

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



2025г.

Тема № 8

Методы и маркёры

лекция

Тяпкина Оксана Викторовна

к.б.н., доцент кафедры
медицинской биологии и генетики
КГМУ

ПЛАН

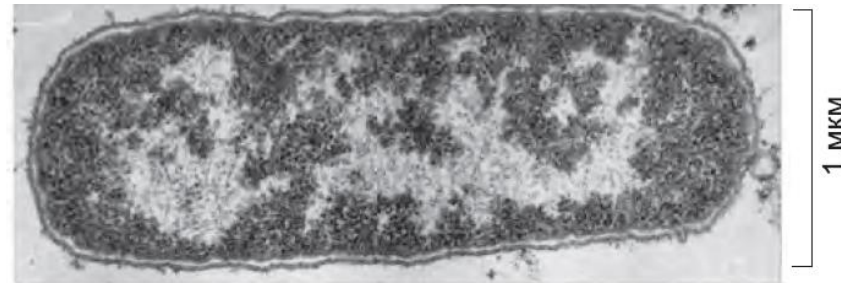
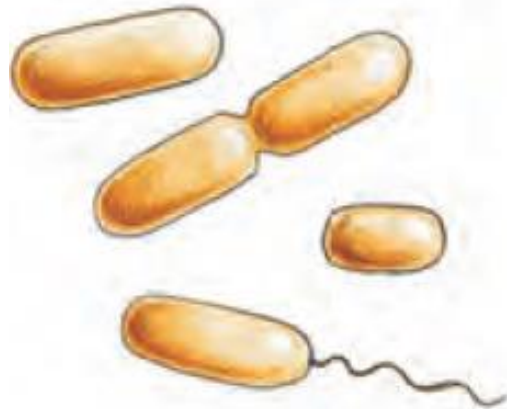
1. Методы исследований живых систем.
2. Возможности современных методов для выявления маркеров в диагностических и исследовательских целях.

1. Методы исследований живых систем.

Модельные организмы. Прокариоты

Escherichia coli или *E. coli*

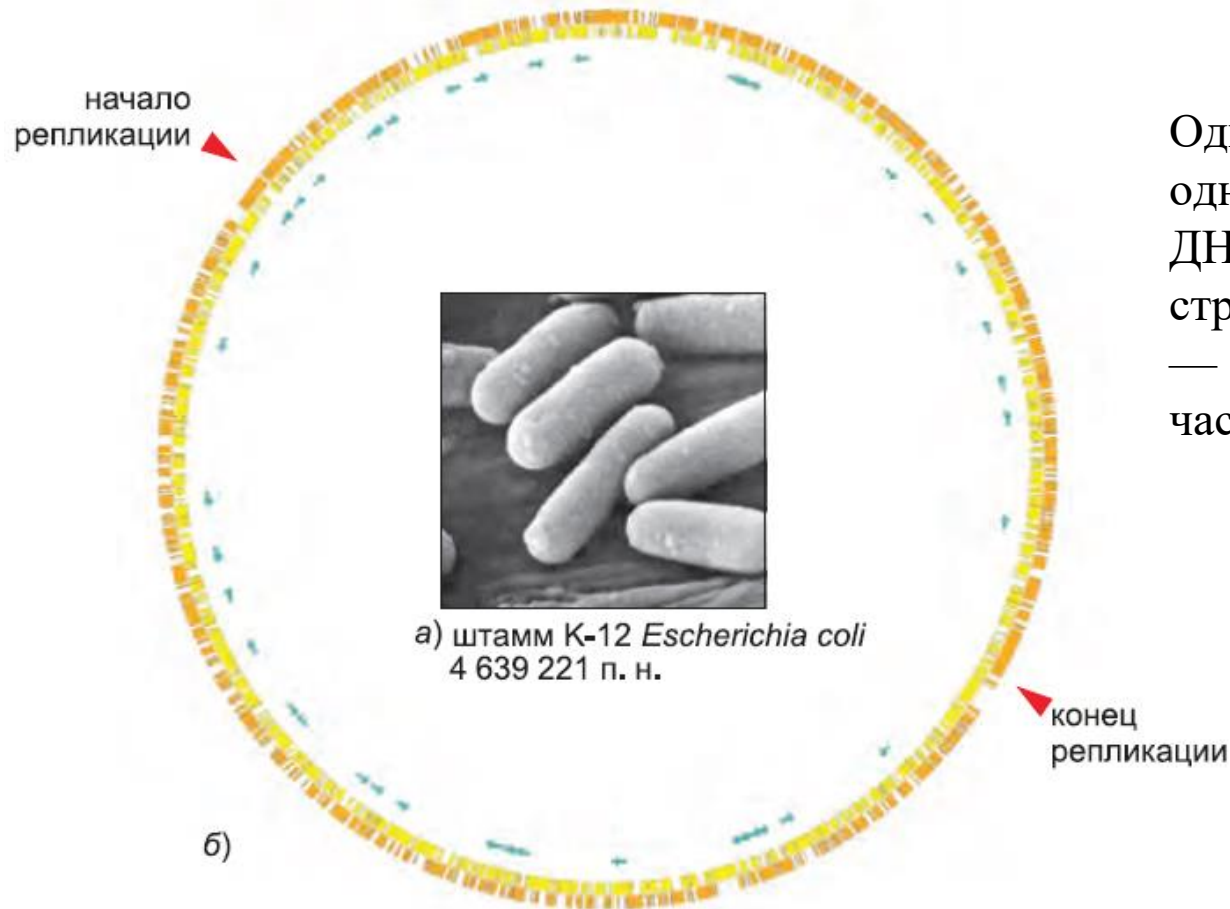
палочковидные
клетки
(*Escherichia coli*,
Vibrio cholerae)



б)

Структура бактерии. а) Внутренняя организация бактерии *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* имеет на одном конце завитой придаток — жгутик, вращающийся как пропеллер, продвигающий клетку вперед. б) Электронная микрофотография продольного среза бактерии *Escherichia coli*, похожей на *Vibrio cholerae*, но без жгутика. ДНК клетки концентрируется в окрашенной светлой области.

Стандартный искусственный штамм *E. coli* К-12 имеет геном приблизительно из 4,6 млн. п. н., содержащихся в единственной кольцевой молекуле ДНК, кодирующей приблизительно 4 300 различных видов белков.



Одни гены транскрибируются с одной цепи двойной спирали ДНК (в направлении часовой стрелки на этой схеме), другие — с другой нити (против часовой стрелки).

Геном *E. coli*. а) Скопление клеток. б) Схема генома штамма К-12 *E. coli*. ДНК образует единичную замкнутую петлю. Кодированные белком гены показаны желтыми или оранжевыми полосками в зависимости от нити ДНК, с которой они транскрибируются; гены, кодирующие только молекулы РНК, обозначены зелеными стрелками.

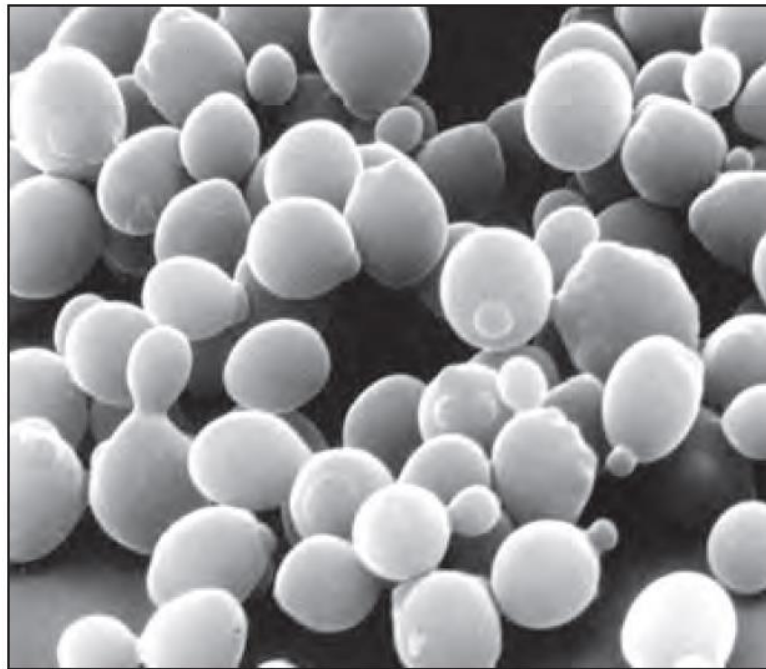
ВИД	ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ	СРЕДА ОБИТАНИЯ	РАЗМЕР ГЕНОМА (Т. П. Н. НА ГАПЛОИДНЫЙ ГЕНОМ)	ЧИСЛО ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ
Бактерии				
<i>Mycoplasma genitalium</i>	наименьший геном среди всех известных клеток	половые пути человека	580	468
<i>Synechocystis</i> sp.	фотосинтетический, вырабатывающий кислород (цианобактерия)	озера и ручьи	3 573	3 168
<i>Escherichia coli</i>	фаворит исследовательских лабораторий	кишечник человека	4 639	4 289
<i>Helicobacter pylori</i>	вызывает язвы желудка и предрасполагает к раку желудка	желудок человека	1 667	1 590
<i>Bacillus subtilis</i>	бактерия	почва	4 214	4 099
<i>Aquifex aeolicus</i>	литотроф; живет при высоких температурах	гидротермальные источники	1 551	1 544
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	вызывает туберкулез	ткани человека	4 447	4 402
<i>Treponema pallidum</i>	спирохета; вызывает сифилис	ткани человека	1 138	1 041
<i>Rickettsia prowazekii</i>	бактерия, наиболее близкородственная митохондриям; вызывает тиф	вошь и человек (внутриклеточный паразит)	1 111	834
<i>Thermotoga maritima</i>	органотроф; живет при высоких температурах	гидротермальные источники	1 860	877
Археи				
<i>Methanococcus jannaschii</i>	литотроф, анаэроб, вырабатывает метан	гидротермальные источники	1 664	1 750
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	литотроф или органотроф, анаэроб, восстанавливает сульфаты	гидротермальные источники	2 178	2 493
<i>Aeropyrum pernix</i>	аэроб, органотроф, горячие паровые гейзеры	прибрежные вулканы	669	2 620
Эукариоты				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (пекарские дрожжи)	минимальный модельный эукариот	кожица винограда, пиво	12 069	≈ 6 300
<i>Arabidopsis thaliana</i> (резушка Таля)	организм — модель цветковых растений	почва и воздух	≈ 142 000	≈ 26 000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (червь-нематода)	простое животное с точно предсказуемым развитием	почва	≈ 97 000	≈ 20 000
<i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая мушка)	ключ к генетике развития животных	гниющие фрукты	≈ 137 000	≈ 14 000
<i>Homo sapiens</i> (человек)	наиболее интенсивно изучаемое млекопитающее	дома	≈ 3 200 000	≈ 24 000

Некоторые полностью секвенированные геномы

Модельные организмы. Эукариоты

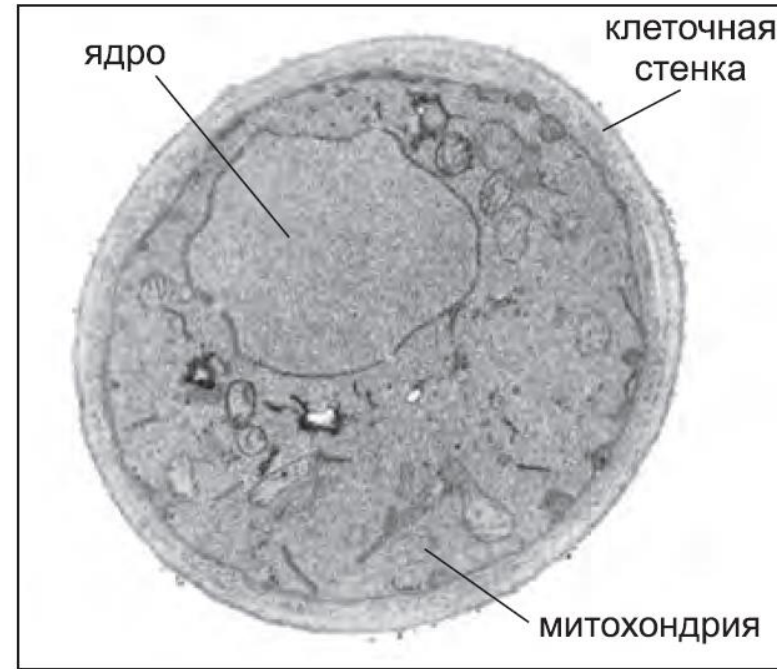
Дрожжи как минимальная модель эукариот

Дрожжи (пекарские) *Saccharomyces cerevisiae*



а)

10 мкм



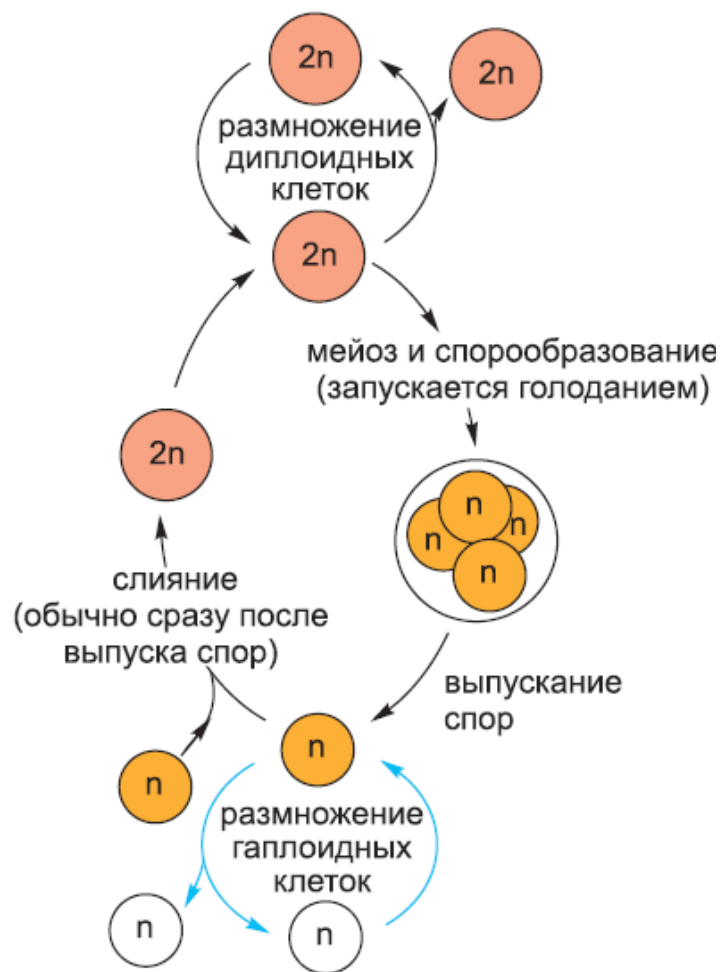
б)

2 мкм

а) Электронная микрофотография скопления клеток (почкующиеся клетки: размножаются, формируя выпячивание, или почку, которая увеличивается в размере и затем отделяется от материнской клетки).

б) Трансмиссионная электронная микрофотография поперечного разреза клетки дрожжей: ядро, митохондрия и толстая клеточная стенка.

Дрожжи (пекарские) *Saccharomyces cerevisiae*



ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Циклы воспроизводства дрожжей *S. cerevisiae*.

В зависимости от условий окружающей среды и от особенностей генотипа, клетки этого вида могут существовать или в диплоидном ($2n$) состоянии с двойным набором хромосом, или в гаплоидном (n) состоянии с одинарным набором хромосом. Диплоидная форма может размножаться обычными циклами деления клетки или предаться мейозу, с тем чтобы произвести гаплоидные клетки. Гаплоидная форма может или размножаться обычными циклами деления клетки, или претерпеть половое слияние с другой гаплоидной клеткой и стать диплоидной.

Мейоз вызывается голоданием и порождает споры — гаплоидные клетки в состоянии покоя, устойчивые к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Модельные организмы. Эукариоты

Из 300 000 видов растений в качестве модели выбран *Arabidopsis thaliana*



Маленький сорняк, обычной резушке Таля *Arabidopsis thaliana*, который можно выращивать в закрытом помещении в больших количествах и получать тысячи потомков от одного растения через каждые 8–10 недель. Геном арабидопсиса состоит приблизительно из 140 миллионов пар нуклеотидов, что примерно в 11 раз больше, чем у дрожжей, и его полная последовательность уже известна.

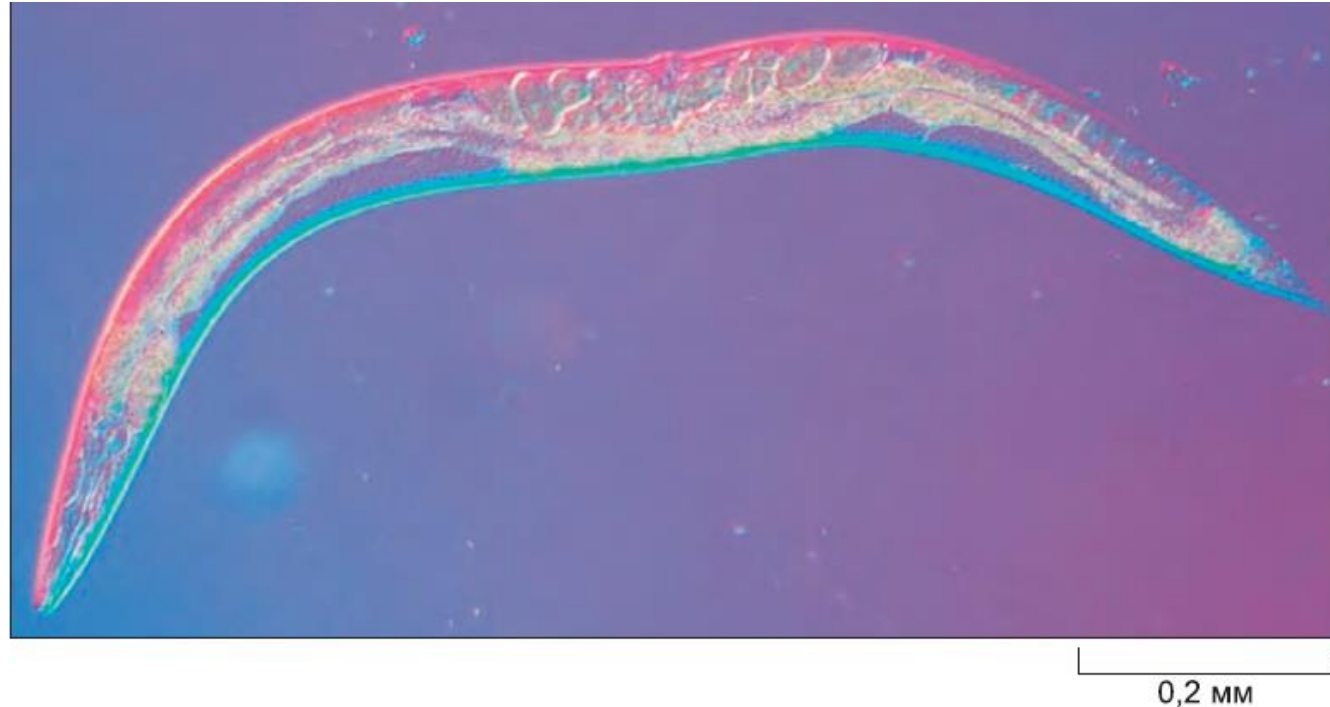
Arabidopsis thaliana — растение, выбранное в качестве основной модели для изучения молекулярной генетики растений.

В качестве главных модельных организмов для проведения молекулярных генетических исследований выбрано четыре вида.

В порядке увеличения размера их располагают в следующий ряд: круглый червь *Caenorhabditis elegans*, муха *Drosophila melanogaster*, мышь *Mus musculus* и человек *Homo sapiens*. Геномы всех этих видов уже секвенированы.

Модельные организмы. Эукариоты

Caenorhabditis elegans



Caenorhabditis elegans, первый многоклеточный организм, для которого полностью определена последовательность генома. Эта маленькая нематода, около 1 мм в длину, живет в почве. Большинство индивидов — гермафродиты, производящие и яйцеклетки, и сперматозоиды. Приведенное здесь изображение получено с использованием оптического метода интерференционного контраста, благодаря чему яркими цветами четко вырисованы границы тканей животного; при обычном освещении животное не окрашено.

Модельные организмы. Эукариоты

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster*



Drosophila melanogaster. Проведенные на этой мухе исследования дали главный ключ к пониманию того, как все животные развиваются из оплодотворенной яйцеклетки во взрослую особь.

