Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение

высшего профессионального образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

**РЕФЕРАТ**

По дисциплине Применение информационно-коммуникационных технологий в науке и образовании

Обзор литературы по теме своего исследования

Преподаватель \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

подпись, дата инициалы, фамилия

Студент \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

номер группы номер зачетной книжки подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2013

СОДЕРЖАНИЕ

[Введение 3](#_Toc374459753)

[1.Получение гибридных белков - гентетический фьюзинг 4](#_Toc374459754)

[2.Люциферазы как метки для иммуноанализа 6](#_Toc374459755)

[Заключение 7](#_Toc374459756)

[Список используемых источников 8](#_Toc374459757)

# Введение

Одной из главных задач современной биотехнологии является конструирование диагностических систем для медицинских нужд. Важнейшей медицинской задачей является своевременное обнаружение инфекций или изменений в содержании важных биологически активных белков или низкомолекулярных соединении в организме. Профилактику и лечение любого заболевания существенно облегчает ранняя и точная диагностика.

Методы иммунодиагностики – это разнообразная группа аналитических методов, используемых в клинических лабораториях. Независимо от области применения и технологий иммунодиагностический анализ включает в себя 4 компонента: антиген, который необходимо обнаружить; антитело, используемое для детекции; метод отделения несвязанных реагентов от комплекса антиген-антитело (в случае гетерогенного анализа); метод обнаружения комплекса антиген-антитело. В течение нескольких лет было разработано огромное количество иммунодиагностических конструкций [[[1]](#endnote-1)]. В целом, эффективность любых методов иммунодиагностики зависит от двух параметров: эффективности образования иммунокомплекса и возможность детекции с наибольшей чувствительностью. Эффективность образования иммунокомплекса обеспечивается специфичностью антитела и его способность аффинно связываться с антигеном. Антитела являются важнейшим компонентом иммуноанализа. Они способны связываться с чрезвычайно разнообразными природными и созданными человеком молекулами, клетками и вирусами; обладают исключительной специфичностью в отношении анализируемого вещества, что позволяет использовать иммуноанализ в комплексных биологических средах (сыворотка, моча и др.); способны прочно связываться, обеспечивая формирование антиген-антитело, который сохраняется при генерации и обработке сигнала.

В наше время применяется огромное количество меток и зависящих от природы этих меток систем обнаружения. Основным требованием для иммуноанализа является достоверное обнаружение метки выше фонового шума.

В радиоиммунологическом анализе (РИА), предложенным Ялоу и Берсоном, в качестве метки применяют радиоактивные изотопы. Радиоиммунологический анализ широко применяется в клинической биохимии. Однако РИА обладает определенными недостатками. К ним относятся: а) сравнительно короткий период полураспада изотопов, испускающих γ-кванты; б) опасность для здоровья персонала при проведении введения изотопных меток, подготовки и выполнении анализов; в) повреждение структуры меченых молекул, вызываемое излучением; г) необходимость отделения меченых и немеченых антигенов, связавшихся с антителами, от свободных антигенов и д) обусловленная этим трудность автоматизации РИА.

С середины 20-го века интенсивно развиваются методы неизотопного иммуноанализа. Среди них едва ли не самое широкое распространение получили иммуноферментные системы, в которых роль метки играют различные ферменты, катализирующие какую-либо химическую реакцию, что приводит к образованию продукта, обладающего каким-либо визуальным признаком (цвет, свет).

# 1.Получение гибридных белков - генетический фьюзинг

Получение меток осуществляют двумя способами: 1) химическое коньюгирование биоспецифической молекулы с молекулой-репортером; 2) с помощью генетического фьюзинга. Во втором случае при экспрессии белка необходимо обеспечить его правильный фолдинг, что позволяет получить целевой белок с правильной структурой (биологически-активной конформацией).

В случае генетического фьюзинга конструируют ген химерного белка, в котором в одной рамке считывания находятся гены, кодирующие биоспецифический белок и ген, кодирующий репортерный белок. Полученный химерный белок синтезируется рекомбинантными бактериальными клетками и обладает двумя функциями – способностью аффинно связывать антиген и при добавлении субстрата люциферазы генерировать кванты света.

