**АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ И СДАЧИ ЭКЗАМЕНА ПО ДИСЦИПЛИНЕ «Медицинская БИОТЕХНОЛОГИЯ», специальность «Медицинская биофизика»**

Экзамен по дисциплине « Биотехнология» проводится **в письменной форме.**

Для написания письменных ответов представляется **3 астрономических часа** времени. Ответы должны быть подробно изложены в рамках обозначенных вопросов.

По истечении выделенного времени работы сдаются преподавателю.

**Структура билета** включает 4 вопроса, из них 3 теоретических и 1 вопрос в виде ситуационной задачи. **Каждый вопрос оценивается в 25 баллов** при полном изложении ответов на поставленные вопросы, что равнозначно 100%.

<17 баллов-неудовлетворительно (менее 70%)

18-19 баллов-удовлетворительно (70%)

20-22 баллов-хорошо (80%)

23-25 баллов-отлично (90-100 %)

**ФГБОУ ВО КАЗАНСКИЙ ГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ**

**Институт фармации**

**Специальность 30.05.02 Медицинская биофизика**

**Медицинская биотехнология**

**Экзаменационный билет №1**

1. Определение понятия «биомедицинские технологии». Генотерапия (25б.)

2. Этапы подготовки посевного материала. Восстановление продуцентов из состояния анабиоза. Инокуляторы(25б.)

3. Основные принципы культивирования клеток млекопитающих. Первичные и пассируемые культуры. Суспензионные культуры(25б.)

 4.Что за устройство изображено на схеме? Назовите его составляющие части.

Расскажите принцип работы прибора (25б.)