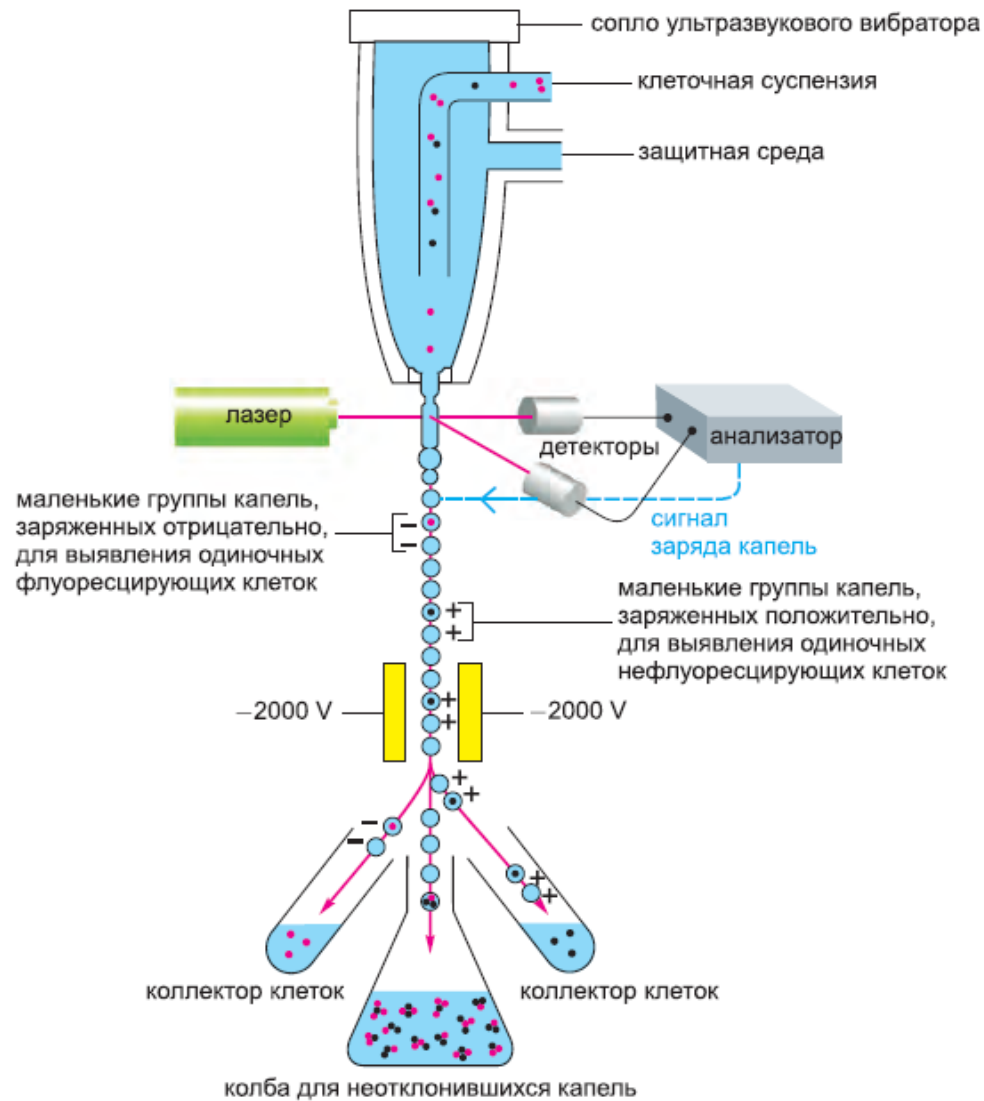
Модельные организмы. Эукариоты *Mus musculus* и человек *Homo sapiens*



ИЗУЧАТЬ КЛЕТКУ МОЖНО НА
РАЗНЫХ УРОВНЯХ

1. Клетки можно выделить из интактных тканей

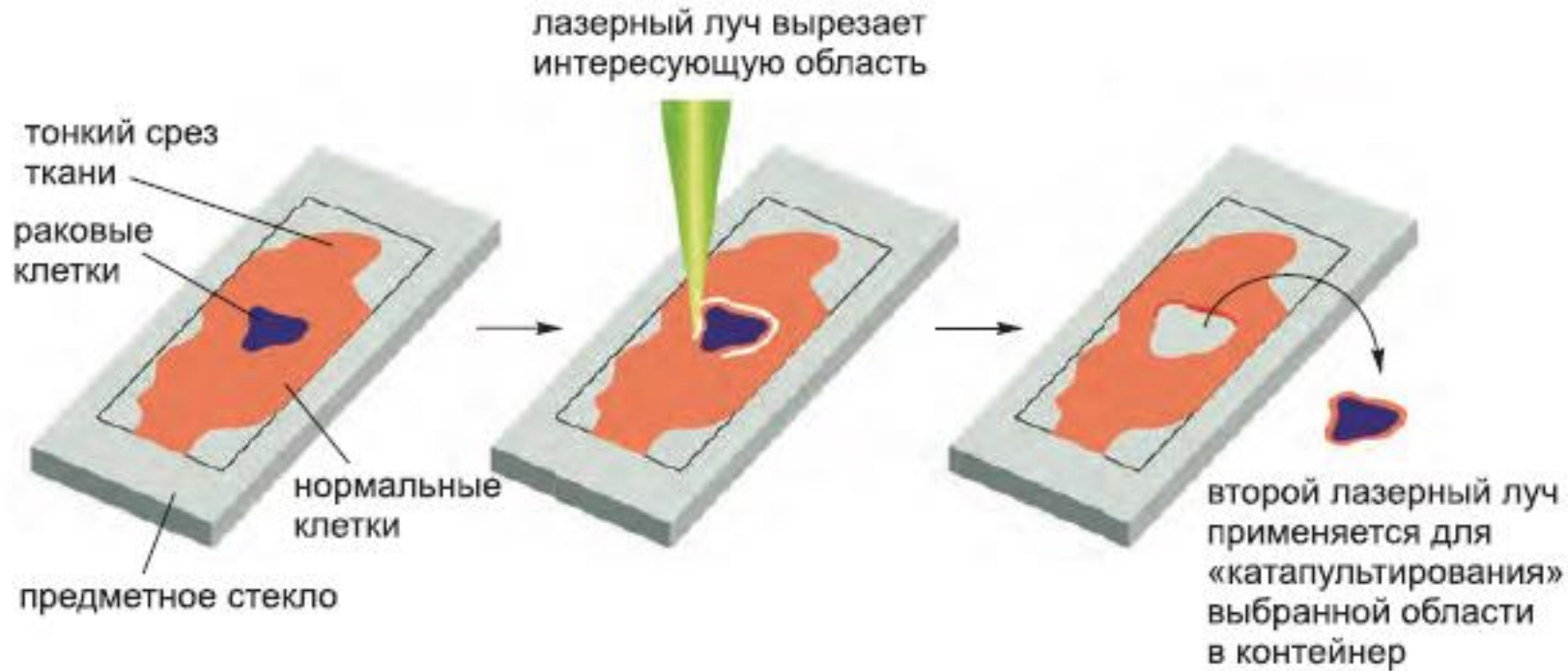
Меченые клетки отделяют от немеченых при помощи электронного *клеточного сортера с возбуждением флуоресценции*



Клеточный сортер с возбуждением флуоресценции. Изменяют флуоресценцию проходящей через лазерный луч клетки. Капельки, содержащие единственную клетку, заряжаются положительно или отрицательно в зависимости от того, обладает ли клетка флуоресценцией. Затем они в соответствии с зарядом направляются за счет электрического поля в пробирку для сбора образцов. Отметим, что необходимо подобрать концентрацию клеток таким образом, чтобы большинство капель не содержало клеток и уходило в контейнер для отходов вместе с любыми клеточными агрегатами.

1. Клетки можно выделить из интактных тканей

Лазерная захватывающая микродиссекция применяется для выделения и анализа клеток из различных областей опухоли, что позволяет сравнивать их свойства и молекулярный состав со свойствами соседних нормальных клеток.



Метод микродиссекции для выделения клеток из тканевых срезов. Лазерный луч использован для вырезания интересующего участка ткани и его выталкивания в контейнер. Этот подход позволяет выделить даже единичные клетки из образца ткани.

2. Выделение и выращивание клеток в культуре

Эксперименты с культурами клеток называют экспериментами *in vitro* (буквально — «в стекле»).

В экспериментах с интактными живыми организмами используют термин *in vivo* (буквально — «в живом организме»).

В биохимической лаборатории термин *in vitro* относится к экспериментам, проводимым в пробирке без живых клеток, тогда как *in vivo* относится к любой реакции, протекающей внутри живой клетки, даже если эта клетка растет в культуре.

2. Выделение и выращивание клеток в культуре

Культивирование тканей началось в 1907 г. с эксперимента, направленного на разрешение спора между нейробиологами, чтобы проверить гипотезу, носящую название «нейронной доктрины». Ее смысл заключается в том, что каждое нервное волокно представляет собой отросток единственной нервной клетки, а не результат слияния нескольких клеток. Чтобы проверить это утверждение, маленькие кусочки спинного мозга поместили в свернувшуюся тканевую жидкость и поставили в теплую влажную камеру. Через равные интервалы времени препарат наблюдали под микроскопом. Примерно через день отдельные нервные клетки начали выпускать в тромбы длинные тонкие волокна (аксоны). Таким образом, нейронная доктрина получила широкую поддержку и заложила фундамент для революции в молекулярной биологии, произошедшей в результате разработки метода культивирования клеток. В этих первых экспериментах на нервных волокнах использовали маленькие фрагменты тканей, называемые эксплантатами. Сейчас культуры чаще выращивают из суспензии клеток, выделенных из тканей при помощи различных методов.

Культуры, приготовленные напрямую из клеток организма, называют *первичными культурами*. На начальном этапе их можно фракционировать, то есть разделить по типам клеток, но так делают не всегда. В большинстве случаев, клетки первичной культуры можно извлекать из культуральной чашки и повторно выращивать, получая так называемые вторичные культуры; таким образом, их можно многократно пересевать (пассировать) в течение недель или месяцев. В клеточных культурах выращивают не только животные клетки. Когда фрагмент растительной ткани культивируют в стерильной среде, содержащей минеральные вещества и соответствующие регуляторы роста, многие клетки начинают неограниченно пролиферировать, образуя беспорядочную массу относительно недифференцированных клеток – каллус.

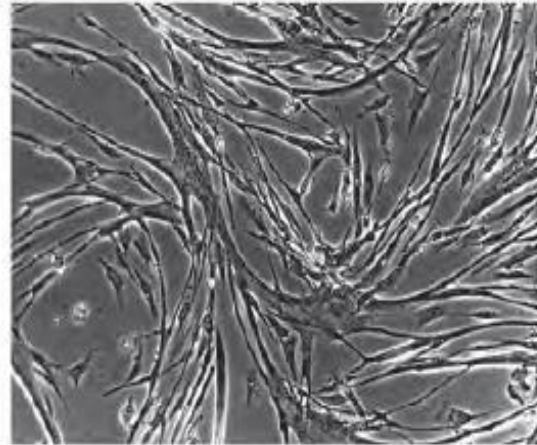
2. Клетки можно выращивать в культуре

Фибробласты
мышь



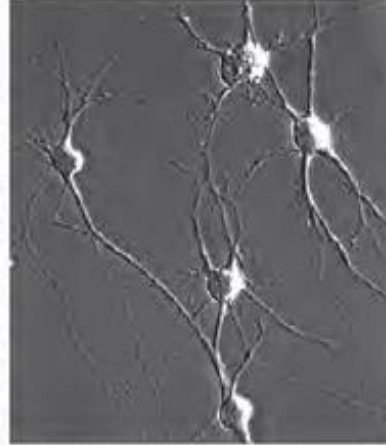
а) 20 мкм

Куриные
миобласты



б) 100 мкм

Очищенные нервные
клетки ганглия
сетчатки крысы



в) 50 мкм

Клетки табака
в жидкой культуре



г) 50 мкм

Микрофотографии клеточных культур. (а) Фибробласты мышь. (б) Куриные миобласты, сливающиеся с образованием многоядерных мышечных клеток. (в) Очищенные нервные клетки ганглия сетчатки крысы. (г) Клетки табака в жидкой культуре.

Некоторые часто используемые клеточные линии

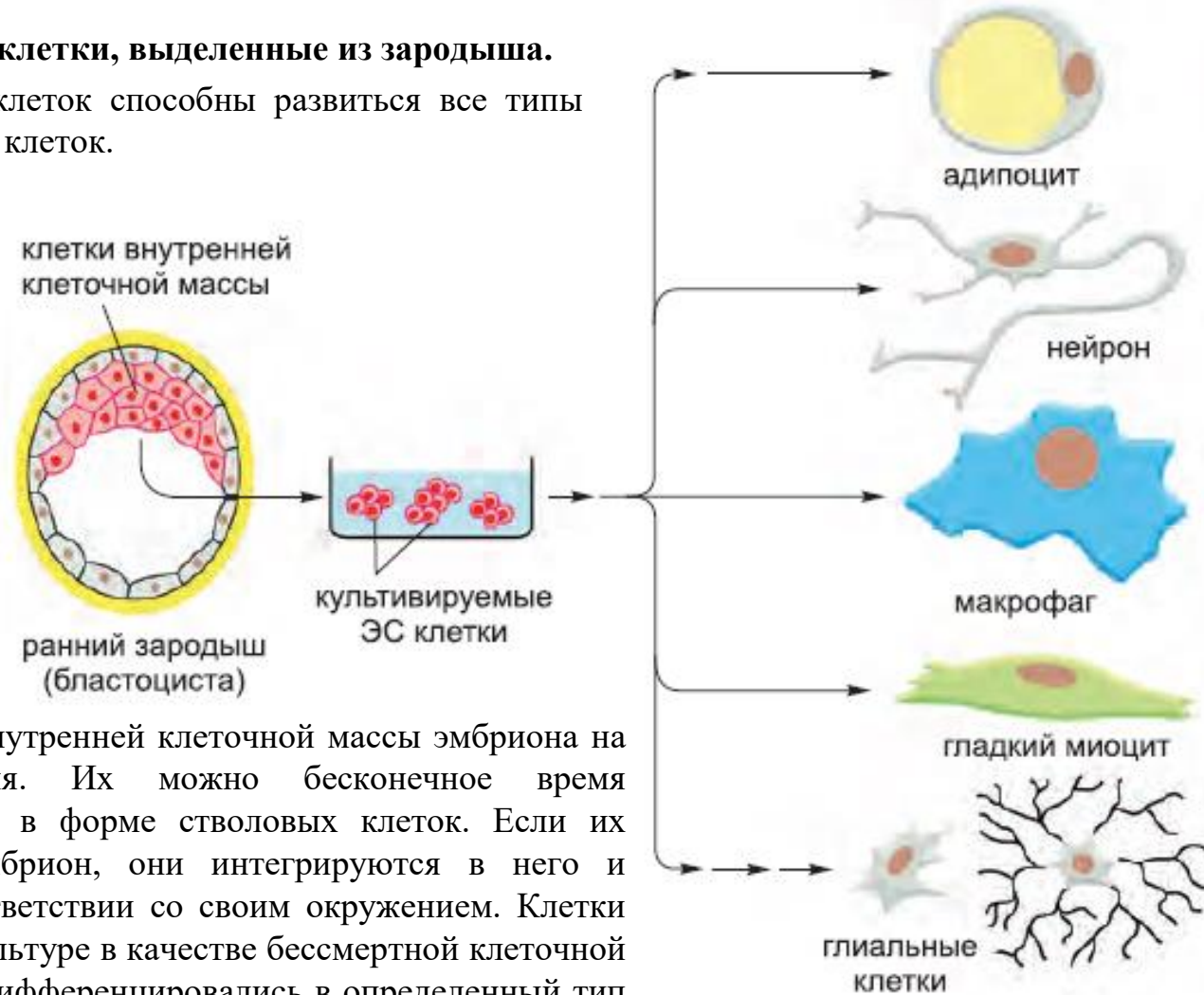
Клеточная линия*	Тип и происхождение клеток
3T3	Фибробласт (мышь)
BHK21	Фибробласт (сирийский хомячок)
MDCK	Эпителиальная клетка (собака)
HeLa	Эпителиальная клетка (человек)
PtK1	Эпителиальная клетка (кенгуровая крыса)
L6	Миобласт (крыса)
PC12	Хромаффинная клетка (крыса)
SP2	Плазматическая клетка (мышь)
COS	Почка (обезьяна)
293	Почка (человек); трансформирована аденовирусом
CHO	Яичник (китайский хомячок)
DT40	Клетка лимфомы для эффективной направленной рекомбинации (курица)
R1	Эмбриональная стволовая клетка (мышь)
E14.1	Эмбриональная стволовая клетка (мышь)
H1, H9	Эмбриональная стволовая клетка (человек)
S2	Макрофагоподобная клетка (<i>Drosophila</i>)
BY2	Недифференцированная клетка меристемы (табак)

Многие из этих клеток получены из опухолей. Все они способны к бесконечной репликации в культуре и обладают, по крайней мере, некоторыми из характерных свойств клеток, от которых они произошли.

3. Эмбриональные стволовые клетки (ЭС) способны совершить переворот в медицине

Эмбриональные стволовые клетки, выделенные из зародыша.

Из этих культивированных клеток способны развиться все типы присутствующих в организме клеток.



ЭС клетки выделяют из внутренней клеточной массы эмбриона на ранней стадии развития. Их можно бесконечное время поддерживать в культуре в форме стволовых клеток. Если их поместить обратно в эмбрион, они интегрируются в него и дифференцируются в соответствии со своим окружением. Клетки также можно держать в культуре в качестве бессмертной клеточной линии; затем, чтобы они дифференцировались в определенный тип клеток, их можно обработать различными гормонами или факторами роста.

3. Эмбриональные стволовые клетки (ЭС) Синтез антител

Антитела — очень полезный инструмент клеточной биологии.

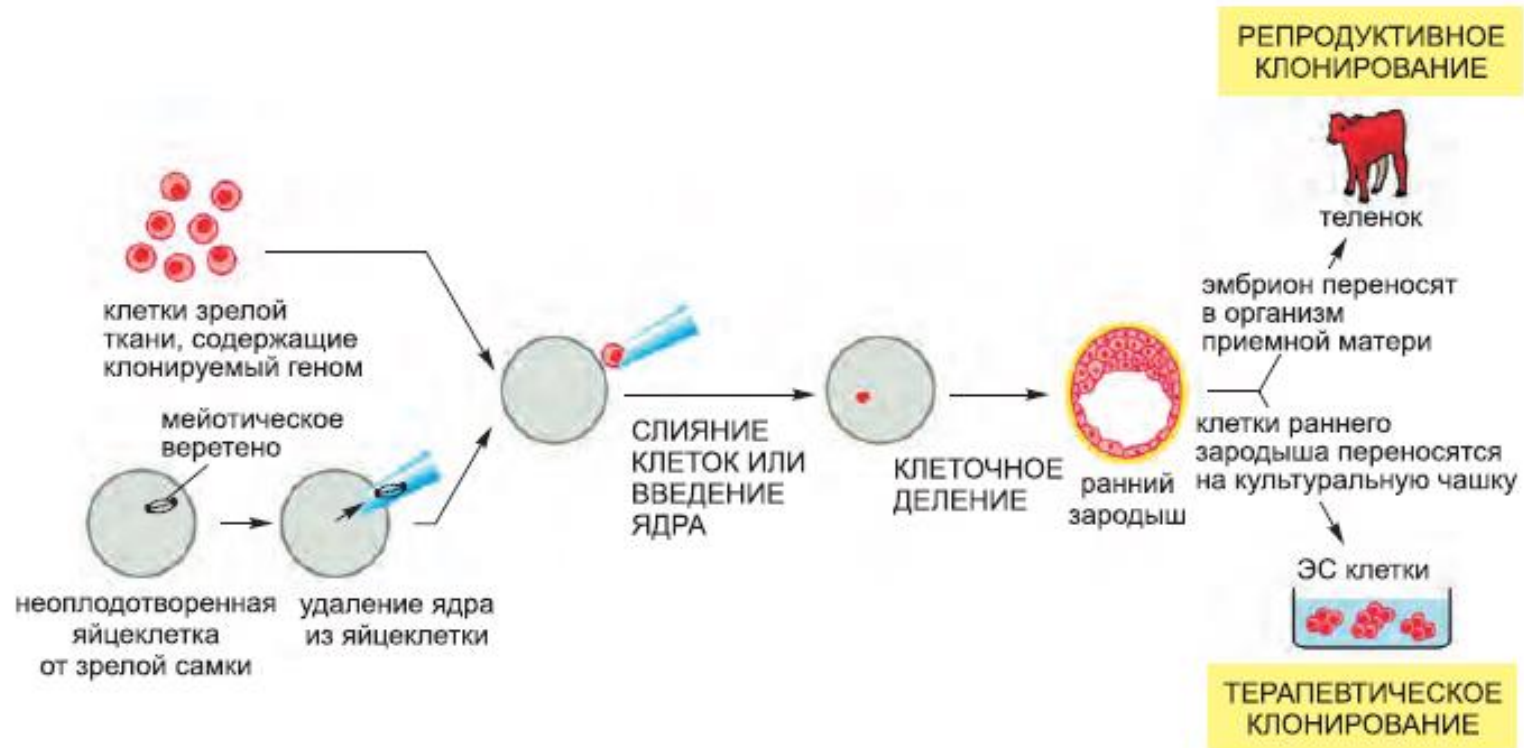
Антитела часто получают путем прививки животным интересующего белка и последующего выделения из сыворотки крови специфичных к этому белку антител. Однако в результате получается неоднородная смесь антител, распознающих разные антигенные сайты макромолекулы. Более того, одно привитое животное может дать ограниченное число антител, а у разных особей антитела будут отличаться. К тому же специфичные к нужному антигену антитела составляют лишь некоторую часть всех антител в сыворотке крови. Альтернативным подходом, позволяющим получить неограниченное число идентичных друг другу антител и значительно увеличить специфичность и применимость основанных на антителах методов, является синтез антител клеточными линиями гибридомы.



3. Эмбриональные стволовые клетки (ЭС)

Клеточные линии гибридомы как фабрики по производству моноклональных антител

Антитела — очень полезный инструмент клеточной биологии.

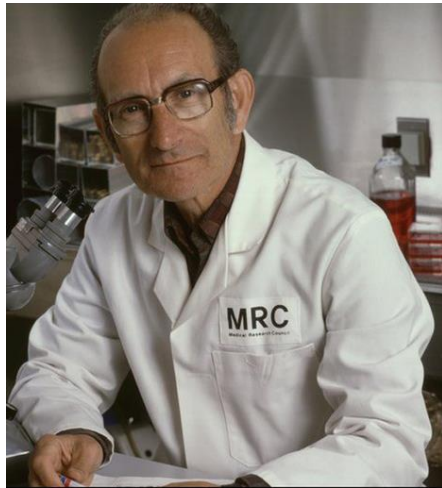


Репродуктивное и терапевтическое клонирование. Клетки взрослого организма можно использовать для репродуктивного клонирования или создания персональных ЭС клеток (так называемого терапевтического клонирования).

4. Приготовление гибридом, секретирующих моноклональные антитела против конкретного антигена

Альтернативным подходом, позволяющим получить неограниченное число идентичных друг другу антител и значительно увеличить специфичность и применимость основанных на антителах методов, является **синтез антител клеточными линиями гибридомы**. Эта технология, разработанная в 1975 г., совершила переворот в синтезе антител как для нужд клеточной биологии, так и для диагностики и лечения некоторых заболеваний, например, ревматического артрита и рака.

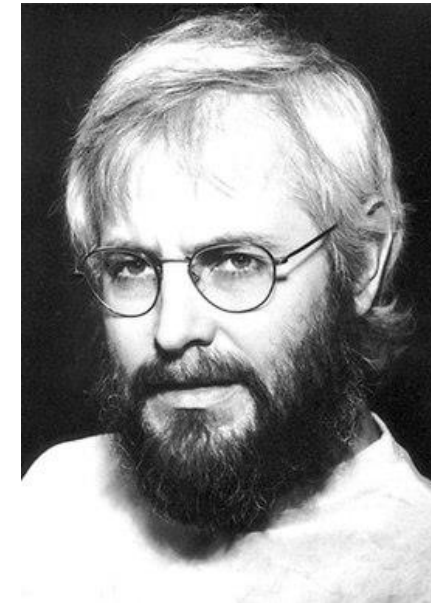
В 1984 г. за открытие принципа получения моноклональных антител Мильштейн, Кёлер и Эрне получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.