Так, например, Zheng-jie Huang с соавторами [[[2]](#endnote-2)] был получен гибридный белок (RGD)3-tTF, состоящий из (RGD)3 (биоспецифическая часть) нацеленной на 𝛼V𝛽 интегрин рецептор опухолевых сосудов и tTF часть, ответственная за активацию тромбообразования. С помощью этой конструкции был получен рекомбинантный белок, который авторы исследовали в противораковой терапии.

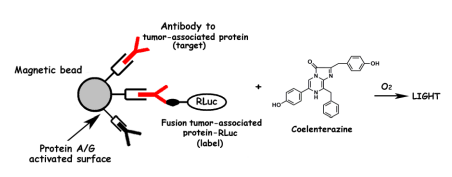
В поисках и разработках вакцин против гриппа также используется метод генетического фьюзинга. С его помощью созданы искусственные гены и рекомбинантные векторы экспрессии, позволяющие получать в клетках *E. coli* гибридные белки, содержащие одну или две копии M2ek пептида вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в иммунодоминантной петле НВс антигена. По мнению авторов полученные гибридные белки, в случае образования ими вирусоподобных частиц, могут стать основой для создания новой рекомбинантной противогриппозной вакцины. [[[3]](#endnote-3)]

В статье Томаса Лист и Дарио Нери проводится обзор иммуноцитокинов (сконструированных с помощью генетического фьюзинга гибридных белков (антитело-цитокин)). Основываясь на доклинических и клинических исследованиях авторы делают вывод о том, что использование иммуноцитокинов потенциально уменьшит токсическое действие за счет направленного действия при терапии онкозаболеваний. [[[4]](#endnote-4)]

Люциферазы также являются перспективным объектом для конструирования гибридных белков. Люциферазы - это белки, одним из продуктов реакций которых является квант света в видимой области спектра, что позволяет их использовать в качестве репортерной части химерного белка. Так, к примеру, был создан гибридный белок состоящий из домена B белка А (способного связываться с IgG) – биоспецифическая часть, и фрагмента Renilla люциферазы – репортерная часть. После экспрессии и очистки авторы проводили иммуноферментный анализ с регистрацией люминесцентного сигнала. По мнению авторов такой метод можно будет использовать для обнаружения различных мишеней, поскольку нековалентное связывание домена люциферазы с доменом В белка А позволяет варьировать биоспецифическую часть химерного белка. Однако, необходимо тщательно подбирать количество антител и соотношение между антителом и гибридным белком. Чрезмерная концентрация в случае антител ведет к ухудшению связывания, а в случае люциферазы – рост фонового шума. [[[5]](#endnote-5)]

2.Люциферазы как метки для иммуноанализа.

За биолюминесценцию многих морских животных - мягких кораллов *Renilla reniformis* и *Renilla muelleri*, рачков *Metridia longa* и *Gaussia princeps*, медузы *Aequorea victoria*, гидроидного полипа *Obelia longissima* и т.д., отвечает большая группа ферментов – люцифераз, катализирующих окисление молекулы одного и того же субстрата – целентеразина. кДНК люцифераз всех перечисленных животных были клонированы и получены их рекомбинантные аналоги. *Renilla* люцифераза (RLuc ) – одноцепочечный полипептид с молекулярной массой около 36 кДа. С помощью генетических модификаций получены аналоги RLuc с существенно улучшенными свойствами: термостабильностью, интенсивность света или цвета [[[6]](#endnote-6), [[7]](#endnote-7)] , что делает их более подходящими в качестве репортеров для любого вида анализа. При химическом коньюгировании с другими молекулами наблюдаются потери активности белка [[[8]](#endnote-8)]. Высокочувствительный биолюминесцентный иммуноанализ был разработан с использованием люциферазы, генетически «сшитой» с антигеном или антителом. На рисунке 1 представлена люциферазная иммунопреципитационная система, разработанная Бурбело с соавторами для обнаружения антител, ответственных за опухолевые белки [[[9]](#endnote-9)], а также ряда инфекционных агентов [[[10]](#endnote-10), [[11]](#endnote-11), [[12]](#endnote-12)] .

