

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

***Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова***

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ**

*Учебное пособие*

*Допущено Министерством сельского хозяйства Российской Федерации  
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,  
обучающихся по специальности 110401 – Зоотехния*

Барнаул  
Издательство АГАУ  
2006

УДК 575.(072).

Коростелева Н.И. Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. 127 с.

ISBN 5-94485-085-X

Учебное издание написано в соответствии с программой преподавания курса «Биотехнология в животноводстве» Министерства образования РФ, программой курса по выбору «Применение биотехнологии в народном хозяйстве», а также «Основы биотехнологии» по специальности «Технология производства и переработки с.-х. продукции».

В учебном пособии изложены особенности строения и жизнедеятельности вирусов, прокариот и эукариот; строение и синтез нуклеиновых кислот, синтез белка; синтез генов и их клонирование, введение в вектор и их трансформация в бактерии, животные и растительные клетки. Описаны способы промышленного культивирования микроорганизмов, клеточная инженерия растений, трансплантация эмбрионов, клонирование и химеризация животных.

Кроме краткого изложения теоретического материала учебное пособие включает методические рекомендации по проведению лабораторных работ и семинарских занятий, задачи и вопросы для самоконтроля.

Учебное пособие предназначено для студентов зооинженерного факультета по специальностям 310700 «Зоотехния» и 311200 «Технология производства и переработки продуктов с.-х. производства», а также слушателей факультета заочного и дополнительного образования.

Рекомендовано к изданию методической комиссией зооинженерного факультета АГАУ (протокол № 3 от 28 ноября 2005 г.).

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор Г.Г. Соколова;  
кандидат биологических наук, доцент Л.П. Григорьева;  
кандидат ветеринарных наук, доцент М.Н. Черных.

ISBN 5-94485-085-X

© Коростелева Н.И., Громова Т.В., Жукова И.Г., 2006

© ФГОУ ВПО АГАУ, 2006

© Издательство АГАУ, 2006

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
1. История развития, цель и задачи биотехнологии	6
2. Цитологические основы наследственности.	
Объекты биотехнологии	14
3. Молекулярные основы наследственности	20
4. Методы генетической инженерии	30
4.1. Методы получения генов	30
4.2. Введение гена в вектор и клонирование	34
4.3. Методы трансформации животных и растительных клеток	39
4.4. Скрининг	42
4.5. Экспрессия (функционирование) чужеродных генов в геноме бактерий, растений и животных	43
4.6. Вылавливание генных продуктов из «грязной» смеси	45
5. Способы стерилизации	47
5.1. Общие сведения	47
6. Промышленное культивирование микроорганизмов	51
6.1. Общие сведения	51
6.2. Особенности технологии промышленного культивирования микроорганизмов	52
6.3. Отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними	53
6.4. Приготовление посевной микробной культуры	54
6.5. Приготовление и стерилизация питательных сред	54
6.6. Подготовка биореакторов к посеву и выращивание микроорганизмов	57
6.7. Технология культивирования микроорганизмов в покоем состоянии без аэрации	61
6.8. Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов	61
6.9. Периодические и хемостатные системы культивирования микроорганизмов	62
6.9.1. Периодическое культивирование микроорганизмов	63
6.9.2. Хемостатная культура, или метод непрерывного культивирования микроорганизмов	66
6.10. Особенности биотехнологии культивирования вирусов	67
7. Концентрирование и высушивание биопрепаратов	75

7.1. Методы выделения и концентрирования целевого продукта	76
7.1.1. Осаживание	76
7.1.2. Центрифугирование	76
7.1.3. Фильтрация	77
7.1.4. Экстракция	78
7.1.5. Ионнообмен	78
7.1.6. Кристаллизация	79
7.1.7. Упаривание	79
7.1.8. Мембранные методы разделения	80
7.2. Способы консервирования биологических препаратов	82
7.2.1. Лиофильное высушивание биопрепаратов	83
7.2.2. Конвективный метод высушивания биопрепаратов	84
7.2.3. Контактный метод высушивания	85
7.2.4. Терморadiационный метод высушивания	86
7.2.5. Метод сушки токами высокой частоты	87
7.2.6. Комбинированные методы высушивания	88
8. Клеточная инженерия растений	95
8.1. Общие сведения	96
8.2. Метод вегетативного клонирования растений (клональное микроразмножение)	96
8.3. Культивирование каллусных тканей	101
9. Трансплантация эмбрионов	117
9.1. Общие сведения	120
Библиографический список	126

## ВВЕДЕНИЕ

Новейшая биотехнология (биоинженерия) – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых продуктов различного назначения.

Основная цель и задачи биотехнологии направлены на разработку методов и приемов, позволяющих получить биологически активные соединения (ферменты, гормоны, аминокислоты, вакцины, лекарственные препараты), а также конструирование молекулы новых веществ и создание форм организмов, отсутствующих в природе (химерные гибридные молекулы, химерные животные и растительные ткани и организмы).

Другими словами, **биотехнология** – это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве.

Название ее происходит от греческих слов «bios» – жизнь, «teken» – искусство, «logos» – слово, учение.

Биотехнология создает возможность получения разнообразных веществ и соединений из сравнительно дешевых, доступных и возобновляемых материалов. Сегодня биотехнология – это наука, промышленность и многомиллионный бизнес.

## 1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ, ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Фундаментом современной биотехнологии являются молекулярная биология, микробиология, генетика, биохимия, биофизика, технология, приборостроение. За последние 40-50 лет произошло скачкообразное развитие этих наук, что привело к форменной революции в производстве ветеринарных и медицинских биопрепаратов, созданию трансгенных растений и животных с заданными уникальными свойствами. Подобные исследования являются приоритетными направлениями научно-технического прогресса и в XXI веке займут ведущее место среди всех наук.

Наука формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода.

I. *Эмпирический* (греч. «эмперикос» – опытный), или *доисторический*, период – самый длительный, охватывающий примерно 8000 лет, из которых более 6000 лет до нашей эры и около 2000 лет нашей эры. Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива, уксуса, получение кисломолочных продуктов, квашение капусты, силосование, которые теперь мы относим к разряду биотехнологических.

II. *Этиологический* (греч. «аитиа» – причина) период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX века и первую треть XX века (1856-1933 гг.). Он связан с выдающимися исследованиями великого французского ученого Луи Пастера (1822-1895) – основоположника научной микробиологии. Пастер установил микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг существовавшее тогда представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии; предложил метод пастеризации как способ стерилизации.

В этот же период занимались наукой его выдающиеся ученики, сотрудники и коллеги: Э. Дюкло, Э. Ру, И.И. Мечников, Р. Кох, Д. Листер, Ш. Китазато, Д.И. Ивановский и др.

В биотехнологии очень важным этапом является приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов и культур клеток. Уже в 1859 г. Л. Пастер приготовил жидкую питательную среду, Р. Коху в 1876 г. удалось вырастить бациллы сибирской язвы в капле водянистой влаги, извлеченной из глаза погибшей коровы. В 80-е гг. XIX столетия Р. Кох предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля, а позднее – на агаризованных питательных средах.

И как следствие этого, удалось доказать индивидуальность микроорганизмов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.); например, маслянокислые бактерии и вызываемое ими маслянокислое брожение, лактобактерии и молочнокислое брожение, дрожжи-сахаромицеты и спиртовое брожение, уксуснокислые бактерии и окисление этанола до уксусной кислоты и т.д.

В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также продуктов обмена бактерий (метаболизма) – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот. Во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод.

Были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореактора (ферментера, аппарата-культиватора). Это оборудование используют и в настоящее время.

Среди научных достижений особо стоит отметить следующие:

1868 г. – Ф. Мишер получил «нуклеин» (ДНК) из лейкоцитов;

1902 г. – Г. Хаберланд показал возможность культивирования клеток различных тканей растений в простых питательных растворах;

1912 г. – Ц. Нейберг раскрыл механизм процессов брожения;

1913 г. – Л. Михаэлис и М.Л. Ментен разработали кинетику ферментативных реакций.

### III. Биотехнический период (1933-1972 гг.).

В 1933 г. А. Клейвер и А.Х. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. Началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (время Второй мировой войны 1939-1945 гг., когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами).

Все прогрессивное в области биотехнологических и технических дисциплин, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в биотехнологии.

1937 г. – Кребс открыл цикл трикарбоновых кислот.

1953 г. – Ф. Крик и Дж. Уотсон расшифровали структуру ДНК.

Эти факты стали побудительным мотивом для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток различного происхождения для получения разнообразных клеточных продуктов и самих клеток для нужд человека, и, прежде всего, пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, декстрана, ряда аминокислот и многих других веществ.

К 1950 г. Ж. Моно разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов, которые развили в своих исследованиях М. Стефенсон, И. Малек, М.Д. Иерусалимский и др.

В этот период французский ученый Р. Горте предложил способ долгого культивирования растительных тканей *in vitro* (в стекле) за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре ткани, который ознаменовался нарастающим числом новых объектов, успешно введенных в культуру.

С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов-цитокининов, в частности кинетина, была получена возмож-



ность стимулировать деление клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез.

Большой успех в биотехнологии растений в нашей стране достигнут в институте физиологии растений А.А. Курсановым и Р.Г. Бутенко.

В этот период появляются биотехнологические процессы, значительно ускорившие процесс воспроизводства животных. В начале XX века был предложен И.И. Ивановым метод искусственного осеменения животных. В 1890 г. английский биолог из Кембриджского университета У. Вальтер провел успешную трансплантацию зиготы у кроликов и получил потомство. Начиная с 1930 г. проводились многочисленные опыты по трансплантации эмбрионов хирургическим путем у лабораторных и сельскохозяйственных животных. В нашей стране наиболее успешно осуществлял трансплантацию эмбрионов овец А.И. Лопырин, свиней – А.В. Квасницкий.

IV. Период биотехнологии – *геннотехнический* (греч. «гине-сис» – происхождение, возникновение, рождение) – начался с 1972 г. В этом году в США П. Берг создал первую рекомбинантную молекулу ДНК, тем самым показав возможность направленных манипуляций с генетическим материалом бактерий.

Естественно, что без фундаментальной работы Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953 г.) по установлению структуры ДНК, расшифровки генетического кода (М. Ниренберг, С. Очао, Г. Корана, 1962-1966 гг.) было невозможным достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и репликации ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнических процессов на основе генно-инженерных манипуляций.

В 1977 г. Итокура синтезировал ген гормона соматотропина человека, а в 1979 г. – ген инсулина человека.

Уже в 1982 г. поступил в продажу человеческий инсулин, продуцируемый клетками кишечной палочки. Наряду с инсулином разработаны следующие генно-инженерные препараты: интерфероны, фактор некротизации опухолей (TNF), интерлейкин-2, соматотропный гормон человека и аналог его соматодомин Ц,  $\alpha$ -антитрипсин, гемопоэтин и др.

В 1982 г. американские ученые Пальмитер и Бриксон получили первых трансгенных мышей. А сегодня уже получены сотни трансгенных животных и растений.

Большие возможности перед генной инженерией открыло изобретение в 1985 г. К. Мулисом полимеразной цепной реакции, позволившей сделать рутинным процесс синтеза генов.

Большой прорыв в клеточной инженерии животных был сделан после разработки Келлером и Милстайном (1975 г.) методики получения моноклональных антител. Стало возможным получать безопасные вакцины (без ДНК возбудителя), а также диагностикумы.

Клонирование (копирование) животных только на основе наследственности одного из родителей было впервые осуществлено Гердоном (в 1962 г.) на лягушках и Вилмутом (1997 г.) – на овцах. В настоящее время имеются сотни клонированных животных, некоторые – в 3-4 поколениях.

С. Вилладсен (Кембридж) разработал микрохирургическую методику деления эмбриона и получения искусственных близнецов, а также способ клонирования эмбрионов для получения большого количества однородных животных.

Так, в Англии для производства высококачественного мясного скота разработан дешевый метод получения эмбрионов. Яйцеклетки, полученные от мясных животных, помещают в культуральную среду и оплодотворяют спермой высококлассных мясных быков. После 6-дневного культивирования эмбрионы вводят молочным малоценным или более старым коровам тем же способом, который применяют при искусственном осеменении. Таким дешевым способом производят 75% говядины в Великобритании.

В результате комбинации эмбриональных клеток овец и коз в Великобритании, Германии и США получены овцекозы и химеры.

Наиболее важные достижения биотехнологии в IV периоде.

1. Разработка интенсивных процессов (вместо экстенсивных) на основе направленных, фундаментальных исследований (с суперпродуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов).

2. Создание различных продуктов, необходимых человеку на основе генно-инженерных технологий.

3. Создание необычных организмов, ранее не существовавших в природе: не клубеньковых растений, несущих ген азотобактерий, которые отвечают за способность фиксировать молекулярный азот из воздуха, в результате чего отпадает необходимость удобрять почву азотсодержащими удобрениями; светящихся растений; получение химер – овцекозы в США, индоутки – в России; помато-гибрида картофеля и томата, клонирование животных.

4. Разработка и внедрение в практику специальной аппаратуры, биотехнологических схем.

5. Автоматизация и компьютеризация биотехнологических оптимальных производственных процессов при максимальном использовании дешевого сырья и минимальном потреблении энергии.

6. Внедрение биотехнологии в воспроизводство животных – трансплантация эмбрионов от донора реципиентам – позволяет получить от выдающихся коров более 100 телят и ускоряет в 2-3 раза селекционный процесс.

В целом же применение биотехнологии в народном хозяйстве очень разнообразно.

Ниже приведены лишь основные области применения, так как в настоящее время разрабатываются способы получения более 1000 наименований продуктов биотехнологическими способами и невозможно перечислить отрасли, в которых они уже используются или могут применяться.

Область применения	Примеры
Медицина, здравоохранение, фармакология	Антибиотики, ферменты, аминокислоты, кровезаменители, алкалоиды, нуклеотиды, иммунорегуляторные препараты, противораковые и противовирусные препараты, новые вакцины, гормональные препараты (инсулин, гормон роста), моноклональные антитела для диагностики и лечения, пробы ДНК для диагностики, исследования природы рака и процессов старения человеческого организма, продукты для диетического питания

Область применения	Примеры
Получение химических веществ	Этилен, пропилен, бутилен, окисленные углеводороды, органические кислоты, терпены, фенолы, полимеры, ферменты, продукты тонкого органического синтеза, полисахариды
Животноводство	Усовершенствование кормовых рационов (производство белка, аминокислот, витаминов, кормовых антибиотиков, ферментов, заквасок для силосования), ветеринарных препаратов (антибиотики, вакцины и т.д.), гормонов роста, создание высокопродуктивных пород, пересадка оплодотворенных яйцеклеток и эмбрионов, манипуляции с эмбрионами
Растениеводство	Биорациональные пестициды, бактериальные удобрения, гиббереллины, производство безвирусного посадочного материала, создание высокопродуктивных сортов и гибридов, устойчивых к болезням, засухе, заморозкам, засоленности почв
Рыбное хозяйство	Кормовой белок, ферменты, антибиотики
Пищевая промышленность	Белок, аминокислоты, заменители сахара (аспартам, глюкозофруктовый сироп), полисахариды, органические кислоты, нуклеотиды, липиды, переработка пищевых продуктов
Энергетика и добыча полезных ископаемых	Спирты, биогаз, жирные кислоты, алифатические углеводороды, водород, уран, а также интенсификация добычи нефти, газа, угля, искусственный фотосинтез, биометаллургия, добыча серы
Тяжелая промышленность	Улучшение технических характеристик каучука, бетонных, цементных, гипсовых растворов, моторных топлив; антикоррозийные присадки, смазка для прокатки черных и цветных металлов, технический белок и липиды
Легкая промышленность	Улучшение технологий переработки кож, производство текстильного сырья, шерсти, бумаги, парфюмерно-косметических изделий, получение биополимеров, искусственных кожи и шерсти и т.д.

Область применения	Примеры
Биоэлектроника	Биосенсоры, биочипы
Космонавтика	Создание замкнутых систем жизнеобеспечения в космосе
Экология	Утилизация сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, биodeградация трудноразлагаемых токсических веществ (пестицидов, гербицидов, нефти), создание замкнутых технологических циклов, производство безвредных пестицидов, легкоразрушаемых полимеров
Научные исследования	Генно-инженерные и молекулярно-биологические исследования (ферменты рестрикции ДНК, ДНК-и РНК-полимеразы, ДНК-и РНК-лигазы, нуклеиновые кислоты и нуклеотиды и т.д.), медицинские исследования (средства диагностики, реактивы и т.д.), химия (сенсоры, реактивы)

В Российской Федерации наиболее интенсивные исследования в области биотехнологии и генной инженерии проводятся в филиале института биоорганической химии (ФИБХ) РАН (г. Пущено Московской области), центре «Биоинженерия» РАН и Всероссийском научно-исследовательском институте биотехнологии (ВНИИСХБ) РАН, Всероссийском институте животноводства (ВИЖ). В ФИБХс получены трансгенные растения плодовых, ягодных, декоративных, овощных и злаковых культур. В центре «Биоинженерия» специализируются на получении трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, вирусам и гербицидам. Во ВНИИСХБе получены трансгенные сорта томата, рапса, устойчивые к фитопатогенам и гербицидам. В ФИБХе получены трансгенные растения табака с геном цекропина, устойчивые к грибным и бактериальным патогенам. В 1993 г. в ВИЖе получены трансгенные овцы с геном химозина (Л.К. Эрнст, Г. Брем, И.В. Прокофьев).

## 2. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ. ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Объектами биотехнологии являются: клетки растений, животных и человека, бактерии, вирусы, грибы, некоторые вещества биологического происхождения (например, ферменты, нуклеиновые кислоты и др.), молекулы. Отсюда следует, что объекты биотехнологии относятся либо к микробам, либо к растительным или животным клеткам.

Типичной клетки в природе не существует, но все эукариотические клетки имеют общие черты строения, характерные для клеток представителей различных царств живой природы (рис. 1).

