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

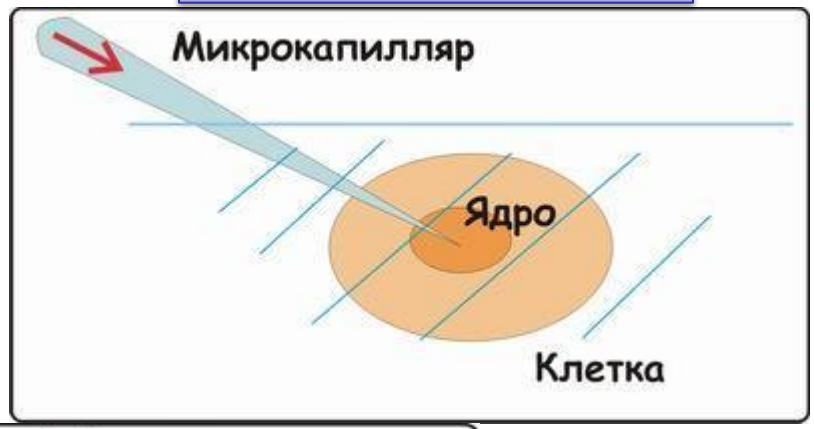
ДНК вводится в клетки с помощью физического воздействия:

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

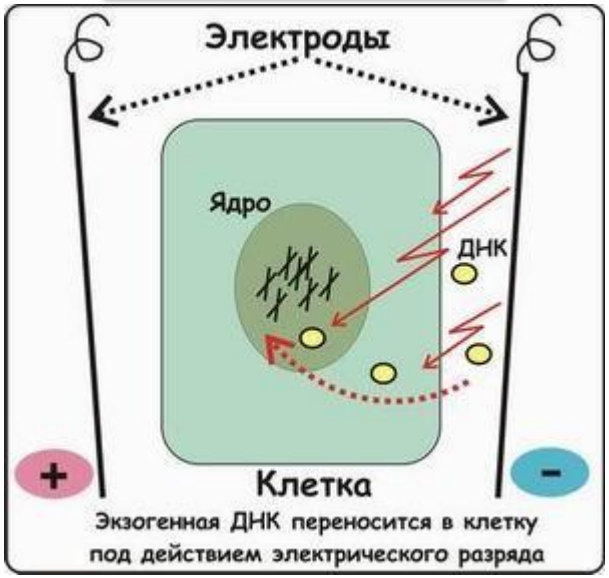
Методы введения rДНК в клетку-реципиент трансформация

(при физиологической некомпетентности)

