

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

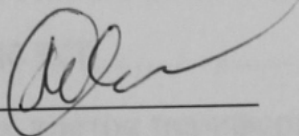
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗУ**

Работа завершена:

«5» 06 2018 г.



(Х.Ю. Муртазалиева)

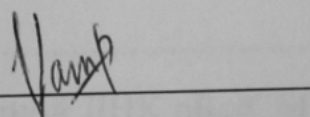
Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., ст. преподаватель

кафедры генетики

«5» 06 2018 г.

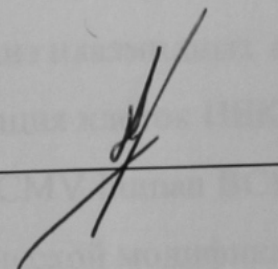


(В.В. Соловьева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«7» 06 2018 г.



(В.М. Чернов)

Казань – 2018

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1.1 Классификация холинэстераз.....	7
1.2 Функции бутирилхолинэстеразы	12
1.2.1 Детоксикация	12
1.2.2 Гидролиз ацетилхолина	13
1.2.3 Жировой обмен.....	14
1.2.4 Связывание и утилизация полипролин-богатых пептидов.....	14
1.3 Использование БуХЭ в клинической практике.....	15
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	18
2.1 Объект и материалы исследования.....	18
2.2 Клеточные линии.....	18
2.3 Выделение и культивирование кМСК-ЖТ	19
2.3.1 Пассирование кМСК-ЖТ.....	20
2.3.2 Криоконсервация кМСК-ЖТ.....	21
2.4 Получение монулеарных клеток периферической крови человека.....	21
2.5 Работа с бактериальными клетками	22
2.5.1 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 α	23
2.5.2 Генетическая трансформация клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 α	23
2.5.3 Приготовление бактериальной культуры <i>E. Coli</i> для долговременного хранения	24
2.5.4. Выделение плазмидной ДНК pRc/CMV-human BCNE.	24
2.5.5 Рестрикционный анализ плазмидных конструкций	27
2.6 Генетическая модификация клеток НЕК293Т, кМСК-ЖТ и МКПК с помощью плазмидной ДНК pRc/CMV-human BCNE	28
2.6.1. Оптимизация генетической модификации клеток НЕК293Т, кМСК-ЖТ.	28
4.2. Генетическая модификация НЕК293Т и кМСК-ЖТ TurboFect.....	30

4.3. Генетическая модификация МКПК с помощью электропорации...	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1 Трансформации клеток <i>E. Coli</i> с помощью плазмидной ДНК pRc/CMV-human BCNE.....	33
3.2 Генетическая модификация клеток НЕК293Т, кМСК-ЖТ и МКПК с помощью плазмидной ДНК pRc/CMV-human BCNE	35
3.2.1 Оптимизация генетической модификации клеток с помощью Turbofect и Lipofectamine 3000	35
3.2.2 Генетическая модификация клеток НЕК293Т и кМСК-ЖТ с помощью Turbofect	37
3.2.3 Генетическая модификация МКПК с помощью электропорации.	38
Выводы	39
Список использованных источников.....	40

г — грамм

кДн — килобайт

л — литр

МСК — мезенхимные стволовые клетки

МСК-ЖТ — мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани

кМСК-ЖТ — культура мезенхимных стволовых клеток, выделенных из
жировой ткани крысы

мг — миллиграмм

мин — минута

мкд — микролитр

мл — миллилитр

МСК — мезенхимные стволовые клетки

см — сантиметр

г.д.н. — глицерил дипнуклеотидат

УФ — ультрафиолет

ВВЕДЕНИЕ

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – сериновая гидролаза, способна стехиометрически связываться с разнообразными токсинами, ингибируя ацетилхолинэстеразу. БуХЭ обнаруживается практически во всех органах и тканях млекопитающих и человека, а именно в тканях желудочно-кишечного тракта, печени и органах дыхательной системы и в сыворотке крови. Высокая реакционная способность ингибирования токсинов, делает БуХЭ человека перспективным кандидатом стать биологическим антидотом, действующего направлено на множества фосфорорганических ядов. Препаративное и промышленное получение рекомбинантной БуХЭ, достаточных для инъекционного введения, затруднено из-за ее низкой экспрессии.

