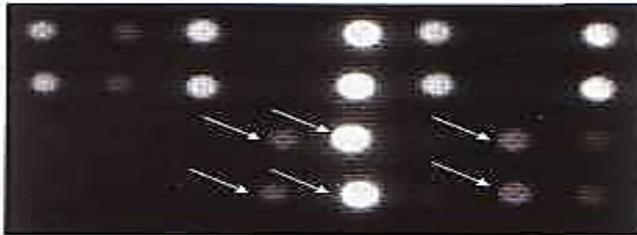


Преимущества:

- Высокая емкость благодаря иммобилизации биомолекул в трехмерной структуре геля
- Гомогенное водное окружение в геле
- Гелевый элемент биочипа используется как индивидуальная пробирка объемом в доли нанолитра для проведения различных химических и ферментативных реакций
- Универсальность в изготовлении ДНК, белковых и клеточных микрочипов
- Низкая стоимость биочипов и их анализаторов и доступность массовому потребителю.

Кардио-Биочип

(Гены: AGT, REN, AGTR1, AGTR2, BKR2, MTHFR, ADRB2)



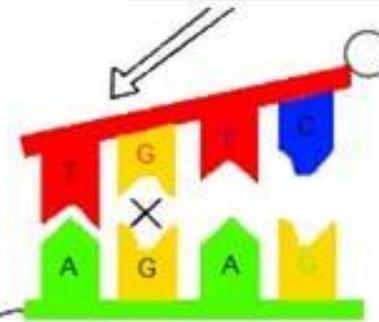
Генотип:

REN -83G>A функция фермента не изменена (G/G)
AGT M235T функция фермента не изменена (M/M)
AGTR1 1166A>C функция фермента не изменена (A/A)
AGTR2 3123C>A (A/A)
BKR2 -58T>C (T/C)
MTHFR 677C>T функция фермента не изменена (C/C)
ADRB2 48A>G (G/G)
ADRB2 81C>G функция фермента не изменена (C/C)
Повышенный риск артериальной гипертензии.

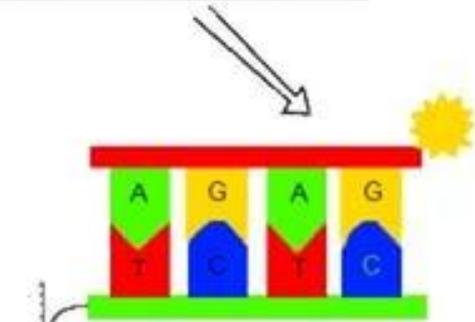
При некомплементарности
темное пятно



Гибридизация флуоресцентно-меченной ДНК



При комплементарности
светлое пятно



Благодарим за внимание!