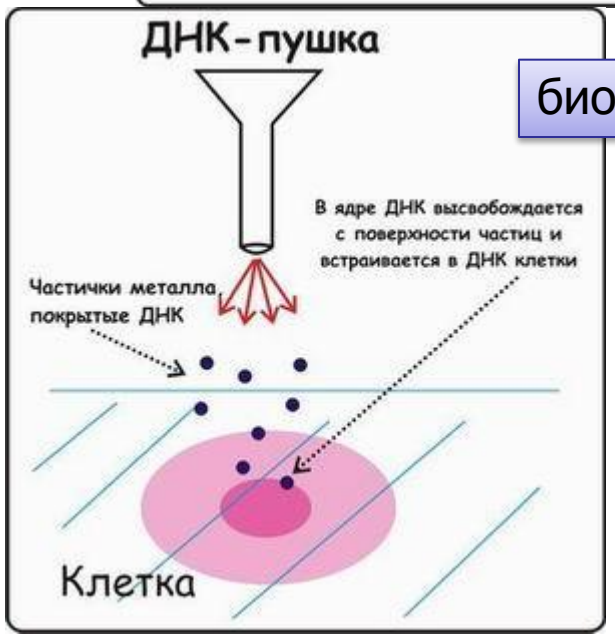
микроиньекция



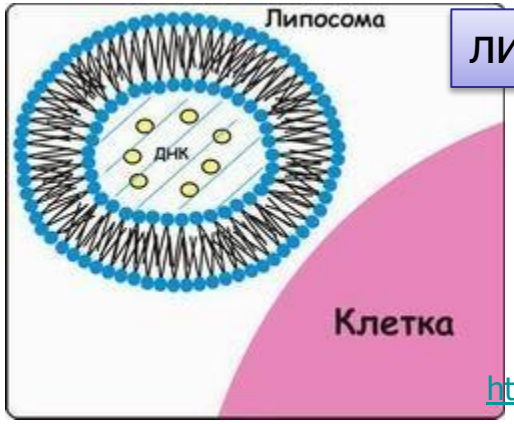
электропорация



биобаллистика

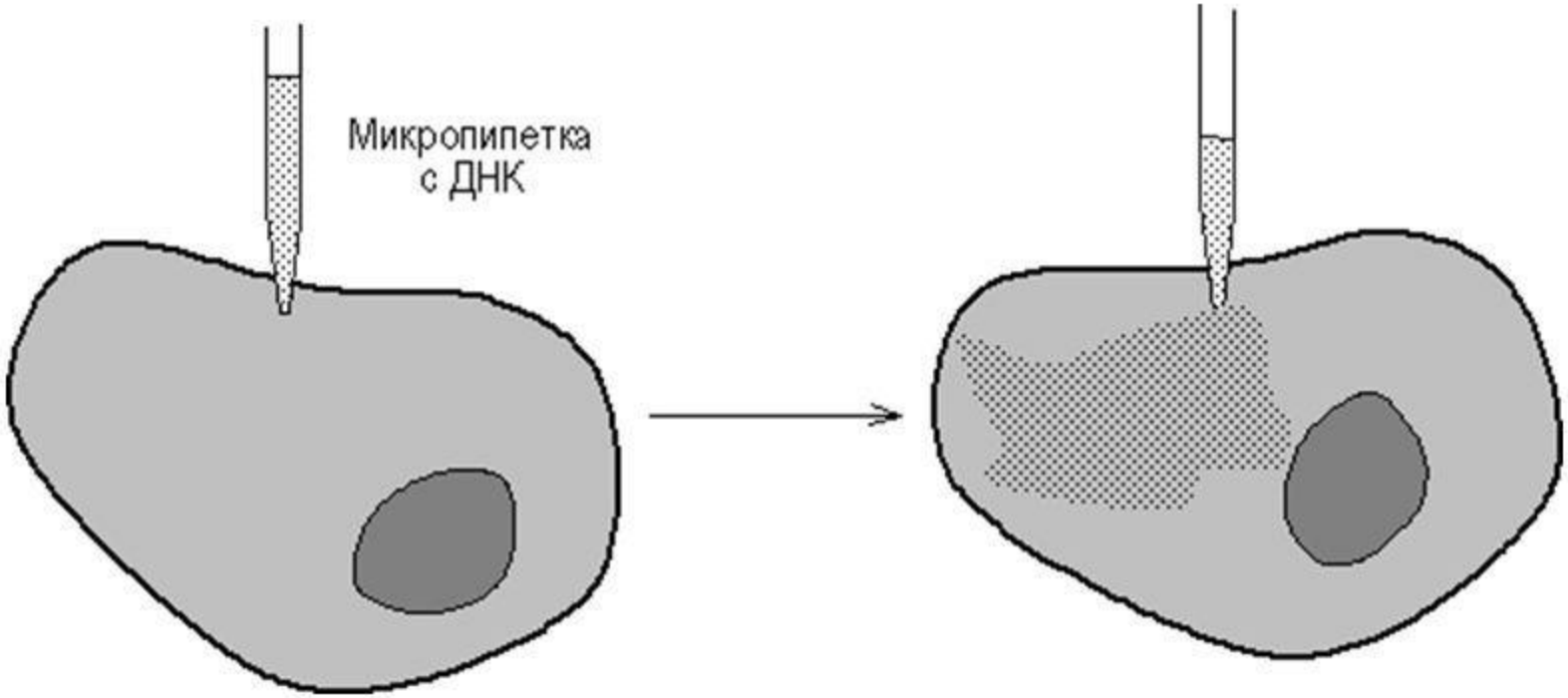


липофекция