Сезар Мильштéйн
(8 октября 1927 — 24 марта 2002)
аргентинский и британский иммунолог

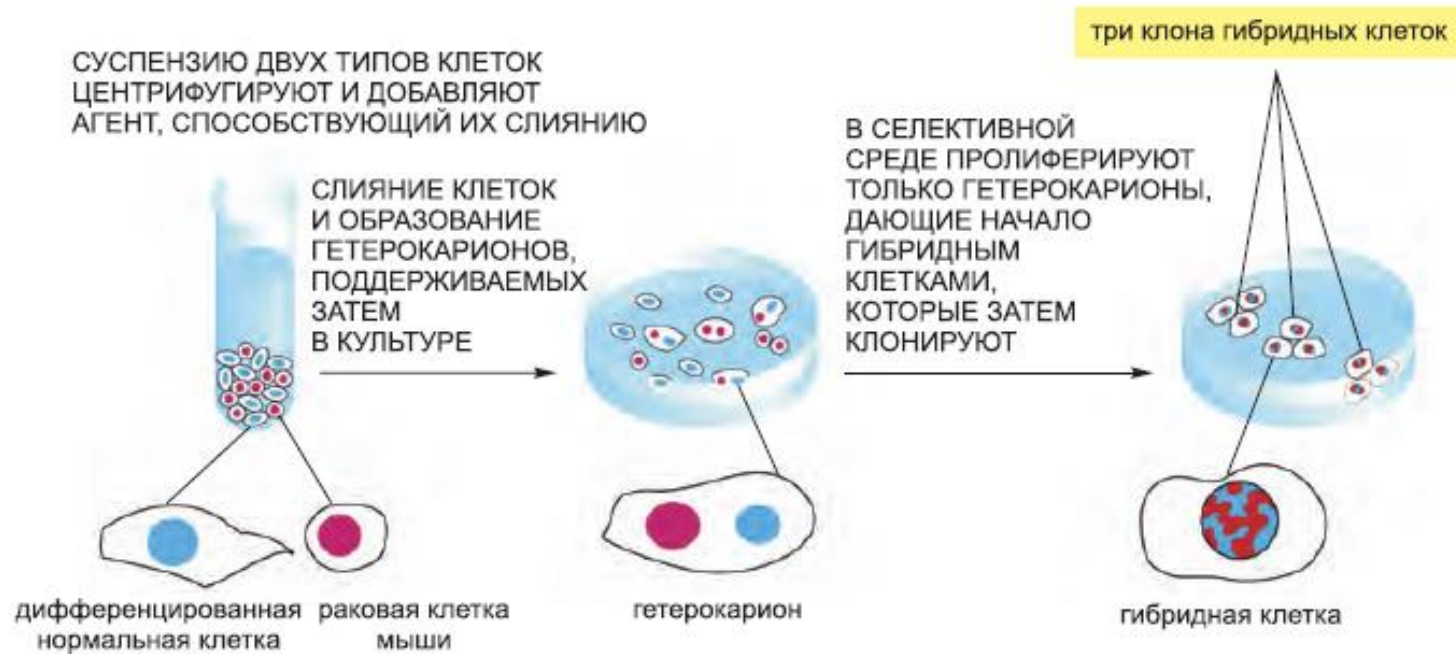


Нильс Кай Ёрне
(23 декабря 1911 — 7 октября 1994)
датский иммунолог



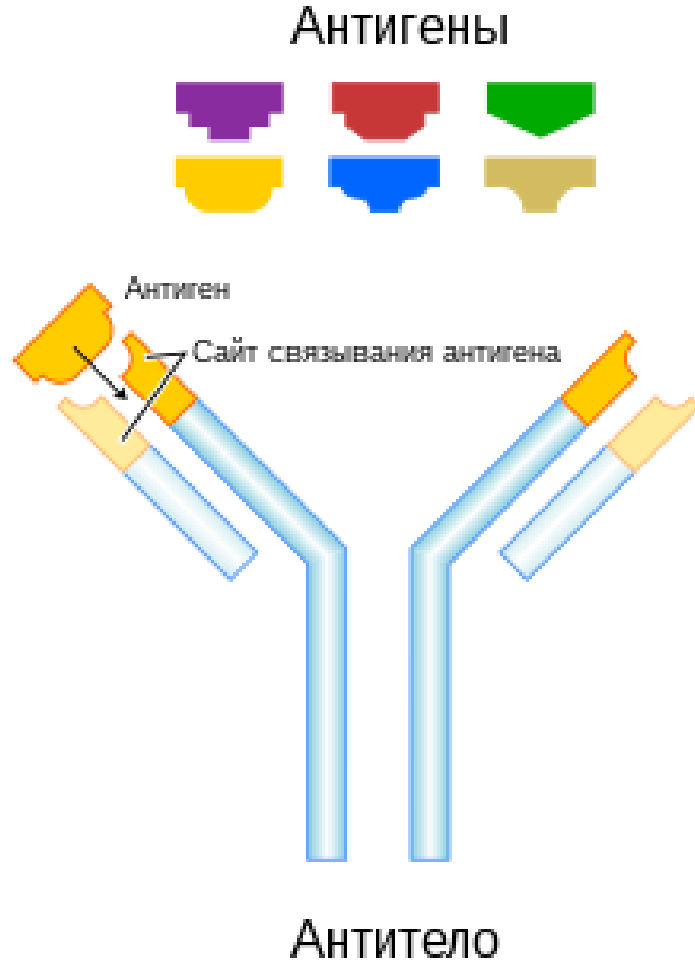
Георг (Жорж Жан Франц) Кёлер
(17 апреля 1946 — 1 марта 1995)
немецкий биолог и иммунолог
Вместе с Сезаром Мильштейном разработал
технику получения моноклональных антител

4. Получение клеточных гибридов

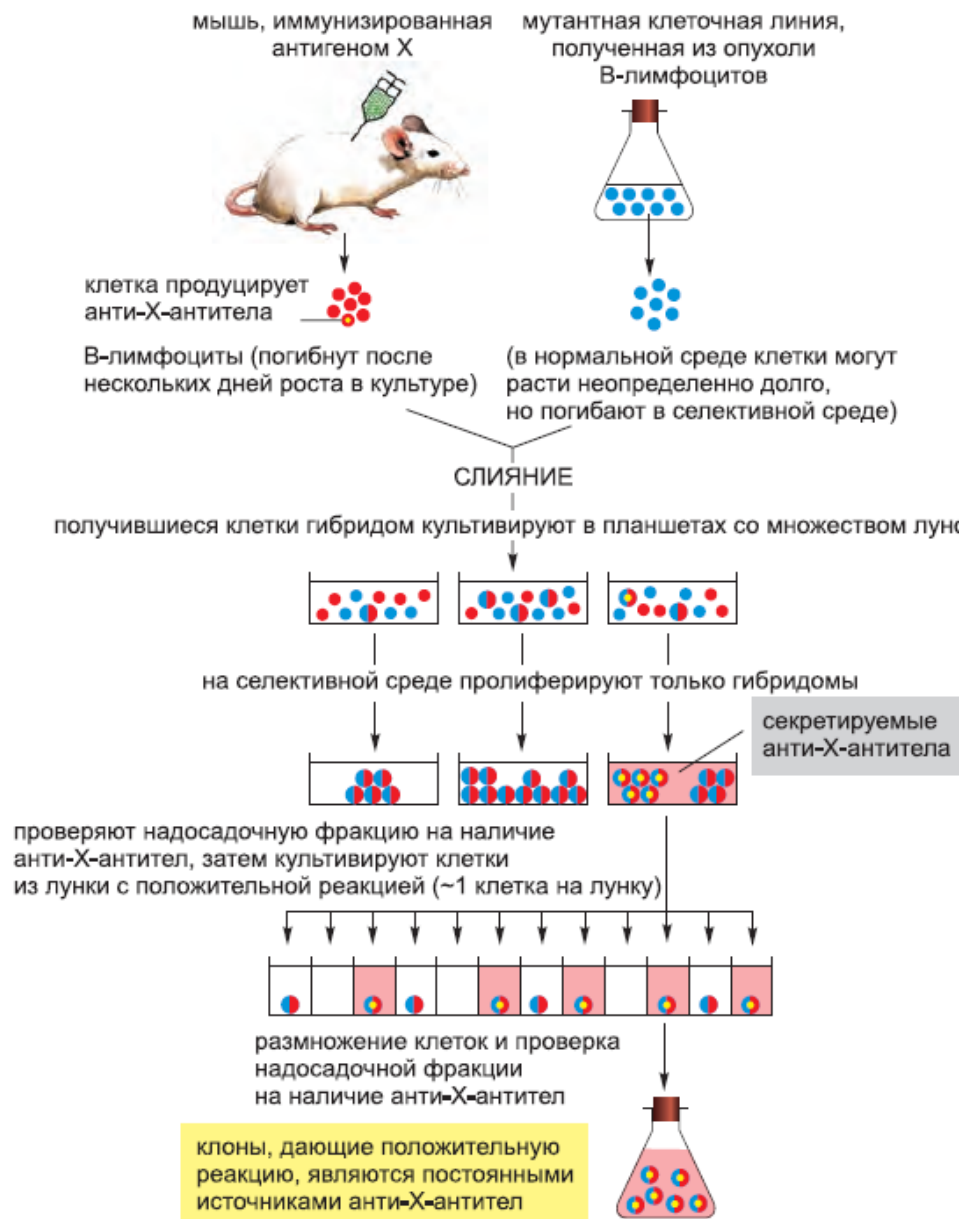


При слиянии двух клеток образуется **гетерокарион** — одна клетка с двумя ядрами.

Суспензию клеток обрабатывают определенными инактивированными вирусами или полиэтиленгликолем, которые способствуют слиянию клеток путем изменения структуры их плазматической мембраны. Затем, гетерокарион претерпевает митоз, и получается гибридная клетка, в которой оболочки двух ядер разрушаются, а хромосомы объединяются в одном большом ядре. Такие гибридные клетки дают начало бессмертным гибридным клеточным линиям. Если одна из родительских клеток произошла из опухолевой клеточной линии, то гибридную клетку называют гибридомой.



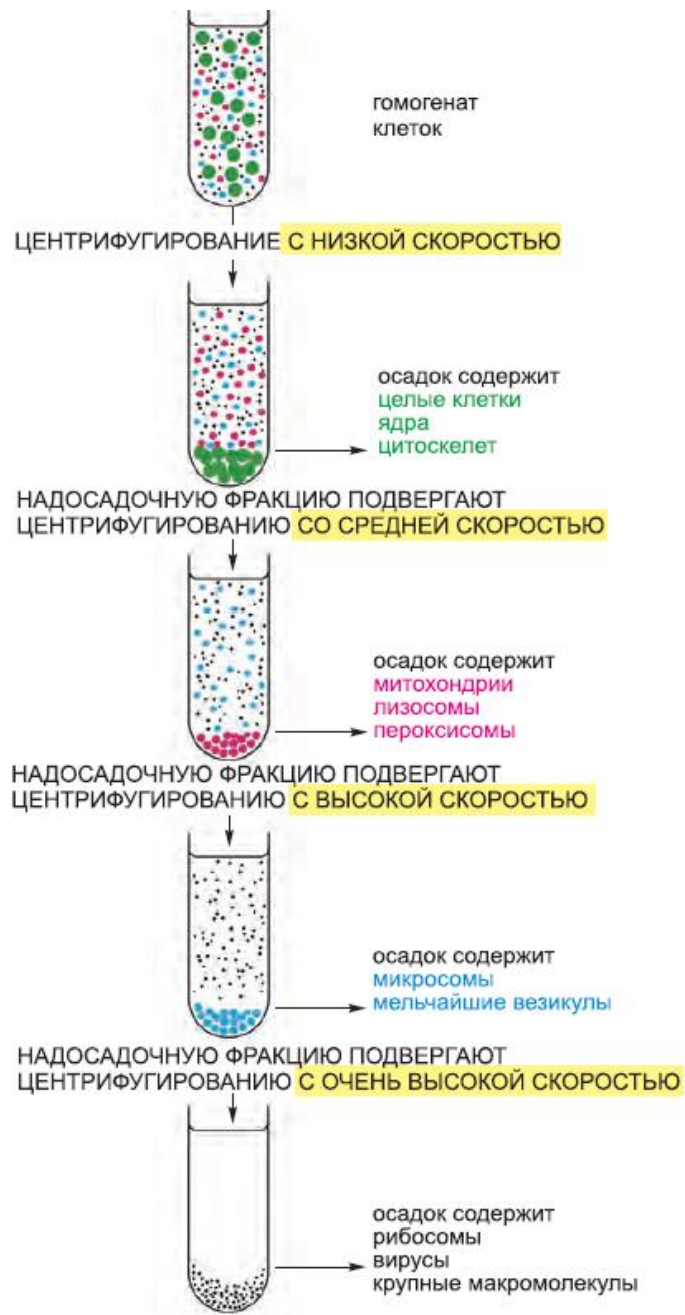
Гибридома — гибридная клеточная линия, полученная в результате слияния клеток двух видов: способных к образованию антител В-лимфоцитов, полученных из селезёнки иммунизированного животного (чаще всего мыши), и опухолевых клеток миеломы. Слияние клеток производится с помощью нарушающего мембраны агента, такого, как полиэтиленгликоль или вирус Сёндай. Поскольку раковые клетки миеломы «бессмертны», то есть способны делиться большое количество раз, после слияния и соответствующей селекции гибридома, производящая моноклональные антитела против антигена может поддерживаться долгое время.



4. Приготовление гибридом, секретирующих моноклональные антитела против конкретного антигена

Антиген обозначен как «антиген X». Селективная среда, используемая после этапа слияния клеток, содержит ингибитор (аминоптерин), блокирующий нормальные биосинтетические пути образования нуклеотидов. Таким образом, клеткам приходится использовать альтернативный путь синтеза нуклеиновых кислот. Этот путь у мутантных клеточных линий, выращенных из опухолевых В-лимфоцитов, нарушен, когда как у нормальных клеток, полученных из иммунизированных мышей, он работает. Поскольку ни один из использованных для исходного слияния клеточных типов не способен выжить и пролиферировать сам по себе, в культуре остаются только клетки гибридомы.

5. Фракционирование клеток при помощи центрифугирования



Многokратное центрифугирование с постоянным увеличением скорости позволяет разделить гомогенаты клеток на компоненты. В целом, чем меньше субклеточный компонент, тем большая центробежная сила необходима для его седиментации. Типичные значения для различных шагов седиментации:

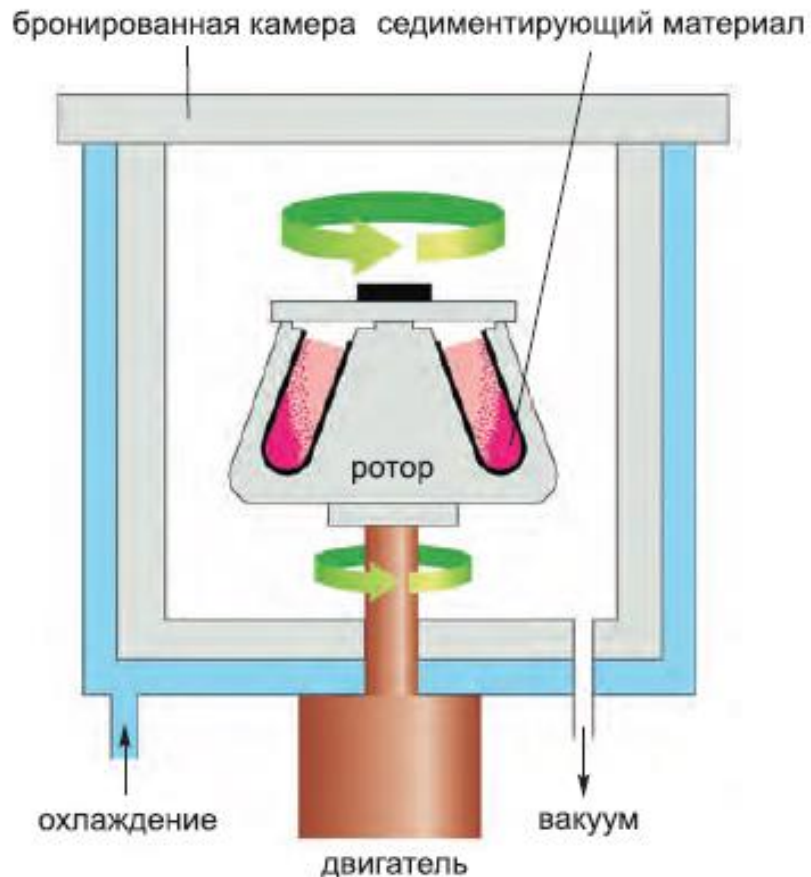
низкая скорость: 1 000 g, 10 минут

средняя скорость: 20 000 g, 20 минут

высокая скорость: 80 000 g, 1 час

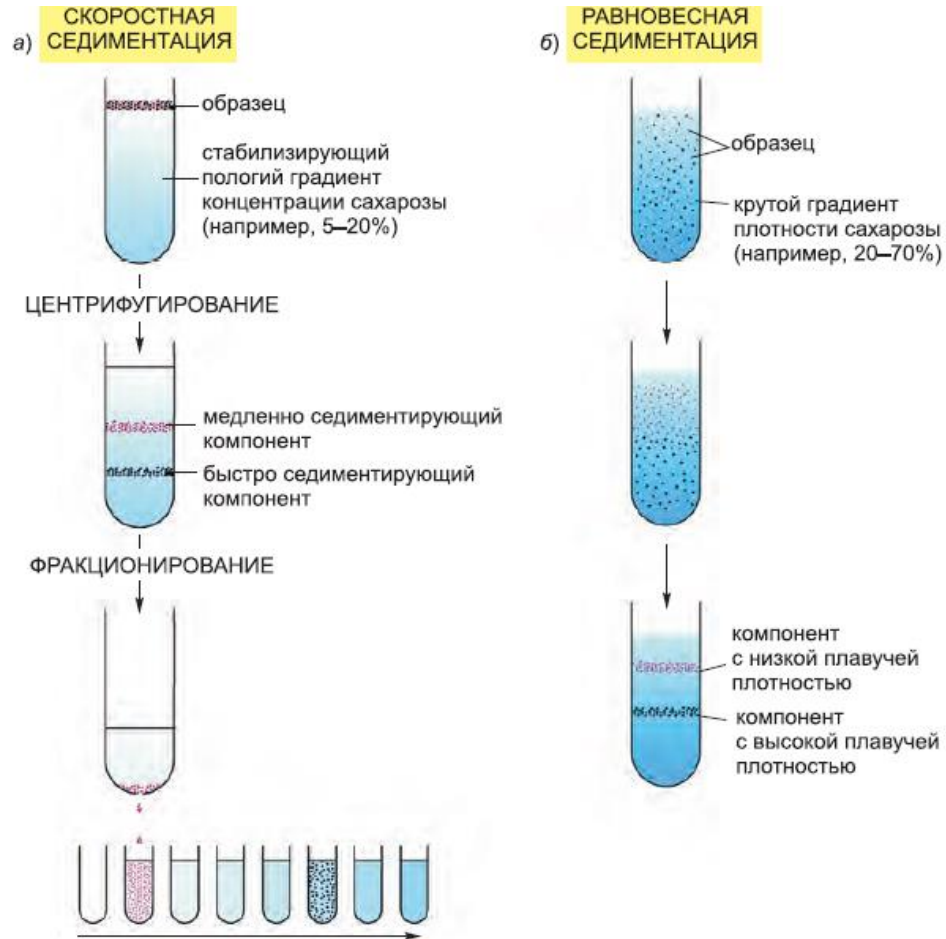
очень высокая скорость: 150 000 g, 3 часа.

5. Фракционирование клеток при помощи центрифугирования



Препаративная ультрацентрифуга. Проба находится в пробирке, которую помещают в цилиндрические отверстия в металлическом роторе. За счет быстрого вращения ротора создается огромная центробежная сила, заставляющая частицы в образце оседать. Вакуум уменьшает трение, препятствуя перегреву ротора и позволяя системе охлаждения поддерживать постоянную температуру образца 4°C .

5. Сравнение методов скоростной седиментации и седиментационного равновесия



(а) При скоростной седиментации субклеточные компоненты, нанесенные на содержащий сахарозу разбавленный

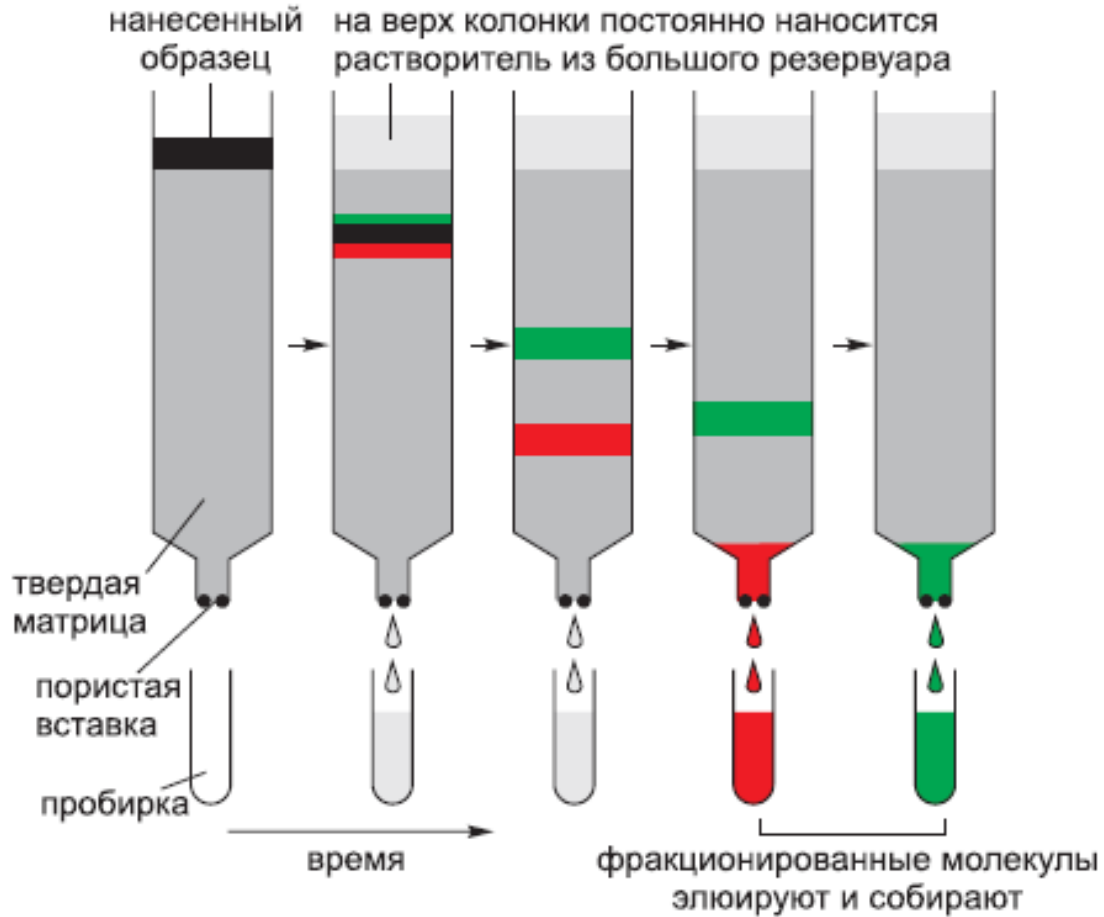
раствор, осаждаются с разной скоростью в зависимости от размера и формы. Чтобы избежать конвекционного смешивания различных полос, вызываемого небольшими различиями в температуре или концентрации раствора, в пробирке создают непрерывный слабый градиент сахарозы, концентрация которой возрастает в направлении дна пробирки (обычно от 5 до 20 % сахарозы). После центрифугирования разные компоненты можно выделить по одному путем прокалывания дна пластиковой центрифужной пробирки и сбора капель, как показано на рисунке.

(б) В методе седиментационного равновесия субклеточные компоненты движутся вверх или вниз при центрифугировании в градиенте до тех пор, пока они не достигнут положения, в котором их плотность будет совпадать с плотностью окружающего раствора.

Несмотря на то что здесь показан градиент сахарозы, для разделения белков или нуклеиновых кислот удобнее использовать более плотные градиенты, которые можно создавать при помощи хлорида цезия.