Рисунок 1 Люциферазная иммунопреципитационная система.

# Заключение

Таким образом, анализ литературных данных показал перспективность получения и исследования гибридных белков, в частности с использованием *Renilla* люциферазы в качестве репортера в различных областях фундаментальной и прикладной науки. Особо интересным является разработка иммунодиагностических биолюминесцентных систем с применением технологии генетического фьюзинга. Высокая чувствительность, широкий линейный диапазон зависимости люминесценции от концентрации белка, безопасность и простота применения позволяют биолюминесцентным меткам составить серьезную конкуренцию радиоизотопным меткам и ферментативным меткам с колориметрической детекцией.

# Список используемых источников

1. . Immunological biosensors / Gimzewski J.-K., Reed J., Teitell M.-A., Malan P.-G. // The immunoassay handbook. Third edition. Elsevier, Oxford. 2005. P.265-282 [↑](#endnote-ref-1)
2. . Targeting the Vasculature of Colorectal Carcinoma with a Fused Protein of (RGD)3-tTF/Huang Z.-j., Zhao Y., Luo W.-y., You J., Li S.-w., Yi W.-c., Wang S.-y., Yan J.-h., Luo Q. // The ScientificWorld Journal. 2013 [↑](#endnote-ref-2)
3. . Блохина Е.А., Куприянов В.В. Получение рекомбинантного ядерного антигена вируса гепатита В, содержащего внеклеточный домен белка М2 вируса гриппа в районе поверхностной иммунодоминантной петли // Фундаментальные исследования. 2013. С.1456-1460 [↑](#endnote-ref-3)
4. . Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy / List T., Neri D. // Clinical Pharmacology: Advances and Applications. 2013. P. 29-45 [↑](#endnote-ref-4)
5. . Development of a homogeneous immunoassay system using protein A fusion fragmented Renilla luciferase / Mie M., Thuy N. P. B., Kobatake E. // Analyst. 2012. P.1085-1089 [↑](#endnote-ref-5)
6. . Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output / Loening A.M., Fenn T.D., Wu A.M., Gambhir S.S. // Protein Engineering, Design and Selection 19(9) . 2006. P. 391-400 [↑](#endnote-ref-6)
7. . Coelenterazine-v ligated to Ca2+- triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red- shifted mutant of Renilla muelleri luciferase / Stepanyuk GA, Unch J, Markova SV et al // Anal Bioanal Chem 398. 2010. P.1809-1817 [↑](#endnote-ref-7)
8. . Bioluminescent reporters for identification of gene allelic variants / Krasitskaya V.V., Burakova L.P., Pyshnaya I.A., Frank L.A. // Rus J Bioorg Chem 38(3). 2012. P.298-305 [↑](#endnote-ref-8)
9. . A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian-produced Renilla luciferase-antigen fusion proteins / Burbelo P.D., Goldman R., Mattson T.L. // BMC Biotechnol 5(22). 2005. P. 692 – 699 [↑](#endnote-ref-9)
10. . Rapid antibody quantification and generation of whole proteome antibody response profiles using LIPS (luciferase im- munoprecipitation systems) / Burbelo P.D., Ching K.H., Mattson T.L. et al // Biochem Biophys Res Commun 352. 2007. P. 889 – 895 [↑](#endnote-ref-10)
11. . A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of Strongyloides ster- coralis infection / Ramanathan R., Burbelo P., Groot S. et al // J Infect Dis 198. 2008. P. 444 – 451 [↑](#endnote-ref-11)
12. . Rapid, simple, quantitative and highly sensitive antibody detection for lyme disease / Burbelo P.D., Issa A.T., Ching K.H. et al // Clin vaccine immunol 17(6). 2010. P. 904 - 909 [↑](#endnote-ref-12)