**Зам. директора по образовательной**

**деятельности, профессор Егорова С.Н.**

**АЛГОРИТМ ОТВЕТА**

Билет №

1.Определение понятия «биомедицинские технологии». Генотерапия (25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание Ответа |
| Определение медицинской биотехнологии как науки. Преимущества.  | **Биотехнология** *медицинская* — технология получения продуктов, необходимых для профилактики и лечения заболеваний, из живых клеток различного происхождения. Термин «биотехнология» появился в 70-х гг. 20 в. и объединил ранее употреблявшиеся понятия «промышленная микробиология», «техническая биохимия» и др.В истории развития биотехнологии можно выделить три основныхпериода:1. эмпирическая биотехнология (тысячелетия). Самый первый биотехнологический процесс, осуществленный человеком – получениепива, был изобретен шумерами приблизительно 5 тысяч лет назад;2. научная биотехнология (с Пастера);3. современная биотехнология.Основы медицинской Б. были заложены в 40-х гг. 20 в. разработкой промышленного производства пенициллина. Затем были найдены продуценты и налажено промышленное получение других антибиотиков. В ряде случаев выход антибиотиков удалось существенно повысить, создав высокопроизводительные мутантные штаммы продуцентов. Ряд антибиотиков в настоящее время производится полусинтетическим способом биоконверсии, в соответствии с которым грибы или микроорганизмы осуществляют лишь некоторые ключевые стадии модификации молекулы лекарственного вещества. Этот способ успешно применяют и в производстве препаратов стероидных гормонов — глюкокортикоидов и половых гормонов. Для производства интерферона, вирусных антигенов используются клетки человека, культивируемые в искусственной среде. |
| Направления медицинской биотехнологии | Наибольшее влияние на развитие Б. оказывает[*генетическая инженерия*](http://www.nedug.ru/library/doc.%3Cdiv%20class%3D)*,* методы которой позволяют выделять индивидуальные гены и получать кодируемые ими продукты в больших количествах. На основе генно-инженерной технологии разработано и осуществляется производство инсулина и гормона роста человека, интерферонов и других биологически активных белков. Разрабатываются генно-инженерные технологии получения противовирусных вакцин, которые особенно ценны в тех случаях, когда выделять вирус для этих целей либо трудно, либо опасно. Так, вирус [гепатит](http://www.nedug.ru/desease/%D0%93%D0%B5%D0%BF%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%82)а В вне организма не размножается, и его специфичный антиген ранее выделяли только из крови людей — носителей вируса. После того, как был получен ген, контролирующий синтез этого белка, были созданы микроорганизмы, активно продуцирующие антиген вируса [гепатит](http://www.nedug.ru/desease/%D0%93%D0%B5%D0%BF%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%82)а В в процессе своей жизнедеятельности.    Важнейшей для медицинской Б. областью стала клеточная инженерия, в частности технология получения моноклональных антител, которые продуцируются в культуре или в организме животного гибридными лимфоидными клетками — гибридомами. Технология получения моноклональных антител оказала большое влияние на фундаментальные и прикладные исследования в области медицины и на медицинскую практику. На их основе разработаны и применяются новые системы иммунологического анализа — радиоиммунологический и иммуноферментативный анализ. Они позволяют определять в организме исчезающе малые концентрации специфических антигенов и антител.Большое значение моноклональные антитела приобрели для типирования тканевых антигенов (прежде всего антигенов класса HLA) при подборе наиболее подходящих доноров для трансплантации органов и тканей. Моноклональные антитела к специфическим опухолевым антигенам или определенным белкам, появляющимся при наличии опухолей, играют большую роль в ранней диагностике опухолей и их метастазов, позволяют контролировать эффективность терапии. Эти антитела, иммобилизованные на нерастворимом инертном носителе, могут быть весьма эффективны для избирательного удаления из кровотока ядовитых соединений, при интоксикациях. С помощью иммобилизованных моноклональных антител получают также такие препараты, как, например, интерферон, в промышленных масштабах.Клонированные гены и другие участки ДНК человека, а также искусственно синтезированные участки генов, полученные с помощью биотехнологических подходов, уже нашли практическое применение при выявлении носительства патологических генов и диагностике некоторых наследственных болезней человека, в т.ч. и дородовой диагностике. Поставлена и активно разрабатывается на экспериментальных моделях проблема лечения наследственных болезней путем пересадки нормального гена в клетки больного человека.Генная терапия - это технология излечения болезней человека путем использования в качестве объекта лечебного действия гена, дополняющих или заменяющих, либо подавляющих нарушенные функции генов клеток тех или иных органов и тканей организма. Наследственные и ненаследственные (соматические и инфекционные), онкологические болезни обусловлены в конечном итоге нарушением функции структурных или регуляторных генов. При наследственных заболеваниях изначально присутствуют нарушения в геноме клетки (гемофилия, болезнь Паркинсона и др.). Генная терапия основывается на методах генной инженерии, технологии рекомбинантной ДНК- это создание генетических конструкций, содержащих целевой ген и их введение в больной организм. Разработанные генетические конструкции способны восстановить или заменить дефектный ген, экспрессировать полноценный генный продукт или блокировать функциональную активность мутировавших генов. известно, что почти все заболевания так или иначе связаны с нарушением функции генов, т.е. с негативными мутациями. Генная терапия находится на начальном этапе развития и применения в клинической практике. Предпосылкой становления технологии генной терапии как и в прочем технологии рекомбинантной ДНК явились исследования по вирусной трансфекции, установление факта существования в природе способности вирусов проникать внутрь клеток и интегрировать с их геномом. Успехи технологии генной терапии основываются на результатах секвенирования и картирования генома человека, полученных при реализации программы «Геном человека», современных сведений в области протеомики, бионанотехнологий, биоинформационных технологий. Стандартная технология генной терапии имеет следующие стадии:1.подготовка экзогенного генетического материала, необходимого для трансфекции в клетки-мишени больного организма;2.встраивание этого фрагмента ДНК в векторную систему, сконструированную на основе плазмиды, адено- , ретровирусов путем использования липосом;3. трансфекция ex vivo либо in vivo вектора, несущего целевой ген в клетки-мишени больного организма в следующей последовательности: экспериментальные или предклинические испытания генной конструкции на лабораторных животных, затем апробирование на добровольцах и применение у больных после утверждения протоколов клинических испытаний.  |