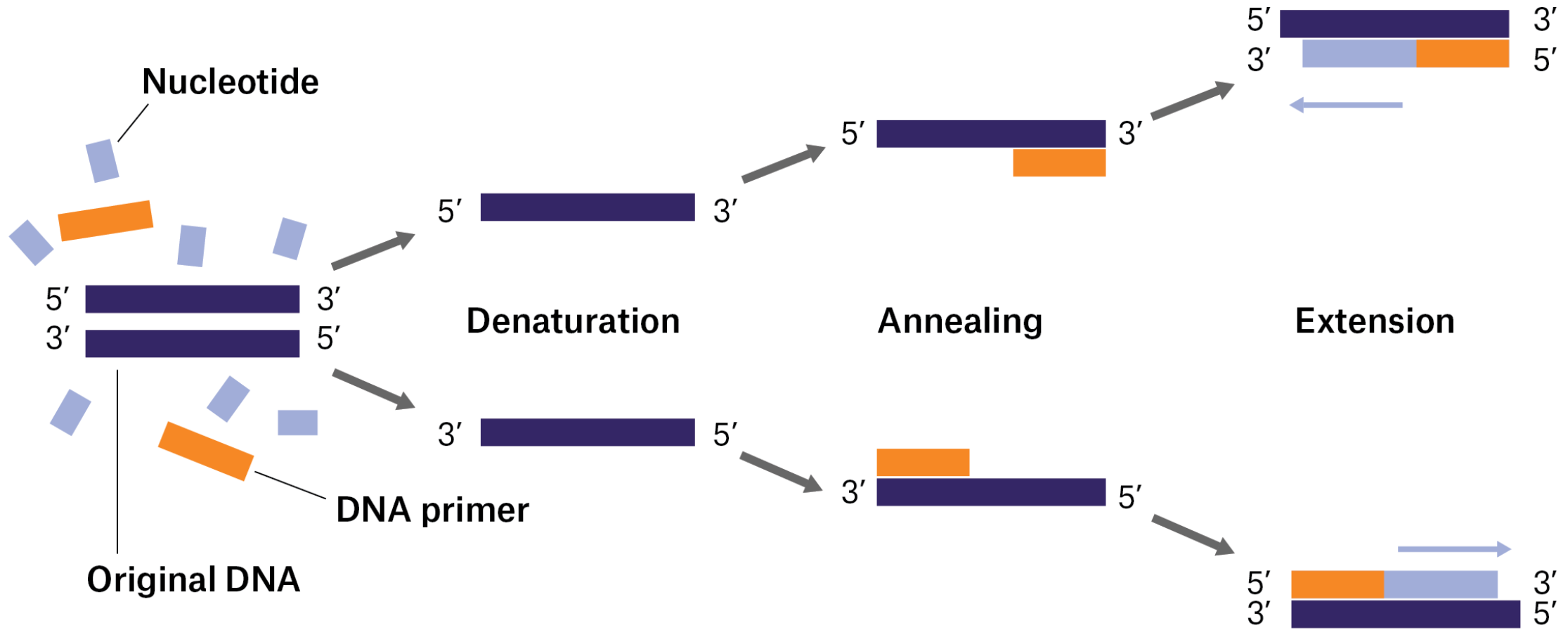
6. Разделение молекул методом колончатой хроматографии

КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

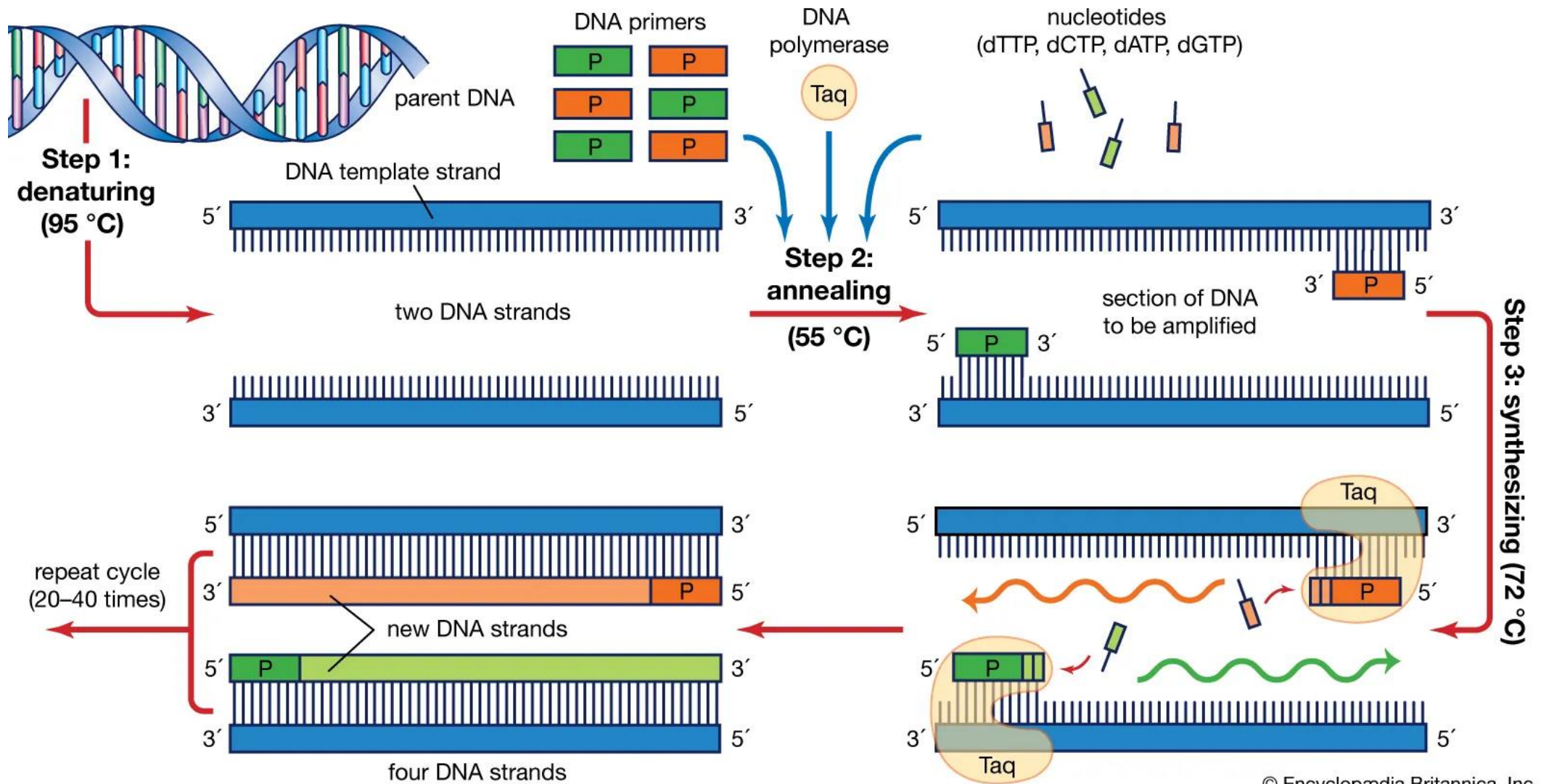


Образец — раствор, содержащий смесь различных молекул, — наносят на цилиндрическую стеклянную или пластиковую колонку, содержащую проницаемую твердую матрицу, например целлюлозу. Затем через колонку медленно прокачивают большой объем растворителя и собирают его в разные пробирки по мере выхода. Поскольку различные компоненты движутся по колонке с разными скоростями, они будут разделены по разным пробиркам.

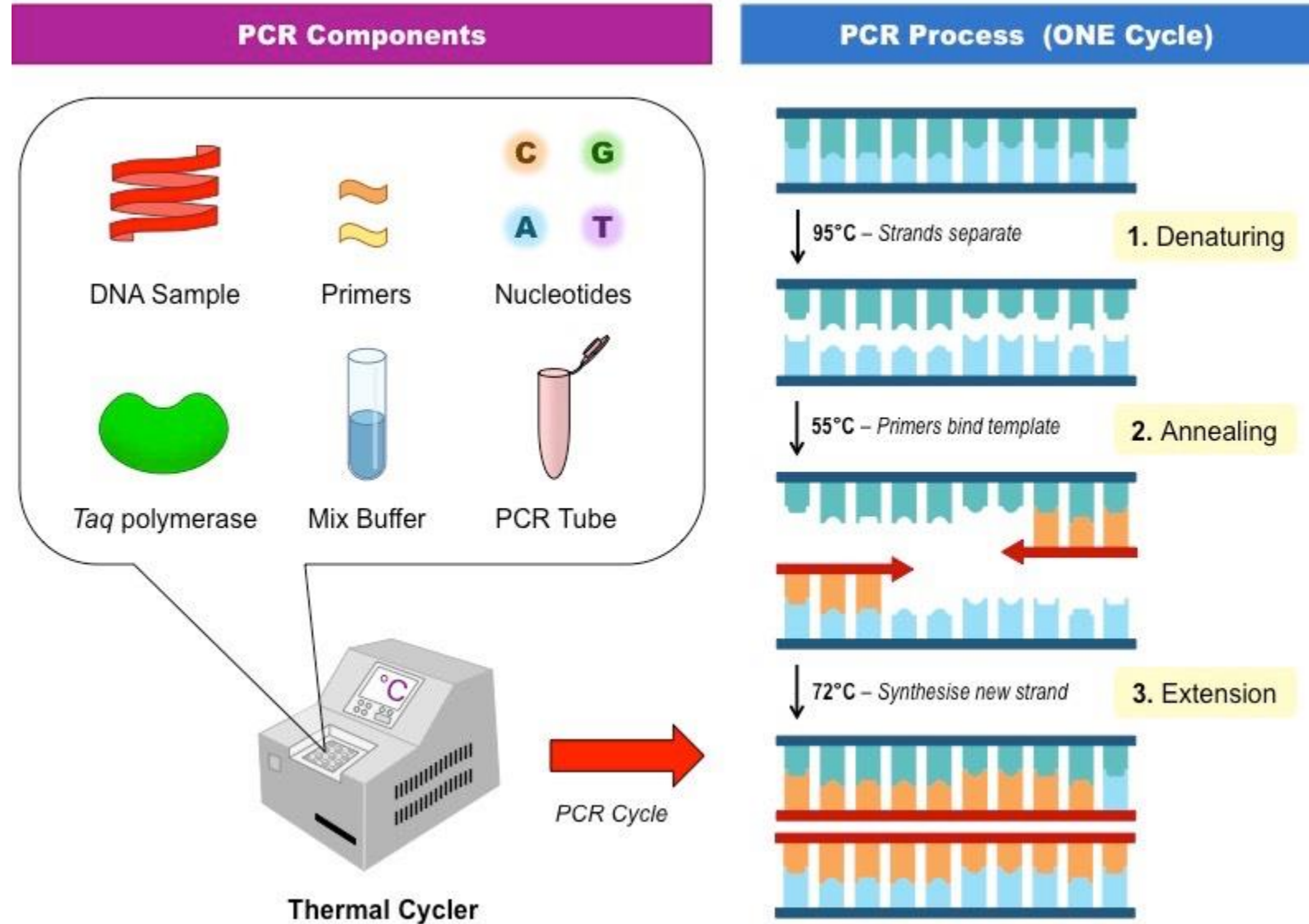
Полимеразная цепная реакция



Полимеразная цепная реакция



Полимеразная цепная реакция



Полимеразная цепная реакция

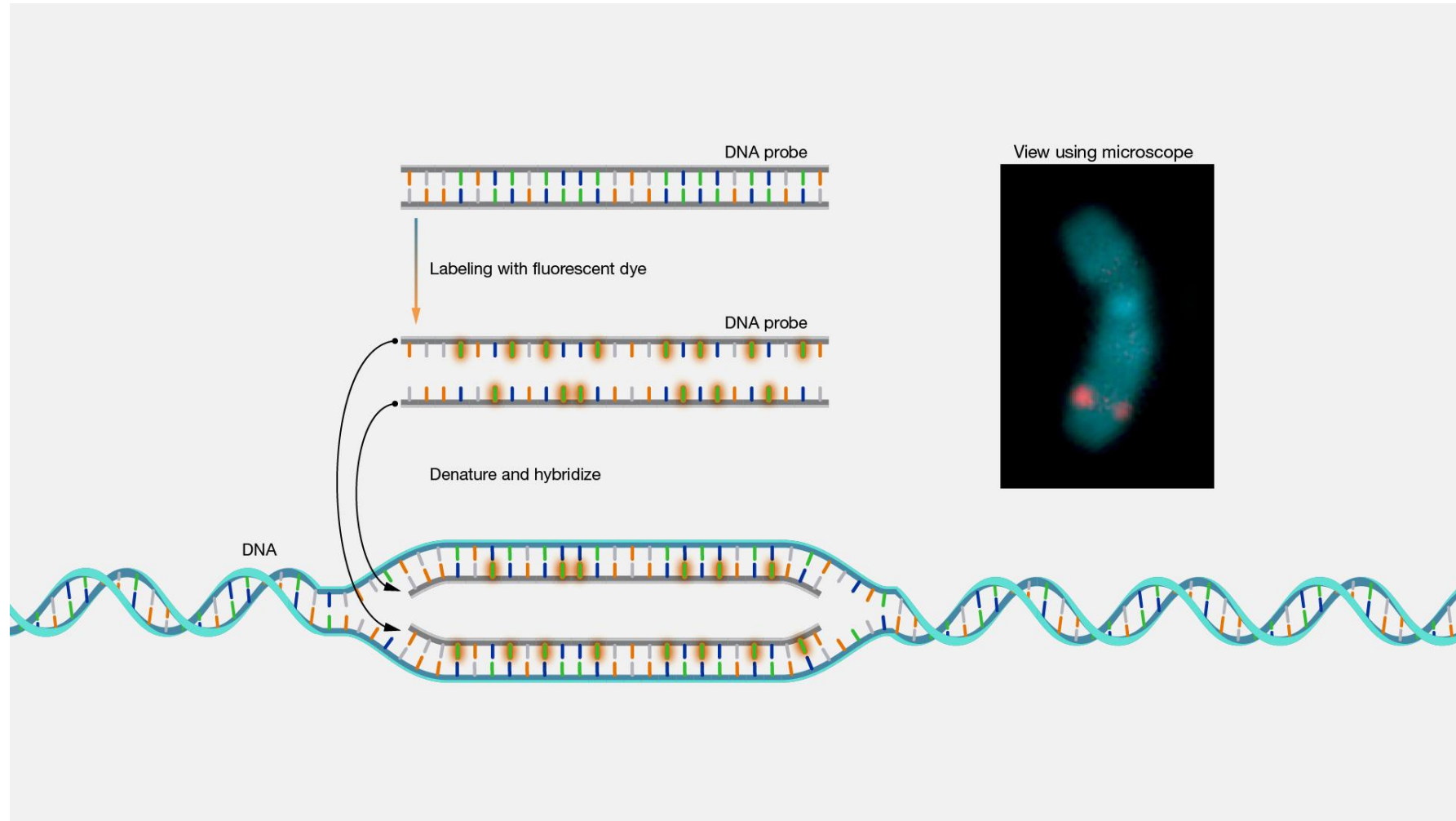
Применяемый метод	Возможности	Преимущества	Недостатки
Стандартный ПЦР	Выявление искомой последовательности или ее отсутствия	Минимальный набор реактивов и оборудования, минимальные финансовые затраты	Определение только после завершения процедуры (по конечной точке)
ПЦР в реальном времени (real-time PCR)	Выявление искомой последовательности или ее отсутствия одновременно в большом количестве образцов	Возможность получения количественного результата	Требуется специальное оборудование
Матричная технология (PCR array)	Одновременная оценка большого количества полученных ПЦР продуктов	Возможность получения количественного результата, оценка профиля экспрессии генов	Требуется достаточно сложное специальное оборудование
<u>Микрофлюидная чиповая технология (Microfluidic chip)</u>	Оперативное выявление искомой последовательности или ее отсутствия	Быстрое получение результата на месте без сложного лабораторного оборудования	Требуется достаточно дорогое и специализированное оборудование
Цифровой капельный ПЦР (<u>drop digital PCR</u>)	Выявление искомой последовательности с очень низкой <u>копийностью</u> с возможностью точного определения числа копий	Возможность получения абсолютного количественного результата	Требуется сложное и дорогое специальное оборудование

Полимеразная цепная реакция

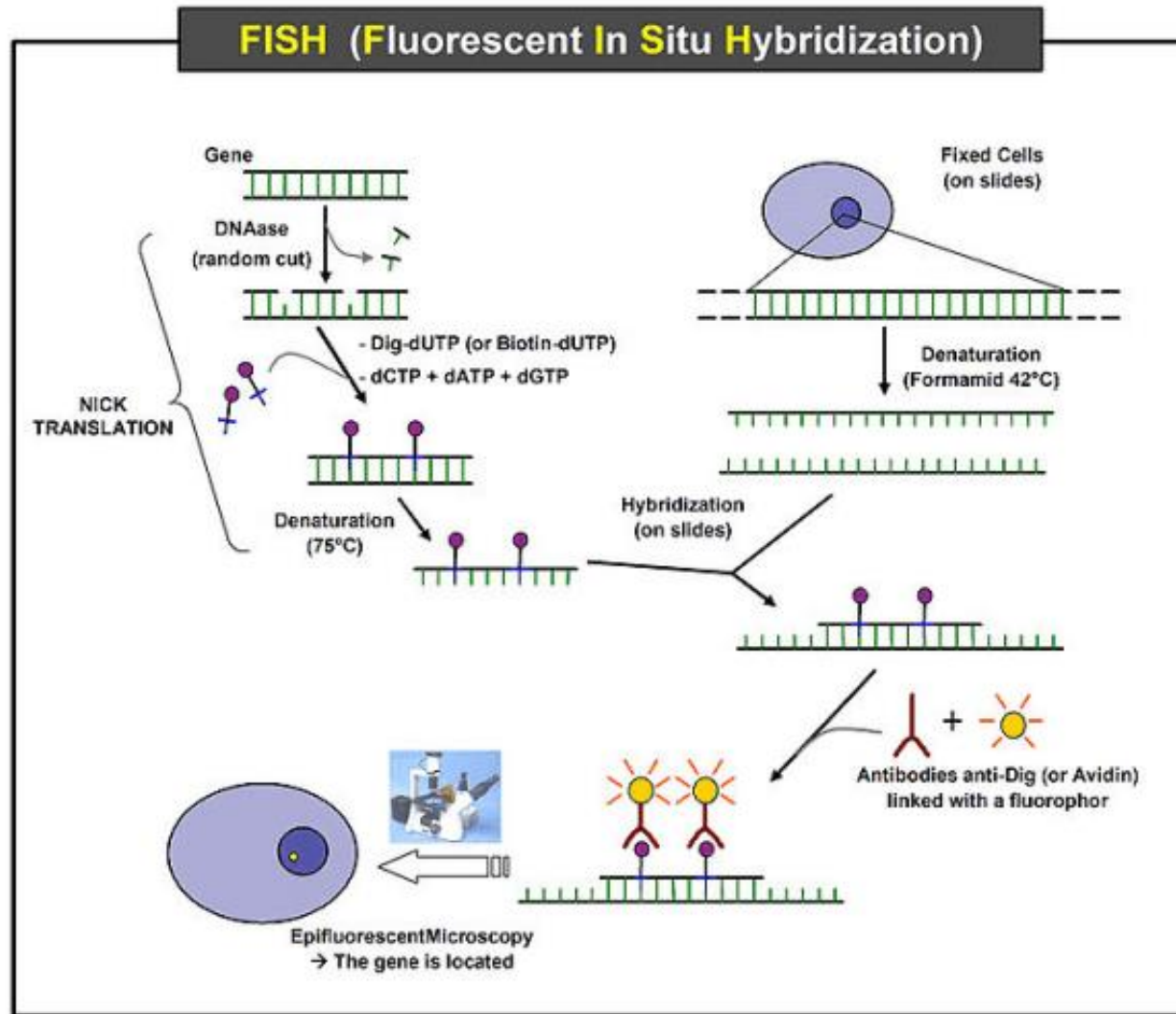
Чаще всего ПЦР-метод применяют для диагностики:

- ▶ ВИЧ;
- ▶ герпеса;
- ▶ различных половых инфекций, в частности хламидиоза, уреаплазмоза, гарднереллеза, микоплазмоза и трихомониоза;
- ▶ кандидоза;
- ▶ гепатитов;
- ▶ мононуклеоза;
- ▶ листериоза;
- ▶ цитомегаловируса;
- ▶ туберкулеза;
- ▶ вируса папилломы человека;
- ▶ клещевого энцефалита.