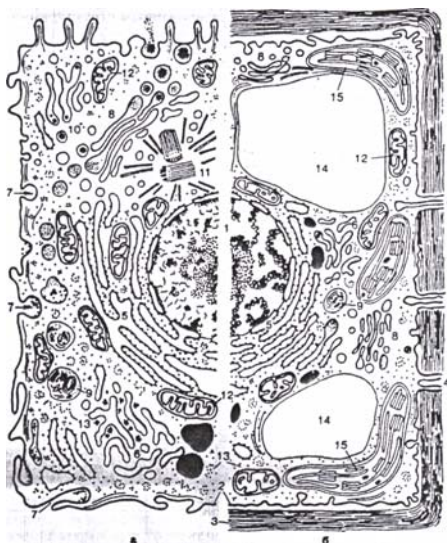


Рис. 1. Комбинированная схема строения эукариотической клетки:  
*а* – клетка животного происхождения; *б* – растительная клетка:  
1 – ядро с хроматином и ядрышком; 2 – плазматическая мембрана;  
3 – клеточная стенка; 4 – плазмодесмы; 5 – гранулированный эндоплазматический ретикулум; 6 – гладкий ретикулум; 7 – пиноцитозная вакуоль; 8 – аппарат Гольджи; 9 – лизосома; 10 – жировые включения в гладком ретикулуме; 11 – центриоль и микротрубочки центросферы; 12 – митохондрия; 13 – полирибосомы гялоплазмы; 14 – центральная вакуоль; 15 – хлоропласт

Каждая клетка состоит из двух важнейших, неразрывно связанных между собой частей – цитоплазмы и ядра. В цитоплазме находится целый ряд структур, каждая из которых имеет закономерные особенности строения и поведения в различные периоды жизнедеятельности клетки. Каждая из этих структур-органойдов обладает определенной функцией. Есть органойды, свойственные всем клеткам: митохондрии, клеточный центр, аппарат Гольджи, рибосомы, эндоплазматическая сеть, лизосомы, а также органойды, присущие только определенным типам клеток: миофибриллы, реснички и ряд других. Органойды – постоянные, жизненно важные составные части цитоплазмы клеток. В цитоплазме откладываются также различные вещества – включения. Включениями называют непостоянные структуры цитоплазмы, которые в отличие от органойдов то возникают, то исчезают в процессе жизнедеятельности клетки. Плотные включения называют гранулами, жидкие – вакуолями. Включения животной клетки: гликоген, жиры, пигмент, пыль, микробы и т.д.

Ядро – важная составная часть клетки. Клеточное ядро содержит ДНК и благодаря этому выполняет две главные функции:

- 1) хранения и воспроизведения генетической информации;
- 2) регуляции процессов обмена веществ, протекающих в клетке.

Растительная клетка отличается от животной следующими признаками:

- 1) прочной клеточной стенкой из целлюлозы значительной толщины;
- 2) особыми органоидами-пластидами, в которых происходит первичный синтез органических веществ из минеральных за счет энергии света;
- 3) развитой системой вакуолей, в значительной мере обуславливающих осмотические свойства клеток.

Основная особенность строения бактерий – отсутствие ядра, ограниченного оболочкой. Наследственная информация у бактерий заключена в одной хромосоме. Бактериальная хромосома, состоящая из одной молекулы ДНК, имеет форму кольца и погружена в цитоплазму (рис. 2).

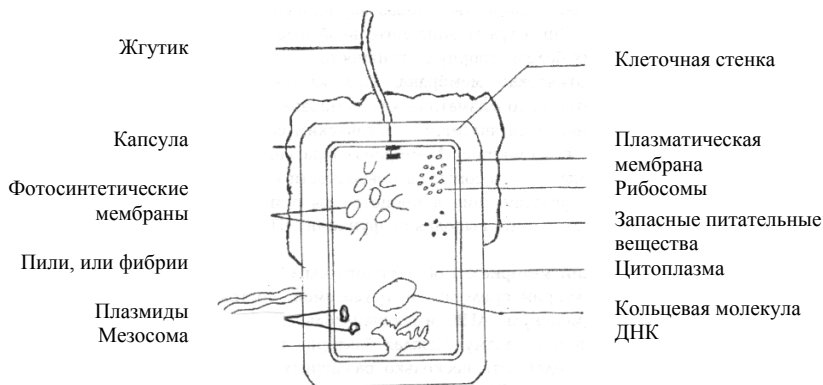


Рис. 2. Схема строения прокариотической клетки

ДНК у бактерий не образует комплексов с белками, поэтому подавляющее большинство наследственных задатков – генов, входящих в состав хромосомы, «работает», т.е. с них непрерывно считывается наследственная информация. Каждая бактерия, помимо основной ДНК, может содержать несколько различных плазмид, которыми она обменивается с другими бактериями. Плазмиды представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, состоящие из нескольких тысяч пар нуклеотидов. Они являются автономными генетическими элементами, реплицирующимися в бактериальной клетке не одновременно с основной молекулой ДНК. Хотя на долю плазмид приходится лишь небольшая часть клеточной ДНК (0,1-0,01%), именно они несут такие жизненно важные для бактерии гены, как гены лекарственной устойчивости. Разные плазмиды содержат разные гены устойчивости к антибактериальным препаратам. Простота устройства плазмид и легкость, с которой они «входят и выходят» из бактерий, используются в генной инженерии для введения в клетки бактерий генов высших организмов.

Вирусы – это неклеточная форма жизни. Они являются облигатными паразитами, т.е. могут функционировать только внутри организма. Ни один из известных вирусов не способен к самостоятельному существованию.



Просто организованные вирусы представляют собой нуклеопротеиды, т.е. состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и нескольких белков, образующих оболочку вокруг нуклеиновой кислоты. Белковая оболочка носит название *капсид*. Капсиды состоят из различного числа симметрично расположенных морфологических субъединиц, называемых капсомерами. Эти капсомеры подобно своеобразному белковому «частоколу» окружают полость, в которой расположена нуклеиновая кислота. Сложно организованные вирусы имеют дополнительную оболочку, белковую либо липопротеиновую (рис. 3).

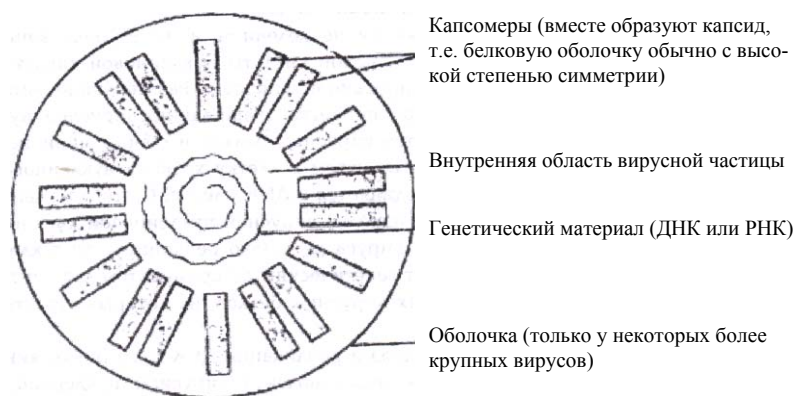


Рис. 3. Схематический разрез вируса

Вирусы размножаются не делением, а путем репликации (синтеза). Размножение вирусов включает в себя три процесса: репликацию вирусной нуклеиновой кислоты, синтез вирусных белков и сборку вирионов.

Вирусы, которые нападают на бактерии, образуют группу бактериофагов. Бактериофаг  $T_2$ , уничтожающий кишечную палочку (*Escherichia coli*), имеет следующее строение: головка икосаэдрической формы, внутри которой находится нуклеиновая кислота, хвост, покрытый белковым чехлом, базальная пластинка и хвостовые нити (рис. 4).

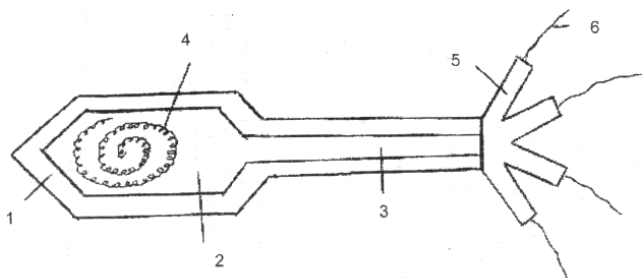


Рис. 4. Строение бактериофага T<sub>2</sub>:  
 1 – головка; 2 – сердцевина; 3 – хвост; 4 – ДНК;  
 5 – базальная пластинка; 6 – хвостовые нити

Толстые клеточные стенки бактерий не позволяют белку-рецептору вместе с присоединившимся к нему вирусом погружаться в цитоплазму, как это происходит при инфицировании клеток животных. Поэтому бактериофаг вводит полый стержень в клетку и выталкивает через него ДНК (или РНК), находящуюся в его головке. Геном бактериофага попадает в цитоплазму, а капсид остается снаружи. В цитоплазме бактериальной клетки начинаются репликация генома бактериофага, синтез его белков и формирование капсида. Через определенный промежуток времени бактериальная клетка гибнет, и зрелые фаговые частицы выходят в окружающую среду.

### Лабораторная работа 1

**Цель работы:** ознакомиться с основными объектами биотехнологии; изучить строение растительной и животной клеток, бактерий и вирусов.

**Материалы и оборудование:** микроскопы, готовые препараты различных типов клеток.

#### Задание:

1. Ознакомиться с общими сведениями по теме и усвоить основные понятия (прокариоты, эукариоты, вирусы, бактериофаги).

2. Рассмотреть под микроскопом и зарисовать строение прокариотической и эукариотической клетки.

3. Заполнить таблицу «Основные органоиды клетки и их функции».

Органоиды клетки	Основные особенности строения	Функции в клетке

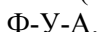
4. Зарисовать строение бактериофага.

### **Вопросы и задания для самоконтроля**

1. Строение и размножение вирусов.
2. Имеют ли вирусы клеточное строение?
3. Какие вирусы называются бактериофагами?
4. Строение и размножение бактериофага.
5. Какие организмы относятся к прокариотам?
6. Строение бактерий.
7. Чем представлен генетический аппарат в бактериальной клетке?
8. Строение и типы плазмид.
9. Кто и в каком году создал клеточную теорию?
10. Основные положения клеточной теории.
11. Строение эукариотической клетки по современным данным.
12. Строение и функции мембранных органоидов.
13. Строение и функции немембранных органоидов.
14. Какие органоиды эукариотической клетки содержат ДНК?
15. Строение ядра.
16. Химический состав, строение и функции хромосом.
17. Сходство и различие в строении растительной и животной клеток.
18. Сходство и различие в строении клеток прокариот и эукариот.

### 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Молекулярная генетика исследует процессы, связанные с наследственностью на молекулярном уровне. Носителем наследственной информации является ДНК (у ретровирусов – РНК), а ген – это участок молекулы ДНК, ответственный за формирование какого-либо признака. Дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты – биополимеры, мономерами которых являются нуклеотиды. Нуклеотид состоит из трех химических веществ: углевода (У), остатка фосфорной кислоты (Ф) и азотистого основания (А):

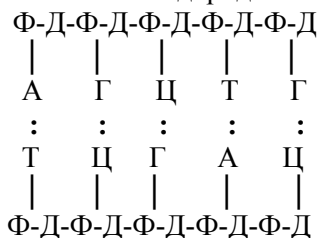


ДНК отличается от РНК углеводом: ДНК содержит дезоксирибозу, а РНК – рибозу.

В ДНК содержатся азотистые основания: аденин, гуанин, тимин и цитозин. В молекуле РНК тимин заменяется на урацил. Молекула ДНК, как правило, двухцепочечная, а РНК – одноцепочечная.

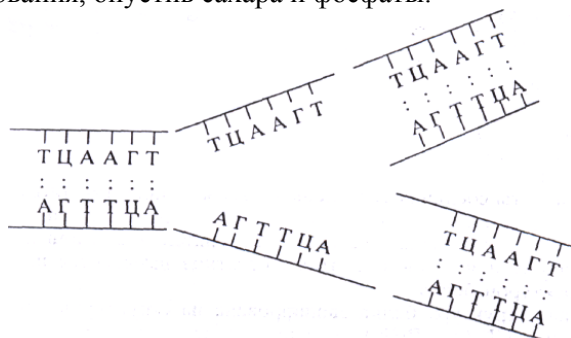
Нуклеотиды двух цепочек ДНК соединяются с помощью азотистых оснований по правилу комплементарности (дополнительности): аденин с тимином, а гуанин с цитозином.

В раскрученном виде ДНК имеет подобие лестницы. Ее прочные (с ковалентными связями) перила образованы сахарами и фосфатами, а ступени – азотистыми основаниями, между которыми имеются более слабые водородные связи:



Последовательность расположения нуклеотидных пар создает специфичность молекулы ДНК и позволяет (при огромной ее длине) зашифровать большое количество информации. Молекула ДНК состоит из правозакрученных антипараллельных цепочек, одна из которых (как правило) является смысловой, то есть содержит генетическую информацию.

ДНК способна к авторепродукции, то есть самовоспроизведению. Процесс этот происходит в период S-интерфазы перед митозом или мейозом. Перед делением клетки на две дочерние все молекулы ДНК должны воспроизвести подобные им молекулы для того, чтобы каждая дочерняя клетка получила полный набор молекул ДНК и полный объем генетической информации, содержащейся в ДНК материнской клетки. При авторепродукции каждая молекула ДНК распадается на две одиночные цепи (при помощи фермента ДНК-нуклеазы), а затем на каждой материнской цепи достраивается дочерняя из свободных нуклеотидов по правилу комплементарности (при помощи фермента ДНК-полимеразы). Две новые цепочки являются точной копией материнской. Для простоты изобразим на схеме только азотистые основания, опустив сахара и фосфаты.



Реализация генетической информации происходит в процессе биосинтеза белков. Белки – органические соединения, играющие важную роль в жизнедеятельности живых организмов, 80% которых составляют клеточные структуры; белковую природу имеют почти все ферменты-катализаторы биохимических реакций, многие гормоны. Сократимые белки мышц обуславливают движение, а белки иммуноглобулины – защиту организма от инфекций.

Несмотря на многообразие белков, их видовую и тканевую специфичность молекулы имеют единый план строения. Как и нуклеиновые кислоты, они являются линейными полимерами, но их мономерами становятся не нуклеотиды, а аминокислотные остатки. В состав белковой молекулы могут входить до 20 раз-

личных аминокислот. Ниже приведены их названия и общепринятые условные обозначения:

Аланин (ала)  
Аргинин (арг)  
Аспарагин (асин)  
Аспарагиновая кислота (асп)  
Валин (вал)  
Гистидин (гис)  
Глицин (гли)  
Глутами (глун)  
Глутаминовая кислота (глу)  
Изолейцин (илей)  
Лейцин (лей)  
Лизин (лиз)  
Метионин (мет)  
Пролин (про)  
Серин (сер)  
Тирозин (тир)  
Треонин (тре)  
Триптофан (три)  
Фенилаланин (фен)  
Цистеин (цис)

Аминокислоты соединяются в цепь, образуя полипептид. Молекула белка представляет собой одну или несколько связанных между собой полипептидных цепей. Последовательность, или порядок расположения, аминокислотных остатков называется первичной структурой белка.

Первичная структура белка зашифрована на структурных генах молекулы ДНК (или РНК). Одну аминокислоту шифрует один триплет (кодон) – три расположенных рядом в цепочке ДНК (или РНК) нуклеотида. Например, триплет информационной РНК УУУ кодирует аминокислоту фенилаланин, АУУ – изолейцин, ГЦЦ – аланин. Из четырех нуклеотидов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) можно составить 64 триплета. Из них 61 являются смысловыми (то есть шифруют какую-то аминокислоту) и 3 – бессмысленными (нонсенсы), так называемые стоп-кодоны. Последние не кодируют аминокислот, а означают окончание информации о строении молекулы белка (табл. 1).

Таблица 1

Последовательность нуклеотидов в кодонах и-РНК для разных аминокислот

Первый нуклеотид кодона	Второй нуклеотид кодона				Третий нуклеотид кодона
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ фенилаланин УУЦ (фен) УУА лейцин УУГ (лей)	УЦУ УЦЦ серин УЦА (сер) УЦГ	УАУ тирозин УАЦ (тир) УАА сигнал УАГ прекр. синтез белка	УГУ цистеин УГЦ (цис) УГА прекр. синтез бел. УГГ триптофан (три)	У Ц А Г
Ц	ЦУУ лейцин ЦУЦ (лей) ЦУА ЦУГ	ЦЦУ пролин ЦЦЦ (про) ЦЦА ЦЦГ	ЦАУ гистидин ЦАЦ (гис) ЦАА глутамин ЦАГ (глун)	ЦГУ аргинин ЦГЦ (арг) ЦГА ЦГГ	У Ц А Г
А	АУУ Изолейцин АУЦ (илей) АУА АУГ метионин (мет)	АЦУ треонин АЦЦ (тре) АЦА АЦГ	ААУ аспарагин ААЦ (аспн) ААА лизин ААГ (лиз)	АГУ серин АГЦ (сер) АГА аргинин АГГ (арг)	У Ц А Г
Г	ГУУ валин ГУЦ (вал) ГУА ГУГ	ГЦУ аланин ГЦЦ (ала) ГЦА ГЦГ	ГАУ асп. к-та ГАЦ (асп) ГАА глутаминовая к-та ГАГ (глу)	ГГУ ГГЦ глицин ГГА (гли) ГГГ	У Ц А Г

Синтез белка осуществляется в два этапа: транскрипция и трансляция.

I. **Транскрипция** – это переписывание генетической информации с молекулы ДНК на молекулу и-РНК (информационную, или матричную, РНК). ДНК деспирализуется, рвутся водородные связи между азотистыми основаниями, и цепочки расходятся на участке какого-либо гена. Затем на смысловой цепочке ДНК, на участке структурного гена, синтезируется молекула и-РНК (при помощи фермента РНК-полимеразы) по правилу комплементарности (А-У; Г-Ц) из свободных нуклеотидов.

II. **Трансляция** – этап синтеза белка, происходящий в рибосомах ядра и цитоплазмы. В нем активное участие принимают транспортные РНК (т-РНК), которые подносят к рибосоме активированные аминокислоты и участвуют в расшифровке генетического кода. Небольшие молекулы (70-90 нуклеотидов) т-РНК способны сворачиваться таким образом, что образуют структуры, напоминающие по форме клеверный лист. В клетке имеется столько же разных т-РНК, сколько кодонов, шифрующих аминокислоты. На вершине среднего «листа» имеется распознающий триплет – антикодон.

Последовательность триплетов в молекуле и-РНК определяет последовательность аминокислотных остатков в синтезируемой на данной матрице молекуле белка.

УУГ	УЦУ	АЦУ	и-РНК
лейцин	серин	треонин	белок

Только в том случае, если антикодон т-РНК комплементарен кодону и-РНК, т-РНК оставляет в рибосоме принесенную аминокислоту, и она присоединяется к синтезируемой белковой цепочке (рис. 5).






АУГ	ГУУ	УУУ	АЦУ	АГА	и-РНК
УАЦ	ЦАА	ААА	УГА	УЦУ-антикодоны	т-РНК
					} т-РНК
мет	вал	фен	тре	арг	
○	●	○	○	○	аминокислоты

Рис. 5. Схема взаимодействия кодонов и-РНК и антикодонов т-РНК



В рибосоме могут находиться одновременно две т-РНК. Таким образом, зная строение ДНК (гена), можно расшифровывать структуру молекулы белка. Например:

ДНК: ААЦ ТГА ЦАЦ

и-РНК: УУГ АЦУ ГУГ

белок: лей-тре-вал.

Если известны изменения в ДНК, то можно предвидеть изменения в структуре белка.

