

Практические занятия по генной инженерии и иммунохимии.

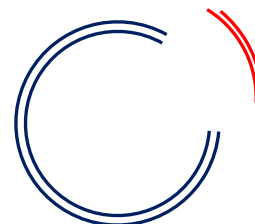
Вопросы к экзамену по теме «Бактериальная экспрессия рекомбинантных белков»

1. Поставлена задача получить рекомбинантный белок с молекулярной массой 30 кДа. Известно, что в структуре этого белка есть две дисульфидные связи, и он не подвергается в клетке посттрансляционным модификациям. Какую систему (или системы) для его экспрессии стоит выбрать и почему?
2. Поставлена задача получить рекомбинантный белок с молекулярной массой 80 кДа. Известно, что в структуре этого белка нет дисульфидных связей, однако, в клетке он подвергается O-гликозилированию. Какую экспрессионную систему стоит выбрать и почему?
3. При анализе экспрессии методом белкового электрофореза целевой белок обнаруживался не только в пробах после индукции, но и в пробах до индукции (в меньшем количестве). С чем это может быть связано?
4. Как можно изменить условия экспрессии целевого белка, который в стандартных условиях экспрессии (3 часа, 37°C) получается в нерастворимой форме (в виде телец включения)?
5. Транслируемый белок содержит на N-конце сигнал последовательность PelB – сигнал для экспорта в периплазматическое пространство. Детекция целевого белка методом Вестерн-блоттинга в пробах после индукции показала наличие двух полос с близкой молекулярной массой. С чем это может быть связано, какова предполагаемая природа этих полос?
6. Какие существуют способы увеличения выхода экспрессии целевого белка?
7. Если целевой белок получается в нерастворимой форме (оптимизация условий экспрессии ничего не дала), существуют ли способы «возврата» его нативной структуры?
8. Что означают аббревиатуры **pLysS** (или **pLysE**) в названиях экспрессионных штаммов *E. coli*. В чем преимущества подобных штаммов?
9. Экспрессионные штаммы *E. coli* **Rosetta(DE3)pLysS**, **Origami(DE3)pLysS** – в чем их отличительные особенности? В каких случаях оправданно использование этих штаммов вместо стандартного варианта **BL21(DE3)pLysS**?
10. Какие существуют способы разрушения (лизиса) бактериальных клеток?
11. Зачем перед индукцией осуществляют подрачивание культуры *E. coli*, засевая большой объем свежей среды небольшим объемом «ночной» культуры? Почему нецелесообразно индуцировать продукцию рекомбинантного белка сразу в большом объеме «ночной» культуры?

Вопросы к экзамену по теме «Молекулярное клонирование»

1. Назовите три (любых, их много...) преимущества, которые дает в работе использование рекомбинантных белков по сравнению с нативными белками.

2. Необходимо клонировать вставку с «липкими» концами в линейизованный вектор, с «тупыми» концами (см. рис.). Как это сделать? Какие варианты подготовки вставки к клонированию Вы можете предложить?



3. Что такое **изошизомеры**? Могут ли быть лигированы - без предварительной обработки - два конца ДНК, образовавшихся в результате обработки двумя разными эндонуклеазами рестрикции, НЕ являющимися изошизомерами? Если да, то при каком условии (можно назвать несколько ☺)?

4. Что является необходимым (и отсутствующим в реакционных буферах эндонуклеаз рестрикции) компонентом реакционного буфера T4 ДНК-лигазы?

5. Что такое **“звездная активность”** (*star activity*) эндонуклеаз рестрикции? При каких условиях она может проявляться?

6. Что такое **система модификации-рестрикции**? Каково её назначение?

7. В каких случаях при клонировании оправдано использование **dam- / dcm-** штаммов *E.coli*?

8. В некоторых случаях вектор перед лигированием обрабатывают ферментом **фосфатазой**. Какие преимущества при последующем лигировании может давать подобная обработка?

9. Необходимо обработать фрагмент ДНК двумя разными эндонуклеазами рестрикции:

	Активность 2-х ферментов в различных буферах, %					
	B (blue) 1X	G (green) 1X	O (orange) 1X	R (red) 1X	Tango (yellow) 1X	Tango (yellow) 2X
Фермент А	0-20	0-20	20-50	100	20-50	100
Фермент В	100	50-100	20-50	0-20	100	0-20

Можно ли провести обе реакции в одной пробирке? Если да, то какие варианты Вы можете предложить?

10. Вам необходимо экспрессировать человеческий белок массой 60 кДа. В организме человека данный белок гликозилирован. Какую экспрессионную систему – *E. coli* или культуру клеток **млекопитающих** – Вы выберете, чтобы получить белок, максимально приближенный по характеристикам к нативному белку, и почему?

11. Что такое **кодонная оптимизация** гена? В каких случаях она необходима?

12. Что является лимитирующим фактором при выращивании культуры *E. coli* в колбах в термостатируемой качалке?

13. Каковы плюсы и минусы формирования телец включения при экспрессии рекомбинантного белка в *E. coli*? Можно ли как-то бороться с этим процессом?

14. Что такое шаттл-вектор (челночный вектор)?

15. Зачем в культуральные среды добавляют антибиотики? Гарантирует ли это отсутствие роста в культуре нежелательных организмов?

16. Какая энзиматическая активность (5'→3' экзонуклеазная, 5'→3' полимеразная, 3'→5' экзонуклеазная) позволяет производить «**тупление**» **5'** - **выступающих** концов ДНК?

17. Какая энзиматическая активность (5'→3' экзонуклеазная, 5'→3' полимеразная, 3'→5' экзонуклеазная) позволяет производить «**тупление**» **3'** - **выступающих** концов ДНК?