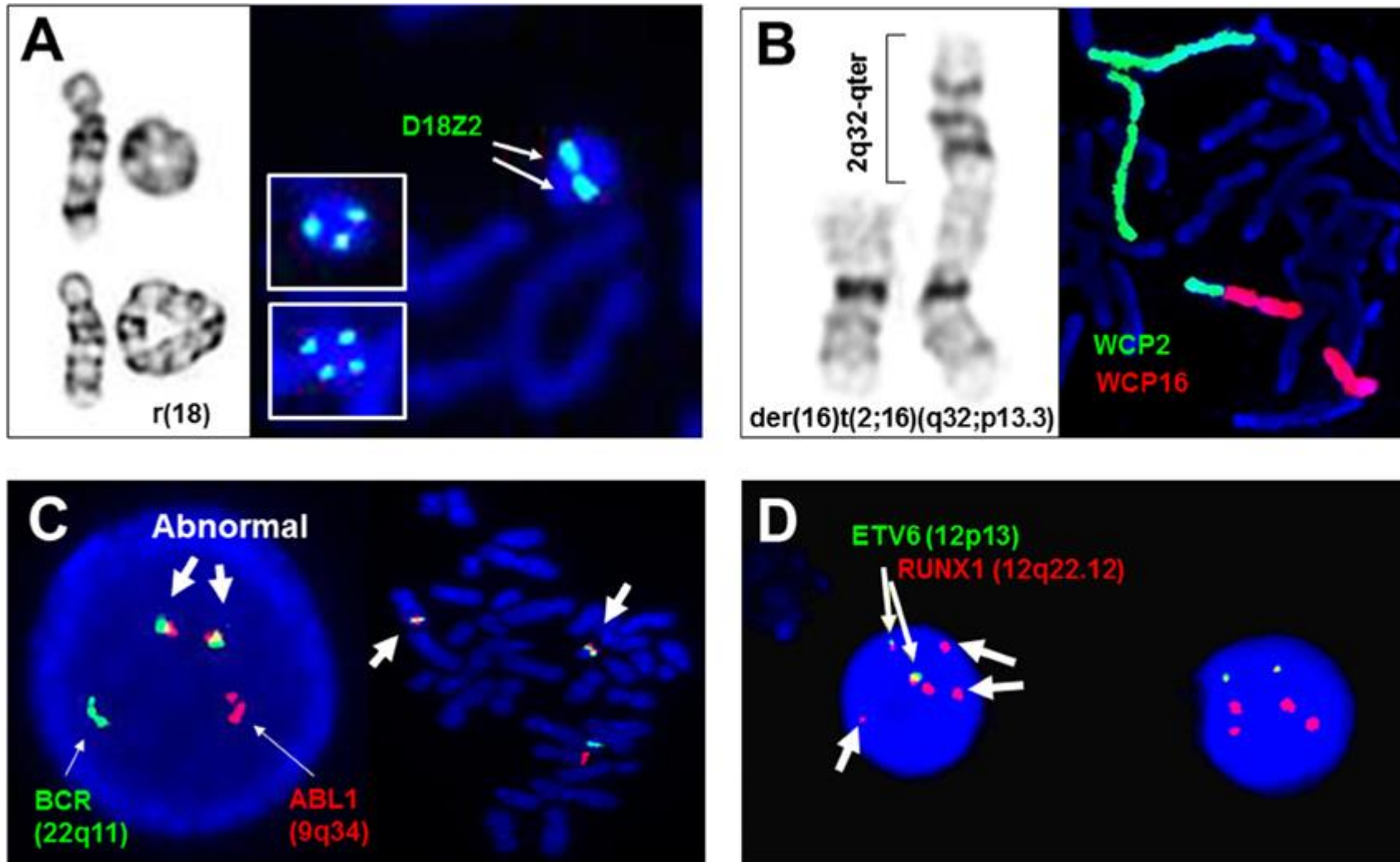
Флуоресцентная гибридизация in situ



Флуоресцентная гибридизация in situ



Флуоресцентная гибридизация in situ



Флуоресцентная гибридизация in situ

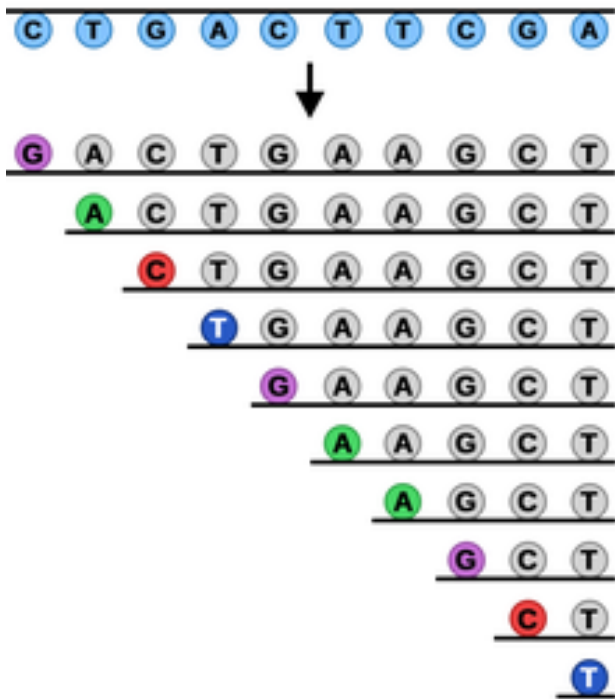


Секвенирование ДНК

Fluorescently labeled ddNTPs



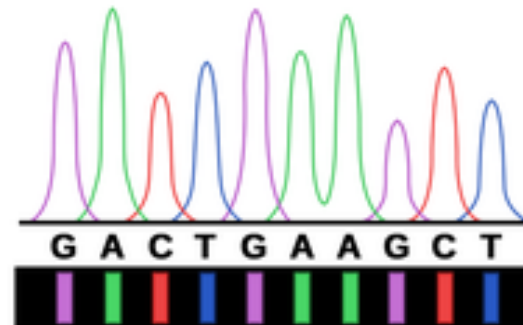
↓ DNA template



Separate with a gel



Use a sequencing machine



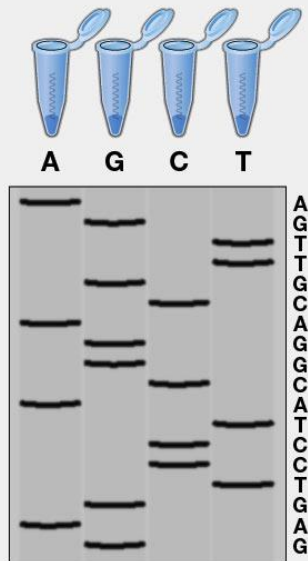
Секвенирование ДНК

DNA sequencing by synthesis

Polymerase-based DNA sequencing

Sanger DNA sequencing

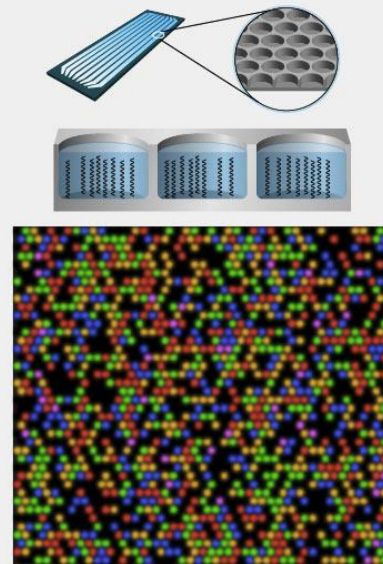
Sequence 500 - 700 DNA bases per reaction
16 reactions per gel



Sequence 10,000 DNA bases per gel

Massively parallel DNA sequencing

Sequence 100 - 5,000 DNA bases per reaction
10 thousand to 10 billion reactions per slide

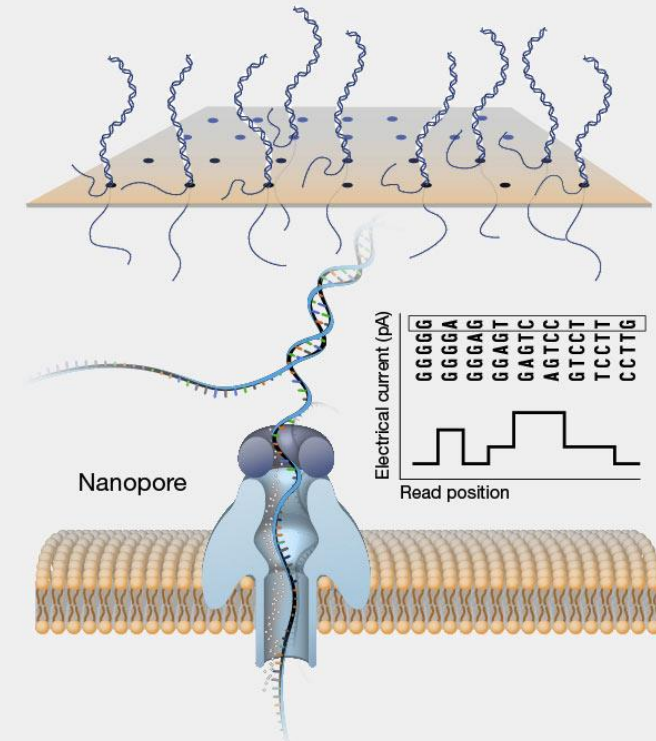


Sequence 2 trillion DNA bases per slide

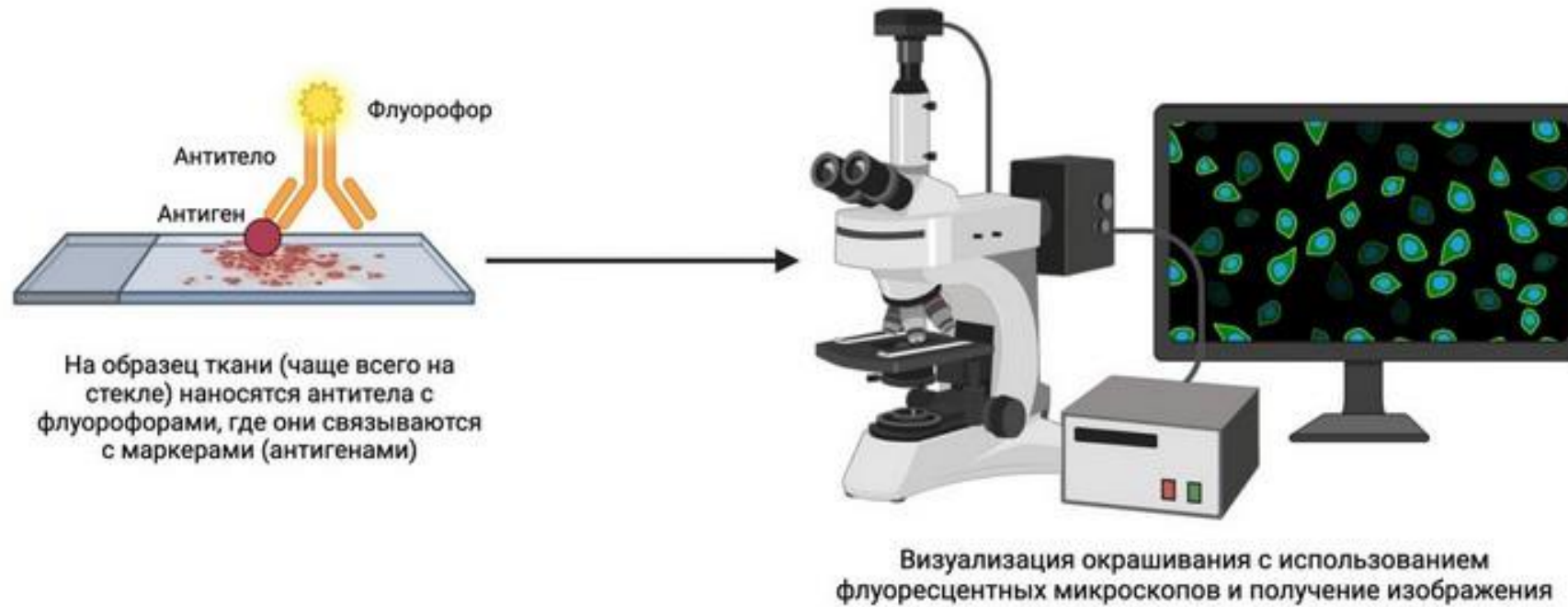
Single molecule DNA sequencing

Nanopore DNA sequencing

Sequence 10 thousand to 4 million DNA bases per pore
40,000 - 250,000 pores per device



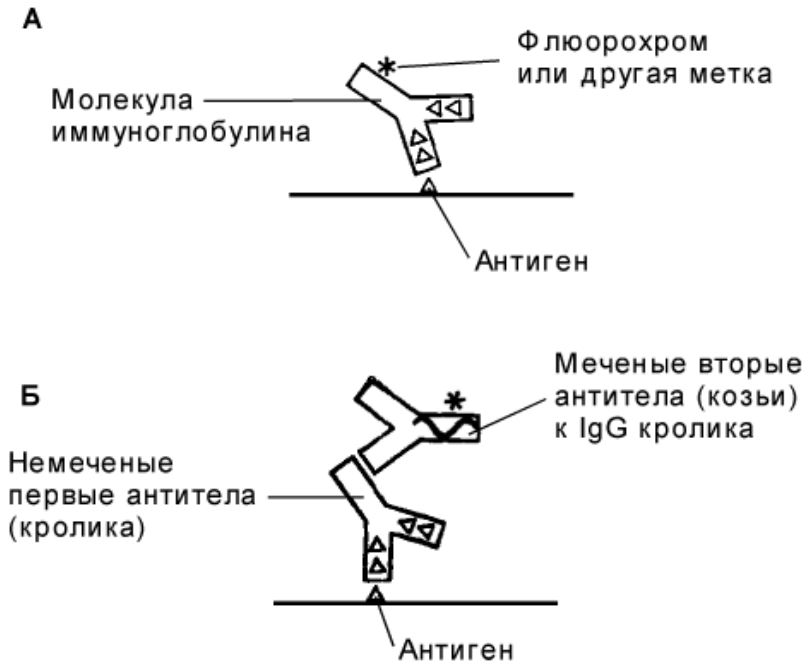
Sequence upwards of 200 billion DNA bases per device



Схематичное изображение метода иммунофлуоресценции

2. Возможности современных методов для выявления маркеров в диагностических и исследовательских целях.

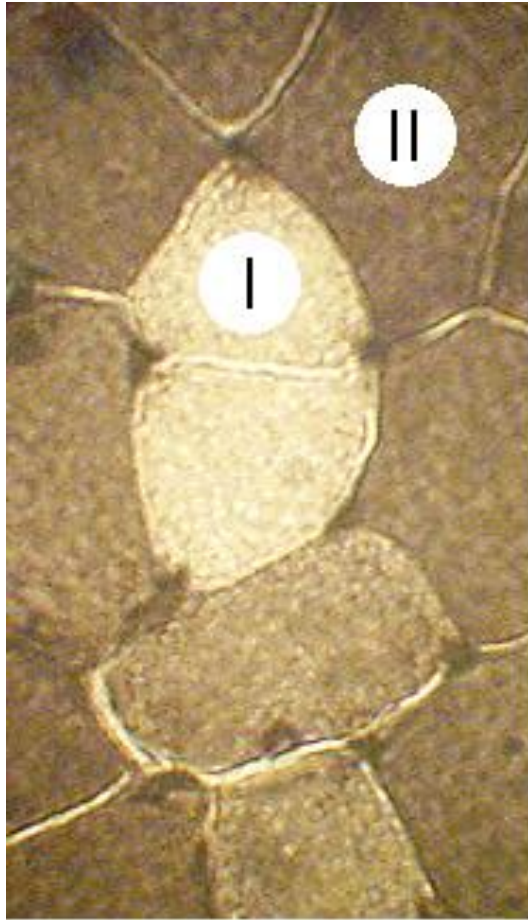
Иммуногистохимический метод



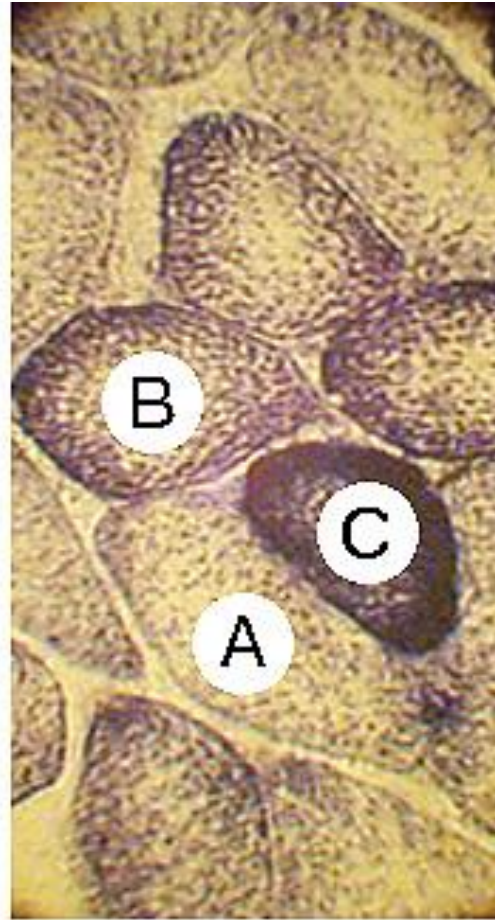
А. Прямой метод предполагает использование меченых АТ против интересующего Аг. АТ взаимодействуют с Аг в местах их локализации. Эти места выявляют при помощи метки, связанной с АТ.

Б. Непрямой метод предполагает использование двух различных АТ. Первые АТ реагируют с Аг ткани. Связанные с меткой вторые АТ специфически взаимодействуют с первыми АТ, которые для вторых АТ являются Аг. Метод значительно чувствительнее прямого, т.к. с каждой молекулой первых АТ связывается несколько молекул вторых АТ, содержащих метку (например, пероксидазу).

Поперечный срез скелетной мышцы



АТФаза миозина



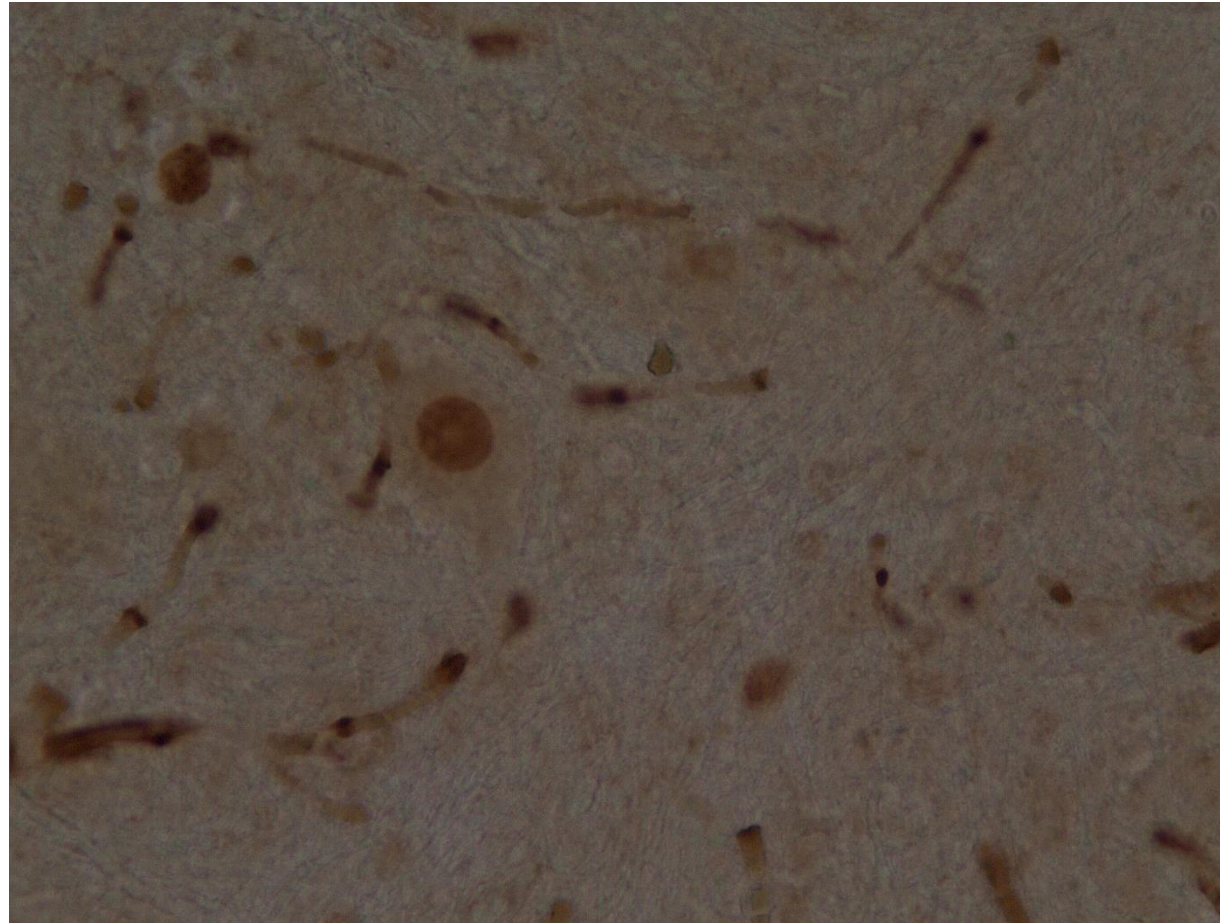
Сукцинатдегидрогеназа

Принцип метода

Реакция включает несколько стадий:

1. Реакция расщепления субстрата
2. Реакция осаждения продукта ферментативной реакции с помощью ионов кальция, свинца, меди или бария
3. Реакция превращения. Получение окрашенного продукта реакции видимого в световой микроскоп.

**Иммуногистохимическая реакция с антителами к рецептору
сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR) в мотонейронах
спинного мозга**



Поперечный срез спинного мозга мыши после космического полета

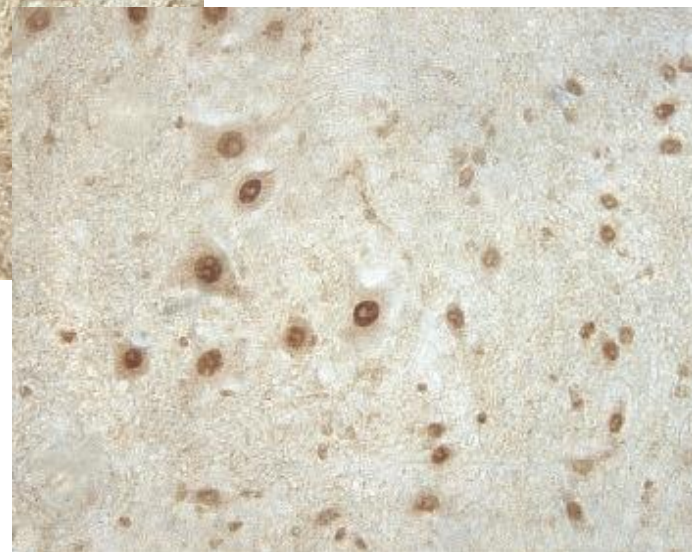
Иммуногистохимическая реакция с антителами к сосудистому
эндотелиальному фактору роста и его рецепторам в мотонейронах
спинного мозга