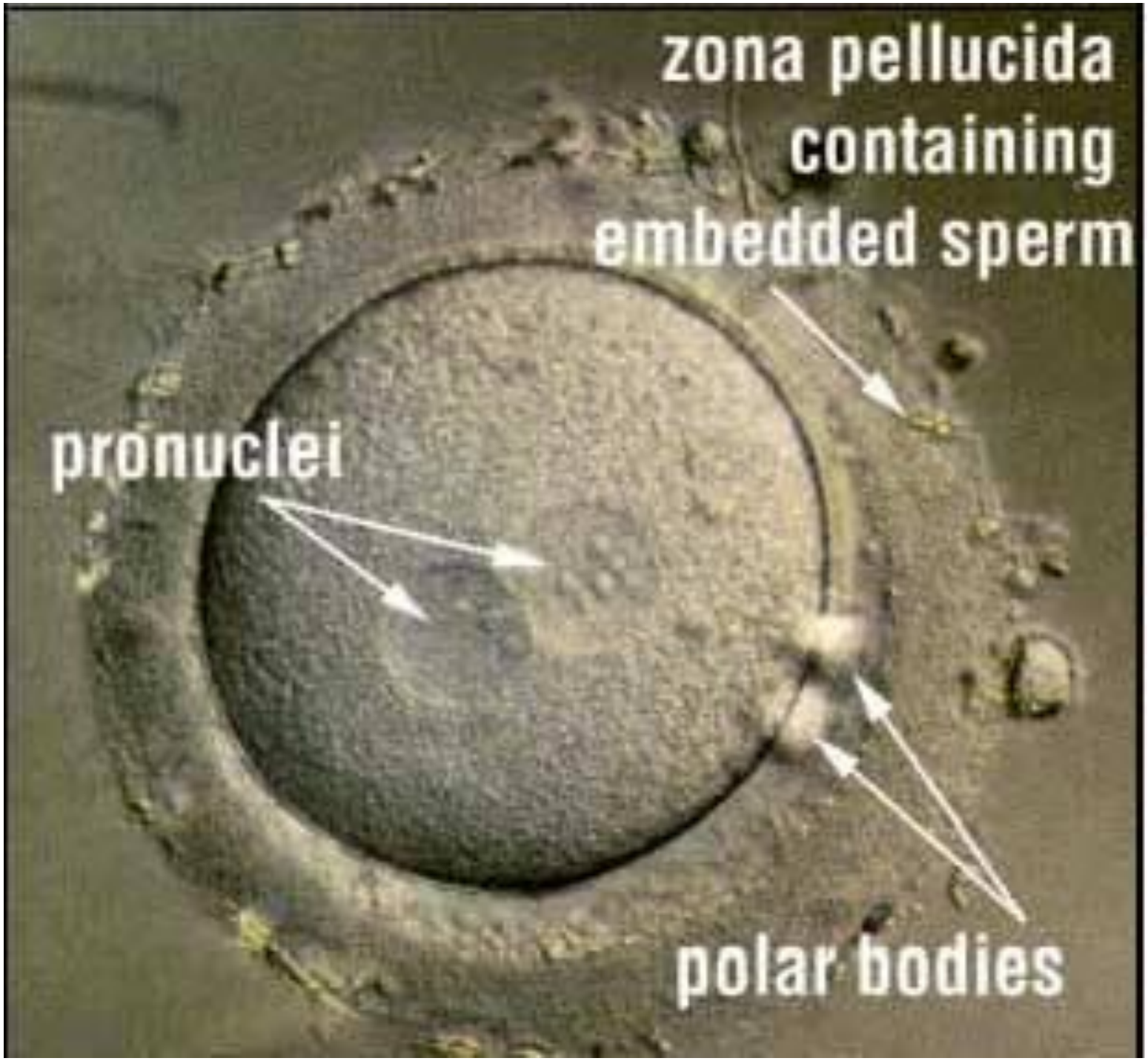


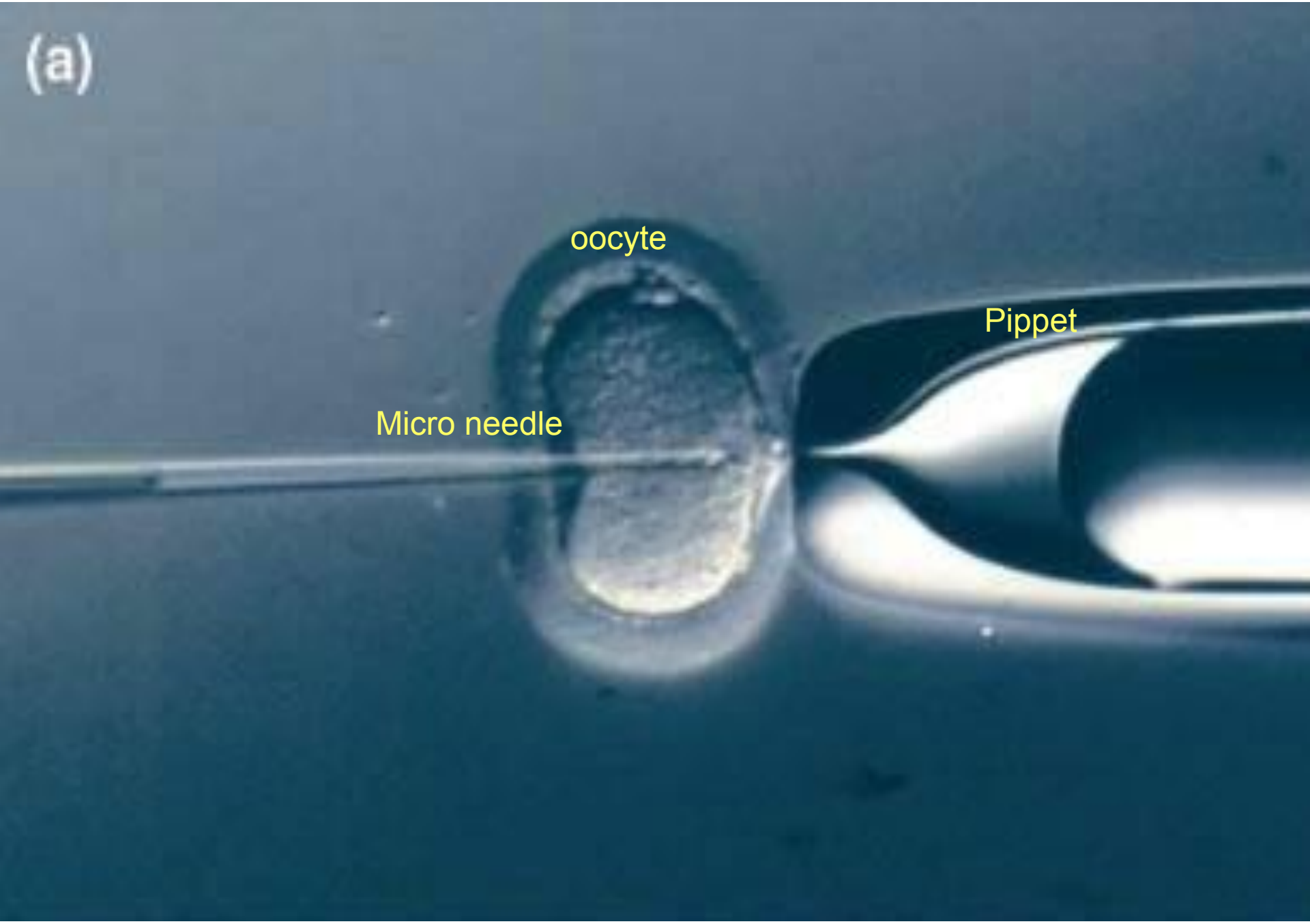
http://rudocs.exdat.com

Микроинъекция ДНК в ткани

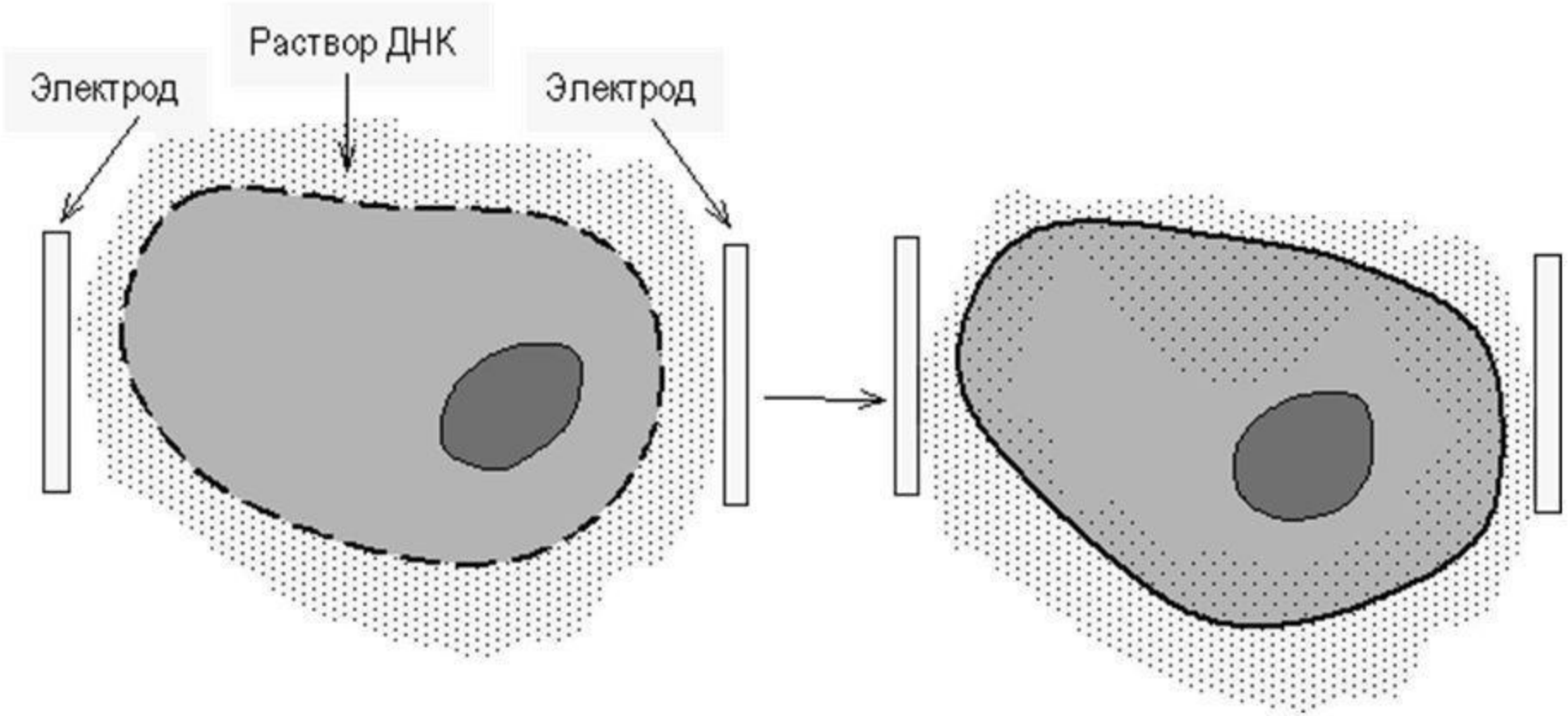


MyShared


zona pellucida
containing