Задачи в данном пособии рассчитаны на расшифровку структуры белка и обратный анализ.

### **Семинарское занятие 1**

**Цель работы:** изучить химический состав, строение и функции нуклеиновых кислот и механизм реализации генетической информации в процессе синтеза белка.

#### **Задание:**

1. Используя таблицы и модель молекулы ДНК, ответить на вопросы 1-38.
2. Пользуясь таблицей 1, решить задачи 1-15.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Каков химический состав ДНК, ее структура и функции?
2. Что такое нуклеотид? Какие нуклеотиды входят в состав ДНК?
3. Какие ученые и когда доказали генетическую роль ДНК?
4. Какие ученые и когда построили пространственную модель молекулы ДНК?
5. Что обуславливает первичную структуру молекулы ДНК?
6. В чем заключается правило комплементарности, и кто его открыл?
7. На какой стадии клеточного цикла и как происходит репликация молекулы ДНК?
8. Какие ферменты принимают участие в репликации молекулы ДНК?
9. Что такое ген? Какие классы генов Вам известны?

10. Что зашифровано на участке структурного гена?
11. Каков химический состав и структура молекулы РНК?
12. Какие типы РНК Вам известны, их размер, функции?
13. В чем сходство и отличие ДНК и РНК?
14. Где синтезируется и-РНК и какова ее функция?
15. Расскажите о строении и функции т-РНК. Сколько типов т-РНК существует?
16. Что такое генетический код?
17. Каковы свойства генетического кода?
18. Почему генетический код называется вырожденным?
19. Что шифрует триплет (кодон)? Сколько имеется смысловых триплетов?
20. Каковы функции бессмысленных триплетов? Сколько их?
21. Что является мономером молекулы белка? Что обуславливает специфичность белка?
22. Имеет ли каждый организм свой особый генетический код, или он носит универсальный характер?
23. Из каких этапов состоит биосинтез белка?
24. В чем суть матричной теории синтеза белка Крика?
25. Где и как происходит транскрипция?
26. Где и каким образом происходит трансляция?
27. Допишите комплементарную цепочку ДНК А Г Г Ц Т А А.  

| | | | | |
28. Где находятся антикодоны и кодон?
29. Что такое полирибосома?
30. Какова схема синтеза белка в клетках высших животных?
31. Как построены мозаичные гены?
32. Что такое сплайсинг?
33. Что такое сателлитная ДНК?
34. Где происходит синтез белков?
35. Как происходит регуляция синтеза и-РНК и белков в клетке?
36. Что такое оперон?
37. В чем состоит действие гена-оператора и гена-регулятора?
38. Обратившись к таблице 1 генетического кода, скажите, что опаснее, с точки зрения возможного влияния на наследственность: замена в кодовой тройке первого или последнего нуклеотида?

## Задачи

1. Одна цепочка молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: АЦЦАТТГАЦЦАТГАА. Какова последовательность нуклеотидов в другой цепочке ДНК?

2. Смысловая цепочка молекулы ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов: ТААЦААГГААГГАЦТААГ. Какова последовательность нуклеотидов в молекуле и-РНК, образовавшейся в процессе транскрипции?

3. В одной цепочке ДНК нуклеотиды расположены в такой последовательности: ГГАЦГГАГТТГГГАГ. Сколько урацил-нуклеотидов содержит информационная РНК? Сколько аминокислот кодирует этот фрагмент гена?

4. Полипептид состоит из следующих аминокислот: аланин-цистеин-гистидин-лейцин-метионин-тирозин. Определите структуру участка ДНК, кодирующего эту полипептидную цепь.

5. Цепочка молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: ЦАГААЦГАТААГ. Сколько кодонов содержит образующаяся при транскрипции и-РНК? Сколько аминокислот кодирует этот фрагмент гена? Сколько изменений произойдет в полипептидной цепочке фрагмента белка, кодируемого этим участком гена, если радиацией выбит пятый нуклеотид гена? Сколько раз в процессе трансляции этой генетической информации в полипептидной цепочке встретится аминокислота валин?

6. Фрагмент белка имеет такую последовательность аминокислот: лейцин-валин-серин-гистидин-аланин-лизин. Сколько нуклеотидов содержит соответствующий ему фрагмент гена? Сколько может быть вариантов и-РНК, содержащих информацию об этом белке?

7. Цепочка и-РНК имеет следующую последовательность: ЦЦГГЦАЦЦУГЦГГГАУЦЦАЦ. Сколько аминокислот кодирует эта последовательность нуклеотидов? Сколько цитозин-нуклеотидов содержит участок гена, на котором шла транскрипция этой и-РНК? Сколько типов т-РНК будет участвовать в процессе трансляции этой информации? Каков молекулярный вес гена, если молекулярный вес нуклеотида равен 300?

8. При синдроме Фанкони (нарушение образования костной ткани) у больного с мочой выделяются аминокислоты, которым соответствуют следующие триплеты и-РНК: АУА, ГУЦ, АУГ, УЦА, УУГ, УУУ, ГУУ, ГУЦ. *Определите, выделение каких аминокислот с мочой характерно для синдрома Фанкони?*

9. Известно, что один из белков состоит из 450 аминокислот. *Определите количество триплетов, которым он кодируется, и длину гена, если в ДНК один нуклеотид занимает участок длиной в 3,4 А.*

10. Поскольку код является «вырожденным», то есть аминокислота шифруется не одним, а несколькими кодонами, то *выясните, сколькими способами в молекуле ДНК (и и-РНК) может быть закодирован фрагмент белка, состоящий из следующих аминокислот: гистидин-валин-лизин-пролин-серин-тирозин-глицин.*

11. Чтобы произошел синтез белка в рибосоме, *какие антикодоны должны иметь т-РНК, если и-РНК имеет последовательность кодонов: УЦГ УУУ ГТТ ЦАГ ЦГУ ГАУ УГЦ ГГУ АУГ ААУ?*

12. Бактериофаг, паразитирующий в кишечничкой палочке, содержит в зрелых частицах одноцепочечную ДНК (плюс-спираль). После внедрения в бактериальную клетку молекула ДНК достраивает комплементарную минус-спираль. Последняя становится матрицей для синтеза и-РНК и контролирует синтез белка оболочки фага.

*Составьте модель транскрипции и трансляции информации гена при условии, что участок плюс-цепи фага содержит азотистые основания, расположенные в нижеприведенной последовательности:*

а) ГТАТАЦГГГАТА;

б) ТГГАЦГЦЦАТЦ;

в) ЦАГГЦАЦЦГАТ.

13. *Какие изменения произойдут в строении белка, если в кодирующем его участке ДНК ТААЦАГАГТАЦГААГ между 10-м и 11-м нуклеотидами включен цитозин, между 13-м и 14-м – тимин, а на конце прибавилось два гуанина?*

14. Участок цепи белка вируса табачной мозаики состоит из следующих аминокислот: серин-глицин-серин-изолейцин-треонин-пролин-серин. В результате воздействия азотистой кислоты на информационную РНК цитозин РНК превращается в гуанин. *Определите изменения в строении белка вируса после воздействия на РНК азотистой кислотой.*

15. В цепи А-инсулина лошади аминокислоты в позиции 6-11-я имеют следующий состав: цистиен-цистеин-треонин-глицин-изолейцин-цистеин. У быка в этой цепи 8-ю позицию занимает аланин, 9-ю – серин, 10-ю – валин. *Определите строение участка ДНК, кодирующего эту часть цепи инсулина у лошади и быка.*

## 4. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В новой биотехнологии чаще используются вирусы и бактерии, растения и животные и их клетки, полученные (или улучшенные) с использованием методов генетической инженерии.

Последовательность генно-инженерных процессов следующая:

1. Получение генов.
2. Введение гена в вектор и их клонирование.
3. Методы трансформации животных и растительных клеток.
4. Скрининг – отбор бактерий или клеток, в которые встроен ген.
5. Экспрессия (функционирование) генов у реципиента.
6. Вылавливание генных продуктов из «грязной» смеси.

### 4.1. Методы получения генов

1. **Химический синтез.** Расшифровав последовательность аминокислот в белке и используя генетический код, определяют последовательность нуклеотидов ДНК на участке гена и производят его синтез из нуклеотидов при помощи фермента полимераза-1. Таким путем в 1969 г. Корана впервые синтезировал участок молекулы ДНК, кодирующий аланиновую т-РНК, а в 1977 г. Бойер синтезировал ген соматостатина человека, а затем и ген инсулина.

В 1977 г. В. Гилбертом, а также Ф. Сэнгером был предложен метод секвенирования, т.е. распознавания последовательности нуклеотидов в фрагментах нуклеиновых кислот. Метод химического синтеза генов оказался трудоемким и малоэффективным. Затем появились быстрые и простые методы синтеза сравнительно длинных олигонуклеотидов с определенной, заранее заданной, последовательностью нуклеотидов. Теперь довольно легко можно синтезировать последовательность до 100 нуклеотидов. Автоматизация этих процессов еще более облегчает и ускоряет синтез.

2. **Рестрикционный метод**, или получение генов с помощью специфических эндонуклеаз – рестриктаз. Эти ферменты

открыты в 1953 г. у бактерий. С помощью рестриктаз расщепляют ДНК бактерий другого штамма или клетки-хозяина. К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз; в генетической инженерии используется около 200.

Рестриктазы гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называемым *сайтами* рестрикции. Каждая из рестриктаз узнает свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри сайта, либо в непосредственной близости от него. Обозначение рестриктаз складывается из начальных букв латинского названия вида бактерии, из которой выделен фермент, и дополнительного обозначения, т.к. из бактерий одного вида может быть выделено несколько различных рестриктаз: *Escherichia coli* – Eco R1, Eco RV; *Thermus aquaticus* – Tag 1.

Из нескольких типов рестриктаз в генной инженерии часто используются рестриктазы двух типов, которые узнают определенную последовательность ДНК и гидролизуют ее внутри последовательности сайта рестрикции. Сайты их рестрикции представлены симметричными при повороте на 180° последовательностям-полиндрами:

5' ГААТTC 3'

3' CTTAAG 5' сайт рестрикции рестриктазы Eco R1

5' TAGA 3'

3' ATCG 5' сайт рестрикции рестриктазы Tag 1.

Если рестриктазы II вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности, то они образуют «тупые» концы:

ТА ↓ ГА 3'	5' GTT ↓ AAC 3'
Tag AT ↑ CT 5'	Hinc 1 3' CAA ↑ TTT 5'

Если же разрывы образуются со сдвигом и образованием «ступенек», то образуются «липкие» концы:

5' G ↓ AATTC 3'	5' C ↓ CGG 3'
Eco R 3' CTTAAG ↑ G	Hpa II 3' GGC ↑ C 5'

Фрагменты ДНК, имеющие одинаковые «липкие» концы, могут соединяться друг с другом с помощью ДНК-лигазы, при этом сайт рестрикции восстанавливается. Фрагменты с «липкими» концами наиболее удобны для создания рекомбинантных ДНК.

Однако рестриктазы не «выстригают» полностью ген и его нужно либо достраивать химическим путем, либо отщеплять лишние нуклеотидные последовательности.

3. **Ферментативный синтез** генов стал возможен после открытия фермента обратной транскриптазы или ДНК-ревертазы (Г. Тёмин, Мизутани, 1970), выделенной из онкогенных вирусов. Ревертазы могут синтезировать комплементарную цепь ДНК (к-ДНК) на РНК-матрице.

При помощи ДНК-зонда (одноцепочечная меченая молекула ДНК, комплементарная какому-либо участку и-РНК) находят информационную (матричную) РНК. Практически все эукариотические и-РНК содержат на своем 3' конце последовательность, состоящую из остатков аденина (поли А-последовательность), которая присоединяется к и-РНК в результате сплайсинга.

Для начала реакции синтеза ДНК-ревертазе нужна затравка в виде небольшого двухцепочечного отрезка. Эту функцию выполняют короткие олигонуклеотиды из 18-20 тиминовых остатков (поли д-Т), которые соединяются по принципу комплементарности с поли А-последовательностью и-РНК. В результате образуется гибридная и-РНК – к-ДНК молекула, причем на конце у нее будет синтезироваться короткий отрезок двухцепочечной ДНК – *шпилька*. Шпилька служит затравкой для синтеза второй комплементарной цепи ДНК, осуществляющегося уже ферментом ДНК-полимеразой (рис. 6).

Цепь и-РНК гидролизует РНК-азой, а шпилька (одноцепочечная ДНК) – эндонуклеазой S1. В результате получится двухцепочечная молекула к-ДНК, соответствующая структурному гену, с которого транскрибировалась исходная молекула и-РНК.

К полученной ДНК присоединяют «липкие» концы для встраивания в плазмиду и размножения гена. Подобная схема была использована для получения генов, кодирующих инсулин, гормона роста, интерферона, альбумина, иммуноглобулинов и др. белков, производство которых уже налажено в промышленных масштабах.

Возможно и соединение фрагментов ДНК с «тупыми» концами за счет действия ДНК-лигазы, но эффективность такого «сшивания» на порядок ниже.



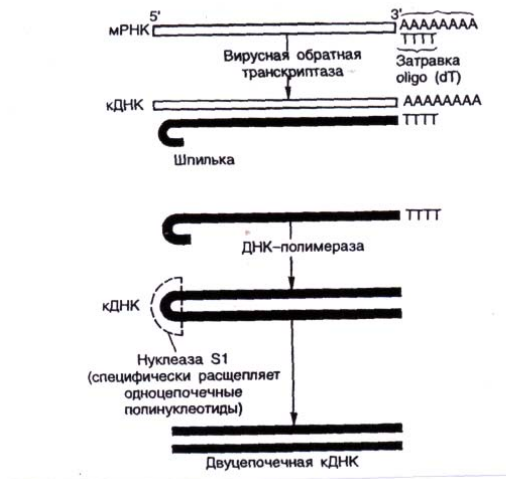


Рис. 6. Схема синтеза двухцепочечной кДНК на м-РНК (и-РНК)

Разработаны методы соединения фрагментов ДНК с «липкими» и «тупыми» концами, что позволяет создавать рекомбинантные молекулы ДНК и в тех случаях, если даже эти фрагменты были получены с использованием различных рестриктаз.

Под *рекомбинантными* ДНК понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* двух и более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников.

4. **Химико-ферментативный синтез** генов применяется наиболее часто. Химическим путем синтезируют олигонуклеотиды: линкеры, адаптеры, праймеры, промоторы, а гены синтезируют ферментативным методом.

**Линкеры** (англ. «link» – соединять) – короткий двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий сайты узнавания для ряда рестриктаз. **Адаптеры** – это линкеры, содержащие более одного сайта узнавания рестриктазой, он предназначен для соединения фрагментов с несовместимыми концами.

**Праймеры** – короткие одноцепочечные фрагменты, комплементарные началу или концу гена. Промотор (80-10 нуклеотидов) – фрагмент ДНК, узнаваемый РНК-полимеразой.

## 4.2. Введение гена в вектор и клонирование

Очень важной операцией в генной инженерии является введение в клетку и стабильное поддержание генетической информации, содержащейся в рекомбинантных молекулах ДНК. ДНК, введенная в бактериальную клетку, гидролизуеться ее ферментами до нуклеотидов. Если даже ДНК «выживает» в клетке, то она утрачивается в процессе деления. Для того, чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генома клетки, она должна либо интегрироваться в хромосому и реплицироваться за ее счет, либо быть способной к автономной репликации. Это достигается при помощи векторных молекул (векторов). Рекомбинантные ДНК приносят в организм реципиента новые свойства: синтез аминокислот и белков, гормонов, ферментов, витаминов и др.

*Вектор* – молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК и обеспечивать там ее размножение (клонирование) или реже – включение в геном. К векторам предъявляются определенные требования. Кольцевая молекула ДНК может реплицироваться в клетках, если содержит ДНК-репликатор (ori-последовательность). Вектор должен содержать уникальные сайты рестрикации для нескольких рестриктаз, обладать определенной емкостью и не выбрасывать встроенный фрагмент; маркерный ген, облегчающий отбор клеток, несущих вектор, чтобы ген экспрессировался (получался продукт, синтезированный по информации введенного гена); специфические для данной клетки промоторы и терминаторы («стоп»-кодона) транскрипции.

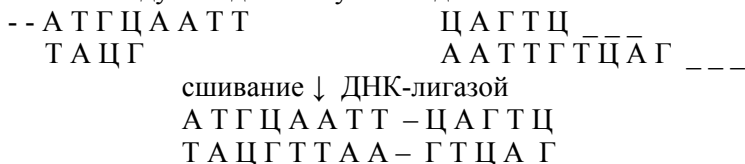
В свою очередь, РНК-транскрипт будет транслироваться, если РНК содержат сигналы связывания с рибосомами и кодоны инициации и терминации трансляции (рис. 7).

Встраивание чужеродного фрагмента ДНК в геном вектора осуществляется в два этапа: сначала ДНК вектора разрезается с помощью рестриктазы, а затем в них встраивается чужеродный фрагмент.



Рис. 7. Экспрессия гена у прокариот:  
 Р – промоторы; Т – сайт инициации транскрипции;  
 R – сайт связывания рибосом

Сшивание генов (фрагментов) ДНК по «липким» концам, т.е. взаимокomплементарным участкам длиной из 4-6 нуклеотидов, достаточно легко осуществляется ферментом ДНК-лигазой (лигирование ДНК) с образованием ковалентной фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами:



При отсутствии комплементарных «липких» концов у сшиваемых фрагментов их достраивают при помощи линкеров (или переходников).

В качестве векторов используют, как правило, плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы животных. В настоящее время создано большое число векторов, и по профилю использования их можно подразделить на несколько типов.

1. Векторы для клонирования фрагмента ДНК. Для этого используются чаще бактериальные плазмиды и фаги.

2. Экспрессионные векторы. Их используют для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуктов, а также наработок конкретного белка. Экспрессионные векторы для эукариотических организмов всегда содержат так называемую экспрессионную кассету, состоящую из промотора, способного работать в данном организме, и сайта полиаденилирования.

3. Векторы для трансформации. Используются для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента. Обычно та-

кие векторы содержат специфические последовательности, способствующие интеграции в геном.

Современные векторные системы часто бывают полифункциональными, совмещая несколько функций в одном векторе. Большинство из них сконструировано при помощи методов генной инженерии.

В качестве векторов прокариот используют плазмиды, фаги и их комбинации. *Плазмиды* – это бактериальные внехромосомные двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК с вариабельными молекулярными массами (1-3% генома бактериальной клетки). Используют плазмиды, способные размножаться автономно, давая до 200 копий, а под действием ингибитора биосинтеза протеинов (хлорамфеникола) – до нескольких тысяч. Используют конъюгативные плазмиды (F) и неконъюгативные (R, Col, D). R-плазмиды содержат гены устойчивости к антибиотикам, Col-плазмиды обеспечивают синтез разных колицинов – высокоспецифических антибиотиков, подавляющих жизнедеятельность других штаммов и видов бактерий, D-плазмиды вызывают биodeградацию. Бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды только одного типа. Встраивание чужеродной ДНК в векторную плазмиду – довольно редкое событие. Только одна из 10-30 полученных после легирования молекул будет рекомбинантной, т.е. нести в своем составе чужеродный фрагмент. Такие клетки отбирают на селективной среде с антибиотиками.