VEGF

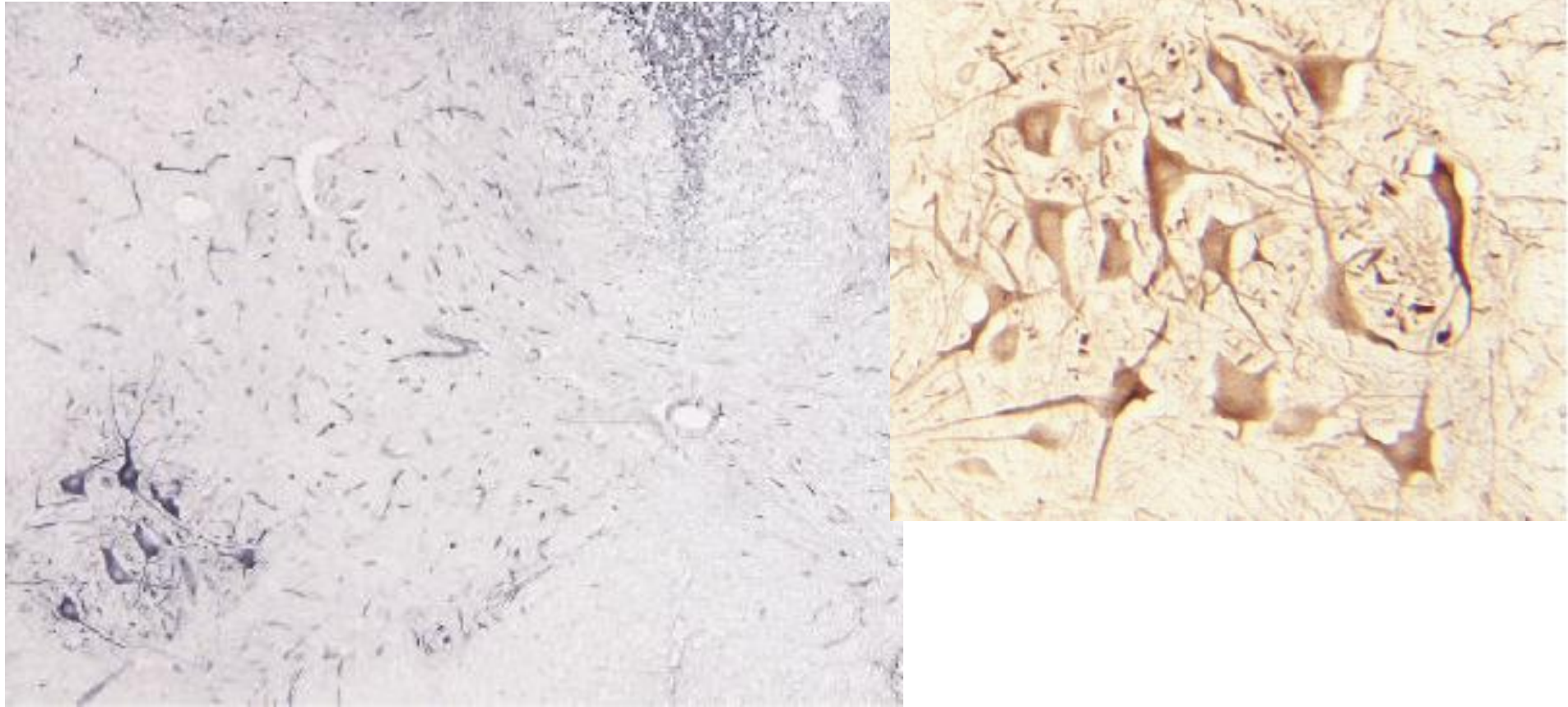


Flk-1



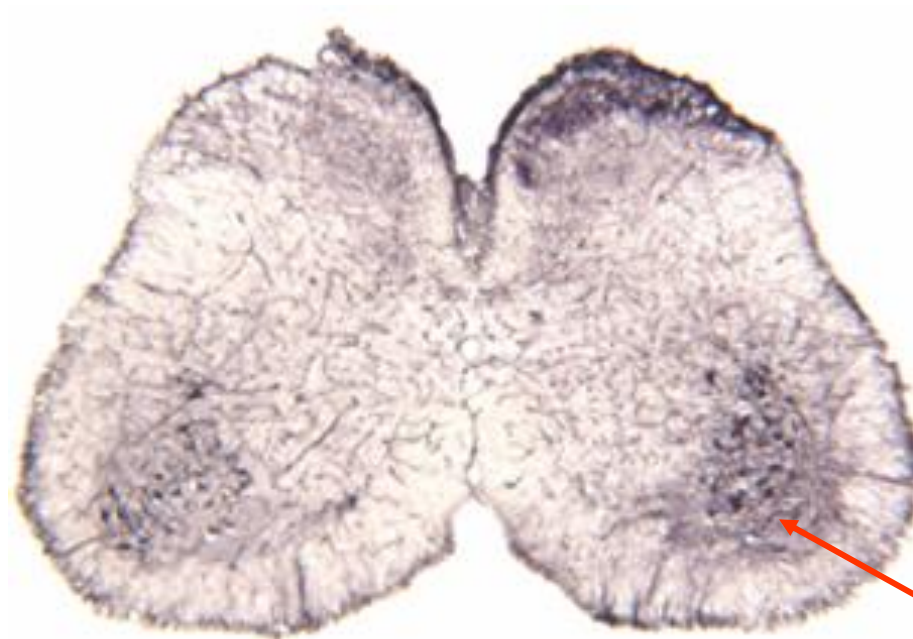
Flt-1

Иммуногистохимическая реакция с антителами к Hsp25 в мотонейронах спинного мозга

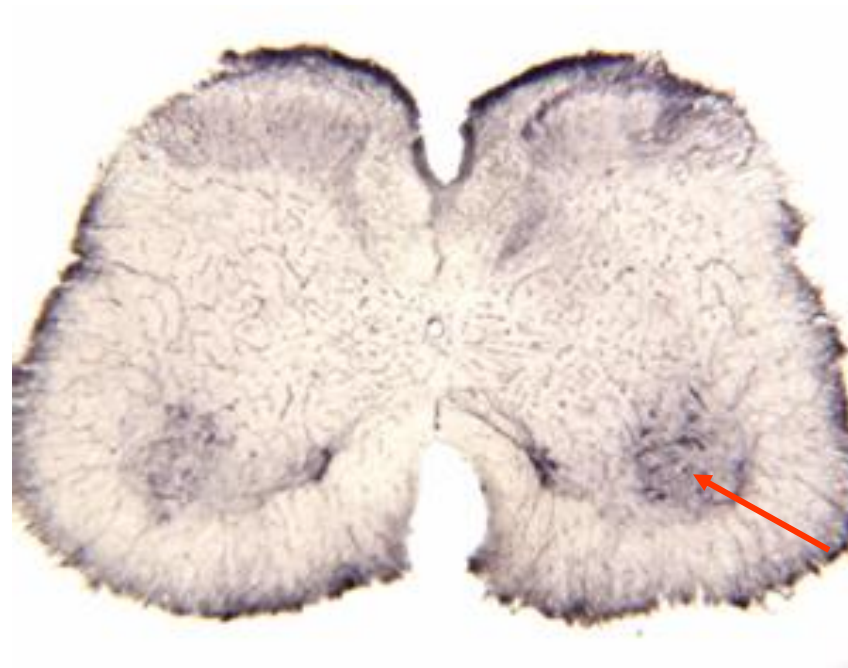


Клетки реагируют на изменение окружающей среды усилением экспрессии белков теплового шока (Hsp — heat shock proteins). Hsp — молекулы шапероны, отвечают за транспорт белков, их нативную конформацию, транслокацию белков через мембраны, контролируют образование трёхмерной структуры белка, предотвращают агрегацию белков.

Иммуноэкспрессия Нsp25 в поясничном отделе спинного мозга после передавливания седалищного нерва

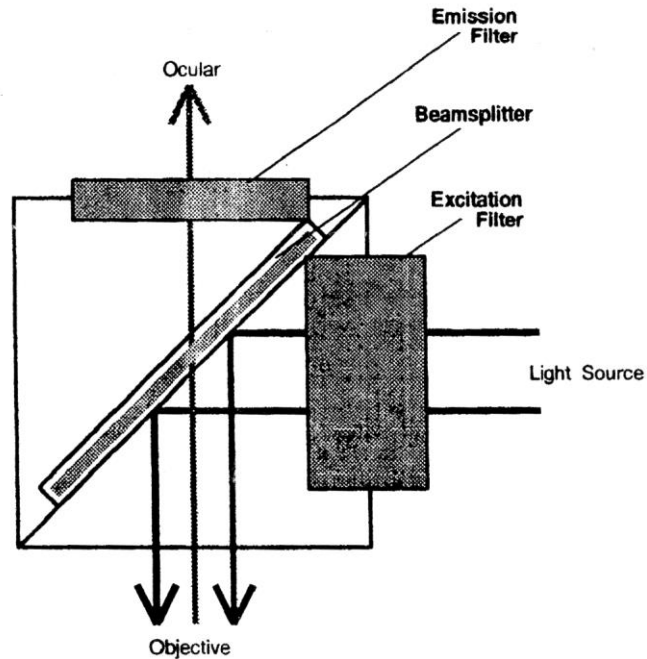


4 день



3 неделя

Флуоресцентная микроскопия



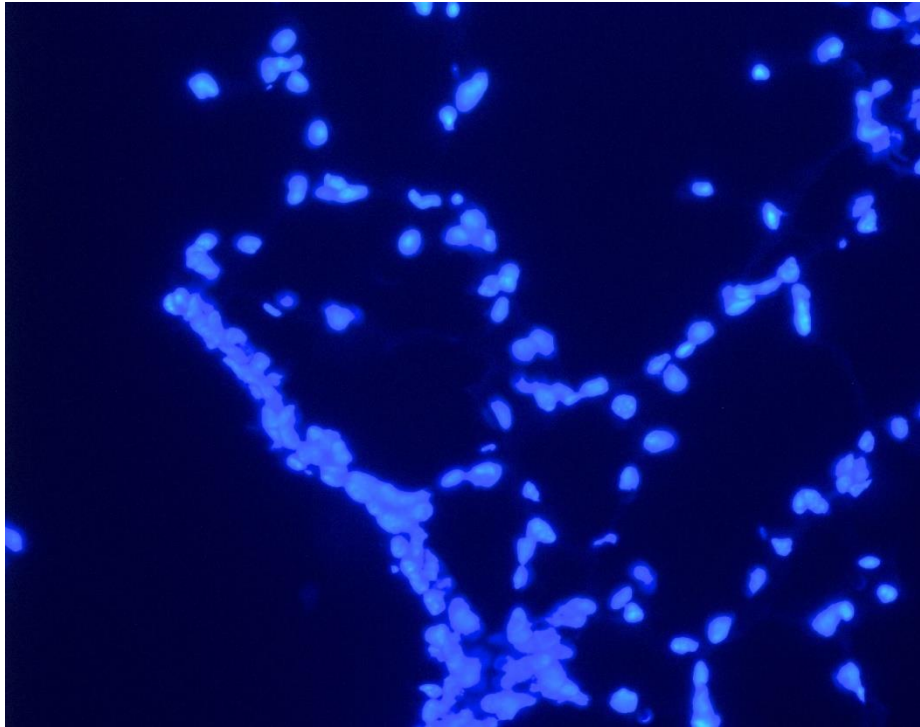
Принцип действия микроскопа основан на использовании явления люминесценции наблюдаемых объектов, возникающей под действием света определенного спектрального состава. Освещение объектов для возбуждения люминесценции производится сверху через объектив микроскопа. Источником света служит ртутная лампа. Свет пропускают через **флуоресцентный куб**, с тремя встроенными светофильтрами.

Возбуждающий фильтр. Свет, необходимый для возбуждения люминесценции, выделяется из общего излучения ртутной лампы с помощью светофильтров, условно называемых светофильтрами возбуждения. Фильтр пропускает лучи определенной длины волны, вызывающей свечение специфического красителя (флуорохрома).

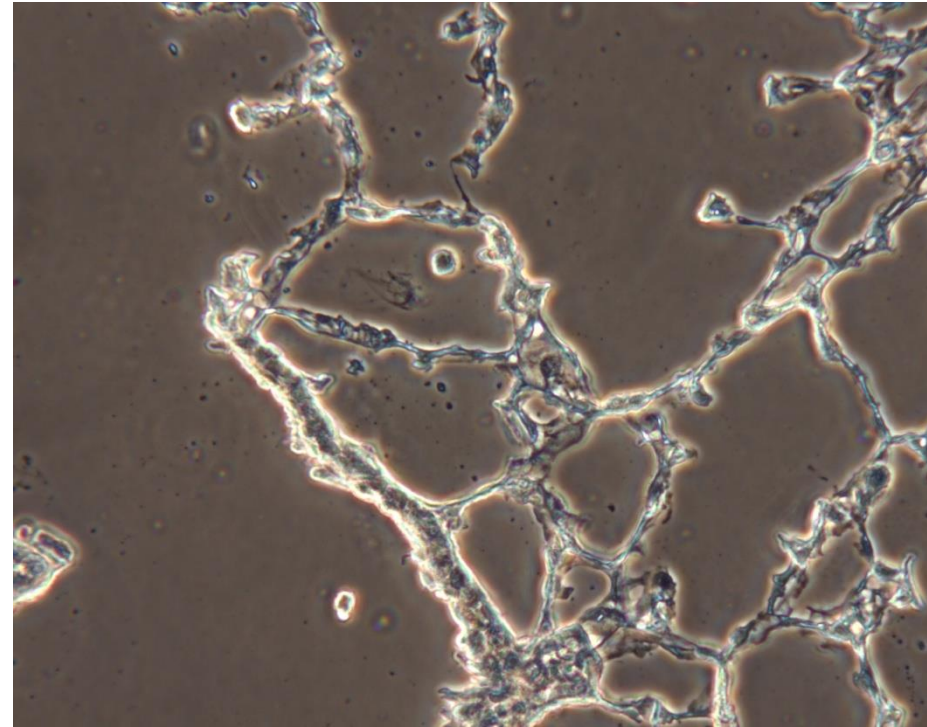
Дихроичное зеркало (светоделительная пластина). В объектив свет направляется светоделительной пластиной с интерференционным покрытием, преимущественно отражающим свет возбуждения и пропускающим свет люминесценции объекта.

Эмиссионный (отсекающий) фильтр. Поглощает свет возбуждения и эффективно пропускает излучение от исследуемого объекта.

Флуоресценция DAPI

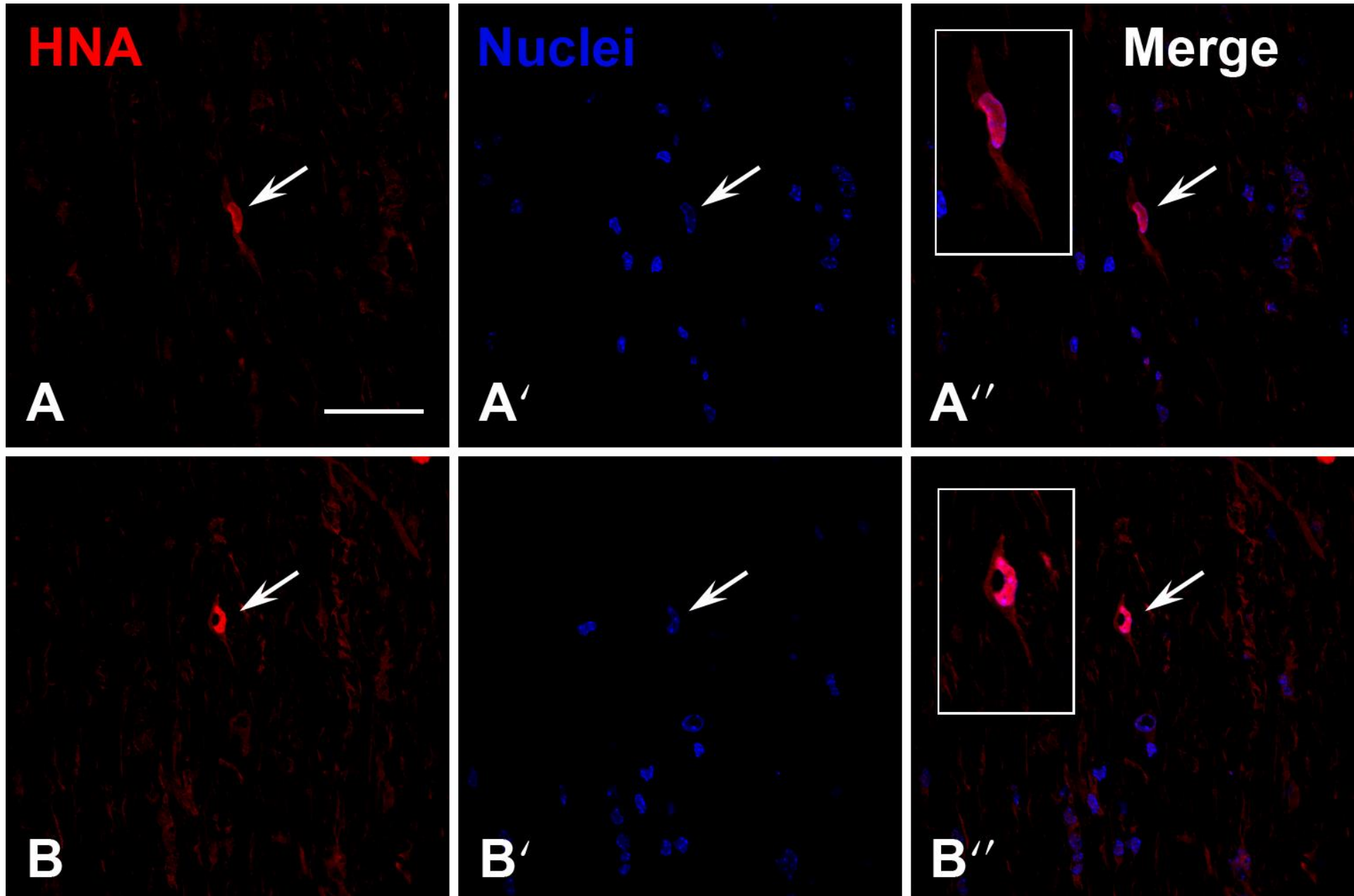


Фазовоконтрастная микроскопия

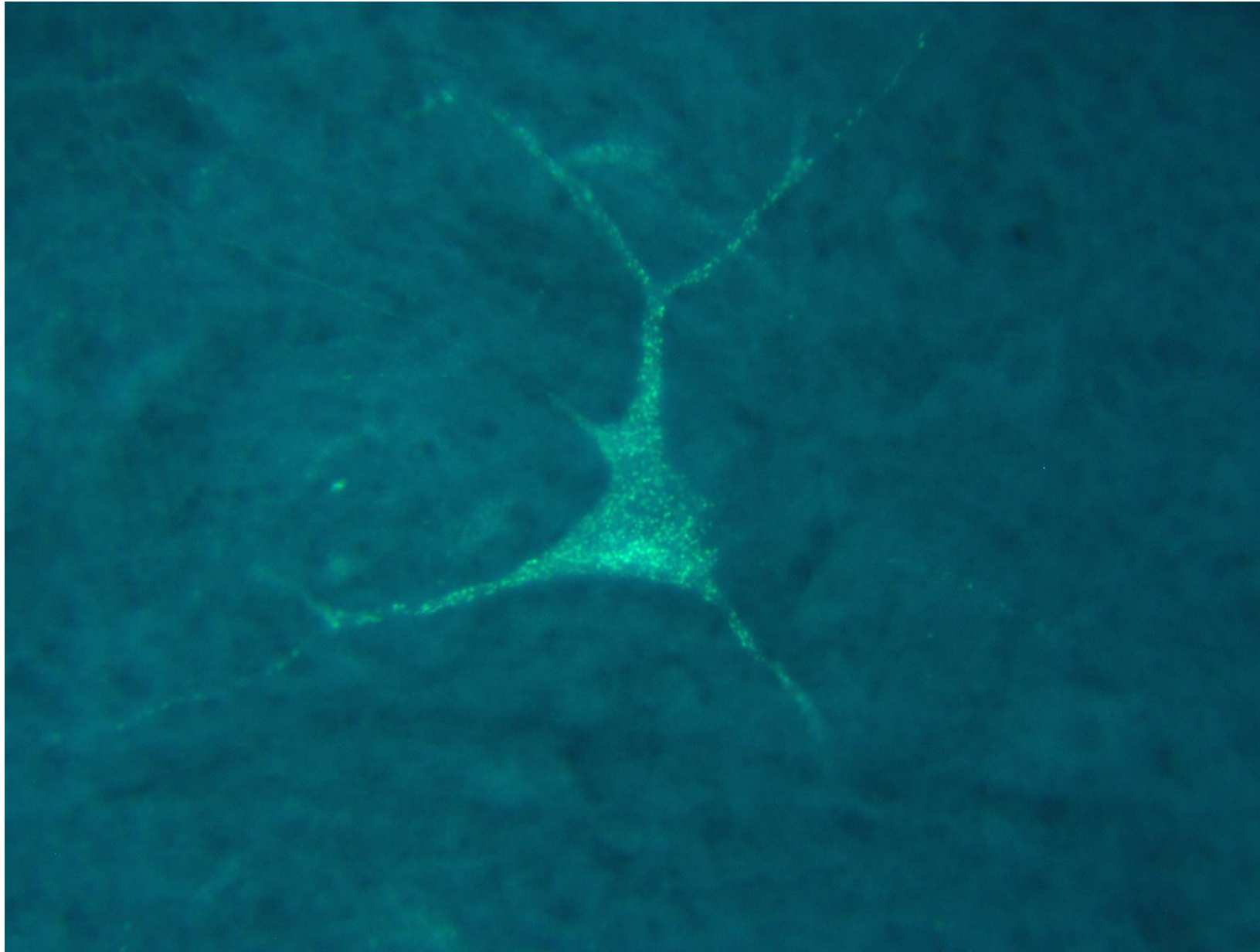


При прохождении света через неокрашенный препарат амплитуда световых волн не меняется, происходит лишь изменение фазы световых волн, прошедших через препарат. Однако человеческий глаз увидеть это изменение фазы света не способен, поэтому неокрашенный препарат невидим. Фазовоконтрастное устройство (конденсор с набором кольцевых диафрагм и фазовоконтрастные объективы) позволяет превратить изменение фазы лучей, прошедших через неокрашенный объект, в изменения амплитуды, воспринимаемые человеческим глазом.

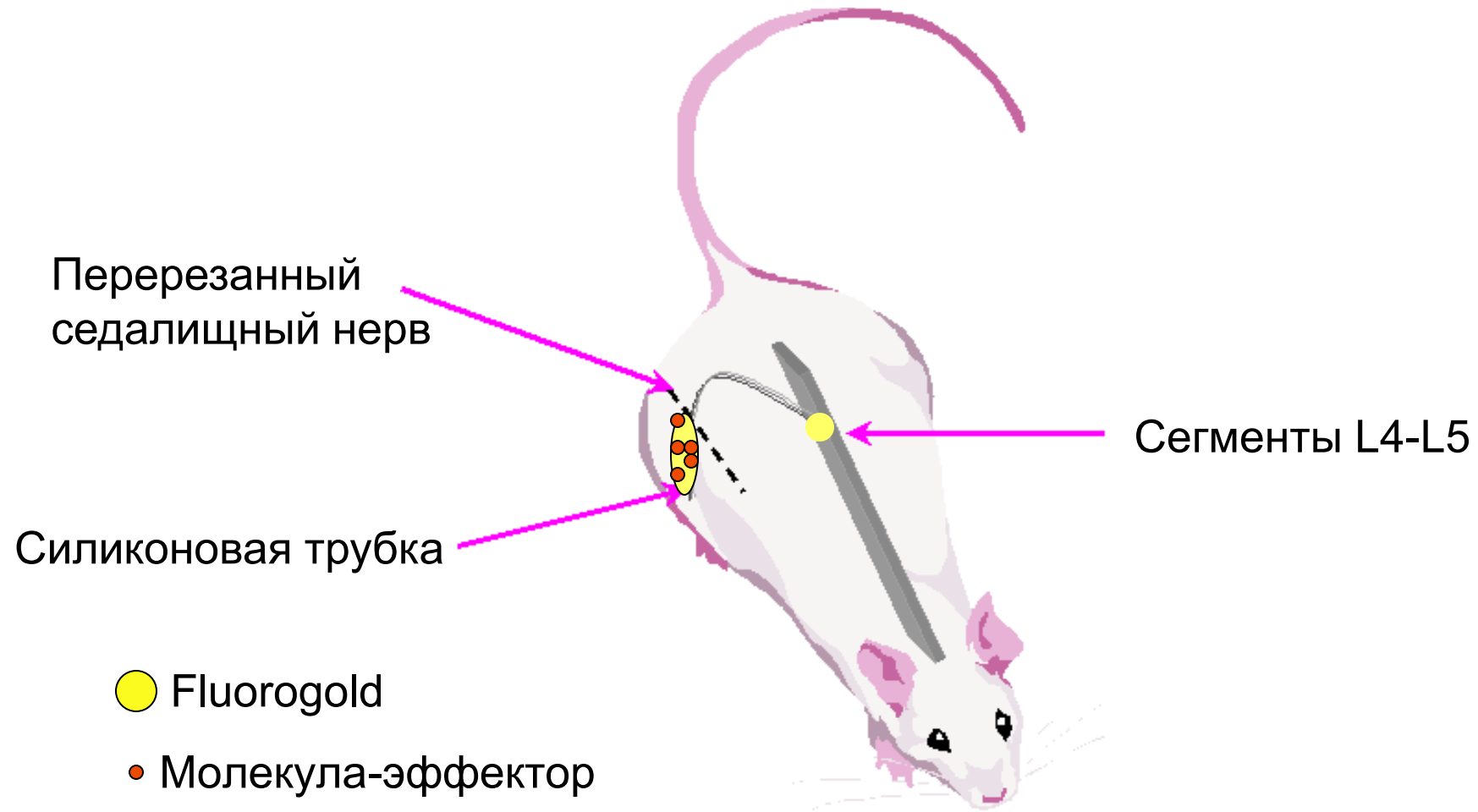
Генетически модифицированные стволовые клетки, трансплантированные в спинной мозг трансгенных мышей с боковым амиотрофическим склерозом