18. Каждый цикл ПЦР состоит из трех стадий: **плавления, отжига и синтеза**, определяющими параметрами каждого из этих этапов являются *i)* **длительность** *ii)* **температура**; значения каждого параметров выбираются в зависимости от характеристик амплифицируемого фрагмента ДНК.

Какой параметр и в какой стадии определяются:

1. **GC – составом** областей, в которых отжигаются праймеры?

2. **Длиной** амплифицируемого фрагмента ДНК?

19. Каковы достоинства и недостатки *i)* **внутриклеточной** локализации экспрессированного рекомбинантного белка *ii)* **секреции** рекомбинантного белка в культуральную среду?

20. Что такое полилинкер (multicloning site, сайт поликлонирования), что в нем находится?

Вопросы к экзамену по теме «Практическая иммунохимия»

1. Определение предмета «Иммунохимия». Что изучает эта наука (объекты, инструменты и предмет исследования)?
2. Основные понятия: антиген, антитело, эпитоп, паратоп. Типы эпитопов и их многообразие. Понятия специфичности, аффинности, avidности.
3. Иммуноглобулины. Строение молекулы иммуноглобулина. Основные функции антител.
4. Антитела человека и других животных. Сходства и различия. Классы и изотипы антител млекопитающих. Особенности строения и функционирования.
5. Взаимодействие антигена и антитела. Специфичность антител. Какие модификации белков и как могут влиять на взаимодействие антитела с антигеном.
6. Схема строения паратопа: переменные и гиперпеременные участки молекулы. Как они формируются. Механизм взаимодействия антигена и антитела.
7. Иммуногенность антигенов разной природы (белки, пептиды, углеводы). Гаптены и особенности получения иммунного ответа на них. Адьюванты: их типы и роль в развитии иммунного ответа.
8. Варианты введения антигена в организм с целью генерации иммунного ответа. Способы иммунизаций и особенности иммунного ответа при разных видах иммунизаций. ДНК иммунизация.
9. Динамика развития иммунного ответа при введении чужеродного антигена. Смена генераций антител.
10. Моноклональные и поликлональные антитела. Способы получения. Применение в диагностических целях. Преимущества и недостатки.
11. Метод получения иммортализованных продуцентов моноклональных антител. Гибридизация. Основные принципы метода. Селекция продуцентов моноклональных антител.
12. Рекомбинантные антитела. Способы получения. Применение в диагностике. Преимущества и недостатки.
13. Получение антител методом дисплея. Типы дисплеев. Принцип фагового дисплея.
14. Получение промышленных количеств антител. Продукция антител *in vivo* и *in vitro*. Основные преимущества и недостатки того и другого метода. Производство антител в биореакторах. Типы биореакторов.
15. Очистка антител. Основные методы очистки. Виды носителей. Белки A, G, L. Особенности связывания с разными классами и изотипами антител.
16. Буферные системы, применяемые в иммунохимии.

17. Практическое использование антител. Терапевтические и диагностические антитела. Требования к свойствам антител в зависимости от целей применения.
18. Антитела как инструмент для детекции антигена. В каких приложениях можно применять антитела? Выявление комплекса антиген-антитело.
19. Конъюгирование антител с метками. Типы меток. Системы амплификации сигнала. Основные приемы. Какими способами можно увеличить чувствительность тест-системы в целом?
20. Иммуный анализ. Основные принципы. ИФА и его разновидности. Анализ «сэндвич»-типа. Одно-, дву- и трех стадийный «сэндвич»-анализ. Сравнение прочих видов ИФА с «сэндвич»-анализом. Влияние условий проведения ИФА (температура, время, концентрации действующих веществ) на результаты определения антигена.
21. Основные особенности иммуноферментного анализа (ELISA). Понятия титра и рабочего разведения антител. Hook-effect: как он возникает, и как его избежать. Особенности детекции олигомеров с помощью антител.
22. Вестерн блоттинг. Различные варианты переноса и определения антигена. Типы мембран. Преимущества и недостатки. Сравнение чувствительности метода с прочими методами иммунодетекции антигенов. Способы выявления комплекса антиген-антитело на мембране. Типы используемых меток. Типы субстратов.
23. Использование антител для выделения антигенов из белковых смесей. Аффинная хроматография. Способы приготовления аффинных носителей.
24. Иммунохроматография и иммунопреципитация как два способа выделения антигенов или антител. Преимущества и недостатки. Прямая преципитация и коиммунопреципитация. Для каких целей какой метод является наиболее подходящим?
25. Выделение антигенов из многокомпонентных смесей. Аффинные носители, их свойства, основные требования к ним.
26. Белковые таги. Типы тагов. Влияние тагов на экспрессию белков. Использование тагов для очистки рекомбинантных белков.
27. Иммунохроматография (Lateral flow). Принцип метода. Типы меток.
28. Турбидиметрия и нефелометрия как количественные методы определения антигена в больших концентрациях. Сравнение с иммунохроматографией.
29. Использование антител для изучения белков *in vivo*. Какие метки используются? Флуоресцентные красители, их многообразие и особенности применения. Изучение колокализации белков с помощью меченых антител. Метод FRET.
30. Применение антител в иммуноцит- и гистохимии. Способы фиксации клеток и тканей. Типы используемых меток.
31. Эпитопное картирование. Принцип метода.

32. Использование антител в клинической практике для диагностики заболеваний. Что нужно учитывать при создании диагностических систем. Какие факторы могут влиять на определение антигена антителами?
33. Терапевтические антитела. Особенности получения и применения.
34. Химерные, гуманизированные и полностью человеческие антитела. Особенности строения, способы создания и область применения.