Плазмидные векторы имеют небольшую емкость, в них можно клонировать фрагменты длиной не более 7-8 тысяч нуклеотидных пар (т.н.п.), т.е. они пригодны только для клонирования генов прокариот. В генетической инженерии часто используют плазмиду pBR 322, которая содержит репликатор колициногенной плазмиды Col E1, ген устойчивости к антибиотикам – ампициллину (Amp<sup>r</sup>) и тетрациклину (Tc<sup>r</sup>).

Плазмидные векторы используются чаще всего для размножения (клонирования) гена. В настоящее время клонирование генов успешно осуществляется при помощи полимеразой цепной реакции (ПЦР) в специальных автоматах. Фрагмент ДНК (ген) помещают в прибор, добавляют праймеры (олигонуклеотиды, комплементарные концам фрагмента ДНК), нуклеотиды, ДНК-полимеразу. Раствор нагревают до 95<sup>0</sup>С, вызывая денату-

рацию ДНК. Затем смесь охлаждают до 50-65<sup>0</sup>С, и праймеры прикрепляются к концам каждой свободной нити ДНК. Снова повышают температуру до 72<sup>0</sup>С, и ДНК-полимераза начинает присоединять нуклеотиды к праймерам и строить копии цепочки ДНК. Изменяя температуру, повторяют цикл и копируют ДНК десятки и сотни раз. После 20 циклов счет идет на миллионы.

Для прокариот сконструированы векторы на основе фага  $\lambda$ , в которые можно включать фрагменты чужеродной ДНК до 22 т.н.п. Из генома фага вырезают его собственную ДНК, оставляя концевые фрагменты фага неизменными, так как они необходимы для репликации и упаковки ДНК в головку фага (cos-сайты).

Для клонирования и переноса более крупных фрагментов ДНК (30-45 т.н.п.) были сконструированы искусственные векторы – космиды, содержащие cos-участок генома фага, за счет чего они могут упаковываться в голову фага  $\lambda$  и специальные последовательности (ori-сайт), позволяющие им реплицироваться по плазмидному типу.

Космидами трансформируют клетки *E. coli*, где они размножаются как плазмиды, и каждая фаговая частица вызывает образование колонии индивидуального бактериального трансформанта.

Клонирование фрагментов ДНК от 100 т.н.п. и более осуществляют в специально сконструированных векторах ВАС и VАС. ВАС-векторы получены на основе F-плазмид бактерий и содержат гены, ответственные за репликацию и копияность этих плазмид в бактериальных клетках. Емкость ВАС-векторов составляет 100-300 т.н.п.

VАС-векторы представляют собой искусственную дрожжевую минихромосому, содержат центромеру, теломеру и точку начала репликации. В такой вектор можно встроить фрагмент чужеродной ДНК более 100 т.н.п., и такая минихромосома, введенная в клетки дрожжей, будет реплицироваться и вести себя аналогично другим дрожжевым хромосомам при митозе.

Эукариотические вирусы нашли более скромное применение в качестве векторов.

Практически используется только онкогенный вирус SV-40 и его производные. Все эти векторы – дефектные вирусы, не способные дать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина.

Для переноса генов в клетки растений широко используются Ti-плазмиды почвенных агробактерий (*Agrobacteria*). Последние могут заражать двудольные растения и вызывать образование опухолей – корончатых галлов. Опухоли состоят из дедифференцированных клеток, интенсивно делящихся и растущих в месте заражения. В бактериальных клетках Ti-плазмиды (англ. «tumor inducing» – индуцирующие опухоли) реплицируются автономно; их кольцевая ДНК длиной около 200 т.н.п. Чаще всего встречаются Ti-плазмиды, кодирующие аминокислоты нопалин или октопин. После заражения фрагмент ДНК Ti-плазмиды встраивается в ДНК растительной клетки, изменяя ее метаболизм и заставляя синтезировать вещества (опины), необходимые бактерии. Этот фрагмент ДНК Ti-плазмиды назван т-ДНК (трансформирующая ДНК); его длина примерно 23 т.н.п. На концах т-ДНК находятся прямые повторы (25 н.п.), которые (наряду с *vir*-областью) необходимы для вырезания ее из состава плазмиды и интеграции в геном растений.

Природная Ti-плазида очень велика, и после трансформации растений клетки не будут способны к регенерации. В настоящее время конструируют производные Ti-плазмиды, в которых вставляют регуляторный участок Т-области, а вместо ее структурных генов вшивают структурную часть гена, который надо ввести в растение. Такие гены безвредны для растения. На основе Ti-плазмиды сконструированы промежуточный и бинарный векторы.

Перспективным вектором считаются Ri-плазмиды (англ. «root inducing» – индуцирующий корни) из бактерий (*A. rhizogenes*), вызывающих усиленное образование корешков при заражении бактерий. В отличие от Ti-плазмид Ri-плазмиды служат естественными безвредными векторами, так как трансформированные с их помощью растительные клетки сохраняют способность к морфогенезу и к регенерации здоровых растений.

В качестве векторов растений используются ДНК-содержащие вирусы (их только 1-2% от вирусов, инфицирующих растения). Это содержащий одноцепочечную ДНК вирус золотой мозаики фасоли (ВЗМФ) или вирус полосатой кукурузы, а также вирус с двухцепочечной ДНК – вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), поражающий в основном растения семейства крестоцветных. Фитовирусы отличаются высокой копийностью

( $10^6$  молекул на зараженную клетку), малым размером, сильными промоторами. Однако фитовирусы имеют ряд недостатков: небольшую емкость, патогенность и неспособность встраиваться в хромосомы хозяина. Иногда геном ВМЦК встраивают в Т-область Ti-плазмиды и в ее составе интегрируют в ядерный геном различных растений, при этом из состава фитовируса вырезаются области, обеспечивающие его вирулентность.

В генной инженерии широко используются геномные библиотеки и библиотеки к-ДНК. Геномная библиотека представляет собой клонированный в составе векторов полный набор последовательностей ДНК какого-либо организма. Полученные при помощи рестриктаз фрагменты ДНК лигируют с плечами фага и упаковывают в уже готовые головки фаговых частиц. Хранят фаговый банк под хлороформом при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Библиотекой к-ДНК называют совокупность векторных плазмид, каждая из которых несет в своем составе к-ДНК. Молекулы к-ДНК, сшитые с векторными молекулами, трансформируют в бактериальные клетки: каждая бактерия получает только одну рекомбинантную плазмиду.

Для поиска нужного гена из клонотеки используют индивидуальную радиоактивно меченную и-РНК или синтетические меченые олигонуклеотиды (не менее 30 н.п.), полностью комплементарные участку искомого гена.

### **4.3. Методы трансформации животных и растительных клеток**

Векторные плазмиды и векторные вирусы со встроенными чужеродными генами называют гибридными (или химерными). После конструирования рекомбинантных ДНК их с помощью трансформации вводят в реципиентный организм: бактериальную, грибную, растительную или животную клетку. При этом производится предварительная обработка клеток соединениями, способствующими проникновению ДНК внутрь клеток с последующим помещением их на селективную среду, в которой способны существовать только клетки, получившие векторную молекулу, например, в среду с определенным антибиотиком.

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, называется трансфекцией.

Практически общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что при обработке клеток бактерий  $\text{CaCl}_2$  их мембрана становится проницаемой для ДНК.

Одним из самых распространенных методов получения трансгенных двудольных растений является кокультивация с агробактерией. Он основан на трансформации растительных эксплантов агробактериями, несущими векторную конструкцию, содержащую чужеродный ген, встроенный в область т-ДНК.

Вектор должен иметь функциональный ген (прокатиотический или эукариотический), промотор, способный экспрессироваться в растительной клетке, и селективный маркер трансформации. В качестве эксплантов берут стерильные листовые диски, молодые корешки, семядоли, междоузлия. На экспланты наносят раны и кокультивируют с жидкой средой, содержащей агробактерии в течение 24-48 часов. Далее экспланты переносят на среду с антибиотиками (или гербицидами) для проведения селективного отбора трансформированных клеток. Кроме того, в среду добавляют соответствующие фитогормоны (для прямой регенерации или каллусообразования). Через 2-5 недель на трансформированном экспланте развиваются побеги, которые в дальнейшем отсаживают или переносят в почву. Выход трансгенных растений достаточно высок (10-60% в зависимости от вида растения).

Существует несколько методов прямого переноса генов в растения и клетки животных. Сначала клеточная оболочка разрушается ферментами (целлюлазой, пектиназой), и остается один протопласт. Наибольшей эффективности трансформации ( $10^{-2}$ ) удалось достигнуть методом *электропорации* и добавлением полиэтиленгликоля. При этом вектор может не содержать пограничных областей т-ДНК и *vir*-области, т.е. годится практически любой ДНК-вектор.

Это может быть метод микроинъекции ДНК в животные и растительные (протопласты прикрепляют к стеклам полилизинном) клетки, лучше в их ядра. Трансформация растительных протопластов происходит с эффективностью не более 10-15%, независимо от типа вектора, и подходит как для двудольных, так и для однодольных растений. Более 140 видов растений протрансформированы путем прямого переноса ДНК-вектора.



Метод электропорации основан на воздействии на клетки (протопласты) высоковольтным импульсом (200-350 В, длительность 54 мс), увеличивающим проницаемость биомембран. Молекулы ДНК поглощаются клетками через поры в клеточной мембране. После разведения раствора протопласты высеиваются на соответствующую среду для регенерации. Эффективность переноса определяется через 24-48 ч после электрошока.

**Упаковка в липосомы** используется для защиты экзогенного генетического материала, который вводится в протопласты растений, от нуклеаз. Липосомы – сферические образования, оболочка которых состоит из фосфолипидов. Их можно получить путем резкого встряхивания или обработки ультразвуком водных эмульсий фосфолипидов. Недостатком метода является его низкая трансформирующая активность (0,5-1%).

Метод биобаллистической трансформации является одним из наиболее эффективных методов трансформации однодольных растений, хотя может быть применим и для двудольных.

На мельчайшие частички вольфрама, платины или золота диаметром 0,6-1,2 мкм напыляется ДНК-вектор. Эти частицы помещаются внутрь биобаллистической пушки, а под нее (на расстоянии 10-15 см) ставится в чашке Петри каллус или суспензия клеток с агаризированной средой. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые или золотые частички с огромной скоростью выбрасываются из пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Центральные клетки, как правило, погибают, а находящиеся от центра на расстоянии 0,6-1 см – будут трансформированными. Их осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

В соматические клетки животных ДНК вводится путем микроинъекции в ядро. Культуры клеток млекопитающих могут быть эффективным источником выделения ряда вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека.

В настоящее время разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений с целью изменения таких свойств организма, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям и внешним воздействиям.

Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки. Затем яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген глобина кролика, ген тимидинкиназного вируса герпеса и к-ДНК вируса лейкемии мышей. Выживает обычно от 10 до 30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток, составляет до 40%. Уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами, от дифференцировки тканей.

#### 4.4. Скрининг

Скрининг – отбор бактерий или клеток, в которые встроился ген.

В состав векторов обычно входит кроме функционального гена и ген селективного маркера. У растений это обычно ген, кодирующий устойчивость к антибиотикам (канамицину или гигромицину), а также гербициду хлорсульфарону или фосфинотрицину; у животных ген устойчивости к ампициллину или тетрациклину.

Первичную селекцию трансгенных растений, бактерий проводят на среде с соответствующим антибиотиком. На такой среде регенерируют растения и дают колонии бактерии, в геноме которых присутствует ген селективного маркера. Однако выживание на селективной среде не может быть абсолютным доказательством трансгенной природы бактерии или растения. Рекомбинантные клоны могут быть идентифицированы и по синтезируемому ими продукту. Для полного доказательства присутствия в геноме растений последовательности т-ДНК проводят анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулярного анализа, основанного на блотгибридизации хромосомной ДНК трансгенного растения с использованием в качестве радиоактивного зонда фрагменты т-ДНК. Кроме того, проводят дополнительный анализ экспрессии функционального гена методом выявления соответствующей и-РНК или белка.

#### 4.5. Экспрессия (функционирование) чужеродных генов в геноме бактерий, растений и животных

В настоящее время разработаны системы клонирования и экспрессии генов в бактериях, дрожжах, грибах, растениях и млекопитающих. Многие грамположительные бактерии являются суперпродуцентами важнейших химических соединений. Значительных успехов в биоиндустрии удалось достичь с клетками *Bacillus subtilis*, стрептомицетами и *Saccharomyces cerevisiae*. Чтобы ген экспрессировался, вектор должен иметь специфические для данной клетки промотор и терминаторы транскрипции, а также сигнал полиаденилирования, для того, чтобы эукариотическая РНК-полимераза могла транскрибировать бактериальную последовательность (и-РНК), а затем и-РНК связывалась с рибосомами (R-сайт) и транскрибировала бактериальный белок в растительной или животной клетке. Экспрессию трансгенов обеспечивают сильные промоторы. Нужна защита чужого гена от эндонуклеаз, а чужого генного продукта от протеаз. Поэтому используют мутантные штаммы бактерий со сниженной активностью этих ферментов. Гибридные гены создаются также для обеспечения секреции чужеродного генного продукта из клетки. У *E. Coli* эту функцию выполняет мембранный липопроtein.

Наиболее успешно клонирование генов и получение их продуктов осуществляется в *E. Coli*. Однако получение продуктов из других групп организмов, особенно эукариот, в клетках *E. Coli* ограничено, так как у них отсутствует сплайсинг и не происходит гликолизирование белков (когда молекулы приобретают свои функциональные и антигенные свойства).

У дрожжей *S. cerevisia* есть сплайсинг, но он происходит не совсем так, как у высших эукариот, и гены им нужно вводить без интронов. Существует у дрожжей и гликолизирование, хотя его функция несколько иная.

Удалось ввести ген лейкоцитарного интерферона человека в дрожжи и добиться его экспрессии, но для этого заменили промоторную и лидерную части гена на соответствующие области алкогольдегидрогеназы дрожжей.

Если ген вводят в клетки животных в виде внехромосомных элементов, то он легко элиминируется, поэтому ген необходимо

встроить в хромосому. Клетки с «чужими» генами имеют пониженную скорость роста. Это сдерживает работы по генной инженерии.

У животных работают промоторы только 4 генов: металло-тионеина, трансферрина, иммуноглобулина и эластазы. Они способны экспрессировать присоединенные к ним гены. Если бактериальные гены трансформированы растениям, то нужно заменить бактериальные промоторы на промоторы растительных генов либо на другие, которые могут инициировать транскрипцию в растительной клетке.

В качестве промотора для экспрессии бактериальных генов наиболее часто используют промотор 35S-РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV), который обеспечивает транскрипцию в геномах как двудольных, так и однодольных растений, и высокий уровень экспрессии гена, находящегося под его контролем. Даже при трансформации растительной клетки растительным геномом часто заменяют его собственный промотор на промотор 35S CaMV как более сильный. В последнее время иногда используют искусственно полученный МАС-промотор, который представляет собой удвоенную последовательность 35S CaMV.

В последнее время все большее значение приобретают также специфические промоторы; гены под их контролем экспрессируются только в определенных тканях (пататиновый промотор будет экспрессировать ген только в клубнях картофеля).

В генной инженерии используются индуцибельные промоторы, которые экспрессируют гены только в определенных условиях (при поранении или в присутствии ионов металлов). Недостатком многих тканеспецифических и индуцибельных промоторов является их слабая активность.

На экспрессию трансгена влияет также место интеграции его в растительный геном. Очень часто т-ДНК встраивается в гетерохроматиновые районы, где экспрессия гена не будет происходить. Ситуацию можно преодолеть только повторными трансформациями.

Для выявления экспрессии чужеродных генов на ранних стадиях получения трансгенных растений используют маркеры экспрессии – репортерные гены, генные продукты которых легко выявляются. Наиболее широко используемый репортерный

ген GUS кодирует фермент  $\beta$ -глюкоронидазу и при добавлении субстрата расщепляет его с получением соединения, окрашенного в ярко-голубой цвет. Другой репортерный ген при экспрессии образует флюоресцирующий белок, который также легко выявляется.

#### **4.6. Вылавливание генных продуктов из «грязной» смеси**

Если ген встроен в бактерию, то она производит более 2000 веществ и необходимо «выловить» нужный белок (фермент, гормон) из «грязной» полимеризационной смеси. Для этого используют моноклональные антитела, специфические к данному белку.

### **Семинарское занятие 2**

**Цель работы:** усвоить основные понятия и методы генной инженерии.

#### **Задание:**

1. Ознакомиться с основными методами и понятиями генной инженерии.
2. Ответить на вопросы для самоконтроля.

#### **Вопросы и задания для самоконтроля**

1. Какие Вам известны методы получения генов?
2. Химический синтез гена. Кто и когда осуществил его впервые? Какие известные Вам гены синтезированы химически?
3. Рестрикционные нуклеазы (рестриктазы). Какие организмы их содержат и для какой цели?
4. Что такое «липкие концы» и «тупые концы» ДНК?
5. Метод «выстригания» генов, его недостатки.
6. Как осуществляется ферментативный синтез ДНК?
7. Химиико-ферментативный синтез генов.
8. Охарактеризуйте олигонуклеотиды: линкеры, адаптеры, праймеры и промоторы.
9. Какие ферменты используются в генной инженерии?

10. В чем суть метода полимеразной цепной реакции? Кто и когда ее изобрел?
11. Что такое вектор? Что используется в качестве вектора?
12. Что такое маркерный ген (ген-репортер)?
13. Каким образом клонируют гены?
14. Как получают химерные векторы-космиды?
15. Какие векторы используют для переноса генов бактерий?
16. Зачем нужен *ori*-сайт в R-плазмиде?
17. Для чего используют т-ДНК – Ti-плазмиды?
18. Зачем нужна *vir*-область в искусственных векторах и где ее берут?
19. Как созданы BAC и VAC векторы и какова их нуклеотидная емкость?
20. Как осуществляется перенос генов в клетки-реципиенты?
21. Какими приемами повышают проницаемость плазмолеммы клетки-реципиенты?
22. Какие существуют методы трансформации растительных клеток?
23. Расскажите подробнее о методе баллистической трансформации. Для какого класса растений используется чаще этот метод?
24. Какими методами определяют вошел ли ген донора в клетки реципиента?
25. Как осуществляется скрининг (отбор) трансформированных клеток или бактерий?
26. Какие специфические фрагменты должен содержать вектор, чтобы ген вошел и экспрессировался в реципиентах (бактериях, клетках, организмах)?
27. Какие векторы чаще используются для клонирования генов животных и способы их введения в клетки животных?
28. Расскажите о методе блот-гибридизации по Саутеру.
29. Каким образом добиваются экспрессии чужеродного гена в клетках растения-реципиента?
30. Какие гены чаще используются в качестве репортеров (маркеров)?

