

Способы введение чужеродной ДНК в клетки

- 1. Физические, химические методы**
- 2. Перенос с помощью иммобилизованной ДНК на сперматозоидах**
- 3. Векторные системы**

Физические методы введения генов

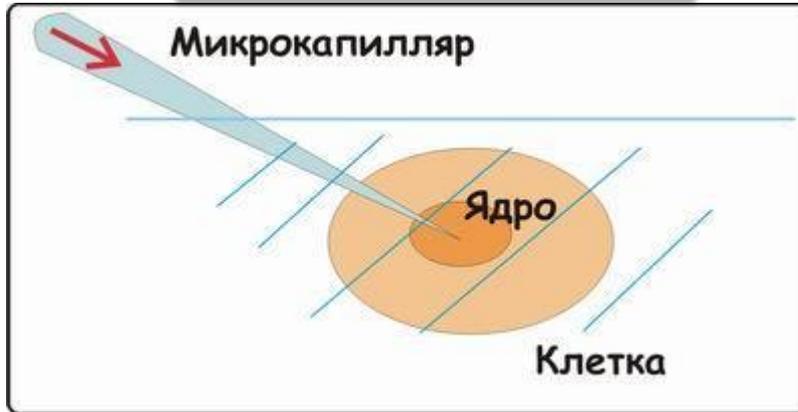
ДНК вводится в клетки с помощью физического воздействия:

- **микроинъекция**
- **ДНК-пушка**
- **ультразвук**
- **электропорация**
- **липофекция**

Методы введения гДНК в клетку-реципиент трансформация

(при физиологической некомпетентности)

