

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

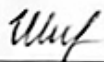
Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Изучение макромолекул единичных и множественных клеток для
определения мишеней бактериального фермента с противовирусным
свойством

Студент 4 курса

группы 01-704

" 1 " 06 20__ г.



(В.Р. Шивирова)

Научный руководитель

к.б.н, доцент

" 1 " 06 20__ г.



(Р. Шах Махмуд)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 1 " 06 20__ г.



(О. Н. Ильинская)

Казань–2021

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается все более стремительное развитие технологий и методов, позволяющих детально анализировать геном, транскриптом, эпигеном, протеом и метаболом изолированных единичных клеток.

Традиционные исследования, проводимые на популяциях с большим количеством клеток, считаются недостаточно информативными, поскольку сводятся к получению усредненных данных, не учитывающих межклеточную гетерогенность, являющуюся следствием вариабельной экспрессии генов.

Анализ единичных клеток способствует пониманию жизни на более фундаментальном уровне, позволяя решить проблему гетерогенности клеточных популяций и выявить конкретные молекулярные механизмы и пути, задействованные в процессе жизнедеятельности клеток и всего организма – как в норме, так и в патологии.

Прогресс в развитии методов анализа, основанного на единичных клетках, и совершенствование технологии его применения позволит науке и человечеству сделать значительный шаг в будущее – решить ряд проблем в области микробиологии и вирусологии, медицины, онкологии, нейробиологии, биологии стволовых клеток, иммунологии, биологии развития, биотехнологии.

Области применения методов анализа единичных клеток чрезвычайно разнообразны, и их число непрерывно растет с каждым днем. Одновременно с этим увеличивается чувствительность, точность и производительность анализа, а также большое значение приобретают экономические преимущества его использования.

В числе потенциальных направлений применения выделяются фундаментальные исследования, посвященные изучению влияния различных факторов на экспрессию генов в клетке.

В связи с этим целью настоящей работы явилось определение содержания мРНК различных генов в единичных и множественных клетках линии А549 для идентификации мишеней бактериального фермента с противовирусным свойством – рибонуклеазы *Bacillus pumilus*.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

- 1) Выявить оптимальный способ изоляции единичных клеток из популяции клеток;
- 2) Оптимизировать метод определения количественного содержания мРНК в образцах с единичными и множественными клетками;
- 3) Определить различия в содержании мРНК в контрольных и подвергшихся обработке биназой образцах.

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что метод ручной изоляции единичных клеток с помощью модифицированной пипетки Пастера является более эффективным, чем метод предельных разведений;

2) Определен эффективный метод определения количественного содержания мРНК в единичных клетках эукариот в сравнении с множественными клетками. Показано, что при анализе экспрессии генов у эукариот на уровне единичных клеток необходимо проведение трехэтапной ПЦР: осуществление стандартной ПЦР перед ПЦР-РВ с целью накопления достаточного для детекции количества дцДНК;

3) Доказано, что обработка линии эукариотических клеток A549 биназой в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 часов культивирования не оказывает влияния на экспрессию генов 18s рРНК и АСТВ клеток человека.