## 5. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

### 5.1. Общие сведения

Все процессы микробиологического синтеза проводят с чистыми культурами микроорганизмов. Чистота посевных и готовых культур является основным условием производства биопрепаратов.

**Асептика** – это комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания в среду или на объект посторонних микроорганизмов.

Для этого в течение всего микробиологического производства проводятся разнообразные мероприятия, обеспечивающие сохранение чистоты культуры на всех этапах технологического цикла (от хранения эталонных штаммов микроорганизмов и промышленного их выращивания в аппаратах-культиваторах (АКВ) до момента получения готовой формы биопрепарата). В противном случае посторонние микроорганизмы, выделяя свои метаболиты, притормозят рост основной культуры, в результате чего снизится качество готового целевого продукта.

К таким мероприятиям относятся:

- стерилизация оборудования и коммуникаций;
- обеспечение герметичности оборудования;
- очистка и стерилизация воздуха;
- стерилизация питательных сред;
- специальные методы отбора проб.

Применяются следующие *виды стерилизации*:

1. **Термическая.** В качестве стерилизующих агентов используют водяной пар, подаваемый под различным давлением, и сухой жар. Погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов в результате коагуляции белков. Наиболее устойчивые термофильные микроорганизмы погибают при использовании водяного пара при температуре 121°C через 25 минут, при 132°C – через 4 минуты. При использовании сухого жара при температуре 160-180°C микробы погибают соответственно через 60 и 10 минут.

*Примечание.* Эффективность данных режимов можно рассмотреть в сравнении с обычным процессом кипячения. Так, при кипячении (100°C) микроорганизмы погибают только через 8-9 часов.

Кроме того, используется горячий сухой воздух для стерилизации материалов и предметов, которые могут быть испорчены при обработке паром (безводные жиры, масла, порошки, предметы, подвергающиеся коррозии и др.).

2. **Химическая.** В качестве агентов используются формальдегид, окись этилена, перекись водорода, щелочи, спирты, кислоты и др., применяемые для стерилизации оборудования, не выдерживающего нагревания до 110-130°C. Это датчики, фильтры воздуха и другое оборудование.

3. **Радиационная** стерилизация вызывает гибель микроорганизмов за счет воздействия ионизирующего излучения. В силу многих технологических причин этот способ пока не нашел широкого применения в микробиологической промышленности.

4. **Фильтрация.** Обеспечивает полное или частичное задержание микроорганизмов. Он широко применяется для очистки газов, воздуха и жидкостей.

Для характеристики эффективности процессов термической стерилизации применяют следующие показатели:

$\tau_c$  – время, необходимое для уничтожения всех микроорганизмов данной популяции, мин.;

$\tau_{10}$  – время, в течение которого концентрация микроорганизмов снижается в 10 раз, мин.;

$k$  – удельная скорость гибели микроорганизмов, мин.<sup>-1</sup>;

$n$  – фактор инаktivации, определяемый как десятичный логарифм отношения количества спор до и после стерилизации:  $n = \lg (N_0 / N)$ , где  $N_0$  и  $N$  – концентрация микроорганизмов, соответственно до и после стерилизации, клеток/мл;

$\bar{V}$  – критерий стерилизации, определяемый как логарифм того же отношения:  $\bar{V} = 2,3 \times n$ .

Общая эффективность стерилизации определяется значением критерия стерилизации по следующей формуле:

$$\bar{V} = k_t \times \tau_c.$$

При этом значение  $k_t$  определяется по вспомогательной таблице 2, отражающей величину удельной скорости гибели наиболее устойчивых спор *Bac. Stearothermophilis* в зависимости от температуры.



Таблица 2

Значение удельной скорости гибели ( $k$ ) и критерия стерилизации ( $V_T$ ) для спор *Bac. Stearothermophilis* (штамм 1518) при различных температурах

Температура, К	$k_T$	$V_T$	Температура, К	$k_T$	$V_T$
373	0,013	0,013	387	0,412	1,86
374	0,017	0,030	388	0,540	2,40
375	0,023	0,053	389	0,653	3,05
376	0,030	0,083	390	0,810	3,86
377	0,036	0,120	391	1,002	4,86
378	0,048	0,170	392	1,210	6,07
379	0,062	0,230	393	1,480	7,55
380	0,083	0,310	394	1,830	9,36
381	0,109	0,420	395	2,440	11,8
382	0,135	0,560	396	3,070	14,9
383	0,163	0,720	397	3,760	18,3
384	0,193	0,910	398	4,570	23,2
385	0,234	1,150	399	5,900	29,1
386	0,302	1,410	400	7,400	36,5

### Семинарское занятие 3

**Цель работы:** изучить комплекс мероприятий по стерилизации оборудования и сырья при культивировании микро- и макроорганизмов.

**Материал и оборудование:** плакаты, рисунки, жарочный шкаф, автоклав, термостат, бактерицидная лампа.

#### Порядок выполнения работы:

1. Познакомиться с основными видами стерилизации оборудования и сырья на различных этапах технологического цикла культивирования.

2. Изучить основные показатели расчета эффективности термической стерилизации.

3. Научиться определять эффективность предлагаемых режимов стерилизации жидких питательных сред для культивирования микроорганизмов.

**Задание.** Определить эффективность двух режимов стерилизации жидких питательных сред для культивирования микроорганизмов. Параметры стерилизации двух сравниваемых режимов представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Параметры разных режимов стерилизации  
жидких питательных сред**

Показатель	Вариант 1	Вариант 2
<b><i>1-й режим</i></b>		
Температура стерилизации, $T_1$ °C	120	118
Время стерилизации, $\tau_1$ , мин.	60	45
<b><i>2-й режим</i></b>		
Температура стерилизации, $T_2$ °C	125	123
Время стерилизации, $\tau_2$ , мин.	30	20

**Вопросы и задания для самоконтроля**

1. Что такое асептика?
2. Дать понятие микробам-контаминантам. Чем они опасны?
3. Какие мероприятия обеспечивают сохранение чистоты культуры микроорганизмов?
4. Какие виды микробов-контаминантов особенно сложно уничтожить?
5. Каковы пути попадания посторонней микрофлоры в аппараты-культиваторы?
6. Какая вода более загрязнена: из артезианских скважин или в открытых водоемах?
7. Какие способы стерилизации Вам известны?
8. Какой способ стерилизации используют для датчиков, фильтров воздуха?
9. Какие вещества используют для химической стерилизации?
10. Какой способ стерилизации применяют для питательных сред, пустых аппаратов?
11. Чем объясняется высокий стерилизационный эффект насыщенного водяного пара?
12. Каковы основные требования к системам очистки и стерилизации воздуха?
13. Каковы критерии оценки эффективности фильтров для стерилизации?
14. Назовите основные параметры стерилизации питательных сред и химической посуды.
15. Охарактеризовать способ определения эффективности режимов термической стерилизации жидких питательных сред.

## 6. ПРОМЫШЛЕННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

### 6.1. Общие сведения

Клеточная инженерия – одно из наиболее важных направлений в биотехнологии, объектами которой являются микробы (бактерии, вирусы, протозойные организмы), а также клетки (ткани) растений, животных и человека.

Воспроизведение микроорганизмов при использовании различных по составу и свойствам питательных сред (*in vitro*) или в условиях обитания восприимчивого организма называется **культивированием**.

Культивирование микроорганизмов в условиях *in vitro* получило название **промышленного культивирования**, а культивирование клеток и тканей растений и животных – культивированием **изолированных клеток и тканей**.

При промышленном культивировании процесс микробного синтеза, как правило, является частью многостадийного производства, в результате которого получают как целевой товарный продукт биосинтеза (дрожжи, кормовой белок, незаменимые аминокислоты и др.), так и «сырой» продукт, подлежащий дальнейшей переработке (сгусток казеина и др.).

Метод культивирования изолированных эукариотических клеток и тканей в условиях *in vitro* используют в биотехнологии для сохранения и размножения ценных генотипов, эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала, а также для получения продуктов вторичного синтеза (алколойды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.).

Таким образом, клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их тотипотентности и регенерации. Применение этих особенностей раскрыло большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач. В области фундаментальных наук стало осуществимым исследование таких сложных проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, реализация тотипотентности клеток, механизмы появления раковых клеток и др.

## 6.2. Особенности технологии промышленного культивирования микроорганизмов

Для осуществления любого биотехнологического процесса необходимы:

- культура микроорганизмов;
- питательная среда;
- аппаратура для выращивания и проведения вспомогательных операций;
- средства контроля и управления процессом.

Культивирование является основной стадией технологического процесса и во многом определяет количественные и качественные характеристики производства препаратов. На стадии культивирования осуществляется накопление как самой биомассы, так и продуктов метаболизма (жизнедеятельности) микроорганизмов. Так, при производстве бактериальных препаратов целевым продуктом является сама биомасса, в других случаях продукты, синтезируемые клеткой, – антибиотики, ферменты, аминокислоты и др. При этом синтезируемый продукт может накапливаться как внутри клеток, так и выделяться в культуральную смесь.

В том случае, когда культура растет на поверхности жидкой или плотной питательной среды, потребляя содержащиеся в ней субстраты и выделяя в эту среду продукты метаболизма, способ культивирования называют **поверхностным**.

Когда же микроорганизмы распределяются по всему объему жидкой питательной среды, культивирование называют **глубинным** (жидкофазным). В таком случае кислород поступает к клеткам в результате интенсивной операции перемешивания.

Последний способ наиболее широко применяется в настоящее время в производстве большинства препаратов по следующим причинам:

1. Позволяет получить *большое количество бактериальной массы* за короткое время. Так, при культивировании микроорганизмов группы кишечной палочки в условиях состояния покоя количество микробов не превышает  $1\text{--}2 \text{ млрд/см}^3$ , а при применении принудительной аэрации урожайность достигает  $50\text{--}60 \text{ млрд/см}^3$ .

2. *Процесс легко управляем.* С целью длительного поддержания роста и размножения микроорганизмов в процессе их культивирования дополнительно вводят углеродные и азотистые соединения, а при необходимости и другие стимуляторы роста. Данный способ также позволяет легко корректировать pH среды в процессе культивирования.

3. *Процесс максимально технологичен.*

Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в реакторах (ферментерах) складывается из следующих **этапов**:

- отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними;
- приготовление посевной микробной культуры;
- приготовление и стерилизация питательных сред;
- подготовка биореактора к посеву;
- выращивание микроорганизмов в реакторе и контроль над процессом культивирования.

Кроме того, он включает ряд **вспомогательных операций**:

- стерилизацию оборудования и коммуникаций;
- приготовление и стерилизацию пеногасителей, растворов и др.

Остановимся на каждом из этапов культивирования.

### **6.3. Отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними**

Эталонные штаммы микроорганизмов хранятся и поддерживаются на заданном уровне во ВГНИКИ (Всесоюзный государственный научно-исследовательский институт клеточной инженерии) ветеринарных препаратов. Эти штаммы, в свою очередь, являются производственными, поскольку на их основе готовятся вакцины.

Наряду с производственными и эталонными штаммами во ВГНИКИ хранятся контрольные штаммы, которые используют для оценки качества вакцинных препаратов. Эти штаммы должны быть генетически однородными популяциями микроорганизмов со стабильными морфологическими, специфическими и биологическими свойствами. Основными требованиями к этим штаммам являются их высокие антигенные и иммуногенные свойства.

Производственные, эталонные штаммы должны сохранять генетическую стабильность антигенных, иммуногенных и других присущих им биологических свойств на протяжении 10-20 последовательных пересевов как *in vivo*, так и *in vitro*.

#### **6.4. Приготовление посевной микробной культуры**

Обычно производственное культивирование микроорганизмов осуществляется в больших объемах. Поэтому вначале из имеющегося эталонного штамма микроорганизма, находящегося, как правило, в лиофильно высушенном состоянии в ампуле, делают посевы в небольшие емкости, например, во флаконе емкостью 100-200 см<sup>3</sup>, заполненные по 50-150 мл производственной средой. Затем из флаконов делают высевы в большие емкости (бутыли объемом 18-20 л).

При хорошем накоплении микроорганизмов такую культуру вносят в реактор и называют посевной (маточной) культурой. При этом нужно предварительно рассчитать необходимое количество посевной культуры для производственного культивирования микроорганизмов исходя из посевной дозы, которая обычно составляет от 1 до 10% по объему. Посевные микробные культуры также контролируются на сохранение ими типичных морфологических, культурально-биохимических, антигенных и иммуногенных свойств, а также на отсутствие в них посторонней микрофлоры (ПМФ).

#### **6.5. Приготовление и стерилизация питательных сред**

Основополагающим принципом конструирования питательных сред является их полноценность, поскольку в процессе роста микроорганизмы потребляют из окружающей питательной среды целый ряд разнообразных химических веществ, составляющих основу энергетического и конструктивного обмена в клетках.

К основным компонентам, формирующим клеточное вещество, относятся: углерод, азот, кислород и водород. Содержание этих элементов в различных микроорганизмах практически постоянно.

В результате разнообразия микроорганизмов, по-разному использующих углерод и азот, одинаково пригодных (универсальных) питательных сред для роста всех без исключения микроорганизмов и клеток не существует. Их специфичность зависит от содержания в них углерода и азота.

В зависимости от типов используемых азотистых соединений микроорганизмы разделяются на две группы:

1. **Протеолитические**, т.е. расщепляющие высокомолекулярные белковые вещества и пептиды.

2. **Дезаминирующие**, требующие присутствия в среде готовых аминокислот, расщепление которых сопровождается выделением аммиака.

Считается, что питательные среды должны быть сбалансированы по содержанию таких органических веществ, как аминокислоты, витамины, жирные кислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, гормоны и др., добавление которых в очень незначительных количествах стимулирует рост и размножение микроорганизмов.

Очень часто микроорганизмы и клетки нуждаются во многих природных *аминокислотах*, которые являются универсальными компонентами питания. Они целиком включаются в структуру клетки. Из всех незаменимых аминокислот ключевая роль принадлежит глутамину и аргинину, которые имеют принципиальное значение для обезвреживания токсичных метаболитов незаменимых аминокислот и аммиака.

Также необходимым компонентом питательных сред являются *неорганические соли*, которые определяют необходимое осмотическое давление среды, величину pH и буферную емкость.

Другим наиболее важным принципом конструирования питательных сред является выбор *сырьевых источников*. Определяющую роль в данном вопросе играют, прежде всего, биохимические показатели состава сырья, от которого зависит выбор способа и режимов его переработки с целью наиболее полного и эффективного использования содержащихся в нем питательных веществ.

Для получения питательных сред с особо ценными свойствами применяют прежде всего традиционные источники *белка*

*животного происхождения*: мясо крупного рогатого скота, казеин, рыбу и продукты ее переработки. Их удельный вес составляет до 80%.

Наиболее широко применяются питательные среды на основе мяса крупного рогатого скота. Также широкое распространение получила рыбная костная мука (РКМ), удовлетворяющая требованиям биологической ценности, доступности и относительной стандартности.

Питательные среды на основе казеина содержат все компоненты, имеющиеся в молоке: жир, лактозу, витамины, ферменты и соли. Однако в результате удорожания продуктов переработки молока применение таких сред носит ограниченный характер.

Из непищевых источников белка животного происхождения в качестве сырья используются кровь убойных животных, селезенка, плацента, эмбрионы домашних животных, творожная сыворожка, мягкие ткани моллюсков и ластоногих и др. Удельный вес непищевого сырья в технологии конструирования питательных сред составляет всего 15%.

В целом питательные среды, приготовленные из сырья животного происхождения, имеют высокое содержание основных питательных компонентов, являются полноценными и сбалансированными по аминокислотному составу и достаточно хорошо изучены.

Следует учитывать, что рыбная и костная мука, а также отходы животного происхождения, во все большем объеме направляются на получение пищевых белков, поэтому требуются полноценные их заменители, способные сбалансировать недостаток белков и незаменимых аминокислот.

В результате изучения различных микроорганизмов было выявлено, что высокой интенсивностью синтеза белков отличаются *микробные клетки*, такие как дрожжи, бактерии и др. Аминокислотный состав микроорганизмов, служащих субстратом для приготовления питательных сред, хорошо изучен, а биомасса используемых микроорганизмов является полноценной по составу питательных веществ (до 60% сухой массы белков) и характеризуется повышенным содержанием лизина и треонина.



Из продуктов *растительного происхождения* в качестве белкового субстрата можно использовать кукурузу, сою, горох, картофель, люпин и др. Однако растительное сельскохозяйственное сырье содержит белок, несбалансированный состав которого зависит от условий выращивания культур, а также липиды в больших количествах, чем продукты животного происхождения.

В настоящее время нашей биологической промышленностью на основе гидролиза растительного сырья производится значительный объем кормового белка для сельского хозяйства.

В качестве исходного сырья для производства **кормового белка** могут использоваться самые дешевые источники, такие как отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, пивная дробина, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

Кроме того, в России (в 1971 г.) и некоторых других нефтедобывающих странах разрабатываются технологии получения кормовых дрожжей из *n*-парафинов нефти. Дрожжевые клетки могут использовать в качестве источников углерода для их роста неразветвленные углеводороды с числом углеродных атомов от 10 до 30.

Наряду с получением кормовых дрожжей важное значение для кормопроизводства имеют также бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60-80% от сухой массы. Здесь в качестве сырья используются газообразные продукты, содержащие метан.

## **6.6. Подготовка биореакторов к посеву и выращивание микроорганизмов**

При культивировании микроорганизмов чаще всего применяется способ глубинного выращивания в специальных аппаратах – *ферментерах*.

В простерилизованный термическим способом ферментер подается заранее измельченное, охлажденное и отстаивающее сы-

рье, которое в данном ферментерном цехе подвергнется кислотному гидролизу при повышенном давлении и температуре, в результате чего 60-65% содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов.

Ферментер для выращивания дрожжей и бактериальных клеток в жидкой питательной среде представлен на рисунке 8.