embedded sperm
pronuclei
polar bodies

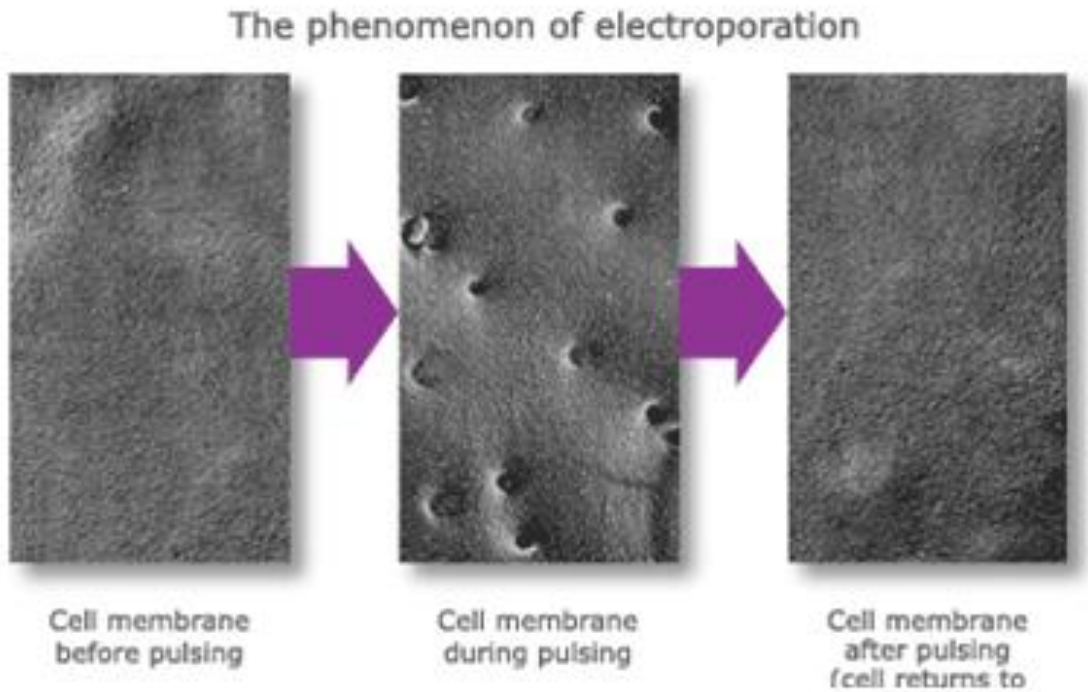

(a)
oocyte
Pippet
Micro needle

Метод электропорации – высокое напряжение увеличивает проницаемость мембраны