2. Этапы подготовки посевного материала. Восстановление продуцентов из состояния анабиоза. Инокуляторы(25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Понятие анабиоз | Состояние организма, характеризующееся почти полным, но обратимым прекращением жизнедеятельности, одна из форм приспособительных реакций микроорганизмов к крайне неблагоприятным условиям внешней среды |
| Хранение посевного материала | Культуру продуцента хранят: в запаянных ампулах ;в жидком азоте; на твердых носителях – пшено, ячмень, рис; в лиофилизированном состоянии – лучше хранятся споры, чем живые клетки; в ампулах в лиофилизированном состоянии на носителе (пшено, желатин- альгинат натрия) в пробирке на скошенном агаре – срок хранения до нескольких месяцев. Продуцент может храниться разными способами, например, на скошенном агаре, с поверхности которого он переносится в колбы с жидкой питательной средой. После накопления биомассы и проверки культуры на чистоту 0,5-1% посевного материала переносится в инокулятор. В нем происходит рост и деление микроорганизмов. Из инокулятора 2-3% материала переносится в посевной аппарат. Из посевного аппарата 5-10% посевного материала переносится в ферментер. |
| Схема этапов подготовки посевного материала | 1.пробирка с продуцентом на скошенном агаре 2. большое количество колб для выращивания молодой культуры (проверяют чистоту культуры под микроскопом. 3. инокулятор, мешалка 4. посевной аппарат (с контролем) Такое количество стадий нужно для получения чистой культуры. Многоэтапное выращивание посевного материала – обязательный принцип биотехнологического производства. |
| Инокулятор | Небольшой ферментер для стерильного выращивания посевного материала(инокулята), обычно это герметичная емкость с мешалкой, барбатером и терморубашкой |

3. Основные принципы культивирования клеток млекопитающих. Первичные и пассируемые культуры. Суспензионные культуры(25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Основные принципы культивирования | Должна быть обеспечена стерильность, которая достигается стерилизацией помещения, воздуха, вспомогательных материалов, посуды и т.д.1. Выделение клеток из крови,мягких тканей с помощью ферментов коллагеназа,трипсин,проназа разрушающих внеклеточный матрикс
2. Культивирование клеток в специальных питатеьных средах, при постоянной температуре, для клеток млекопитающих необходима специальная газовая среда, поддерживаемая в инкубаторе клеточных культур.
3. Избегать перекрестного загрязнения культур
4. Особенности выращивания клеток. При выращивании из-за деления клеток может возникнуть 1)накопление в питательной среде продуктов выделения, в том числе токсичных 2) накопление омертвевших клеток, прекративших жизнедеятельность. Скопление большого количества клеток оказывает негативное влияние на клеточный цикл, рост и деление замедляются, а клетки начинают стареть и отмирать(контактное ингибирование роста), а также может начаться клеточное дифференцирование. Поэтому необходимо заменять питательную среду, проводить пассажирование и трансфекцию клеток. Во избежание загрязнения питательной среды добавляют антибиотики, контролируют кислотность путем добавления в них индикаторов кислотности.2)Пассажирование (разделение) клеток-это отбор небольшого количества клеток для выращивания в другом лабораторном сосуде. Если культура быстро растет, необходимо это проводить регулярно. Суспензионные культуры проще, отбирают необходимое количество клеток помещают в сосуды и добавляют свежей среды.

3.) трансфекция и трансдукция.В клетки при выращивании можно внедрять чужеродную ДНК путем трансфекции для управляемой экспрессии генов.(невирусный путь)Днк может быть внедрена в геном клетки с помощью вирусов или бактериофагов.Они являются внутриклеточными паразитами и внедрение в клетку-хозяина обычная процедура жизненного цикла. Этот метод называется трансдукция.  |
| Основные условия | 1. Питательные среды:1. ростовые(естественные, например, гидролизат лактаальбумина), синтетические (среда 199,среда Игла). Входят в состав аминокислоты, витамины, чаще добавляют 5-20% сыворотки) и 2)поддерживающие, чаще не содержит сыворотку, включают желатину или снятое молоко.
2. Не допустить контоминацию культур клеток микроорганизмами

Для борьбы используют антибиотики: пенициллин,стрептомицин,неомицин и др., с микоплазмами- канамицин, миокризин, с грибками-фунгизон.  |
| Первичные культуры и пассированные культуры. | Клетки полученные от животного и поддерживаемые в культуре называют первичными до тех пор пока они не будут пассированы (субкультивированы), т.е. до первого посева. Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования.  |
| Суспензионные культуры | Это отдельные клетки или группы клеток выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ. Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма и др.  |

 4.Что за устройство изображено на схеме? Назовите его составляющие части.