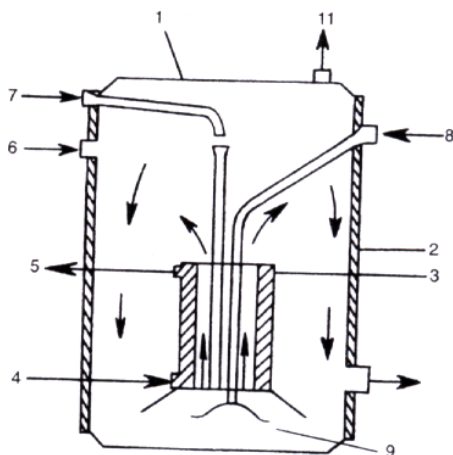


Рис. 8. Ферментер для выращивания микроорганизмов в жидкой питательной среде:

*1 – корпус ферментера; 2 – охлаждающая рубашка; 3 – теплообменник; 4 – подача холодной воды в теплообменник; 5 – вывод теплой воды из теплообменника; 6 – подача посевной культуры; 7 – подача жидкой питательной среды; 8 – подача воздуха для аэрации и перемешивания питательной среды; 9 – кювета для направления потока воздуха во внутреннюю полость теплообменника; 10 – выход микробной суспензии по окончании ферментации; 11 – выход воздуха в атмосферу через очистной фильтр*

Представленный выше ферментер обеспечивает режим постоянного перемешивания суспензии микробных клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации. В целях поддержания заданного температурного режима в конструкции ферментера предусматривается система отвода избыточного тепла.

Рабочий цикл выращивания культуры микроорганизмов длится около 20 часов. Например, при оптимальных условиях из 1 т отходов хвойной древесины можно получить 200 кг кормовых дрожжей. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с суспендированными в ней клетками микроорганизмов выводится из ферментера, а в него вновь подается питательный субстрат и культура дрожжевых или бактериальных клеток для выращивания.

Выведенная из ферментера суспензия далее подается на флотационную установку, с помощью которой производится отделение биомассы от культуральной жидкости. После отстаивания микробная масса концентрируется с помощью сепаратора.

Для достижения лучшей перевариваемости дрожжей и бактериальных клеток в организме животных проводится специальная обработка микробных клеток (механическая, ультразвуковая, термическая, ферментативная), обеспечивающая разрушение их клеточных оболочек. Затем микробная масса упаривается до необходимой концентрации и высушивается до влажности 8-10%.

В полученной сухой дрожжевой массе содержится 40-60% сырого белка, 25-30% усвояемых углеводов, 3-5% сырого жира, 6-7% клетчатки и зольных веществ, а также большое количество витаминов (до 50 мг%). Посредством обработки дрожжей ультрафиолетовыми лучами проводится их обогащение витамином D<sub>2</sub>, который образуется из содержащегося в них эргостерина.

Бактериальные белковые концентраты содержат в среднем 60-80% сырого белка от сухой массы. Коммерческое название препарата, полученного на основе метанола – «Меприн», он содержит в своем составе до 70-74% от сухой массы белков, до 5% липидов, около 10% минеральных веществ, 10-13% нуклеиновых кислот. При этом наиболее эффективны бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas* и др.

Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые белковые вещества выпускают в гранулированном виде.

Культивирование бактериальных клеток на газообразных питательных средах отличается следующими особенностями. Процесс ферментации при выращивании микроорганизмов на газообразных углеводородах представлен на рисунке 9.

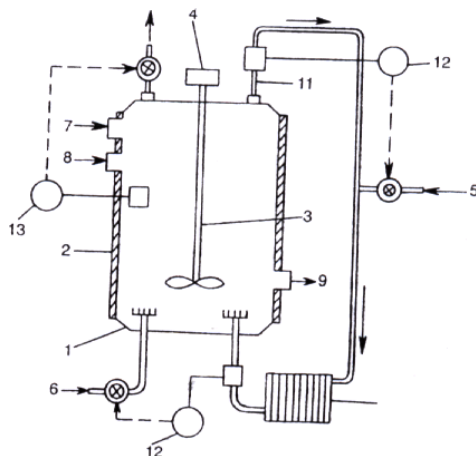


Рис. 9. Процесс ферментации при выращивании микроорганизмов на газообразных углеводородах:

1 – корпус ферментера; 2 – охлаждающая рубашка; 3 – мешалка; 4 – привод мешалки; 5 – подача газообразных углеводородов; 6 – подача кислорода содержащего газа; 7 – подача жидкой питательной смеси; 8 – подача посевной культуры; 9 – выход микробной суспензии по окончании ферментации; 10 – выпуск газа из ферментера; 11 – выход газовой смеси на рециркуляцию; 12 – газоанализатор, подающий сигнал на регулирующее устройство клапана; 13 – регулятор давления внутри ферментера; 14 – улавливатель углекислого газа

В целях лучшей утилизации сырья микроорганизмами в таком ферментере предусматривается рециркуляция газовой смеси. Для обеспечения необходимой аэрации культуры бактерий производится продувка ферментера воздухом или кислородом. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylosoccus*, способные при оптимальных условиях утилизировать до 85-90% подаваемого в ферментер метана. Все технологические линии, связанные с культивированием бактерий в газовой среде, требуют точного контроля за составом этой среды и оснащения производственных установок герметизированным, взрывобезопасным оборудованием.

По окончании ферментации клетки бактерий подвергаются такой же технологии обработки, как и дрожжевые клетки.

В связи с тем, что газовая среда из метана и воздуха взрывоопасна и для лучшей утилизации метана бактериями требуется постоянная рециркуляция, производство кормового белка из газообразных продуктов является довольно сложным и дорогим.

#### **6.7. Технология культивирования микроорганизмов в покоем состоянии без аэрации**

Некоторые организмы относятся к группе микроаэрофильных (возбудители бруцеллёза, лептоспироза, кампилобактериоза и др.), не требующие принудительной аэрации питательной среды, в которой они выращиваются.

Применяют баллонный и реакторный способы культивирования.

Баллонный способ, в частности для культивирования лептоспир, заключается в том, что микробные культуры лептоспир каждого серологического варианта выращиваются в 16-литровых стеклянных баллонах с 10-12 л сывроточной или альбуминно-сывроточной (производственной) средами при температуре 27-28<sup>0</sup>С в течение 5-7 суток.

#### **6.8. Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов**

К анаэробным микроорганизмам относятся такие, которые способны жить и размножаться при отсутствии атмосферного кислорода.

В силу биологических особенностей анаэробов методы культивирования их в промышленности имеют свои особенности.

1. При культивировании анаэробных микроорганизмов нужно в реакторах создать условия полного вытеснения из питательной среды свободного кислорода. Это достигается путём заполнения анаэро(бо)статов газовой смесью водорода и двуокиси углерода, а остаточный кислород может быть удалён путём каталитического связывания с воздухом.

Анаэробные условия могут быть достигнуты также добавлением в среду восстанавливающих агентов, таких как цистеина и сульфида натрия, аскорбиновой кислоты.

2. Степень анаэробноза определяется окислительно-восстановительным потенциалом (Eh). Для этих целей в среду вводят окислительно-восстановительные индикаторы, чаще всего используют резазурин (диазорезоурин) –  $10^{-4}$  ч.-л<sup>-1</sup>, меняющий цвет от сине-розового до бесцветного. Бесцветное состояние достигается при Eh около 100 мВ и указывает на наличие анаэробных условий.

3. При культивировании анаэробов необходимо постоянно корректировать pH среды, поддерживая её в пределах 7,2-7,8. В процессе роста анаэробов pH среды очень быстро снижается в кислую сторону, что приводит к ингибированию их роста.

### **6.9. Периодические и хемостатные системы культивирования микроорганизмов**

При глубинном выращивании микроорганизмов их культуры могут находиться в периодических, или «закрытых», и хемостатных (непрерывных), или «открытых», системах.

Закрытой называют такую систему (культуру), когда хотя бы один из компонентов питательной среды или она вся может ни поступать в систему, ни покидать её. В такой системе скорость роста микроорганизмов должна после ускорения стремиться к нулю из-за недостатка субстрата или по причине гибели микробных клеток вследствие накопления продуктов метаболизма. Следовательно, периодические культуры микроорганизмов находятся в неустойчивом состоянии.

Открытая (хемостатная) система – это система, когда все питательные компоненты могут поступать в реактор, в котором выращивается тот или иной микроорганизм, и удаляться из реактора в виде продуктов синтеза микроорганизмов (антибиотики, витамины, ферменты и т.д.) или биомассы самих микроорганизмов. При этом скорость поступления питательной среды в реактор и удаление из него продуктов синтеза или биомассы можно регулировать в нужной нам среде размножения микроорганизмов.

### 6.9.1. Периодическое культивирование микроорганизмов

В периодическом состоянии динамика роста и размножения микроорганизмов в жидкой питательной среде обладает рядом особенностей, общих для бактерий, актиномицетов, микроскопических грибов, микоплазм и других про- и эукариот. При индивидуальном развитии им свойственна высокая скорость размножения. Развитие происходит в виде последовательных фаз, характер и продолжительность которых зависят от физиологического состояния клеток, определяемого, в свою очередь, условиями разнообразных факторов среды, в которой развивается популяция того или иного организма.

Другими словами, фазы роста микроорганизма отражают количественные и качественные изменения в их биомассе и окружающей среде.

В простой гомогенной периодической культуре микроорганизмов выделяют от 4 до 8 и даже до 16 фаз.

Рост микробной популяции изображают обычно графиками, откладывая на оси абсцисс время роста, а на оси ординат – число микробных клеток (рис. 10).

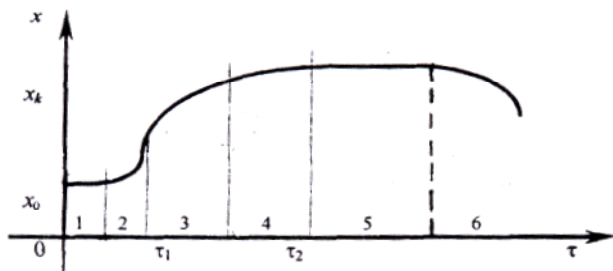


Рис. 10. Рост микробной популяции при периодическом культивировании

Каждая фаза приведённого графика является суммированным выражением размножения и отмирания клеток в микробной популяции. Поскольку микробные клетки делятся в различном темпе, то представленная на графике кривая нарастания их чис-

ла в начале и уменьшения числа живых клеток в конце роста имеет вид пологой линии. Форма этой кривой (S-образная) является универсальной и не зависит от вида микроорганизмов и условий культивирования.

Каждая из указанных на графике (рис. 10) фаз роста и размножения характеризуется следующим образом:

**а) исходная фаза (лаг-фаза или инукционный период)** является фазой задержки роста, когда размножение микробных клеток не происходит. Данная фаза характеризуется отсутствием роста клеток. В этот период посевная культура приспосабливается к изменившимся внешним условиям и вырабатывает ферменты, необходимые для роста на данной питательной среде. В лаг-фазе в клетках культуры происходят значительные качественные изменения: возрастает количество нуклеиновых кислот, в первую очередь РНК, активизируются одни ферменты и синтезируются другие.

Продолжительность лаг-фазы зависит от следующих факторов:

- от состава питательной среды: если питательная среда по составу мало отличается от среды, на которой росла посевная культура, лаг-фаза может практически отсутствовать;
- от качества посевного материала, а именно, количества в нем жизнеспособных клеток, их возраста, способа хранения;
- от посевной дозы;

**б) период положительного ускорения роста.** Длительность этого периода для большинства микроорганизмов составляет 2 часа и зависит от температуры, состава питательной среды, качества посевного материала. Многие авторы эти две фазы рассматривают вместе. Число клеток остается постоянным по причине отсутствия в этот период клеточного деления. Общее состояние микробных клеток характеризуется как состояние приспособления к питательной среде. В этот период усиливается синтез вещества, клеток, они увеличиваются в размере, в них образуется большое количество индуцибельных ферментов;

**в) фаза логарифмического (лог-фаза), или экспоненциального (показательного), роста.** Она характеризуется посто-



янной и максимальной скоростью роста клеток. Рост микробов в эту фазу происходит в геометрической прогрессии.

Продолжительность этой фазы зависит:

- от запасов питательных веществ в среде;
- от условий аэрации;
- от перемешивания и др. факторов.

Для описания процессов роста микроорганизмов используют такие характеристики, как общая и удельная скорости роста биомассы (или числа клеток). Другой важной характеристикой роста культуры является время генерации, за которое биомасса культуры удваивается. Время генерации из разных культур микроорганизмов сильно различается. Наиболее быстрорастущие бактерии при благоприятных условиях имеют период генерации – 20-25 мин.

Продолжительность генерации в лог-фазе у разных микроорганизмов неодинакова. Так, для сальмонелл она равна 20-30 мин., для стрептококков и стафилококков – 25-35 мин., для эшерихий – 15-17 мин.

На продолжительность генерации влияют температура, pH среды, состав среды и т.д.

Высокая скорость развития микроорганизмов сохраняется на всей экспоненциальной стадии. Однако эта зависимость наблюдается в течение ограниченного времени. По мере роста культуры в среде постепенно потребляются питательные вещества, накапливаются продукты обмена, затрудняется транспорт питательных веществ (в первую очередь кислорода) и метаболитов вследствие увеличения плотности популяции;

**г) фаза отрицательного ускорения.** В эту фазу скорость размножения замедляется, а время генерации увеличивается. Наступление данной фазы обусловлено истощением питательной среды и накоплением в культуральной жидкости токсических веществ, которые начинают ингибировать развитие культуры. Кроме того, в эту фазу происходит наивысшее накопление микробной массы в единице объема;

**д) стационарная фаза роста, или максимума,** на протяжении которой численность микробной популяции не уменьшается. В эту фазу скорость размножения и отмирания клеток одинаковая. Концентрация живых клеток в данную фазу достигает

максимума, и она называется М-концентрацией. В этой фазе сама биомасса микроорганизмов и продуктов их биосинтеза обладает наибольшей биотехнологической ценностью;

**е) фаза отмирания микробной популяции.** Любая микробная популяция, растущая в сосуде с несменяемой средой, вступает после фазы стационарного роста в стадию отмирания. По скорости отмирания вначале устанавливают фазу ускоренного отмирания (VI), затем фазу постоянной скорости отмирания (VII) и фазу замедленной скорости отмирания (VIII). Причинами отмирания микробной популяции являются истощение среды и накопление в ней большого количества токсичных продуктов метаболизма. В период стадии отмирания общее количество биомассы уменьшается, что чаще всего происходит за счет аутолиза.

Продолжительность стадии отмирания у различных микроорганизмов неодинакова: у пневмококка она составляет 2-3 суток, у эшерихий – несколько месяцев. В этот период в культуре наблюдается значительное уменьшение клеток. У них уменьшается биохимическая и антигенная активность.

Учитывая это, для изготовления ряда биопрепаратов отбирают культуры микроорганизмов чаще всего в фазе отрицательного ускорения роста или в начале стационарной фазы роста, когда концентрация живых микробных клеток приближается или равна М-концентрации.

### ***6.9.2. Хемостатная культура, или метод непрерывного культивирования микроорганизмов***

Хемостатная, или непрерывная, культура представляет собой поточную культуру тех или иных микроорганизмов. В таком случае возможность продления жизни микробной популяции поддерживается с помощью непрерывной подачи свежей среды и постоянного отбора микробной биомассы или образовавшихся продуктов метаболизма, т.е. можно культуру микроорганизма как бы зафиксировать в одной, например, стационарной, фазе роста и получить нужные продукты обмена или биомассу во времени столько, сколько требуется. Таким образом,

максимальная производительность в хемотратной культуре всегда выше, чем максимальная производительность в периодической культуре.

Нужно сказать, что до 50-х годов для культивирования микроорганизмов с целью их всестороннего изучения служила простая периодическая культура. Только с переходом к методу хемотратного культивирования обнаружился недостаток периодической культуры, которая не даёт полного представления обо всех изменениях, происходящих в клетке, и о влиянии внешних факторов на протекающие в ней процессы.

Развитие хемотратного культивирования открыло возможность управлять процессом, контролируя рост и поведение микроорганизмов, а при необходимости вмешиваться в этот процесс, изменяя скорость роста до задаваемых пределов путём воздействия на такую культуру внешними факторами. В настоящее время интерес к непрерывному культивированию растёт как в нашей стране, так и за рубежом.

#### **6.10. Особенности биотехнологии культивирования вирусов**

Вирусы являются облигатными внутриклеточными микроорганизмами, поэтому на искусственных питательных средах они не растут. Для культивирования вирусов используют 3 живые системы:

1. Восприимчивые животные.
2. Куриные эмбрионы.
3. Культуры клеток.

При лабораторном культивировании вирусов используют культуры клеток, растущие на поверхности стенок тех или других емкостей (матрасах).

В крупномасштабном производстве используют метод выращивания суспензионных клеточных культур. Этот метод впервые описал в 1953 г. Оуенс. Он показал способность клеток размножаться в жидкой среде в свободном суспендированном состоянии. Клетки перевиваемых линий могут длительно культивироваться во взвешенном состоянии. В таких условиях клет-

ки размножаются, не прикрепляясь к стенкам культурального сосуда, благодаря постоянному перемешиванию среды. Перемешивание суспензионных культур проводят лопастными и магнитными мешалками, а также круговыми качалками.

В настоящее время указанная клеточная система широко используется в вирусологических исследованиях для накопления больших количеств вируссодержащего материала при изготовлении вакцин, т.к. при оптимальном режиме выращивания клетки в суспензиях быстро размножаются и дают более высокий «урожай», чем в стационарных культурах.

Суспензионные культуры готовят из однослойных клеточных культур. Клетки снимают со стекла с помощью растворов Версена и трипсина. Осадок клеток после центрифугирования ресуспендируют в свежей ростовой питательной среде. Приготовленную суспензию помещают в культуральные сосуды, реакторы, ферментеры и выращивают при постоянном и интенсивном перемешивании. Это делается для того, чтобы поддержать клетки во взвешенном состоянии, препятствовать их осаждению и прикреплению к стенкам сосуда и в то же время не вызывать их механического повреждения.

Способ суспензионного выращивания клеток в биологической промышленности стал применяться сравнительно недавно.

Даже за короткий срок получены впечатляющие результаты. Большие успехи достигнуты при получении суспензионных постоянных культур клеток ВНК-21 для выращивания вируса ящура, вируса бешенства; клеток почки поросят JBRS-2 для размножения вируса ящура, вируса везикулярной болезни свиней и др.

Выращивание клеточных культур осуществляют в специальных реакторах емкостью 1000 л и более при температуре 36-37<sup>0</sup>С, рН 7,4 и непрерывном перемешивании суспензии клеток при 300-350 об/мин.

Несмотря на достижения по выращиванию суспензионных клеточных культур на многих предприятиях биологической промышленности чаще используются методы получения клеточных линий в состоянии покоя или роллерным (динамичным) способом.

## Семинарское занятие 4

**Цель работы:** изучить особенности промышленного культивирования микроорганизмов, поставляющих готовые целевые продукты биосинтеза.

**Порядок выполнения работы:**

1. Ознакомиться с основными способами культивирования микроорганизмов.
2. Изучить этапы технологического процесса глубинного выращивания микроорганизмов.
3. Усвоить основные требования при приготовлении питательных сред.
4. Рассчитать эффективность стерилизации жидких питательных сред в изотермических условиях при двух разных заданных режимах.
5. Рассчитать количество полученного сырого кормового белка в результате гидролиза растительных отходов дрожжами рода *Candida*.