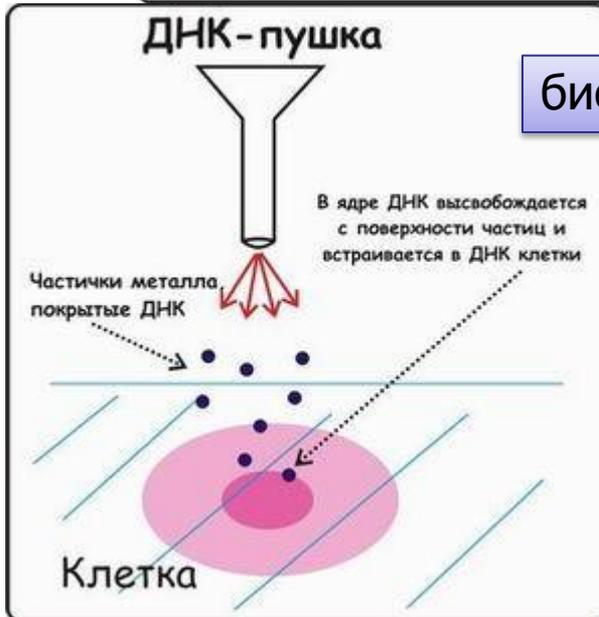
микроинъекция



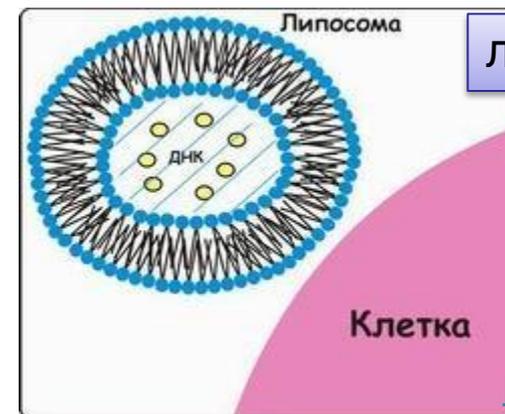
электропорация



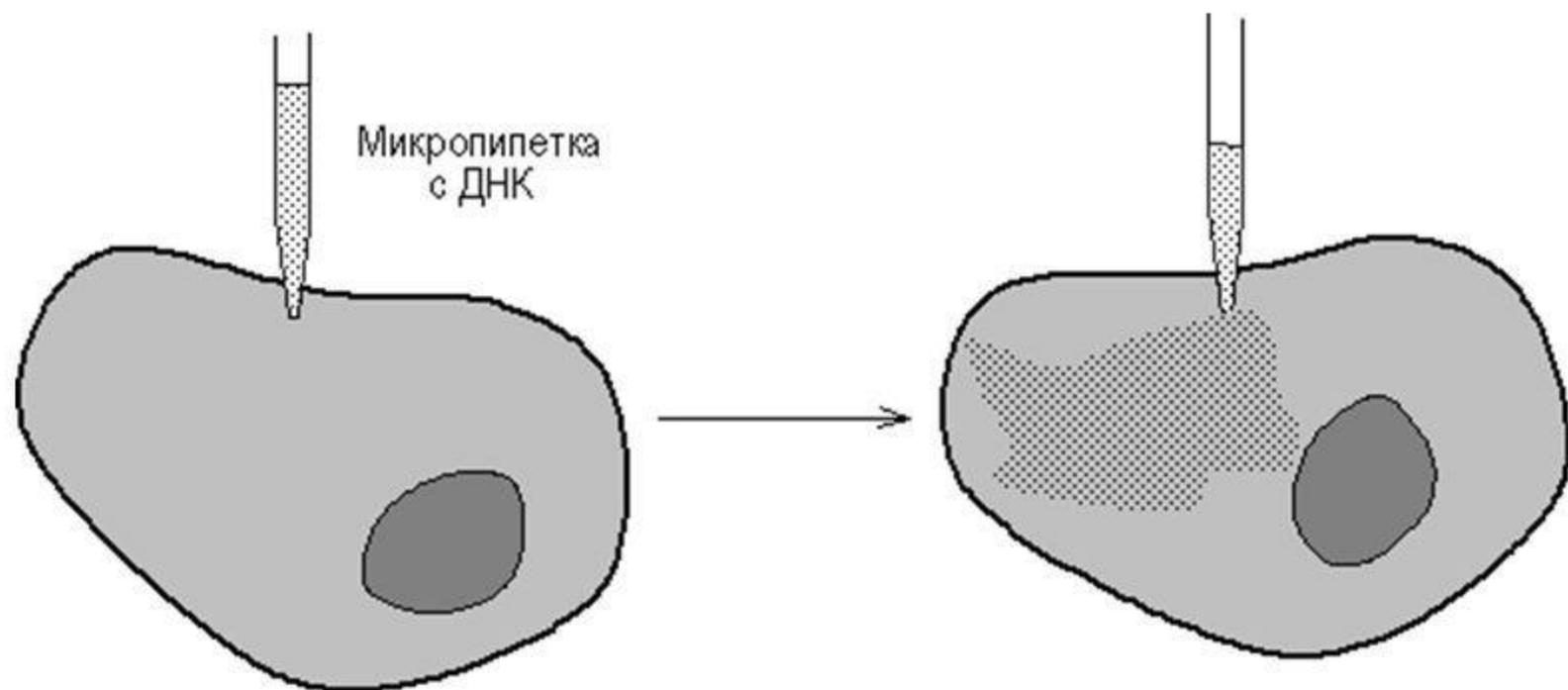
биобаллистика

