

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Кафедра молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

По теме: Метод гибридизации соматических клеток.

Подготовил:

Студент 3 курса 301 группы

По направлению «Биология»

Соколова Анастасия Витальевна

Волгоград

2021

Гибридизация соматических клеток — это метод, основанный на том, что соматические клетки животных способны к гибридизации, при которой образуются гибриды клеток, в ядрах которых содержится набор хромосом обеих сходных клеточных линий, т. е. гибриды являются полиплоидами. В процессе роста гибриды могут терять отдельные хромосомы. Для гибридов, полученных из скрещиваний соматических клеток человека с соматическими клетками млекопитающих, характерно то, что преимущественно теряются человеческие хромосомы. Следовательно, наблюдение одновременной потери той или иной хромосомы и признака указывают на локализацию гена, контролирующего признак в данной хромосоме. В исходных скрещиваниях можно использовать также клетки человека с частично удаленными из них хромосомами. Метод имеет ограничения, определяемые невозможностью экспрессии чужеродных генов в гибридах.

Тот факт, что соматические клетки несут в себе весь объем генетической информации, дает возможность изучать на них генетические закономерности всего организма.

Основу метода составляет культивирование отдельных соматических клеток человека и получение из них клонов, а также их гибридизацию и селекцию.

Соматические клетки обладают рядом особенностей:

- быстро размножаются на питательных средах;
- легко клонируются и дают генетически однородное потомство;
- клоны могут сливаться и давать гибридное потомство;
- легко подвергаются селекции на специальных питательных средах;
- клетки человека хорошо и долго сохраняются при замораживании.

Соматические клетки человека получают из разных органов — кожи, костного мозга, крови, ткани эмбрионов. Однако чаще всего используют клетки соединительной ткани (фибробласты) и лимфоциты крови.

С помощью метода гибридизации соматических клеток:

- а) изучают метаболические процессы в клетке;

- б) выявляют локализацию генов в хромосомах;
- в) исследуют генные мутации;
- г) изучают мутагенную и канцерогенную активность химических веществ.

В 1960 г. было показано, что совместно культивируемые клетки различных линий могут сливаться, образуя гибриды, содержащие геномы обеих родительских форм. Первые такие гибриды были получены при слиянии клеток разных линий мышей. Наряду с внутривидовыми получены и межвидовые гибриды, например, между клетками человека и мыши, мыши и хомячка, мыши и курицы и др. Образование гибридных клеток происходит чаще, если в культуру добавлены некоторые вещества (например, полиэтиленгликоль) или инактивированный вирус Сендай.

При гибридизации соматических клеток двух разных линий образуются гетерокарионы — клетки, которые содержат оба родительских ядра. Затем в результате митоза и деления образуются две одноядерные клетки — синкарионы, имеющие хромосомы обоих родительских клеток.

В течение первых делений гибридной клетки, не ясно почему, происходит потеря хромосом одного из видов. Так, у гибридов мышь-хомячок элиминируются хромосомы мыши. Если присутствие продукта изучаемого гена коррелирует с наличием определенной хромосомы в гибриде, то можно предположить, что этот ген локализован в данной хромосоме.

Потеря хромосом в гибридных клетках мышь — человек происходит случайно

Какая хромосома человека сохранится — предугадать невозможно. Через определенное число поколений в гибридной клетке сохранятся все хромосомы мыши и несколько (в среднем 7) хромосом человека. Однако некоторые клетки могут содержать одну-две пары хромосом, другие — 7, а некоторые — до 20 хромосом человека. Вместе с тем из всей популяции гибридных клеток можно отобрать стабильные клоны (клон — потомство одной клетки),

содержащие конкретные человеческие хромосомы, и провести в них картирование генов.

Гибридные клетки человека и мыши имеют 43 пары хромосом: 23 от человека и 20 от мыши. В дальнейшем происходит элиминация хромосом того вида, клетки которого медленнее размножаются. При этом хромосомы мыши сохраняются, а хромосомы человека утрачиваются.

Функционирующие в гибридных клетках хромосомы синтезируют определенные белки. Фенотипически хромосомы мыши и человека отличаются. Нетрудно определить, какие хромосомы присутствуют в гибриде и выяснить, синтез каких белков связан с данными хромосомами человека. Обычно гибридные клетки теряют хромосомы целиком, поэтому, если какие-либо гены присутствуют или отсутствуют вместе, то они могут быть отнесены к одной хромосоме

Это позволяет картировать хромосомы человека. В ряде случаев для картирования используют хромосомные перестройки, что дает возможность установить локализацию генов в определенном участке хромосомы, определить последовательность их расположения, т. е. построить карты хромосом человека.

В настоящее время выяснено, что в X-хромосоме локализовано 95 генов, в 1-й аутосоме — 24 гена. Ген, определяющий группы крови по системе АВО, расположен в 9-й хромосоме, группы крови по системе MN во 2-й хромосоме, а по системе резус- фактора (Rh) — в 1-й хромосоме.

Использование метода гибридизации соматических клеток дает возможность изучать механизмы первичного действия генов и их взаимодействия, что расширяет возможности точной диагностики наследственных болезней на биохимическом уровне.

Использование новых методов и подходов к картированию хромосом позволило обнаружить в геноме человека сверхизменчивые участки ДНК (минисателлиты), характерные для каждого человека. Одновременно были

выделены последовательности ДНК, изменяющиеся с повышенной частотой. Они локализованы по всему геному и имеют разное число копий

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. На формирование колоний протопластами влияет состав питательной среды. Дальнейшая задача - получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Пока не удалось получить регенеранты из протопластов многих злаковых (пшеницы, ячменя). Однако успешно осуществляется регенерация из протопластов пасленовых (табак, картофель, томаты) и других культур.

Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей. При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают энзиматической обработке пектиназой и целлюлозой (Приложение 2).

Слияние изолированных протопластов может происходить спонтанно, но довольно редко. Индуцированное слияние изолированных протопластов впервые было получено в лаборатории Коккинга в 1970 г. его сотрудниками Пауэром и др. В качестве индуктора они использовали нитрат натрия. Но этот метод оказался малоэффективным, и сейчас найдены другие индукторы слияния. Наиболее эффективными из них оказались растворы с высоким рН (9-11) и высокой концентрацией ионов кальция (100-300 мМ). Протопласты предварительно агглютинируют с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500-6000. У. Циммерман с сотрудниками. разработали физический метод слияния протопластов животных клеток, липосом, в котором в качестве индуктора использовались импульсы электрического тока.

Слияние протопластов приводит к образованию либо гибрида, либо цибрида. Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро - одного. Это возможно в том случае, если после слияния протопластов не происходит соединения ядер, и одно ядро дегенерирует. Образование цибрида

возможно и в том случае, если один из протопластов лишен ядра или оно инактивировано путем облучения.

Цибридизация позволяет ввести цитоплазматические гены, несущие признаки ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности), устойчивости к некоторым гербицидам и патогенам.

Первый неполовой межвидовой гибрид высших растений получен в 1972 г. путем слияния изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *N. Langsdorffii*.

В настоящее время методом парасексуальной гибридизации получено большое число межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов. Однако во многих случаях гибридные растения, полученные таким путем, в той или иной степени ненормальны. Примером может служить соматический гибрид между арабидопсисом и турнепсом, который является растением-монстром. Возникающие аномалии являются результатом хромосомной несбалансированности (Ю.Ю. Глеба, 1982).

Особый интерес представляют межцарственные клеточные гибриды, полученные от слияния протопластов растительных и животных клеток. Описаны гибриды между протопластами эритроцитов крысы и протопластами дрожжевых клеток, между протопластами моркови и человека, табака и человека и др.

При соматической гибридизации эксперимент строится аналогично опытам по генетике микроорганизмов. Иными словами, используются большие популяции клеток обоих родителей. При обработке смешанной суспензии протопластов фьюзогенами часть из них сливается друг с другом, но в суспензии остаются и неслившиеся протопласты. Все они, включая гибридные, в дальнейшем регенерируют клеточные стенки и переходят к делениям. Возникает задача - выделить из общей массы гибридные экземпляры. Селекция гибридов может применяться либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации и осуществляется несколькими методами.

Для идентификации гибридов могут служить пластиды. Например, при слиянии протопластов табака и моркови в качестве селективных маркеров использовались зеленые хлоропласты табака и красно-оранжевые хромопласты моркови.

Другим методом, позволяющим производить отбор гибридов, является генетическая комплементация. Этот метод был применен для обнаружения гибридов табака, при этом использовались хлорофиллдефектные мутации у родителей с последующей комплементацией в гибридных продуктах. Сочетание двух ядерных рецессивных мутаций у табака вызывает светозависимую хлорофилльную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. После слияния и регенерации клеточные колонии пересаживают на среду, индуцирующую стеблевой органогенез, и культивируют на свету.

Под методом физиологической комплементации, который также используется для обнаружения соматических гибридов, подразумевают способность гибридных клеток жить и размножаться либо переходить к морфогенезу в условиях культуры, при которых родительские клетки этого делать не в состоянии, причем неспособность родительских клеток не связана с какой-нибудь определенной мутацией, а является нормальной физиологической реакцией клетки на физиологические условия. Например, половые гибриды между *N. glauca* и *N. Langsdorfii* имеют склонность к опухолообразованию, а клетки гибридов в условиях *in vitro* способны расти и размножаться на питательных средах без гормонов. Гормоннезависимость клеток гибрида и была положена в основу метода селекции. После индуцированного слияния протопластов из мезофилла листьев обоих видов табака клетки через некоторое время пересаживали на питательную среду, не содержащую фитогормонов, и отбирали колонии, способные расти в этих условиях. Существуют также другие методы селекции соматических гибридов: смешанная физиологогенетическая комплементация, физическое

обогащение (метод основан на разделении протопластов при центрифугировании в связи с их различной плотностью), механическая изоляция.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, следовательно, в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Уже проведена успешная трансплантация изолированных ядер в протопласты петунии и табака. Вместе с тем поглощение протопластами чужеродных ядер не всегда ведет к образованию гибридов. Кроме ядер в изолированные протопласты удалось трансплантировать чужеродные хлоропласты. Из этих протопластов Карлсон получил растения-регенеранты, содержащие хлоропласты другого организма.

Однако работы по переносу чужеродных органелл и ДНК только начинают развиваться. В целом использование изолированных протопластов в генетической реконструкции клетки, как мы видим, открывает богатые перспективы перед клеточной селекцией.

Список литературы:

1. https://studbooks.net/1418354/meditsina/gibridizatsiya_somaticheskikh_kletok
2. <https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/104/460.htm>
3. <https://ru-ecology.info/page/00053169200791803850005000009924/#:~:text=Термины-Гибридизация%20соматических%20клеток%20—%20это%20метод%20основанный%20на%20том%20что,гибриды%20являются%20полиплоидами>
4. https://studme.org/353163/agropromyshlennost/somaticheskaya_gibridizatsiya
- 5.