Расскажите принцип работы прибора (25б.)



|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| **Ответ:**На схеме изображена камера для проведения электрофореза (вертикального электрофореза в ПААГ). |  |
| Принцип работы прибора | Принцип работы прибора основан на явлении электрофореза (а именно, на методе гель-электрофореза), то есть на способности заряженных частиц (фрагментов ДНК, белков) перемещаться в геле под действием постоянного электрического поля в соответствии с их размерами и молекулярными массами. |
| Строение камеры: | Для проведения электрофореза необходима специальная камера, которая должна обеспечивать поддержку стекол с залитым между ними гелем. Камера для электрофореза в полиакриламидном геле имеет форму параллелепипеда, сделана из стекла или прочного пластического материала, имеет плотную воздухонепроницаемую крышку, обеспечивающую поддержание давления, насыщенной влажности. Слой геля является внутренним носителем, он имеет форму удлиненного прямоугольника, толщиной 1-2 мм. К противоположным стенкам камеры присоединены (припаяны) два изолированный проводника, к которым подведены электроды из платиновой проволоки. В целях безопасности камера должна быть снабжена приспособлением, обеспечивающим прерывание электропитания при снятии крышки. В камере у двух противоположных сторон вставлены две двойные кюветы, разделенные вдоль пополам, или же эти кюветы могут входить в состав самой камеры. Электрофорез должен проводиться в камере, заполненной буферным раствором. Буфер необходим для повышения ионной силыраствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.Электроды соединены через наружный изолированный кабель с источником постоянного тока. Необходим высоковольтный источник питания. Для эффективного разделения в геле фрагментов ДНК подаваемое напряжение должно находиться в пределах от 30 до 50 В на см длины геля. То есть источник питания должен обеспечивать стабилизацию напряжения не менее 2000 В, вследствие большого размера геля. При электрофорезе ровный слой геля помещают клеящей стороной на стекло и к каждому концу слоя присоединяют электрические клеммы. Подключение камеры к блоку питания осуществляется при помощи сетевых разъемов, закрепленных на свободных концах разноцветных шнуров. Шнуры обычно красного и черного цвета. Положительный вывод блока питания подключается к сетевому разъему, маркированному красным цветом. Отрицательный вывод подключается к сетевому разъему, маркированному черным цветом.В комплекте с камерой также идут гребенки для формирования лунок в геле. |

**ФГБОУ ВО КАЗАНСКИЙ ГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ**

**Институт фармации**

**Специальность 30.05.02 Медицинская биофизика**

**Медицинская биотехнология**

**Экзаменационный билет №**

1.Биообъекты растительного происхождения. Дикорастущие, плантационные растения, водоросли. Культуры растительных тканей. Основные группы,получаемых БАВ(25б.)

2. Понятие культуральная жидкость. Предварительная обработка культуральной суспензии для более полного разделения фаз. Кислотная коагуляция. Тепловая коагуляция. Внесение электролитов.(25б.)

3. Понятие гель-электрофорез. Сущность метода. Основные этапы проведения гель-электрофореза и их характеристика(25б.)

4. Как известно, при использовании клеточной инженерии, при создании новых продуцентов широко применяют методику протопластирования (получения протопластов) как процесс конструкции гибридных структур.

В плане решения задачи получения новых продуцентов как источников новых ЛС предложите:

− схему получения протопластов и гибридных структур;

− конечные цели, достигаемые с помощью продуктов гибридной природы.(25б.)