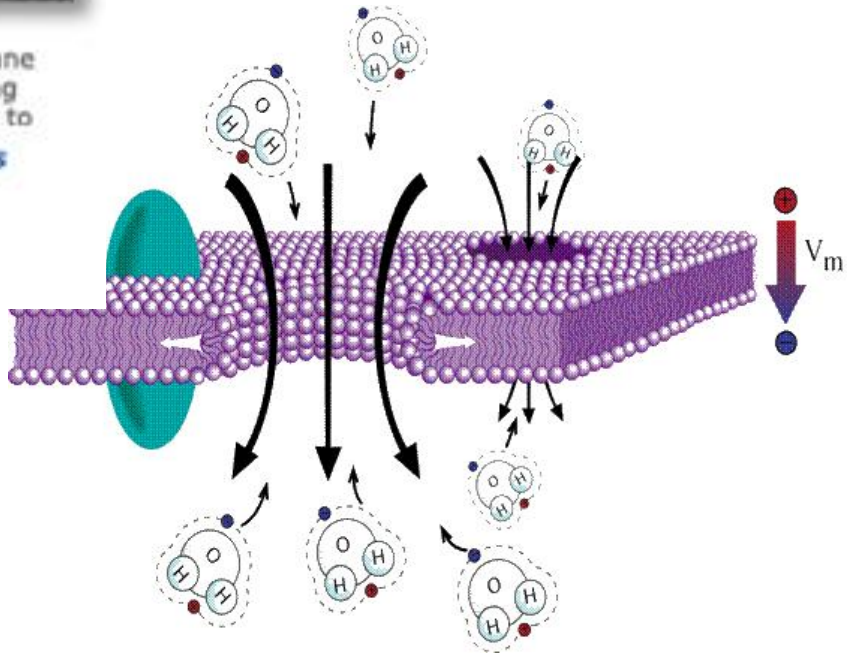


MyShared

Electroporation:



- ***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

MyShared

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

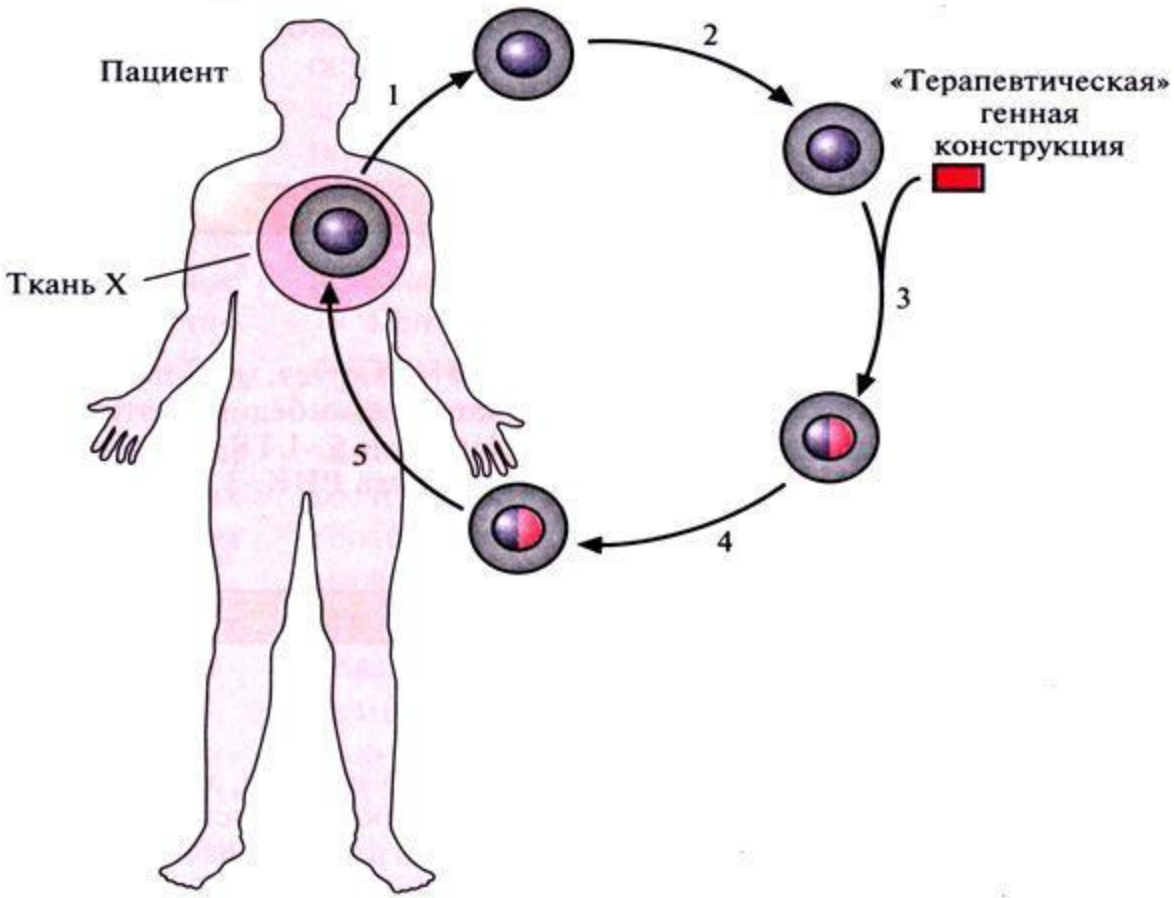
Типичный пример стоволовых клеток – это клетки эмбриона на ранней стадии развития. Стволовые клетки встречаются и у взрослых особей, но количество их с возрастом все более уменьшается.