**Задание 1.** Записать основные характеристики этапов технологического процесса глубинного выращивания микроорганизмов, оформив в виде нижеприведенной таблицы.

Характеристика этапов процесса  
глубинного выращивания микроорганизмов

№ п/п	Этап технологического процесса	Основные характеристики

**Задание 2.** Рассчитать количество полученного сырого кормового белка в результате гидролиза растительных отходов (отходы целлюлозной промышленности, солома, свекловичная меласса, картофельная мезга, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности) за 20 ч рабочего цикла при условии, что из 1 т отходов можно получить 200 кг кормовых дрожжей в сухой массе, содержащих 50% сырого белка.

## Лабораторная работа 2

### Приготовление питательной смеси и матричной культуры для культивации дрожжей

**Цель работы:** получить навыки приготовления питательных сред, посевного материала и контроля концентрации посевного материала. Рассмотреть под микроскопом взвесь пекарских дрожжей и определить присутствие двух рас одноклеточных грибов в культуре.

#### Оборудование и реактивы:

- 1) бюретки (50 и 30 мл), колбы конические (100-500 мл);
- 2) мензурки (0,5; 0,1; 2,5; 30 мл), пипетки (0,2-0,5 мл);
- 3) раствор сульфата натрия 0,5-1,0 Н;
- 4) раствор тиосульфата натрия 0,1 Н;
- 5) глюкоза – 0,1 кг;
- 6) спирт этиловый – 0,05 кг;
- 7) культура *S. servisea* (10 г сухого препарата с влажностью 75%);
- 8) комплект реактивов для определения концентрации глюкозы;
- 9) фотоколориметер (ФКМ);
- 10) микроскопы;
- 11) камера Горяева.

#### Порядок выполнения работы:

1. Приготовить питательную среду, для чего:

- отвесить 50 г глюкозы и всыпать ее в стерильную емкость объемом 0,5 л;
- отвесить по 0,01 г NaCl, MgSO<sub>4</sub>, KCl и всыпать их в емкость;
- влить в эту емкость 300 мл дистиллированной воды температурой 36<sup>0</sup>С и размешать;
- определить концентрацию глюкозы фотоколориметрическим методом.

2. Приготовить посевной материал, для чего:

- взвесить 5 г дрожжей *S. servisea*;
- влить в стерильную емкость (объем 50 мл) 30 мл дистиллированной воды температурой 36<sup>0</sup>С;
- всыпать навеску дрожжей в воду и размешать;

- провести контроль концентрации посевного материала фотоколориметрическим методом на приборе ФКМ;
- определить концентрацию дрожжей микроскопическим анализом.

**Задание 3.** Рассмотреть под микроскопом взвесь пекарских дрожжей и определить присутствие двух рас одноклеточных грибов в культуре.

#### *Ход работы*

1. Взять колбу с взвесью пекарских дрожжей, заранее помещенных в теплую подсахаренную воду.
2. Каплю жидкости из колбы нанести на предметное стекло и накрыть покровным стеклом.
3. Сверху нанести каплю кедрового масла и рассматривать препарат под микроскопом с иммерсионной системой.
4. Определить присутствие двух рас грибов и зарисовать их форму.
5. Рассмотреть процесс почкования дрожжей по наличию почек на клетках.

### **Лабораторная работа 3**

**Цель работы:** приготовить фиксированный препарат из молочнокислого продукта (кефира, ряженки и др.) и зарисовать доминирующие формы микробов.

**Материал и оборудование:** плакаты; рисунки; термостат; бактерицидная лампа; химическая посуда: мерный стакан емкостью 50, 150 и 200 мл; воронка; микроскоп; чашка Петри; бактериологическая петля; предметные и покровные стекла; один из молочнокислых продуктов (кефир, ряженка, ацидофилин, йогурт и др.).

#### **Порядок выполнения работы:**

1. Бактериологическую петлю ввести в сгусток молочнокислого продукта и, повернув вокруг оси, извлечь каплю содержимого.
2. Сгусток размазать по предметному стеклу очень тонким слоем без воды.

3. Высушить на воздухе.

4. Зафиксировать смесью спирта с эфиром (1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и с помощью эфира извлекается и удаляется жир, капли которого на препарате мешают окраске и микроскопированию.

5. Фиксированный препарат окрасить метиленовым синим в течение 2-3 минут.

6. Промыть водой, высушить и микроскопировать с иммерсией.

7. Зарисовать доминирующие формы микробов.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Что такое культивирование микроорганизмов?
2. Какие факторы необходимы для осуществления биотехнологического процесса?
3. Что эффективнее: культивирование микроорганизмов на жидких или плотных питательных средах?
4. Какой способ культивирования называют поверхностным?
5. Что такое твердофазное культивирование, и какой субстрат используется при этом чаще других?
6. Что такое жидкофазное (глубинное) культивирование?
7. В чем преимущества жидкофазного культивирования?
8. Какими приемами можно увеличить интенсивность размножения микроорганизмов при жидкофазном культивировании?
9. Каковы этапы технологического процесса культивирования микроорганизмов?
10. Где хранятся эталонные штаммы микроорганизмов?
11. Каковы требования к эталонным штаммам микроорганизмов?
12. Каким образом готовят посевную микробную культуру?
13. Какие принципы лежат в основе конструирования питательных сред для микроорганизмов?
14. На какие группы делят микроорганизмы по типу питания?
15. На какие группы подразделяются микроорганизмы по типу используемых азотистых оснований?



16. Какие ионы необходимы микроорганизмам и для чего?
17. Какие факторы роста должны входить в состав питательных сред?
18. Какие традиционные источники белка животного происхождения используют для получения питательных сред?
19. Какие непищевые источники белка животного происхождения используют в питательных средах?
20. Какие культуры используют для получения белка растительного происхождения, используемого в питательных средах?
21. Какой белок (растительного, животного или микробного происхождения) более ценен для питательных сред и почему?
22. Какова классификация питательных сред по целевому назначению?
23. Какова классификация питательных сред по физическому состоянию?
24. В чем преимущество жидких питательных сред?
25. Как получить полужидкие и твердые питательные среды?
26. В чем преимущество сухих питательных сред?
27. На основании чего и как осуществляется оптимизация состава питательных сред?
28. Зачем нужна стандартизация питательных сред и по каким показателям она проводится?
29. Принципы устройства биореактора (ферментера) для культивации микроорганизмов.
30. Как производится подготовка биореактора к посеву?
31. Каковы условия промышленного культивирования микроорганизмов с применением активной аэрации?
32. Как производят контроль культивирования микроорганизмов?
33. Какие периоды различают в динамике роста и размножения микрофлоры в ферментерах?
34. Что типично для лаг-фазы (индукционного периода)?
35. Что типично для лог-фазы (экспоненциального роста)?
36. Что характерно для фазы отрицательного ускорения?
37. Стационарная фаза роста и М-концентрация.
38. Что характерно для фазы отмирания микробной популяции?

39. Что такое хемотропная культура?
40. Что необходимо для непрерывного культивирования микроорганизмов?
41. Каковы особенности биотехнологии культивирования вирусов?
42. Какие живые системы используют для культивирования вирусов?
43. Как готовят однослойные клеточные культуры и суспензионные?
44. Как осуществляют аэрацию (барботацию) и перемешивание микробной культуры?

## **7. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И ВЫСУШИВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ**

В культуральной жидкости после окончания процесса ферментации содержатся микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, остатки питательной среды, пеногаситель, растворимые и нерастворимые вещества. Целевым продуктом биосинтеза могут быть непосредственно сами микроорганизмы либо их метаболиты, растворенные в культуральной жидкости или находящиеся внутри клеток микроорганизмов.

Почти во всех случаях для получения целевого продукта необходимо отделить взвешенную фазу – массу микроорганизмов – от культуральной жидкости.

Культуральные жидкости обычно являются сложными смесями и содержат большое число компонентов, многие из которых обладают близкими физико-химическими свойствами.

Наряду с растворенными минеральными солями, углеводами, белками и другими органическими веществами культуральные жидкости содержат в значительном количестве полидисперсные коллоидные частицы и взвеси. Следовательно, они являются не только многокомпонентными растворами, но и суспензиями. Дисперсная фаза этих суспензий состоит из мицелля или клеток микроорганизмов, а также из твердых частиц, содержащихся во многих питательных средах: муки, хлопьев из кукурузного экстракта и т.п. Содержание микроорганизмов в культуральной жидкости, как правило, очень низкое. В 1 л содержится обычно 5-10 г сухой биомассы. Отделение такого количества взвешенной фазы – трудная технологическая задача, которую приходится решать путем концентрирования различными способами (флотирование, сепарирование, упаривание).

Способы отделения клеточной биомассы микроорганизмов от культуральной жидкости можно разделить на:

- механические (отстаивание, фильтрование, центрифугирование);
- теплотехнические (сушка).

## **7.1. Методы выделения и концентрирования целевого продукта**

Все методы выделения продуктов микробиологического синтеза из культуральной жидкости делят на две группы:

1) экстракция, ионный обмен, адсорбция, кристаллизация, если целевой продукт в растворе;

2) осаживание, фильтрование, центрифугирование, сепарирование, если целевой продукт в виде твердой фазы.

Часто невозможно выделить целевой продукт с помощью одного метода, тогда применяют комбинацию нескольких методов и в процессе выделения переводят продукт из растворимой формы в нерастворимую (или наоборот). Как правило, при выделении растворенных веществ культуральную жидкость приходится подвергать предварительной обработке и очистке с помощью осаживания, фильтрования, центрифугирования, сепарирования и мембранных методов (электродиализ, ультра- и микрофильтрация).

### **7.1.1. Осаживание**

**Осаживание (седиментация)** – это процесс расслоения дисперсных систем под действием силы тяжести и отделение дисперсной фазы в виде осадка.

Скорость осаживания биомассы из культуральной жидкости невелика и составляет порядка  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  м/с.

Для ускорения процесса осаживания применяют:

1) коагулянты – вещества, переводящие взвешивание частиц в агрегатно-неустойчивое состояние;

2) флокулянты – вещества, способствующие разрушению коллоидных структур и образованию крупных хлопьев.

В качестве коагулянтов применяют обычно желатин, рыбный клей, казеин, в качестве флокулянтов – метилцеллюлозу, пектин, альгинат натрия и др.

### **7.1.2. Центрифугирование**

Центрифугирование – это разделение неоднородных систем под воздействием поля центробежных сил.

Для центрифугирования применяют центрифуги различных конструкций.

Центрифуги, имеющие высокий фактор разделения и оснащенные тарельчатым барабаном, называют *сепараторами*. В микробиологической промышленности сепараторы являются одним из самых распространенных типов центрифуг. Сепараторы позволяют сконцентрировать осадок до влажности 60-90%.

В последние годы появились специальные герметические сепараторы, позволяющие вести процесс сепарирования в автоматизированном режиме, оптимально подобранном для специфических условий конкретных культуральных жидкостей.

*Область применения центрифугирования:*

1. Выделение биомассы из культуральной жидкости (дрожжи, бактерии, грибы).
2. Отделение различных целевых продуктов микробиологического синтеза (антибиотики, ферменты, витамины и др.), переводение предварительно в твердую фазу.
3. Разделение эмульсий, образующихся при экстракции.

### ***7.1.3. Фильтрация***

***Фильтрация*** – это разделение твердой и жидкой фаз суспензии при пропускании ее через пористую перегородку.

Конечная цель фильтрации – получение твердой или жидкой фазы (когда одна из них является отходом), а также одновременное получение твердой и жидкой фаз.

Фильтрация – гидродинамический процесс, скорость которого прямо пропорциональна разности давлений, создаваемой по обеим сторонам фильтровальной перегородки и обратно пропорциональна сопротивлению, испытываемому жидкостью при ее движении через поры перегородки и слой образовавшегося осадка.

В качестве вспомогательных фильтровальных материалов используются фильтровальные порошки, которые вносят в фильтруемую жидкость как наполнители или предварительно наносят на рабочую поверхность фильтра в виде грунтового слоя.

#### 7.1.4. Экстракция

**Экстракция** – процесс разделения смеси твердых и жидких веществ с помощью избирательных (селективных) растворителей (экстрагентов).

Физическая сущность экстракции состоит в переходе извлекаемого компонента из одной фазы (жидкой или твердой) в фазу жидкого экстрагента при их взаимном соприкосновении. Экстрагируемые компоненты переходят из исходного раствора в растворитель вследствие разности концентраций, поэтому данный процесс относится к числу диффузионных.

Процесс экстракции проводится обычно в двухфазных системах: «твердое тело – жидкость» или «жидкость – жидкость».

*Область применения* экстракции: выделение и очистка антибиотиков, витаминов и аминокислот.

#### 7.1.5. Ионообмен

Ионообмен представляет собой сорбционный процесс.

**Адсорбция** – это процесс поглощения одного или нескольких компонентов целевого продукта из газовой смеси или раствора твердым веществом – *адсорбентом*.

Процессы адсорбции (как и другие процессы массопередачи) избирательны и обычно обратимы. Благодаря этому становится возможным выделение поглощенных веществ из адсорбента, т.е. проведение процесса *десорбции*.

Первые сорбционные методы выделения и очистки биологически активных веществ и антибиотиков были основаны на применении *молекулярных сорбентов* (активированные угли, окись алюминия и др.). Молекулярные сорбенты одинаково хорошо собирают выделяемое вещество и ряд примесей.

В настоящее время разработаны ионообменные сорбенты (иониты), которые характеризуются различной избирательностью и высокой специфичностью.

**Иониты** – это органические и неорганические вещества, практически не растворимые в воде и обычных растворителях, которые содержат активные (ионогенные) группы с подвижными ионами, способные обменивать эти ионы на ионы электролитов при контакте их с растворами.

Наиболее перспективны синтетические ионообменные смолы. Иониты нашли широкое применение в технологии производства антибиотиков на этапе их сорбции из культуральной жидкости.

### ***7.1.6. Кристаллизация***

***Кристаллизация*** – это выделение твердой фазы в виде кристаллов, главным образом из растворов и расплавов.

Кристаллизация антибиотиков и других биологически активных веществ основана на резком уменьшении их растворимости в результате изменения температуры раствора (обычно понижения, но иногда, например, в случае эритромицина – повышения) или перевода их в другую плохо растворимую химическую форму. Последнее достигается изменением pH раствора или добавлением соответствующего реагента, часто с одновременным снижением температур.

Кристаллизация является не только способом получения антибиотиков в твердом виде, но и очень эффективным средством очистки от сопутствующих примесей, что является существенным преимуществом по сравнению с некоторыми другими методами разделения.

Метод кристаллизации нашел применение в технологии получения антибиотиков (тетрациклина, эритромицина и др.), витаминов, полисахаридов.

### ***7.1.7. Упаривание***

***Упаривание*** – это процесс концентрирования жидких растворов путем частичного удаления растворителя испарением при нагревании жидкости. В ряде случаев упаренный раствор подвергают последующей кристаллизации.

Концентрированные растворы и твердые вещества, получаемые в результате упаривания, легче и дешевле перерабатывать, хранить и транспортировать.

Обычно производство антибиотиков осуществляют при температуре 60-70<sup>0</sup>С под вакуумом, поэтому метод недопустим при переработке термолабильных биологически активных веществ.

### **7.1.8. Мембранные методы разделения**

К мембранным методам разделения относятся:

1. Диализ и электродиализ.
2. Обратный осмос.
3. Микрофильтрация.
4. Ультрафильтрация.

В основе этих методов лежит явление осмоса – диффузия растворенных веществ через полупроницаемую перегородку, представляющую собой мембрану с большим количеством (до  $10^{10}$ - $10^{11}$  на  $1 \text{ м}^2$ ) мелких отверстий – пор, диаметр которых не превышает 0,5 мкм.

Под **мембраной** обычно принято понимать высокопористую или беспористую плоскую или трубчатую перегородку, оформленную из полимерных или неорганических материалов и способную эффективно разделять частицы различных видов (ионы, молекулы, макромолекулы и коллоидные частицы), находящиеся в смеси или растворе. Использование мембран позволяет создавать экономически высокоэффективные и малоотходные технологии.

К основным мембранным методам разделения жидких систем относятся обратный осмос, ультра- и микрофильтрация. Эти методы характеризуются такими общими чертами, как использование полупроницаемых, т.е. по-разному пропускающих компоненты растворов и суспензий, мембран, применение в качестве движущей силы процессы избыточного давления, способы борьбы с концентрационной поляризацией.

Как известно ветеринарными иммуно-биологическими препаратами (ВИБП) являются препараты, предназначенные для специфической профилактики, диагностики и лечения инфекционных, паразитарных болезней и аллергических состояний: вакцины, иммуноглобулины, интерфероны, цитокинины, сыворотки, бактериофаги, зубиотики, аллергены, диагностические препараты, питательные среды, иммуномодуляторы бактериального происхождения. В технологии приготовления практически всех из указанных препаратов можно найти применение микрофильтрации.



Перспективным направлением использования микрофльтрации в технологии производства ВИБП является метод культивирования микроорганизмов, который сочетает мембранные элементы с ферментационным оборудованием, что привело к созданию мембранных биореакторов (МБР).

Под МБР понимается обычный аппарат, в котором конструктивно объединены биореактор для глубинного культивирования клеток и мембранный модуль, обеспечивающий выведение потока бесклеточной культуральной жидкости.

В более широком смысле к МБР можно отнести и такие технологические решения, когда биореактор и мембранный аппарат связаны в единую систему с обратной связью, например, благодаря возврату пермеата или его части (концентрата или его части) в биореактор в целях управления процессом культивирования и биосинтеза.

Применение мембран в биореакторах основано на принципе смещения химического равновесия в сторону образования целевого продукта путем удаления этого продукта из реагирующей системы (принцип Ле-Шателье). Для этого регулирующие компоненты приводят в контакт с полунепроницаемой мембраной, обладающей преимущественной проницаемостью для целевых продуктов. Поскольку принцип Ле-Шателье является универсальным, то с такой точки зрения можно рассматривать не только МБР, в которых нужные вещества получают с помощью ферментативных химических реакций, но и мембранные ферменты, используемые для культивирования микроорганизмов с целью получения продуктов биосинтеза или для накопления клеточной биомассы.

В МБР осуществляется проведение одновременно двух процессов:

- управляемое культивирование микроорганизмов в объеме биореактора;
- удаление культуральной жидкости (или ее части) и замена её свежей питательной средой.

Благодаря этому становится возможным создание процесса культивирования микроорганизмов, непрерывного по жидкой фазе и периодического по условно твердой фазе – биомассе, что позволяет устранить ряд недостатков, присущих периодическим способам культивирования.