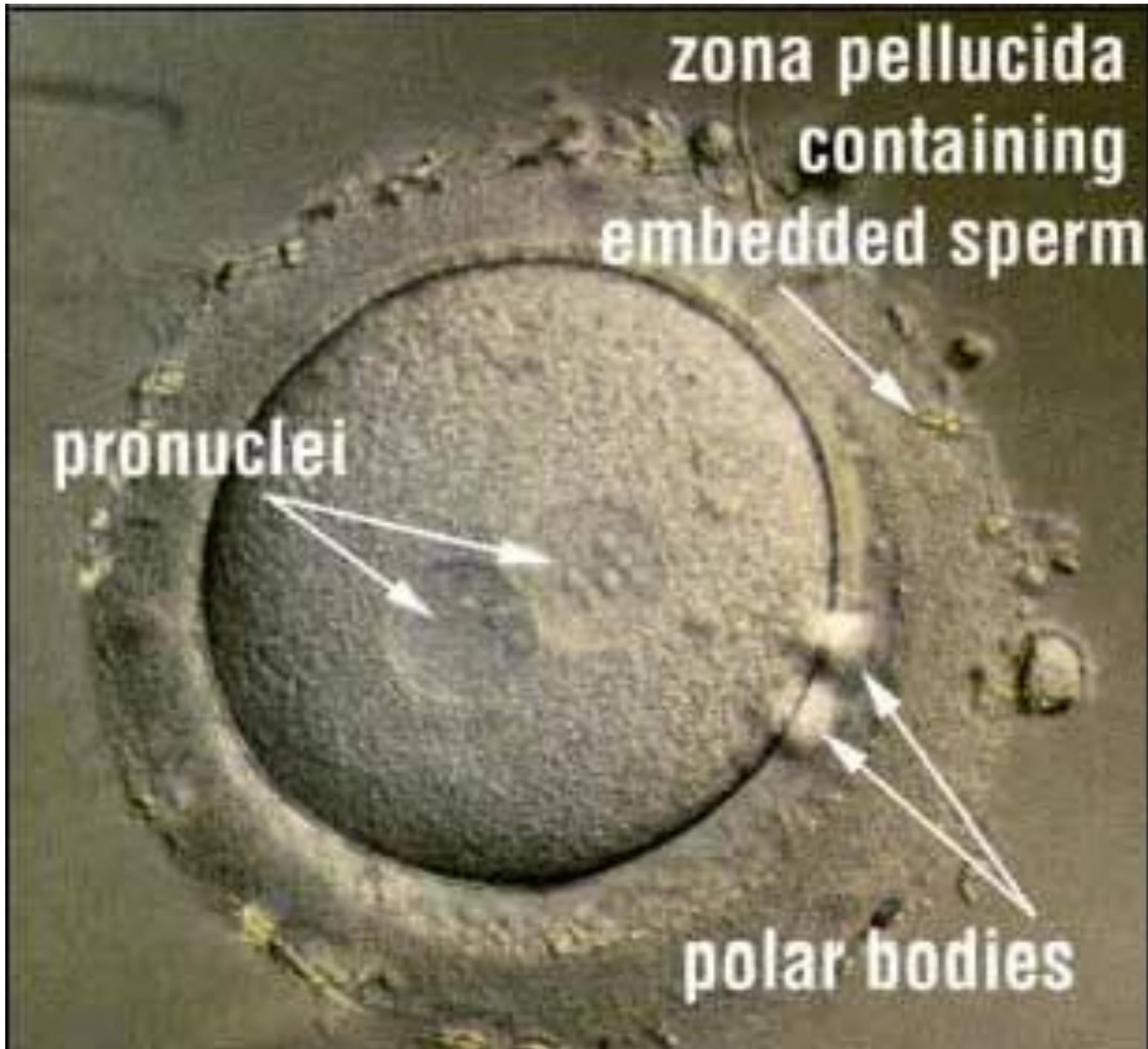


липофекция



Микроинъекция ДНК в ткани





zona pellucida
containing
embedded sperm

pronuclei

polar bodies



(a)