Цель работы: провести генетическую модификацию культур клеток плазмидной ДНК pRc/CMV-human BCHE, кодирующих нуклеотидную последовательность гена бутирилхолинэстеразы (БуХЭ).

Задачи:

- 1) Получить в препаративных количествах плазмидную ДНК pRc/CMV-human BCHE, кодирующую нуклеотидную последовательность гена бутирилхолинэстеразы (БуХЭ);
- 2) Провести рестрикционный анализ выделенной плазмидной конструкции pRc/CMV-human BCHE;
- 3) Выделить мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани крысы (кМСК-ЖТ) и моноклеарные клетки из периферической крови человека (МКПК), провести культивирование полученных клеток *in vitro*;
- 4) Провести генетическую модификацию (трансфекцию) кМСК-ЖТ, МКПК и НЕК293Т плазмидной ДНК, кодирующей БуХЭ и контрольной плазмидой pEGFP-N2, экспрессирующей ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка EGFP;

5) Провести оценку эффективности трансфекции культур клеток по флуоресценции контрольных образцов, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2.

Бутиратхалинастераза (BuXЭ) (железодоступная, холинэстераза) – фермент из группы эстераз. Халинастеразы (ХЭ) – ферменты, основная физиологическая роль которых заключается в быстром расщеплении нейромедиатора ацетилхолина (АХ), выделяющегося из нервных окончаний холинэргических нейронов. ХЭ относятся к классу гидролаз, то есть халинастеразы ферментами, осуществляющими гидролиз ковалентной связи между холином и анионом анионогена нейромедиатора.

Семейство ХЭ млекопитающих включает две биохимически активных ферменты, способных гидролизовать нейротрансмиттер АХ в контролируемый, таким образом, временные границы его действия в процессе сигнальной передачи возбуждения: ацетилхолинэстеразу (АХЭ) и бутиратхалинастеразу (BuXЭ) [1].

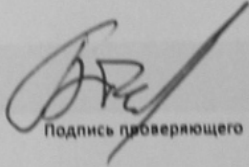
Бутиратхалинастераза (BuXЭ) содержится в различных тканях млекопитающих в печени, сердце, эндотелии сосудов, нервной системе и плазме крови [2]. Исследования BuXЭ берут свое начало с 40-х годов XX века, когда было обнаружено, что существует два типа холинэстераз, но только ацетилхолинэстераза (АХЭ) играет критическую роль в передаче нервных импульсов [3]. Важные в клиническую практику, такого назначения исследования как суданопластика в 50-е гг. XX века привели к пониманию того факта, что некоторые люди имеют особую наследственно обусловленную форму BuXЭ, которая не способна гидролизовать сукарбинилхолин. При этом люди с полностью неактивной BuXЭ являются здоровыми. Эти клинические данные первоначально привели к предположению об отсутствии у BuXЭ значимых физиологических функций. Однако в BuXЭ резко возрос в 70-е гг. XX века, когда было обнаружено, что объектам, получавшим BuXЭ, оказались фармакологически к действию



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Муртазалиева Хаваши Юнусовна
Факультет, кафедра, номер группы	ИФМиБ, 01-640-1
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Разработка и исследование биологических свойств генетических конструкций, кодирующих бутирилхолинэстеразу.
Название файла	Д.Хаваша.docx
Процент заимствования	21,36%
Процент цитирования	0,26%
Процент оригинальности	78,38%
Дата проверки	13:02:34 04 июня 2018г.
Модули поиска	Коллекция РГБ; Модуль поиска "КПФУ"; Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска Интернет; Коллекция ЭЗОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Сводная коллекция ЭБС
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	 Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.