Флуоресцентный зонд FluoroGold избирательно накапливается в нейронах



Ретроградный аксонный транспорт Fluorogold



Fluorogold-позитивные мотонейроны поясничного отдела спинного мозга мыши

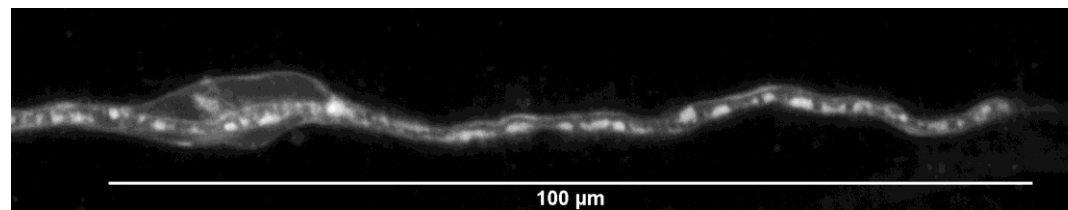
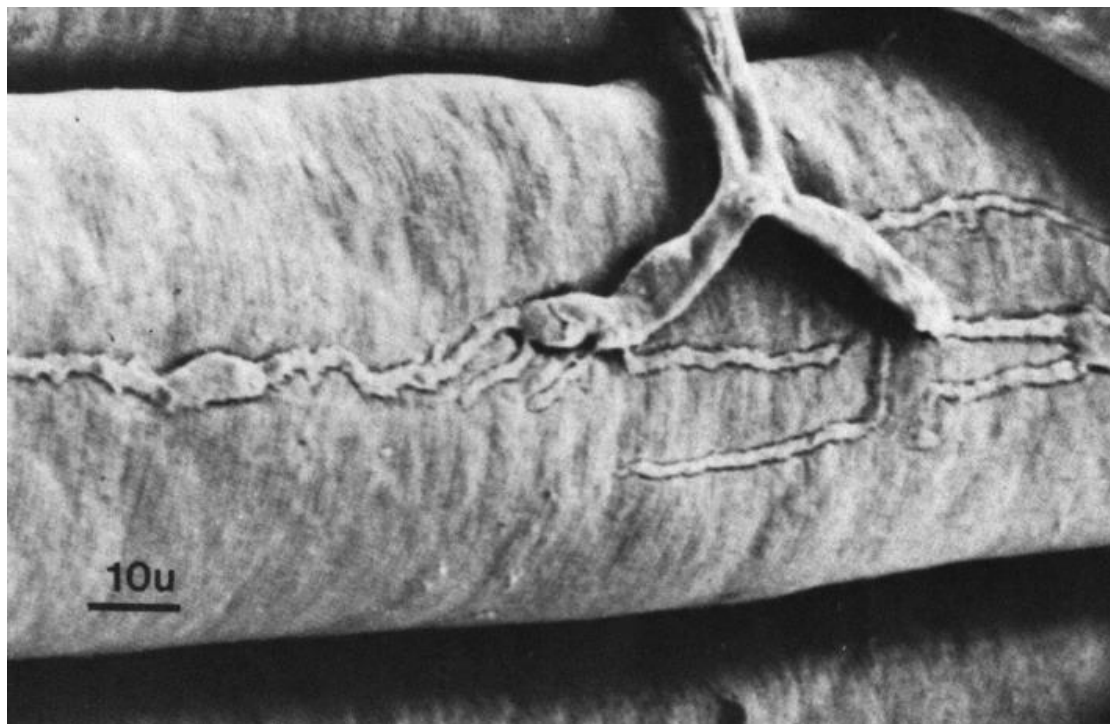


Лазерная конфокальная микроскопия

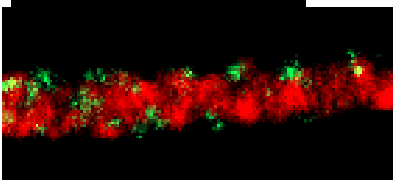
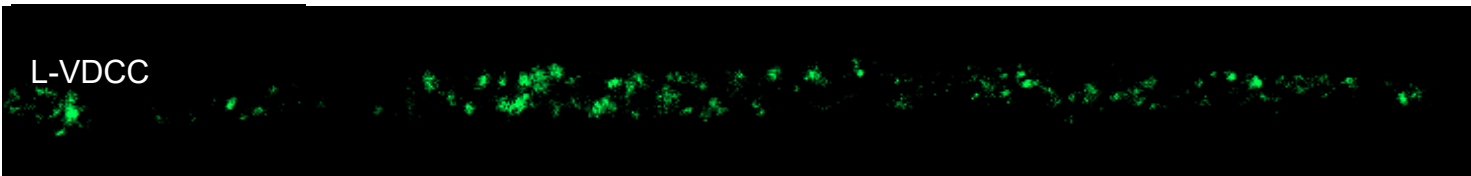
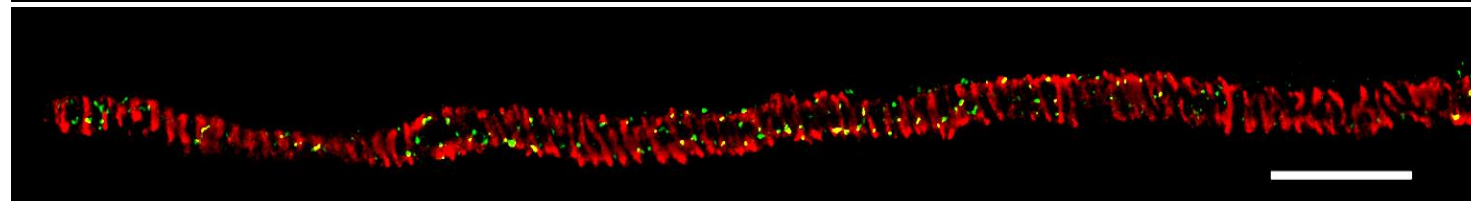
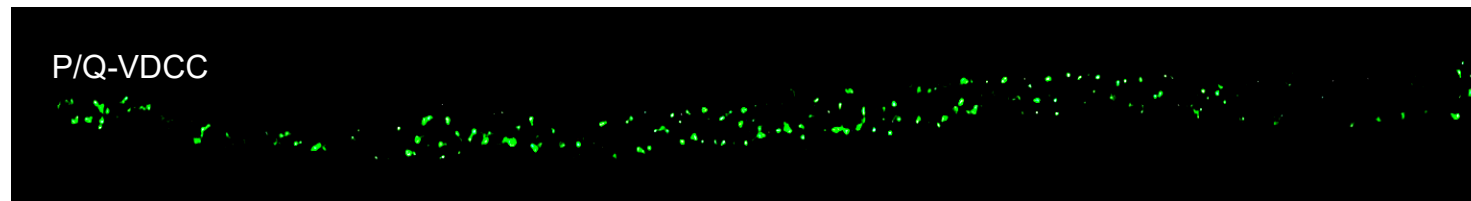
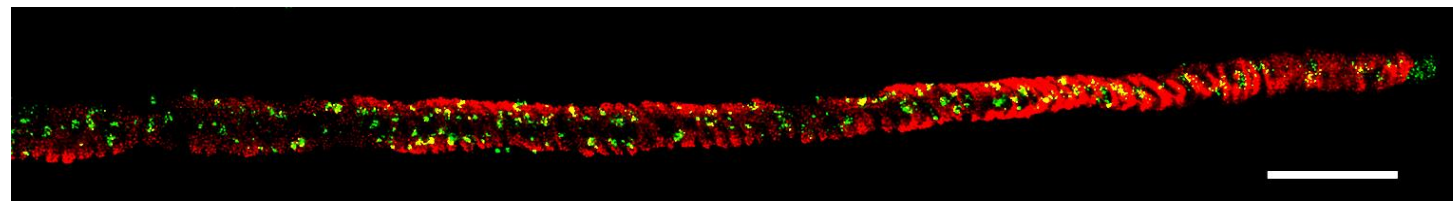
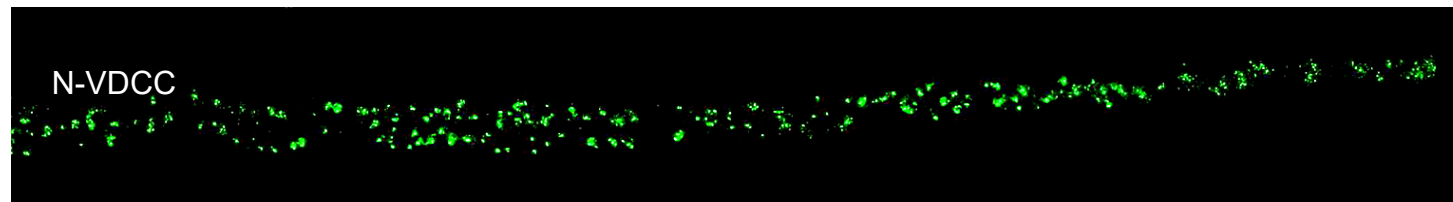
Метод конфокальной сканирующей микроскопии позволяет получить оптические срезы путём послойного сканирования объектов по глубине (наподобие томографии) и производить пространственную реконструкцию флуоресцирующего объекта. Для освещения объекта применяется мощный источник света, а именно система лазеров.

Большое количество шаговых двигателей управляют положением объекта в фокусе конфокального микроскопа как в плоскости XY, так и по оси Z. Конфокальный микроскоп управляется от компьютера, а изображение объекта можно увидеть только на дисплее. Каждый оптический срез запоминается как отдельный файл, после чего с помощью программы воссоздается трёхмерное изображение объекта.

Нервно-мышечное соединение лягушки

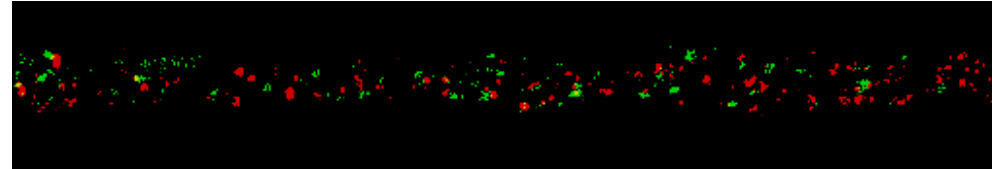


Лазерная конфокальная микроскопия

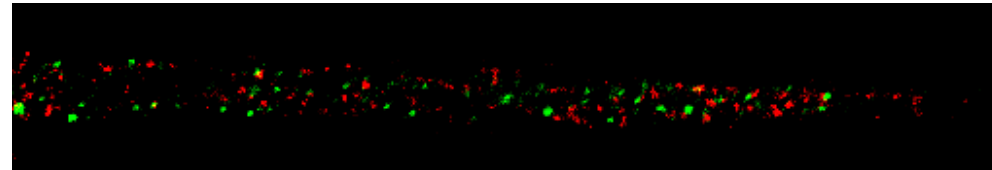


Совместное окрашивание высокопороговых потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов N (Cav2.2), P/Q (Cav2.1), R (Cav2.3), L (Cav1.3)-типов на нервно-мышечном контакте.

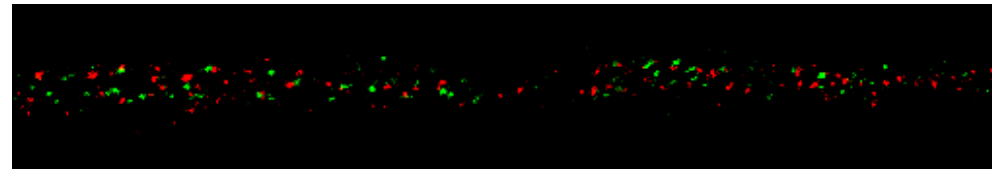
N (кр.) и P/Q (зел.)



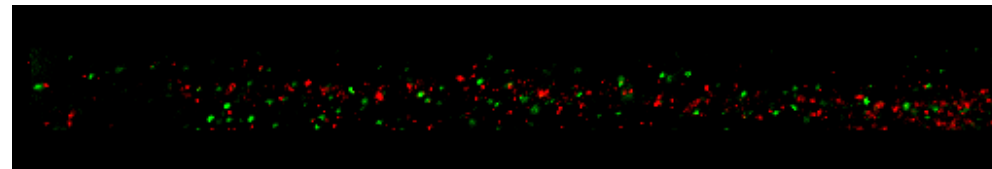
P/Q (кр.) и R (зел.)



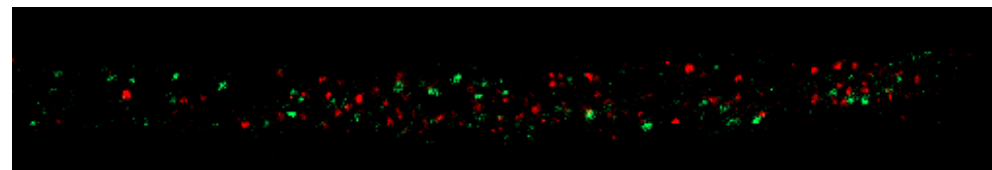
N (кр.) и R (зел.)



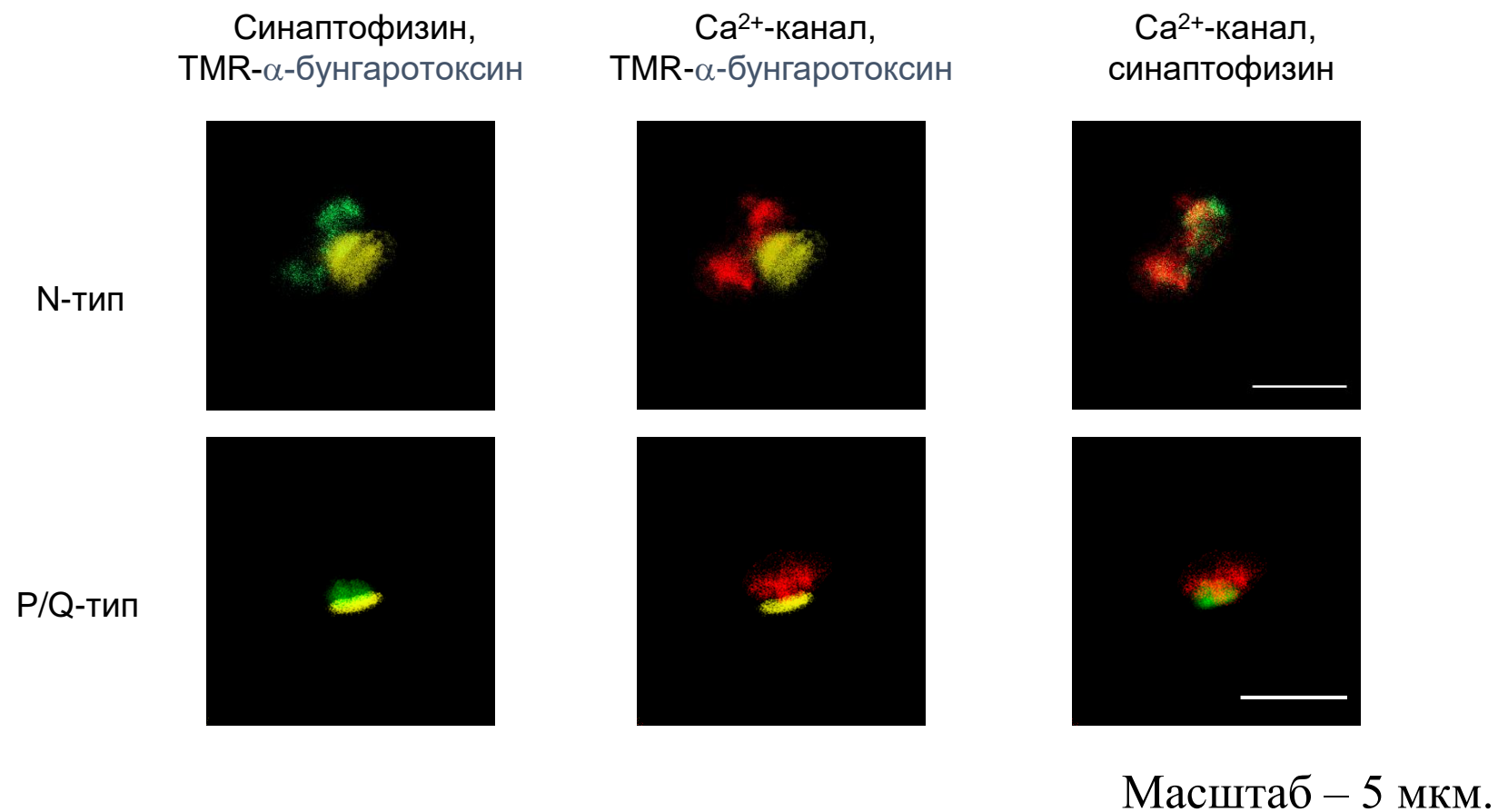
L (кр.) и P/Q (зел.)



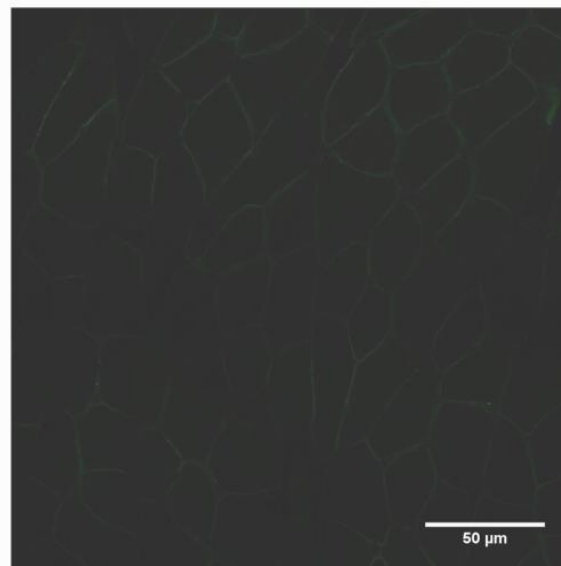
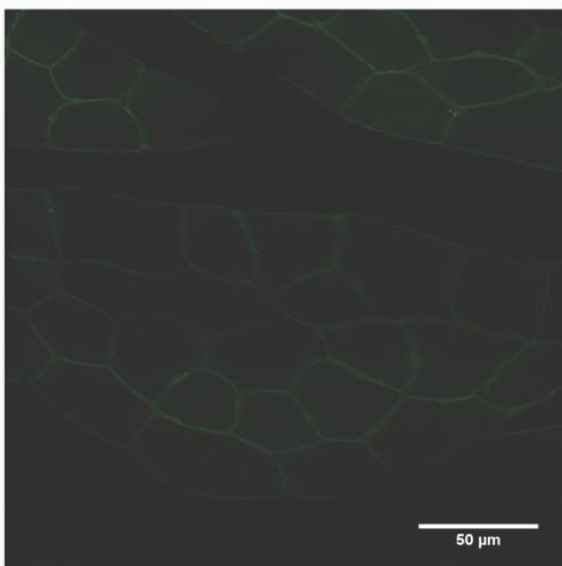
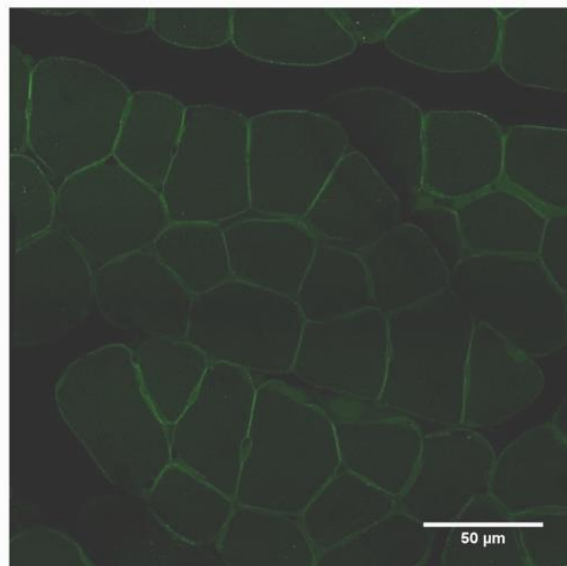
L (кр.) и R (зел.)



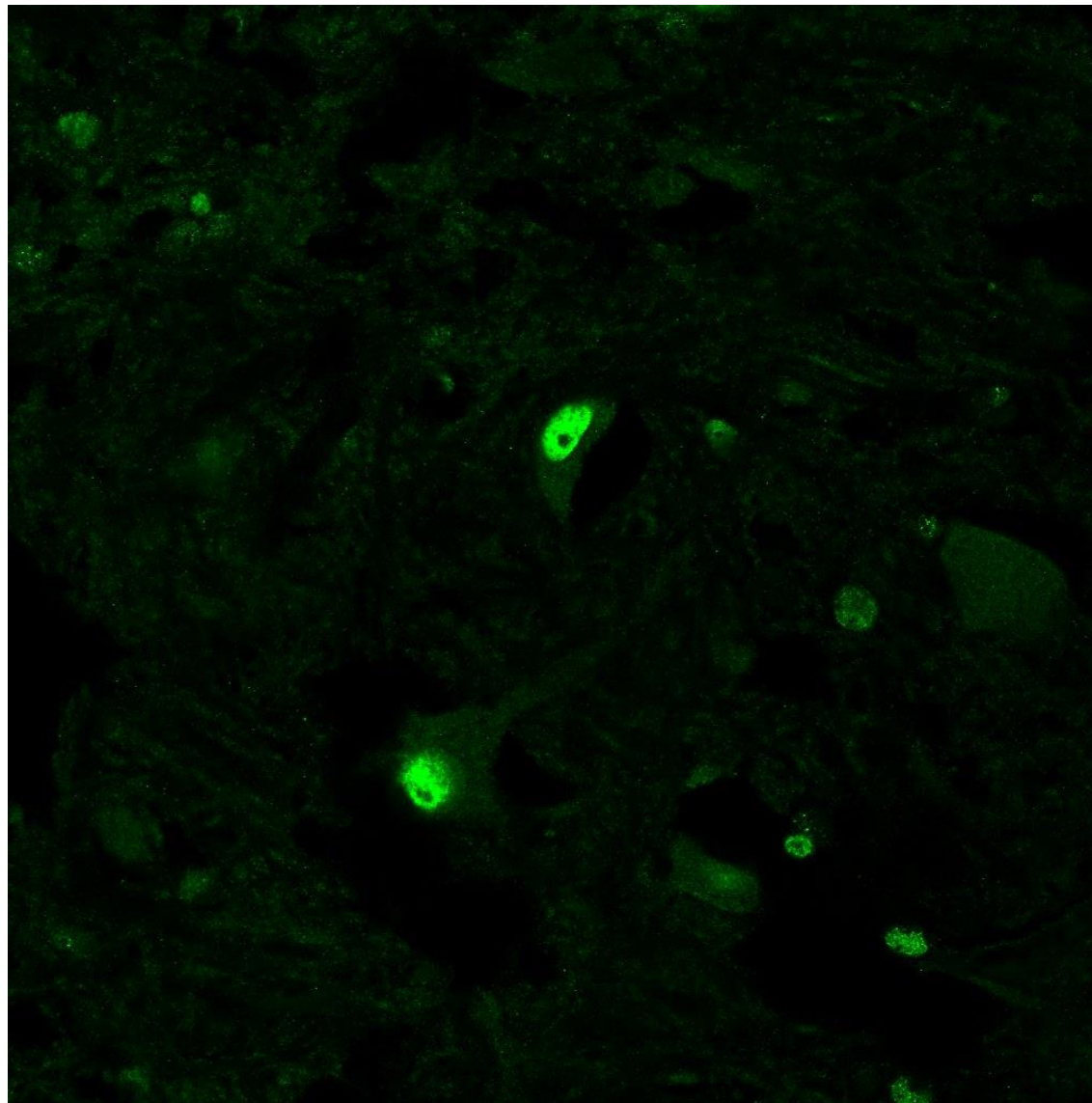
Пресинаптическая локализация потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N и P/Q-типа.