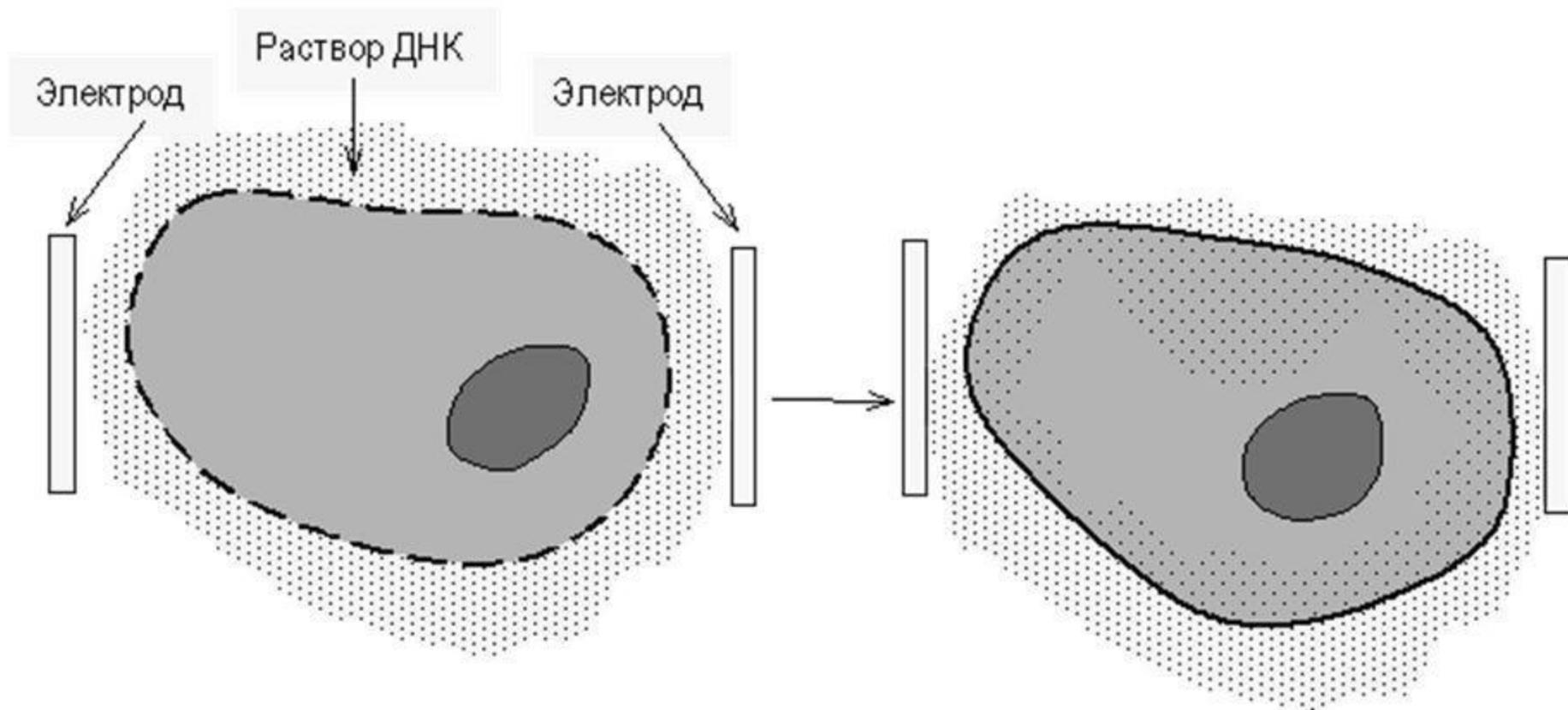


oocyte

Pipet

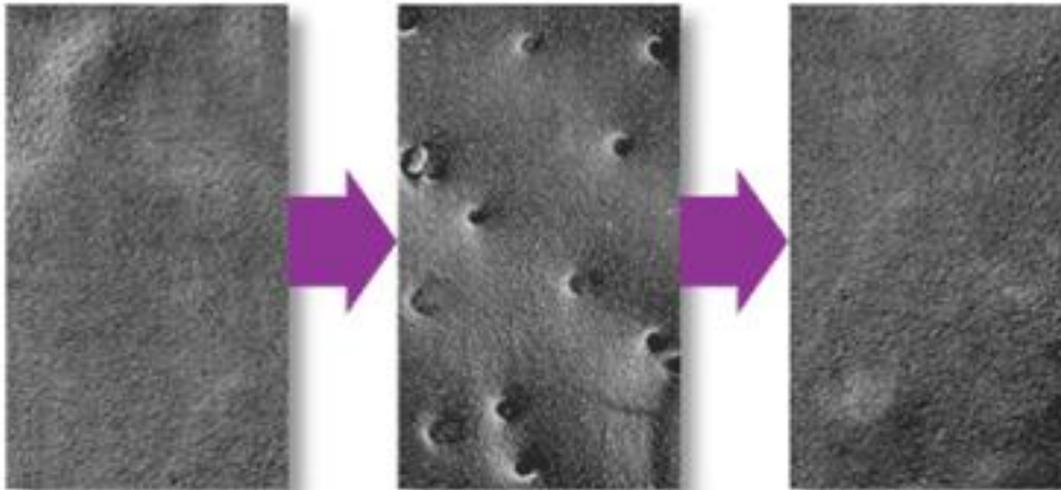
Micro needle

Метод электропорации – высокое напряжение увеличивает проницаемость мембраны



Electroporation:

The phenomenon of electroporation

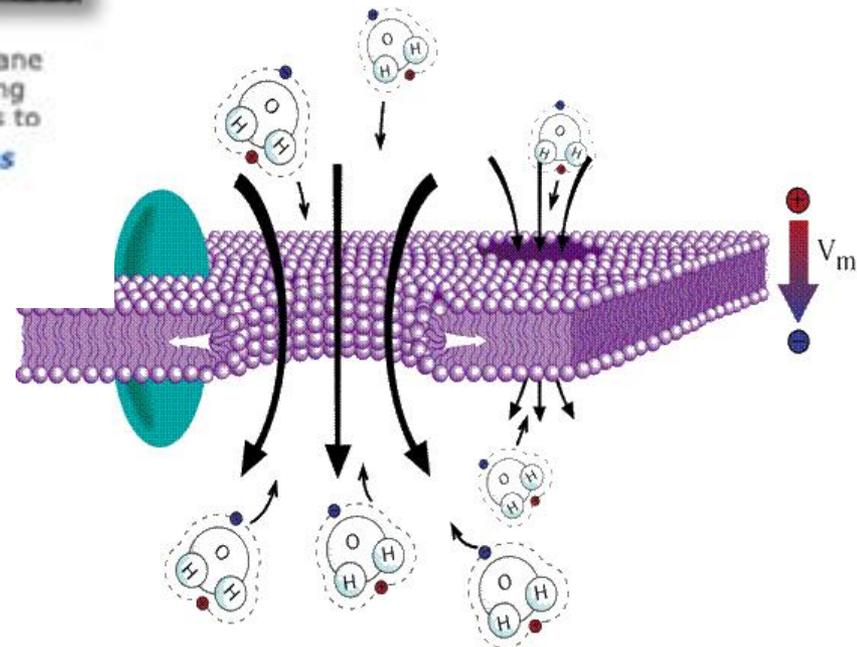


Cell membrane before pulsing

Cell membrane during pulsing

Cell membrane after pulsing (cell returns to)

- *Controlled, millisecond electrical pulses induce temporary pores in the cell membrane*
- *Cell membrane reseals and is left unharmed*



Электропорация

- Это физический метод, основанный на создании временных в клеточной мембране с помощью импульсов тока. Сила тока и длительность подбираются экспериментально.
- Электропорация может использоваться для введения генов в поверхностные ткани (кожа, мышцы, некоторые опухоли), иногда даже для внутренних органов.

Ультразвуковая трансфекция

- Клетки подвергают воздействию ультразвука, образуются микропузырьки в жидкости и клеточной мембране. Процесс называется кавитацией.
- Временное образование пузырьков приводит к проникновению ДНК через мембрану в цитоплазму. Метод можно использовать как *in vivo*, так и *in vitro*, в частности с плазмидной ДНК, остающейся интактной.

Трансгенные эксперименты на человеке запрещены

- Генотерапия основана на введении нормальной копии гена в соматические клетки
- костного мозга, фибробласты кожи, миобласты, гепатоциты или лимфоциты пациента
- Генная терапия на уровне половых и зародышевых клеток не проводится