**Зам. директора по образовательной**

**деятельности, профессор Егорова С.Н.**

**Образец ответа на билет №2**

**Алгоритм ответа**

 **Билет №**

1. Биообъекты растительного происхождения. Дикорастущие, плантационные растения, водоросли. Культуры растительных тканей. Основные группы, получаемых БАВ(25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Культивирование клеток растений**.**Каллусные культуры | Культуры растительных клеток используют:1. в фундаментальных исследованиях для получения препаративных количеств вторичных метаболитов;2. для выведения растений с улучшенными свойствами;3.для получения устойчивых к вирусам декоративных и садовых растений;4. для получения трансгенных растений;5. для сохранения исчезающих растений; Из органа растения, выращенного в стерильных условиях из семени, выделяют **эксплант**(ткань) и переносят ее на твердую или жидкую питательную среду.В настоящее время известно большое количество различных по составу питательных сред. Однако наиболее часто при выращивании изолированных растительных тканей в условиях invitro является среда Т.Мурасиге и Ф.Скуга, впервые составленные в 1962 году.Эта среда имеет сбалансированный состав питательных веществ и отличается сооотношением аммонийного и нитратного азота.Чаще применяют синтетические питательные среды с большим числом ингредиентов (до 20-25). Эффективным источником углерода является глюкоза или сахароза, а источником азота - аммониевые соли неорганических кислот, мочевина и смесь аминокислот. Обязательно входят микроэлементы, используемые в виде концентрата из 6-8 солей марки «ХЧ», не содержащие примеси. Важным для выращивания растительных клеток являются фитогормоны (ауксин, кинетин, индолуксусная и гиббереллиновая кислоты).Культуры поддерживают в стерильных контролируемых условиях (свет, воздух,температура) в климатических *камерах.**Каллусные культуры.Каллус*-это неоформленная взрослая раневая ткань, возникающая в местах выделения эксплантов у растений. Каллусы выращивают в чашках с агаром в виде поверхностных культур , после чего их можно использовать для получения культур недифференцированных омнипотентных растительных клеток.По типу клетокполучаемого материала: меристемные и гаплоидные культуры.Мерисистема-это растительные стволовые клетки,обладающие способностью к неограниченному делению. Их выделяют в стерильных условиях в виде вегетативных конусов из побегов,корней или пазушных почек и культивируют как каллусную или суспензионную культуру. Недостаток этих культур: отсутствие устойчивости к возбудителям заболеваний растений. |
| Суспензионные культуры | Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют *суспензионными культурами.* Отдельные клетки, небольшие группы или достаточно крупные агрегаты (более 50 клеток) выращивают во взвешенном состоянии в жидкой среде.  |
| Преимущества суспензионных культур перед каллусными | Эти культуры представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, поэтому можно получить хорошие воспроизводимые результаты по влиянию экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций.Важным их преимуществом при выделении ферментов или продуктов вторичного метаболизма является отсутствие у большинства суспензионных культур хлорофилла и каротиноидных пигментов. Обрабатывая такие культуры фитогормонами можно получить целые растения, способные к воспроизводству. |
| Использование каллусных культур | Суспензионные культуры клеток широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма , индукции ферментов и связи их с событиями клеточного цикла, экспрессии и репрессии отдельных генов, деградации чужеродных соединений , а также как исходный материал для очистки ферментов. |
| Основные группы получаемых БАВ | Основой биотехнологического использования культур тканей растений является способность клеток invitro синтезировать самые разнообразные группы веществ: фенольные соединения,гликозиды,эфирные масла, каратиноиды,смолы,алколоиды и другие природные соединения. |

2. Понятие культуральная жидкость. Предварительная обработка культуральной суспензии для более полного разделения фаз. Кислотная коагуляция. Тепловая коагуляция. Внесение электролитов.(25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Понятие культуральная жидкость | Жидкость образуемая в процессе ферментации микроорганизмов и содержащий целевой продукт.Культуральную жидкость можно разделить на 3 типа: бактерий, грибов и актиномицетов. К.Ж.актиномицетов требует предварительной обработки из-за липкости, слизистости, переплетенных нитей.  |
| Цель предварительной обработки культуральной суспензии | Для ускорения фильтрации культуральной жидкости перед отделением мицеллия подвергают специальной обработке разными методами |
| Тепловая коагуляция | Наиболее простой и «жесткий» метод коагуляции. Используется для культуральных жидкостей содержащих метаболиты, не разрушающиеся при нагревании в водной среде (пенициллин,эритромицин). Культуральная жидкость нагревается до температуры 70-90 °С, выдерживается некоторое время и быстро охлаждается. |
| Недостатки тепловой коагуляции | Антибиотики термолабильны, поэтому происходит инактивация и снижение выхода целевого продукта. Приводит к усилению пигментации нативного раствора, что может отразится на качестве готового продукта. Возможно выделение дополнительных примесей из мицелия, что также ухудшает качество готового продукта |
| Кислотная коагуляция | Широко применяется при производстве антибитиков, сравнительно устойчивых при низком значении рН раствора (стрептомицин, тетрациклин рН1,1-1,3) |
| Недостатки кислотной коагуляции | При низких значениях рН происходит инактивация целевого продукта, снижающий выход.Возможность образования дополнительных примесей, затрудняющих процессы выделения и очистки, снижающие качество продукта |
| Внесение электролитов | 1.Обработка электролитами имеет ограниченное применение из-за коагуляции белковых коллоидных взвесей без дополнительных мероприятий. Используется для выделения ферментов и называется высаливанием.2.Применяют смесь двух электролитов, которые при взаимодействии в культуральной жидкости образуют осадок, повышающий плотность твердой фазы, предотвращающий слипание частиц мицеллия. Этот метод широко применяется в биопроизводстве.3. Обработка культуральной жидкости полиэлектролитами позволила увеличить возможности флокуляции культуральной жидкости антибиотиков с использованием разветвленных полиэлектролитов |
| Достоинства | Метод является мягким , продукт не инактивируется, увеличивается скорость фильтрации, депигментация нативного раствора повышает качество продукта |
| Недостатки | Нестабильность при хранении |