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

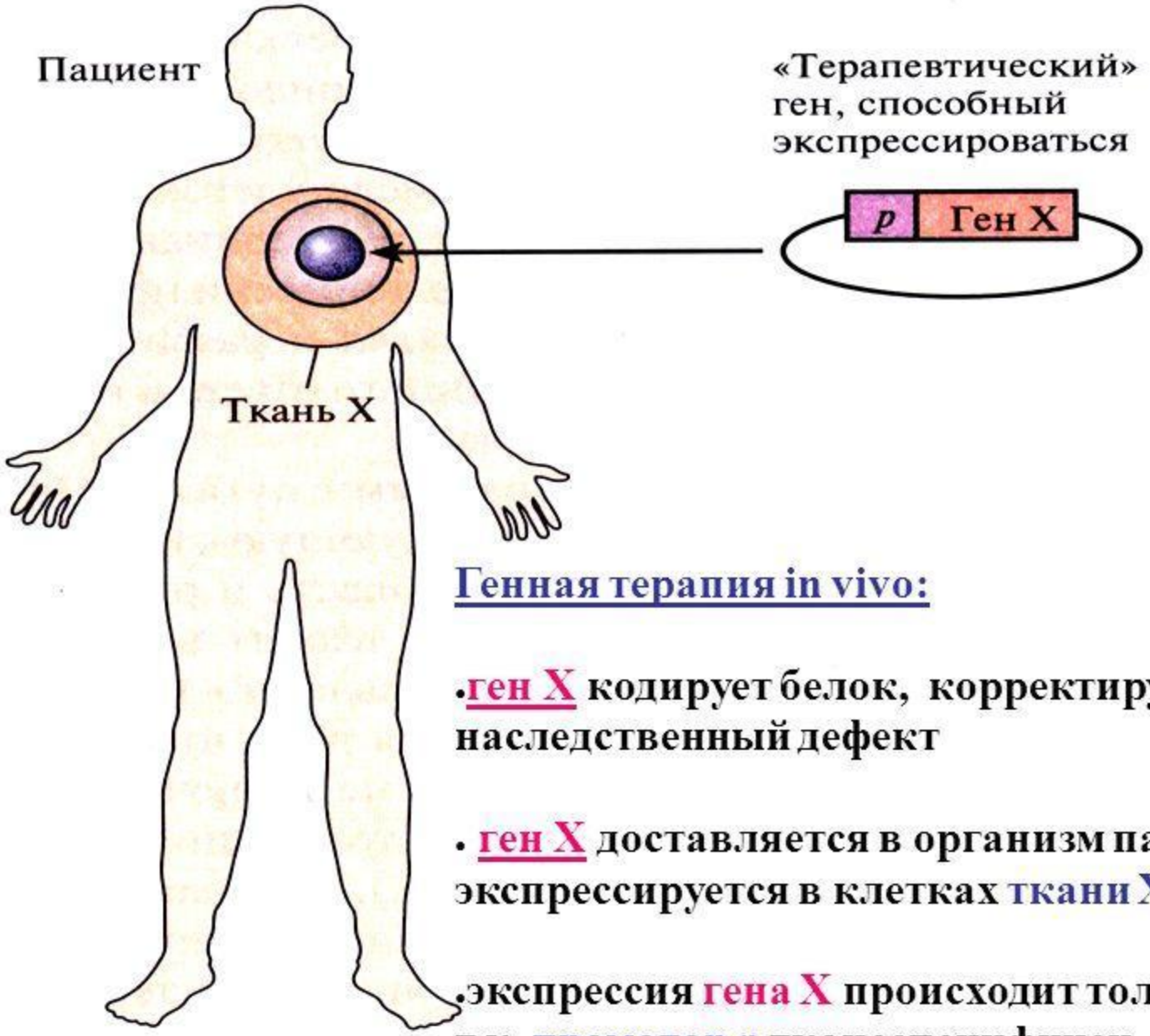
MyShared



Генная терапия ex vivo:

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

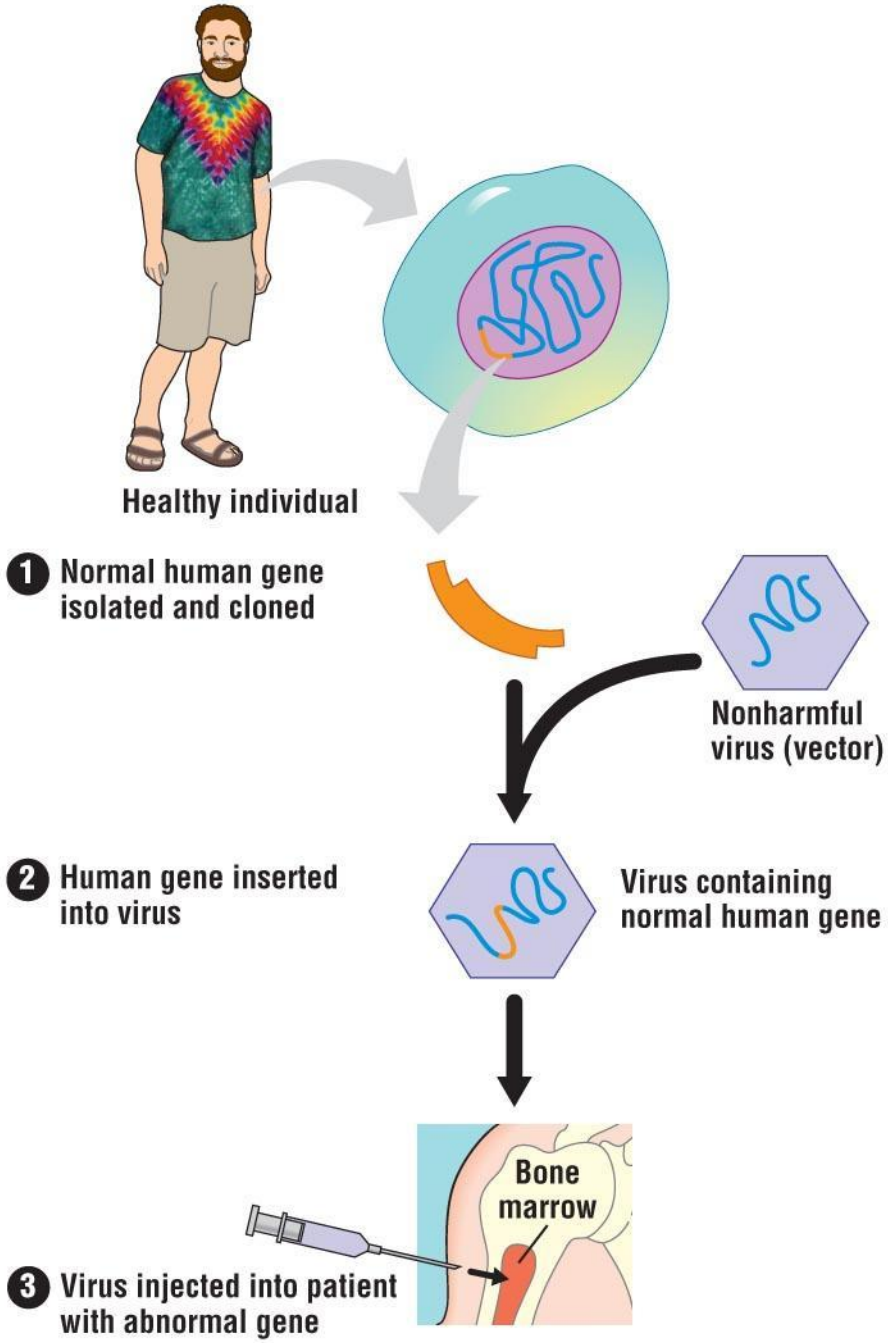
MyShared



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**

MyShared



Copyright © 2007 Pearson Education Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

Figure 12.23