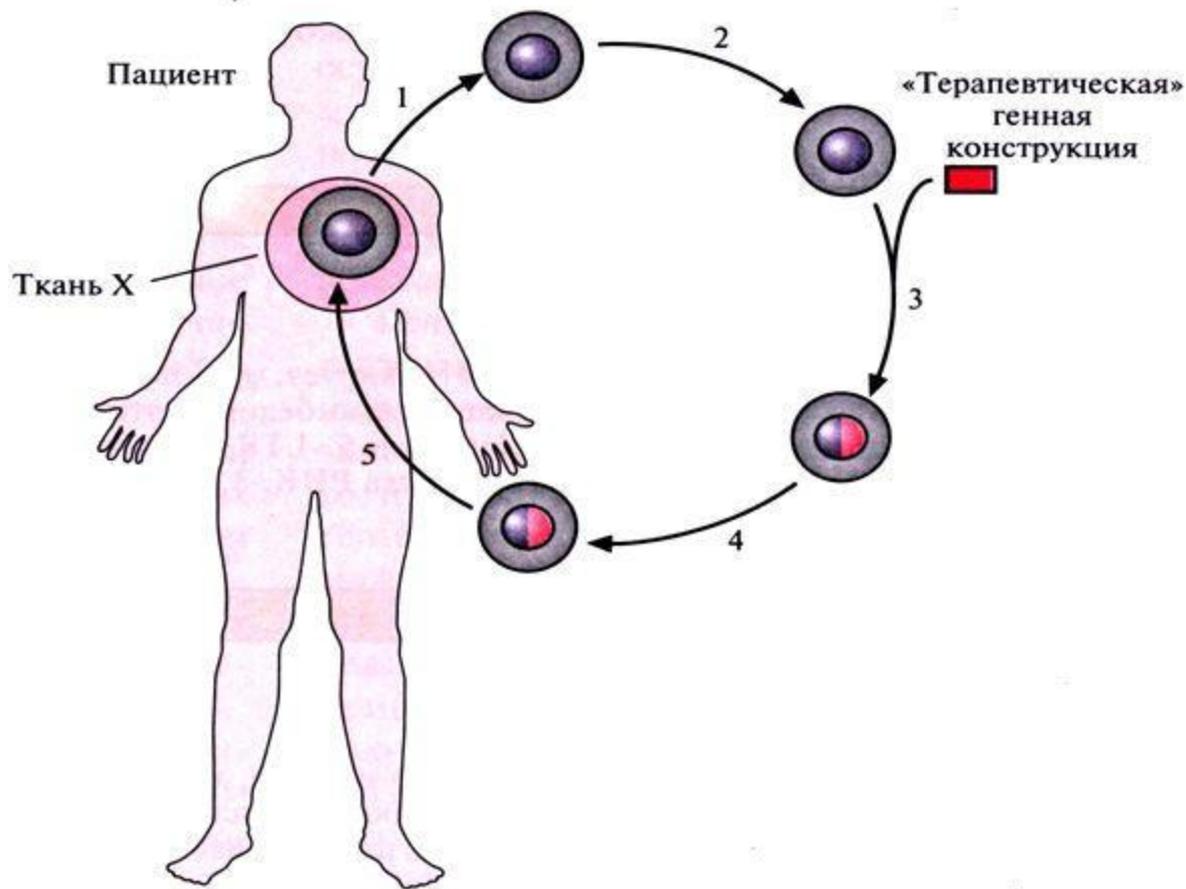
Стволовые клетки – это не дифференцированные клетки в биологической системе, которые при определенных условиях могут дифференцироваться в любой тип клеток, формируя ткани организма.

Типичный пример стволовых клеток – это клетки эмбриона на ранней стадии развития. Стволовые клетки встречаются и у взрослых особей, но количество их с возрастом все более уменьшается.

Стволовые клетки можно культивировать в питательных средах, размножать, проводить с ними генно-инженерные манипуляции (вводить чужеродную ДНК), пересаживать модифицированные клетки в костный мозг (генотерапия)