3. Понятие гель-электрофорез. Сущность метода. Основные этапы проведения гель-электрофореза и их характеристика(25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Определение и сущность метода | Гель-электрофорез – метод, используемый для разделения фрагментов ДНК, белков, основанный на способности заряженных частиц перемещаться в геле под действием постоянного электрического поля в соответствии с их размерами и молекулярными массами.Метод основан на физическом электрокинетическом явлении переноса частиц дисперсной фазы белковых или коллоидных растворов в среде под воздействием внешнего электрического поля. |
| Этапы проведения гель-электрофореза | 1) Приготовление геля.Приготовить агарозный или полиакриламидный. Поместить его в камеру для электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле практически не отличается от электрофореза в агарозном геле. Основные отличия – в технической реализации процесса. Агарозный гель обычно используют для горизонтального электрофореза, а ПААГ – для вертикального. Чаще используется ПААГ, т.к он имеет более мелкие поры, что позволяет разделить даже мелкие фрагменты ДНК (более эффективный электрофорез). Приготовление ПААГ несколько сложнее агарозного, кроме того, акриламид является токсичным веществом (воздействует на кожу и нервную систему), поэтому отвешивать и растворять его следует в перчатках и под тягой.2) Залить гель трис-боратным буфером, содержащим бромистый этидий.Полиакриламидный гель заливается между двумя вертикально расположенными стеклами, поддержку которых осуществляет специальная камера, имеющая в своем составе кюветы для буфера, герметичную крышку и электроды, находящиеся в буфере сверху и снизу. Электроды подключаются к источнику тока. Движение молекул ДНК происходит сверху вниз. После залития геля, сверху в него вставляют гребенку, для формирования лунок.3) Нанести по 5 мкл каждой пробы в отдельные лунки. Нанести в отдельную лунку маркер.4) Подключить камеру для электрофореза к источнику электрического питания.5) Через 30-70 минут после начала электрофореза достать гель из камеры.6) Визуализация.После разделения фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флуоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК. В качестве такого красителя обычно используют бромистыйэтидий. Максимум его спектра поглощения находится в области ультрафиолетовых лучей. |

4. Как известно, при использовании клеточной инженерии, при создании новых продуцентов широко применяют методику протопластирования (получения протопластов) как процесс конструкции гибридных структур.

В плане решения задачи получения новых продуцентов как источников новых ЛС предложите:

− схему получения протопластов и гибридных структур;

− конечные цели, достигаемые с помощью продуктов гибридной природы.(25б.)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Сущность метода клеточной инженерии | Клеточная инженерия-это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и участками и целыми хромасомами у эукариот независимо от степени эволюции.  |
| Этапы получения гибридных клеток с использованием техники протопластирования | 1. выбор биообъекта2.обработка клеточных стенок ферментами3.стабилизация протопластов (10 % гипертонический раствор маннита, Сахарозы, хлорида натрия)4.слияние протопластов в среде ПЭГ; для облегчения фузии клетки обрабатывают солями металлов. Ферментами или быстро меняют температуру, т.е.делают их компетентными, при слиянии получается протопласт с двумя наборами хромосом-диплоидный набор(рекомбинация ДНК05. регенерация (восстановление стенки протопласта) |
| Конечные цели | Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду. Чтобы отличить гибридную от негибридной клетки необходимо на 4 стадии включить еще один протопласт несущий маркер-это участок гена кодирующий образование какого либо фермента, который «заявляет « о себе при высеве на питательную среду.Например, маркер ß-лактамаза.Если в питательной среде находится бензилпенициллин то вырастут клетки содержащие ß-лактамазу а это клетки-гибриды. При протопластировании и слиянии протопластов может происходить явление амплификации(увеличения) количества генов. Если амплифицируется ген ответственный за синтез целевого продукта, то выход последнего (витамины,антибиотики) соответственно увеличиваются.  |