**Драницына, Светлана Михайловна.**

## ДНК/РНК-гидролизующий фрагмент фактора дифференцировки 8,2 кДа клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека : Идентификация и свойства : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10. - Москва, 2000. - 152 с. : ил.

## Оглавление диссертациикандидат химических наук Драницына, Светлана Михайловна

ВВЕДЕНИЕ.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ; ИХ РОЛЬ В АПОПТОЗЕ.

1. Проблема белково-нуклеинового узнавания.

1.1. Сайт-специфические ферменты.

1.2. Сайт-неспецифические белки.

2. Исследования молекулярного механизма функционирования нуклеаз.

3. Апоптоз - генетически контролируемая форма клеточной гибели.

4. Роль нуклеаз в апоптозе.

5. Активные формы кислорода (АФК) в апоптозе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Идентификация фрагмента НЕБЕ, потенциально обладающего ДНК/РНК-гидролизующей активностью.

2. Клонирование кДНК Н1ЮР-8 в хорошо экспрессирующий вектор приводит к подавлению его экспрессии.

3. Определение нуклеотид связывающей способности синтезированных пептидов.

4. Исследование механизма нуклеолитической реакции.

5. Влияние Ни)Р-8 на клетки НЬ-60.

6. Использование поликлональных антител против НЬБР и НЬБР-8 в качестве иммуногистохимических маркеров ранних неопластических процессов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Материалы.

2. Методы.

2.1. Приготовление агарозного геля.

2.2. Выделение плазмидной ДНК Е. coli методом щелочного лизиса.

2.3. Рестрикция и картирование фрагментов ДНК.

2.4. Перенос ДНК на мембрану по методу Саузерна.

2.5. Иммобилизация ДНК из Е. coli на нитроцеллюлозных фильтрах.

2.6. Ник-трансляция ДНК.

2.7. Радиоактивное мечение олигодезоксирибонуклеотидных зондов.

2.8. Блот-гибридизация по Саузерну. Гибридизация in situ бактериальных колоний и фаговых бляшек.

2.9. Выделение ДНК из агарозы.

2.10.Лигировани е.

2.11 .Получение компетентных клеток Е. coli.

2.12.Трансформация компетентных клеток Е. coli.

2.13.Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

2.14.0тбор рекомбинантных клонов с помощью ПЦР.

2.15.Определение нуклеотидных последовательностей по методу Сенгера.

2.16.Продукция гибридного белка в клетках Е. coli В834.

2.17Лизис клеток-продуцентов.

2.18.Анализ продуктов экспрессии.

2.19.0пределение JV-концевых аминокислотных последовательностей.

2.20.Получение поликлональных антител.

2.21.Культивирование клеток HL-60.

2.22.0пределение дифференцирующей активности.

2.23.Синтез и очистка пептидов.

2.24.0пределение нуклеазной активности.

2.25.Частичная апуринизация ДНК плазмиды pSp65.

2.26.Спектр поглощения HLDF-8.

2.27.Хроматографический анализ взаимодействия синтетических пептидов с олигонуклеоти дами.

2.28. Введение флуоресцентных меток.

229.N- Концевой аминокислотный анализ.

2.30.Анализ деградации яДНК клеток HL-60 под действием различных индукторов.

2.31.МТТ-тес т.

2.32.0ценка количества клеток, вступивших в апоптоз с помощью проточного цитофлуориметра.

2.33. Прижизненное окрашивание клеток HL-60.

2.34.Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60.

2.35.Трансфекция НЫ)Р в клетки НЬ-60 с помощью унифектина.

2.36.Имуногистохимический анализ среза ткани предстательной железы человека.

ВЫВОДЫ.