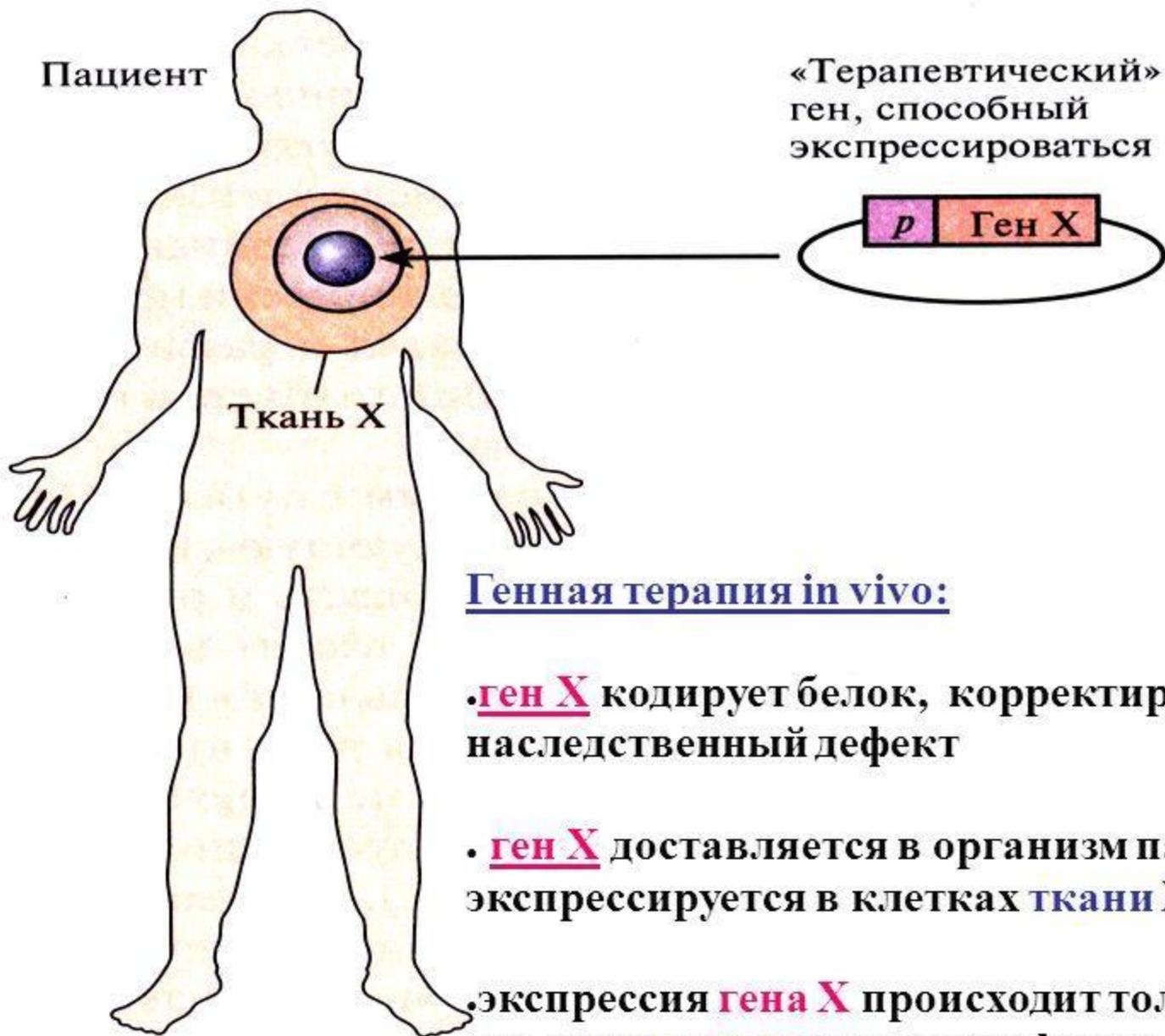
терапевтическая генно-инженерная конструкция содержит

- терапевтический ген для коррекции мутантного гена
- подходящий вектор
- тканеспецифический промотор
- селективный маркер для отбора трансформированных клеток



Генная терапия ex vivo:

1. получение от пациента клеток с генным дефектом
2. перенос “терапевтической” геной конструкции в изолированные клетки;
3. отбор, выращивание и тестирование трансфицированных клеток;
4. трансплантация или трансфузия трансфицированных клеток пациенту



Генная терапия in vivo:

• ген X кодирует белок, корректирующий наследственный дефект

• ген X доставляется в организм пациента и экспрессируется в клетках **ткани X**

• экспрессия **гена X** происходит только в **ткани X**, т.к. **промотор p** тканеспецифичен

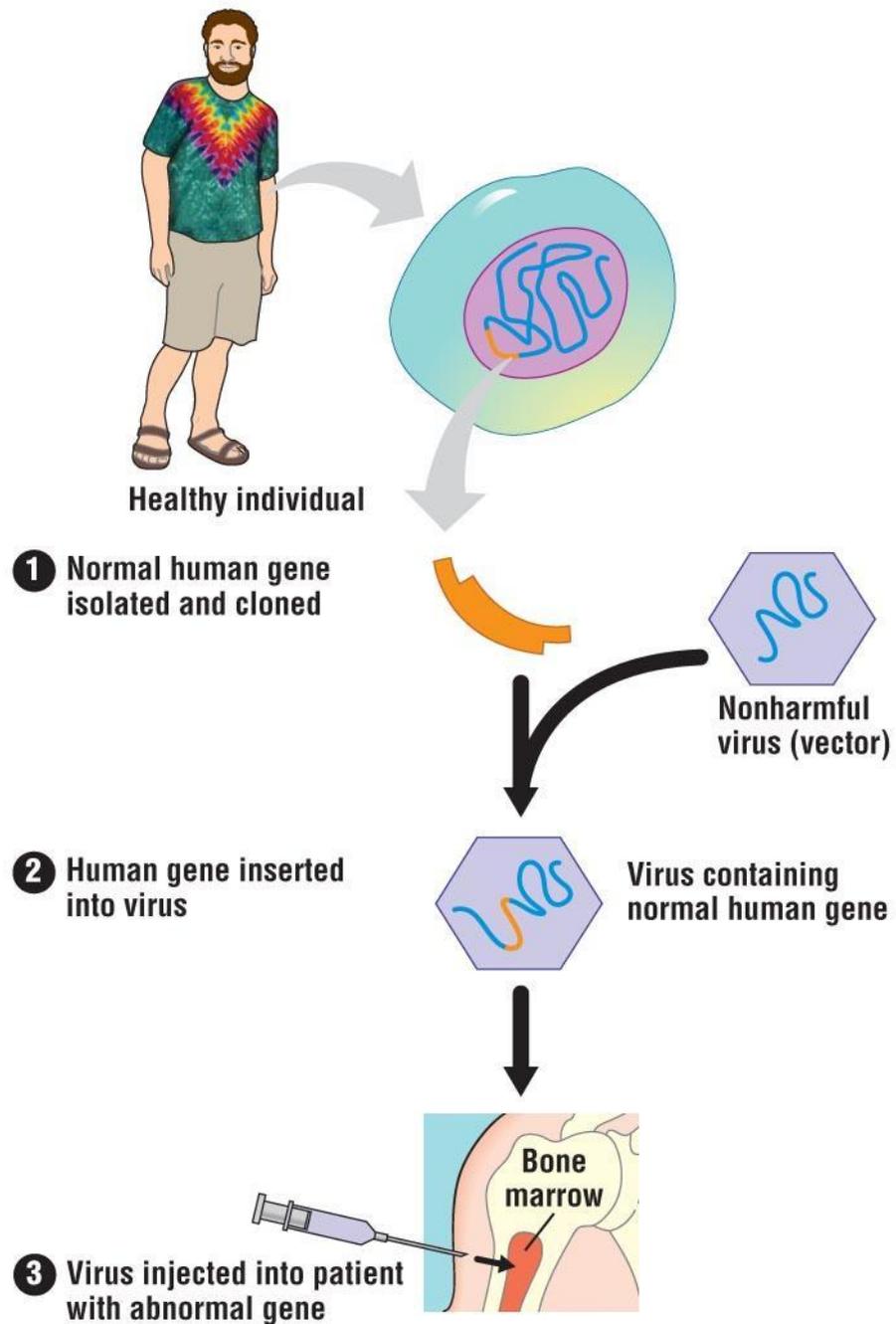


Figure 12.23