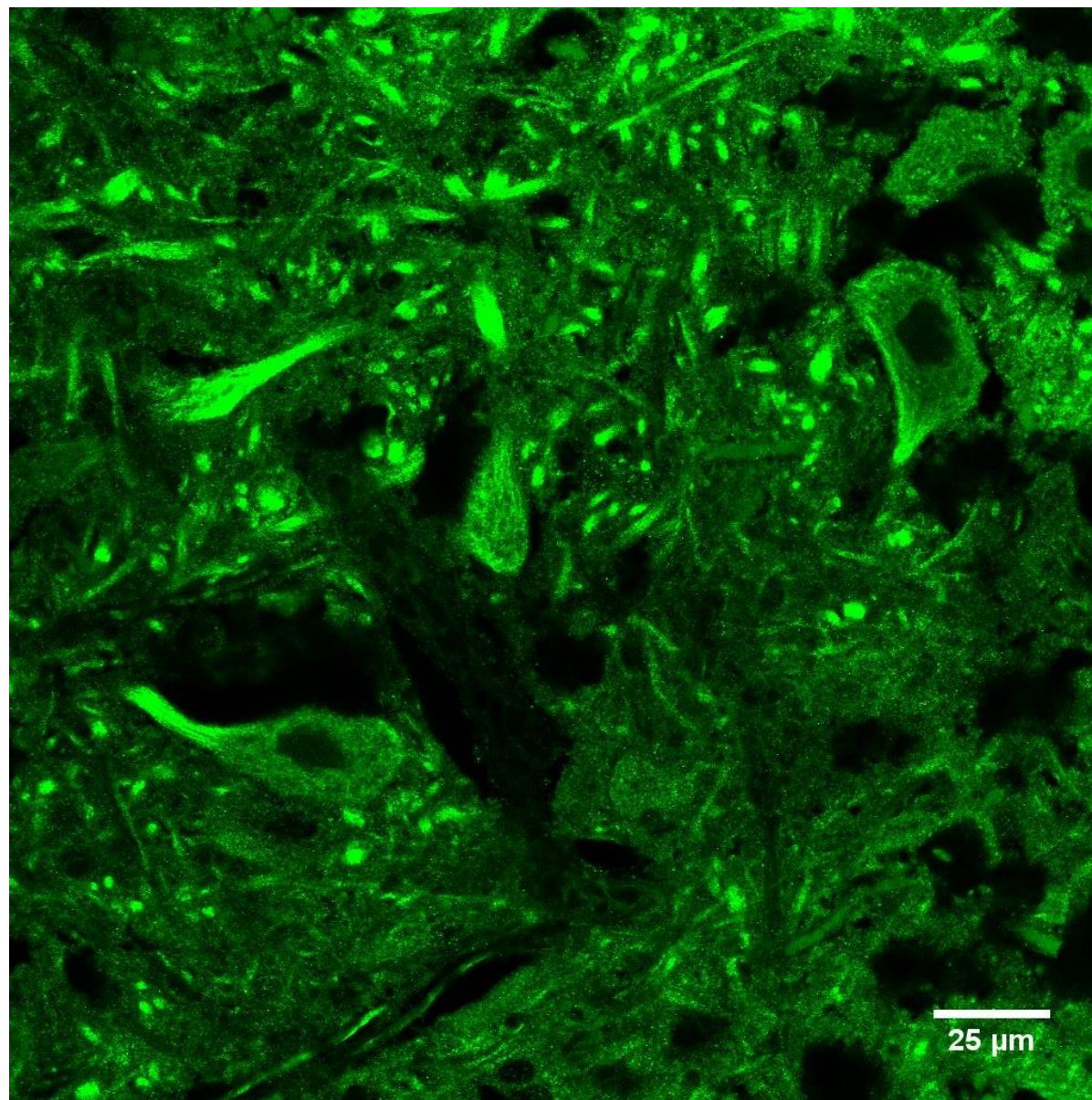
Белок Дистрофин



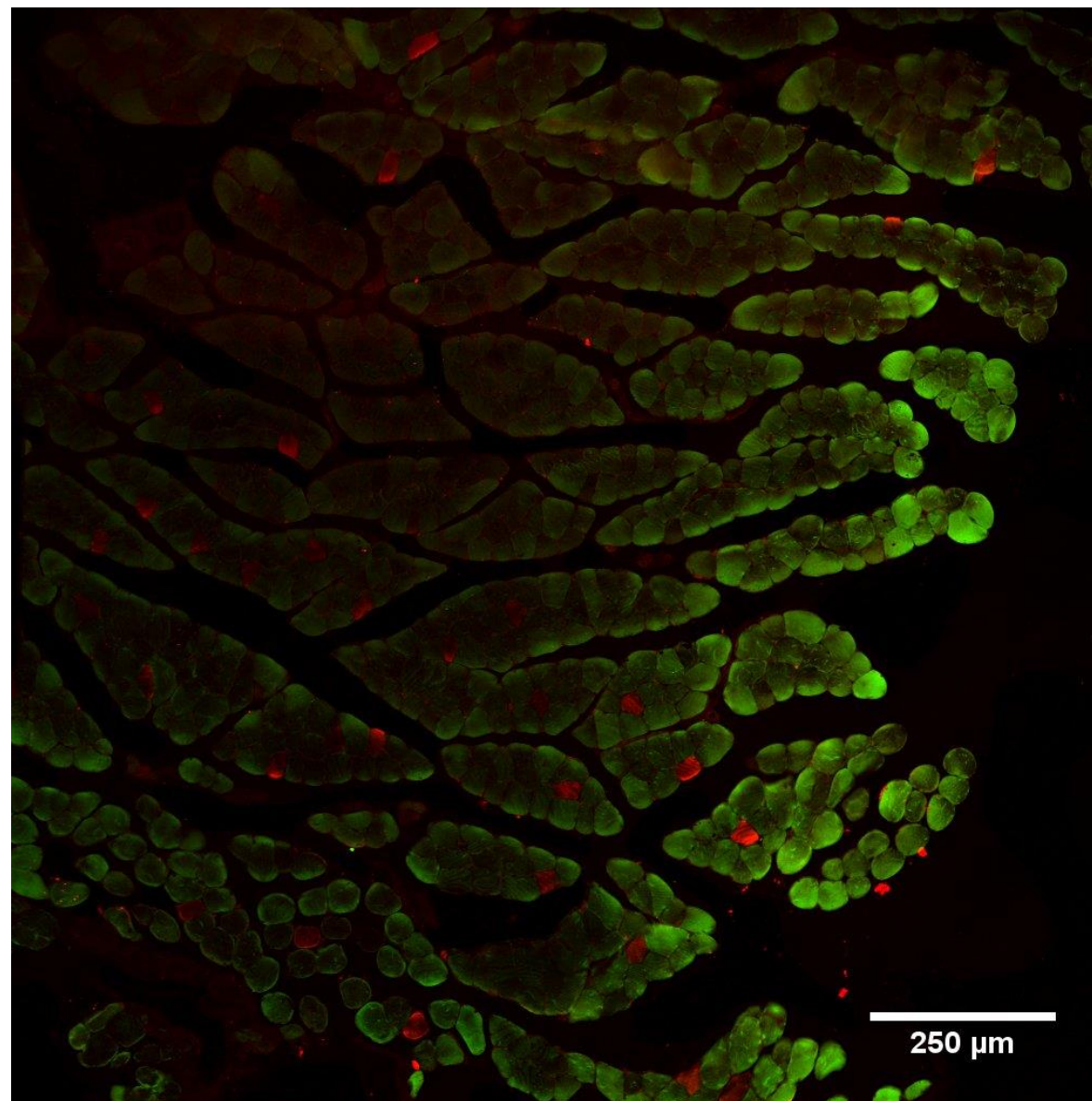
Рецептор VEGFA

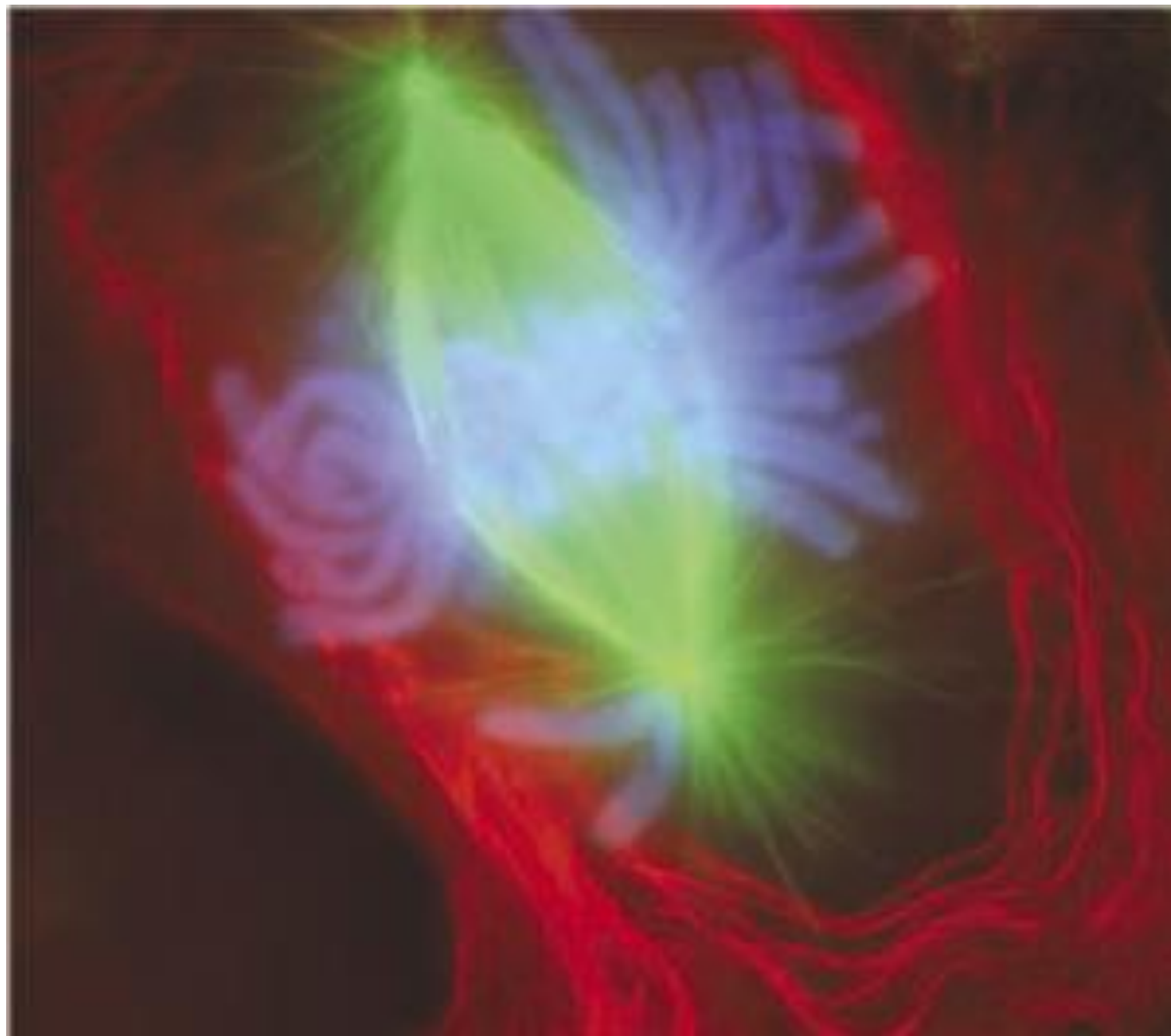


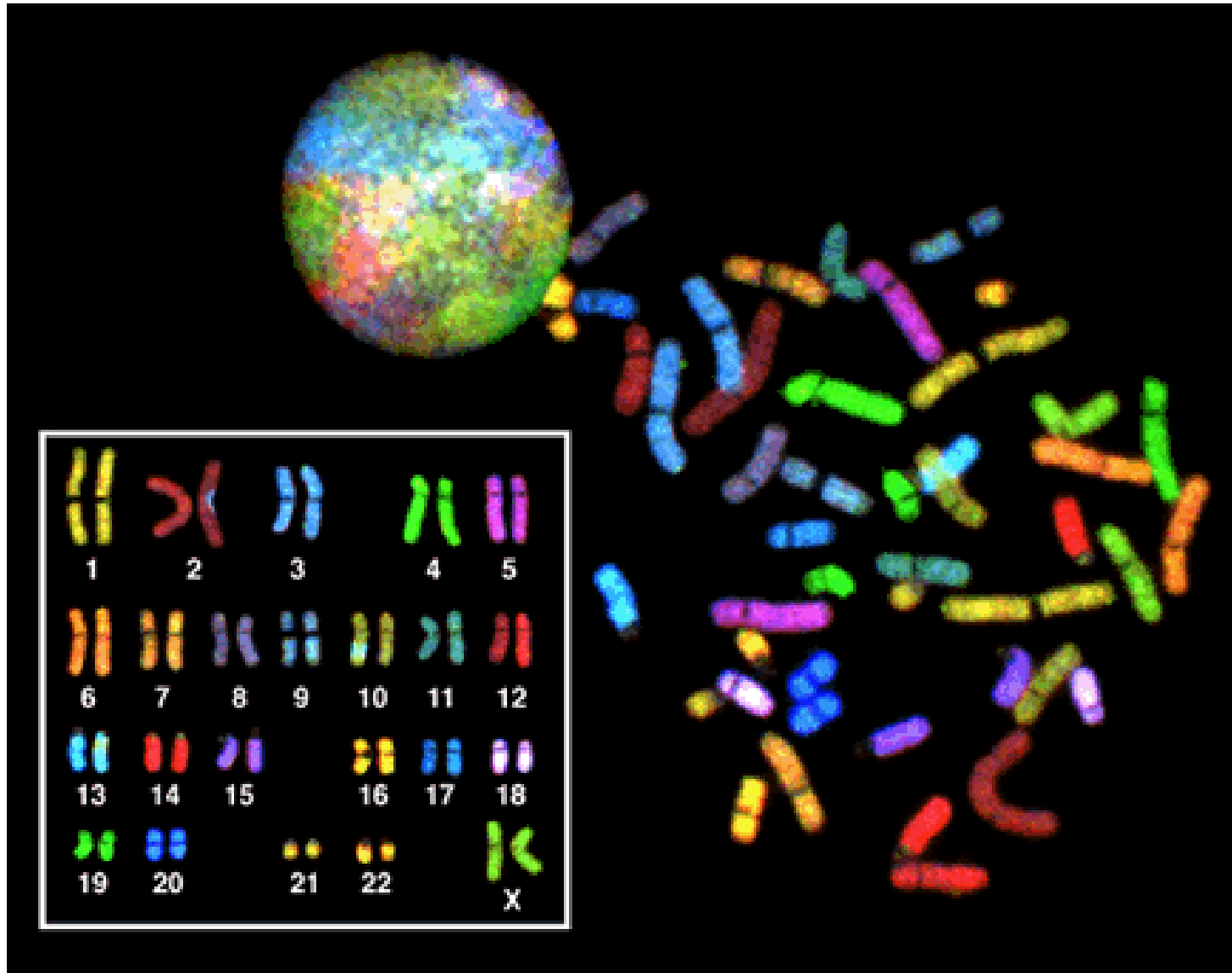
Белок пресинаптической области PSD95



Быстрые и медленные волокна в «быстрой» мышце

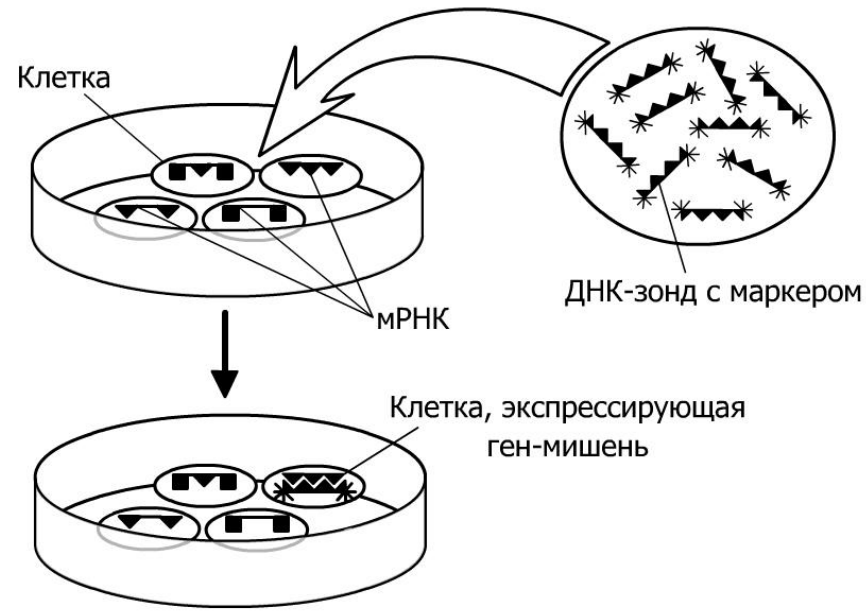






Гибридизация *in situ*

Методы генного зондирования позволяют выявить специфические нуклеотидные последовательности ДНК и РНК в исследуемом объекте (биологическая жидкость, биопсия, гистологический срез, мазок).

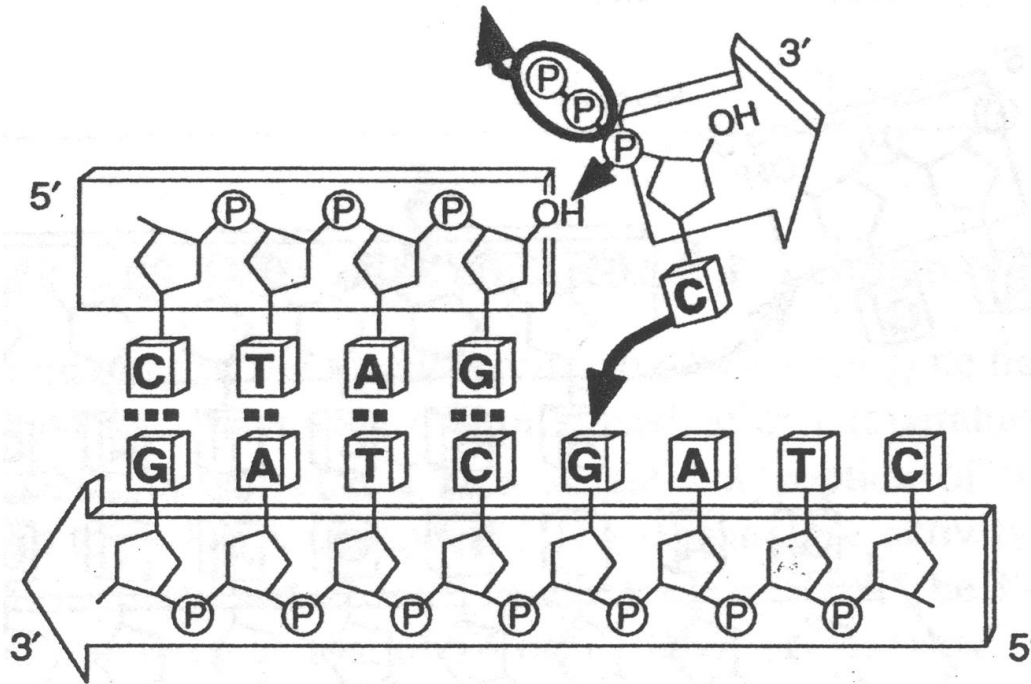


Гибридизация одноцепочечной молекулы ДНК (**ДНК-зонд**) или РНК (**РНК-зонд**) с комплементарной ДНК или информационной РНК позволяет ответить на вопрос, присутствует или нет в ткани ген-мишень, происходит или нет экспрессия этого гена, и установить уровень, на котором она может меняться — транскрипция ДНК, сплайсинг РНК, трансляция.

- Визуализация дифференциальной экспрессии генов в ходе гистогенеза и органогенеза в эмбриогенезе,
- дифференцировки стволовых клеток в постнатальном периоде,
- выявление маркерных генов опухолевых клеток,
- выявление вирусных ДНК и РНК.

Гибридизация

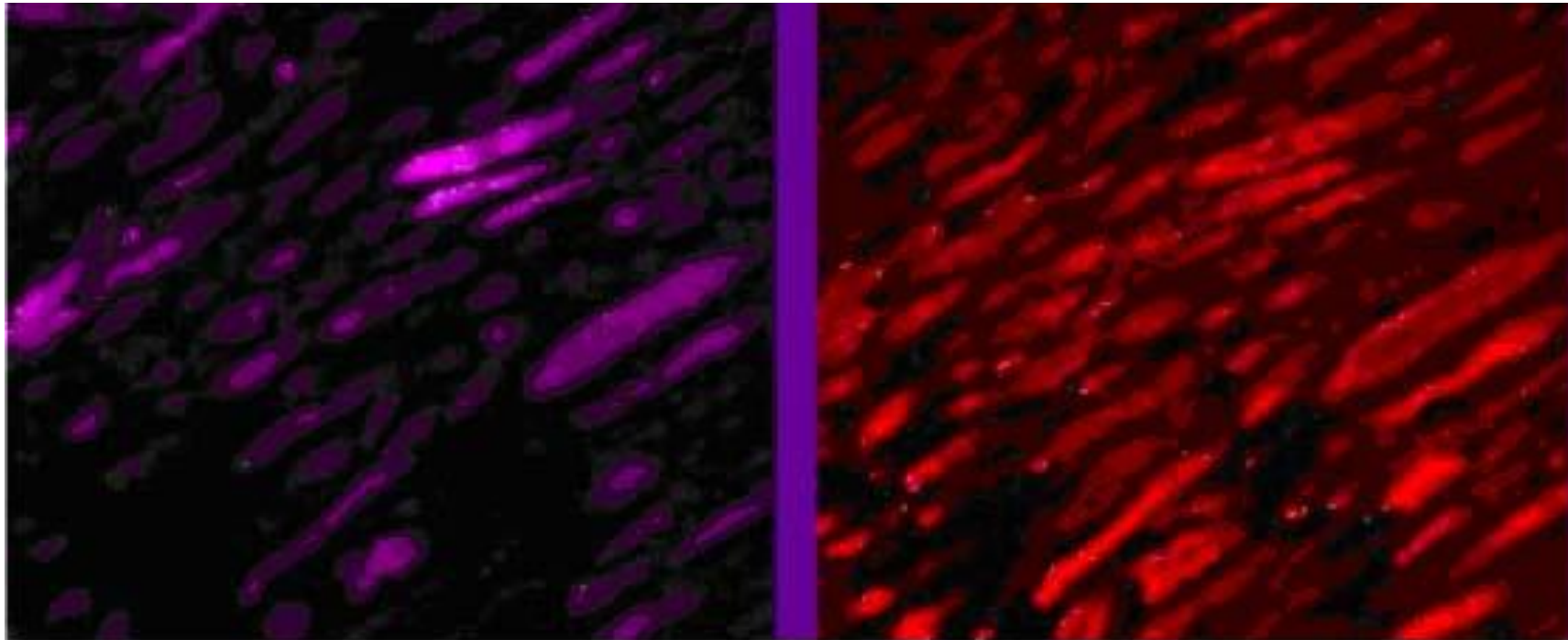
Молекула ДНК построена из двух (смысловой и антисмысловой) полинуклеотидных цепей, кодирующих ядерный геном клетки



Пуриновые основания — аденин (A) и гуанин (G).
Пиримидиновые основания — тимин (T), цитозин (C) и урацил (U), присутствующий только в молекуле РНК вместо тимина.

По правилу Уотсона-Крика (комплементарного спаривания нуклеотидов) две антипараллельные цепи полинуклеотидов соединены водородными связями в парах А–Т и G–C.

Гибридизация in situ



Слева продукт гибридизации с олигонуклеотидным зондом, комплементарным мРНК бета-тубулина. Справа иммунофлуоресценция с АТ к бета-тубулину.



Спасибо за внимание!