## **7.2. Способы консервирования биологических препаратов**

Необходимость стабилизации материалов биологического происхождения, связанная с их чрезвычайной нестойкостью, возникла на заре биологической науки. Известно, что в обычных условиях продолжительность сохранения большинства биологических продуктов исчисляется несколькими днями. В связи с этим разрабатывались различные способы консервирования биологических препаратов, которые в настоящее время можно разделить на:

- консервирование при положительных температурах с помощью химических соединений (хлороформ, фенол, глицерин, формалин и т.д.);
- консервирование при низких температурах (замораживание);
- консервирование высушиванием.

Высушивание является одним из наиболее совершенных процессов стабилизации свойств продуктов биологического (растительного, животного, микробиологического) происхождения и позволяет сохранять данные продукты в обычных условиях длительное время. Кроме того, существенно уменьшенная масса позволяет значительно снизить транспортные расходы и затраты на тару.

Необходимо отметить, что обезвоживание – трудный технологический процесс, который часто является решающим этапом производства, влияющим на качество выпускаемой продукции. Достоинством искусственного высушивания является значительно меньшие затраты времени на удаление влаги. Процесс сушки – это разнообразный комплекс тепловых, диффузионных, часто биологических и химических явлений (особенно когда дело касается интенсивной сушки). Препараты биологического происхождения обычно представляют собой сложные объекты сушки, характеризующиеся рядом показателей, важнейшими из которых являются начальная, конечная и равновесная влажность, термические, электрофизические, структурно-механические и массообменные характеристики. Разнообразие свойств продуктов требует индивидуального подхода к разработке рациональных методов их сушки (с учетом требований к качеству готового изделия).

В настоящее время различают естественную сушку на открытом воздухе и искусственную, в специальных устройствах с организованным и регулируемым подводом сушильного агента. По мнению ряда авторов, наиболее широкое внедрение на практике получили следующие методы сушки:

- сублимационный (лиофильный);
- конвекторный;
- контактный;
- терморadiационный;
- токами высокой частоты;
- комбинированный.

### ***7.2.1. Лиофильное высушивание биопрепаратов***

Одним из основных методов консервирования биопрепаратов, позволяющих длительное время сохранять их активность, является метод лиофильного высушивания. Он позволяет сохранить практически без изменения первоначальные свойства живых и реже инактивированных вакцин – диагностических и лечебных сывороток, агентов и других биологически активных препаратов, используемых для профилактики, диагностики и лечения.

Лиофильное высушивание состоит из двух приемов консервирования: замораживания и высушивания. Влагу из замороженных препаратов удаляют с использованием глубокого вакуума, минуя жидкую фазу. В процессе сушки влага перемещается в препарате не в виде жидкости, а в виде пара. В результате удастся максимально сохранить специфические свойства белков, свести к минимуму их денатурацию, обеспечить живым клеткам и вирусам состояние длительного анабиоза, что позволяет получить стандартизированные по активности биопрепараты.

Консервирование биопрепаратов методом лиофильного высушивания имеет ряд преимуществ перед другими методами:

- снижается масса биопрепарата;
- длительное время сохраняется исходная активность: вакцин – до 12-18 мес., сывороток – до 2-3 лет;
- прекращается рост микробных контаминантов.

Высушенные препараты можно хранить при температуре  $+4...+8^{\circ}\text{C}$ ; допускается кратковременное повышение температуры до  $+10...+15^{\circ}\text{C}$  (на период транспортировки до 7 дней).

Собственно сублимацию условно подразделяют на 2 этапа:

1) сушка при минусовых температурах при повышении температуры на  $1-2^{\circ}\text{C}$  в час;

2) сушка при плюсовых температурах.

Иногда эти периоды называют период удаления из материала свободной влаги и период удаления связанной влаги.

Первый период заканчивается, когда температура материала приближается к нулю градусов. Во втором периоде досушивания температуру поднимают до конечной температуры препарата, равной  $+25...+28^{\circ}\text{C}$ . Как правило, продолжительность первого периода значительно больше второго. В первом периоде удаляется до 90% влаги, во втором остаточная влажность составляет 1-4%. Признаком окончания второго периода является достижение заданной температуры и удержание её на этом уровне 1-3 часа, при этом вакуум в системе постоянно поддерживается на минимальном уровне. После окончания сушки прекращают нагрев и выключают вакуум-насос, постепенно уменьшают вакуум, впуская через специальный фильтр стерильный атмосферный воздух, либо инертный газ, обеспечивающий более длительное хранение материала при плюсовых температурах.

Сухой материал в ампулах запаивают под вакуумом, во флаконах герметически укупоривают, предварительно заполнив их инертным газом (аргоном, неоном, азотом).

### ***7.2.2. Конвективный метод высушивания биопрепаратов***

Конвективный метод высушивания является самым распространенным в биологической промышленности, на нем основана работа подавляющего большинства сушильных установок. В качестве сушильного агента применяют нагретый воздух, топочный газ или перегретый пар. Сушильный агент передает тепло материалу, под действием которого из материала удаляется влага в виде пара, поступающая в окружающую среду. Таким образом, сушильный агент при конвективной сушке является теплоносителем и влагопоглотителем.

Конвективный метод нашел применение в камерных сушильных установках. В таких аппаратах сушка материала производится периодически при атмосферном давлении. Сушилки имеют одну или несколько камер, в которых высушиваемый материал в зависимости от его вида располагается на сетках, противнях, шестах и т.д. и сушится в неподвижном состоянии. Поток нагретого воздуха проходит вдоль высушиваемого продукта и испаряет из него влагу.

Камерными сушильными установками непрерывного действия являются туннельные сушилки, работающие при атмосферном давлении. Камеры представляют собой длинный герметично закрытый туннель, в котором высушиваемый материал перемещается прямо или в противотоке сушильного агента, на кюветах или по ленте транспортера.

Сушильные установки камерного типа непрерывного и периодического действия имеют ряд недостатков:

- большая продолжительность сушки;
- неравномерность высушивания материала;
- значительные потери тепла при загрузке и выгрузке продукта;
- трудоемкость процесса.

В сушильной технике также используются барабанные сушильные установки, представляющие собой полый цилиндр с внутренней насадкой для непрерывного пересыпания и перемещения высушиваемого материала, в который подается теплоноситель.

### ***7.2.3. Контактный метод высушивания***

Этот метод сушки основывается на передаче тепла материалу при соприкосновении с горячей поверхностью. В качестве греющего теплоносителя используют чаще всего водяной пар, реже газы и высококипящие жидкости. Поток воздуха (вакуум) при этом способе служит только для удаления водяных паров из сушилки, являясь влагопоглотителем. По данным литературы, коэффициент теплоотдачи при этом способе значительно выше, чем при конвекторной сушке.

Простейшими контактными сушильными аппаратами являются вакуум-сушильные шкафы периодического действия. Такая сушилка представляет собой герметично закрывающуюся камеру, снабженную рядом полок, внутри которых проходит теплоноситель. Высушиваемый материал укладывается непосредственно на эти полки либо на съемные противни. Образующиеся при сушке пары отсасываются вакуум-насосом. Будучи очень металлоемкими эти сушилки в то же время малопроизводительны, что объясняется неподвижностью слоя высушиваемого материала и большей частью недостаточно полным контактом с поверхностью нагрева.

Широкое применение получили вальцовые сушильные установки непрерывного действия различных конструктивных модификаций. В корпусе сушильной установки вращается полый барабан, обогреваемый изнутри тепловым агентом. Исходный жидкий материал непрерывно подается на барабан, где за один неполный оборот последнего высушивается и срезается ножами. Для большей производительности при конкретном обезвоживании используются двухвальцовые сушилки.

#### ***7.2.4. Терморadiационный метод высушивания***

Сущность терморadiационного метода сушки состоит в том, что тепло материалу передается за счет невидимых тепловых (инфракрасных) лучей. Инфракрасные лучи (ИКЛ) – это лучи с длиной волны 0,77-340 мкм.

По мнению ряда авторов, при сушке ИКЛ к материалу подводится тепловой поток в несколько десятков раз больше, чем при конвективном способе, следовательно, увеличивается и скорость сушки инфракрасными лучами по сравнению с конвективной, но не пропорционально увеличению теплового потока. Так, для биологических препаратов растительного происхождения сушка ИКЛ ускоряется по сравнению с интенсифицированными методами конвективной сушки на 25-95%. Чем меньше длина волны, тем больше проникающая способность инфракрасных лучей. Проницаемость материалов зависит в основном от толщины слоя и влажности продукта.

Для материалов, у которых размер частиц больше глубины проникновения инфракрасных лучей, рекомендуется прерывистое облучение. В период прекращения подачи ИКЛ температура на поверхности частиц материала падает вследствие продолжительного интенсивного испарения. Температура внутри частицы больше, чем на поверхности, и влага начинает перемещаться из центральных слоев к поверхностным под действием обоих градиентов: температуры и влагосодержания.

По характеру излучателей инфракрасных лучей различают терморadiационные сушилки с электрическим и газовым обогревом. Наиболее широко используются на практике терморadiационные сушилки с газовыми панельными излучателями.

### ***7.2.5. Метод сушки токами высокой частоты***

При сушке токами высокой частоты (частота колебания 10-3000 МГц) органический материал помещается между обкладками конденсатора, к которым подается электрический ток высокой частоты. Продукты биологического происхождения представляют собой диэлектрики, имеющие некоторую проводимость, т.е. обладают свойствами полупроводников. В состав органических материалов входят ионы электролитов, электроны, полярные и неполярные молекулы диэлектриков. неполярные молекулы состоят из жестких упругих диполей. Полярные молекулы с постоянным дипольным моментом ориентируются в электрическом поле. Под действием переменного электрического поля высокой частоты происходит регулируемый нагрев материала.

Обкладки конденсатора имеют противоположный заряд, поэтому электроны и ионы перемещаются внутри материала к той или иной обкладке. При смене заряда на обкладках они перемещаются в противоположных направлениях, в результате чего неизбежно возникает трение с выделением тепла.

Таким образом, энергия электромагнитных волн, затрачиваемая на преодоление этих трений, будет переходить в тепло.

В электрическом поле высокой частоты нагрев частиц органического материала осуществляется за доли секунды. Поверхностные слои материала теряют часть тепла вследствие тепло- и

влагообмена с окружающей средой, поэтому температура материала будет выше внутри, чем снаружи. Под действием температурного градиента влага изнутри перемещается к поверхности частицы.

Преимущества сушки токами высокой частоты по сравнению с конвективной и контактной состоит в возможности регулирования и поддержания определенной температуры внутри материала и интенсификации процесса. Однако большие затраты электроэнергии, сложное оборудование и обслуживание, повышенные требования техники безопасности ограничивают применение токов высокой частоты для сушки.

### ***7.2.6. Комбинированные методы высушивания***

В настоящее время для высушивания термолабильных препаратов, кроме рассматриваемых выше методов, применяются их различные комбинации, которые позволяют достичь высокого качества получаемой продукции, повышения производительности и экономичности процесса, уменьшения трудозатрат. Примерами комбинированных способов сушки могут служить распылительно-сублимационное высушивание, контактно-сорбционное обезвоживание и т.д.

## **Лабораторная работа 4 (4 часа)**

### **Сублимационное высушивание биопрепаратов**

**Цель работы:** 1. Изучить кинетику сублимационной сушки продуктов биосинтеза, особенности этого метода сушки. 2. Усвоить принцип действия, устройство и контрольно-измерительную аппаратуру сублимационной установки типа GT-2.

#### **Оборудование:**

1. Сублимационная установка GT-2 фирмы «Лейбольд» (Германия).
2. Сушильный шкаф.
3. Весы ВЛР-200.
4. Микроскопы биологические.
5. Бюксы, чашки Петри, мерные стаканы.
6. Микроорганизмы типа *Saccharomyces servisea*.
7. Фильтровальная бумага.



Группа делится на две подгруппы. Первая подгруппа направляется в помещение для приготовления исходных растворов, вторая подгруппа – в помещение для подготовки установки к работе и проведению непосредственно опыта и необходимых измерений. Затем подгруппы меняются местами.

Титрование проводится под руководством старшего лаборанта, работа с сублиматором – под руководством заведующего лабораторией.

### *Практическая часть*

Обучаемая подгруппа № 1 направляется в лабораторию для приготовления и анализа культуральной жидкости, питательных сред, посевного материала.

Обучаемая подгруппа № 2 направляется в лабораторию для высушивания дрожжей методом сублимации. На местах проводится показ установок для высушивания биопрепаратов, демонстрируются основные режимы технологии получения биопрепаратов. Из каждой подгруппы по 2-3 студента под руководством старшего повторяют работу на данной стадии биотехнологии. Затем проводится смена рабочих мест подгрупп. План работы на рабочих местах приведен в таблицах 4 и 5.

Таблица 4

План работы в помещении  
для приготовления исходных растворов

Наименование работ	Время, мин.
Приготовление 3 л культуральной жидкости на основе дрожжей	25
Проведение анализа количества исходных клеток микроскопическим методом	50

Таблица 5

План работы в помещении сублимационной сушки

Наименование работ	Время, мин.
Проведение высушивания дрожжей на установке	75
Отбор проб на режимах и отправка их в лабораторию	

### *Описание лабораторной установки*

Сублимационная сушильная установка состоит из сушильной камеры (сублиматора), конденсатора и вакуумнасосной системы. Как правило, в сушильной камере находятся пустотелые полки, внутри которых циркулирует хладагент, охлаждающий плиты при замораживании, или теплоноситель, нагревающий материал при сублимации.

Конструктивное оформление отдельных элементов схемы обусловлено спецификой сублимируемого материала и стремлением организовать высокоинтенсивный процесс сушки.

Для сушки небольших партий фасованных продуктов в медицинской, микробиологической и пищевых отраслях промышленности, а также для научных исследований применяют камерные установки типа GT-2 фирмы «Лейбольд» (Германия) с объемом загрузки до 2 л, обеспечивающей получение стерильного продукта.

Сушильная камера (реципиент) изготовлена в виде съемного цилиндрического колпака из прозрачного пластика, который устанавливается на основании и с помощью прокладки и создаваемого внутри разрежения, плотно прилегает к нему, обеспечивая герметичность. На основании крепится полая плитка с электрообогревом, на которой размещается высушиваемый продукт или съемные насадки для флаконов. Паровоздушная смесь поступает в конденсатор-вымораживатель, куда подается хладагент через терморегулирующий вентиль от конденсатора и компрессора холодильной установки. Неконденсирующиеся газы удаляются вакуум-насосом. Нагрев и оттаивание осуществляется электронагревом нагревателя. С помощью приборов в установке контролируется температура и разрежение.

Контроль за температурой продукта осуществляется с помощью термопары и по шкале прибора на передней панели установки. Окончание процесса сублимации оценивается по остаточному давлению в сушильной камере с помощью вакуумметра. На передней панели установки имеется также переключатель, расположенный в квадрате с четырьмя зонами, соответствующими определенной стадии процесса. Правое верхнее положение соответствует режиму «охлаждение», под ним – «сублимационная сушка», затем (по часовой стрелке) – режим оттаивания и левая верхняя область – «Off» – выключение установки.

Данная лабораторная сублимационная установка выпущена в начале 80-х годов. В настоящее время существуют установки с автоматизированной системой управления и работой по заданному технологическому режиму, обеспечивая постоянное взвешивание продукта и проведение процесса до заданной влажности.

### *Методика проведения испытаний*

Перед началом испытаний установку подготовить к пуску. Для этого включить установку в сеть (напряжение 220 В). Перевести ручку переключателя в положение «охлаждение». Снять съемный колпак и для ускорения процесса охлаждения полки выложить ее кусочками сухого льда. Через 15-20 минут на полку установить исследуемые образцы, установить термопару и накрыть цилиндрическим колпаком, плотно притерев его к поверхности основания. Перевести переключатель в положение «сушка». После завершения сушки перекрывают вентиль вакуум-насоса, развакуумируют систему, переключатель переводят в положение «оттайка».

Объектом для изучения влияния процесса сублимационной сушки на качество и жизнеспособность микроорганизмов являются дрожжи рода *Saccharomyces servisea*.

Перед началом испытания подготавливают образцы материала: готовят 2 одинаковые навески дрожжей по 3-5 г. Одну навеску дрожжей помещают в чашку Петри, предварительно взвешенную, а затем еще раз взвешивают и замораживают в ультракриостате.

Для определения влажности высушенного образца необходимо знать массу его сухого остатка. Для этого вторую навеску дрожжей помещают в бюкс с заранее известным весом, бюкс взвешивают с пробой и ставят на 40 минут в сушильный шкаф при температуре 130<sup>0</sup>С.

После этого бюкс вынимают из шкафа и вновь взвешивают. Результаты записывают в протокол (табл. 6).

Таблица 6

Протокол определения массы сухого остатка  
и влажности исходного образца и образца биопрепарата  
после сублимационной сушки

№ чашки / бюкса	Масса чашки Петри, g <sub>4</sub> , г	Масса навески с чашкой Петри, g <sub>1</sub> , г	Масса навески, g, г	Масса навески с чашкой Петри после высушива- ния, g <sub>1</sub> ', г	Масса сухого остатка, g <sub>c</sub> , г	Масса бюкса, g <sub>6</sub> , г
1	2	3	4	5	6	7

Продолжение табл. 6

Масса бюкса с навеской, g <sub>2</sub> , г	Масса навески, g, г	Масса бюкса с образцом после субл. сушки, g <sub>2</sub> ', г	Масса образца после сушки, g <sub>6</sub> , г	Масса влаги в исходном образце g <sub>вл.н</sub> , г	Масса влаг и в образце после сушки, g <sub>вл.к</sub> , г	Влажн. ис. образца, W <sub>сн</sub> , % к массе сух. материала	Влажн. образца, W <sub>с</sub> , % к массе сух. матер.
8	9	10	11	12	13	14	15

### Обработка результатов испытания

Влажность материала (в % к массе сухого материала) после сублимационной сушки определяется по формуле:

$$W_{с_к} = (g_{вл.к} / g_c) \cdot 100,$$

где  $g_{вл.к}$  – масса влаги в образце после сушки, г;

$g_c$  – масса сухого остатка образца, г.

При этом масса сухого остатка равна:

$$g_c = g'_1 - g_ч.$$

Масса влаги в исходном образце:

$$g_{вл.н} = g - g_c.$$

Влажность исходного образца в % к сухой биомассе (СБ):

$$W_{с_н} = (g_{вл.н} / g_c) \cdot 100.$$

Масса образца после сушки:

$$g_k = g''_2 - g_6.$$

Масса влаги в образце после сублимационной сушки:

$$g_{вл.к} = g_k - g_c.$$

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Что может содержаться в культуральной жидкости после окончания процесса ферментации?
2. Какие основные способы концентрации биомассы Вы знаете?
3. Какие применяются методы выделения продуктов микробиологического синтеза из культуральной жидкости, если целевой продукт находится в растворе?
4. Какие применяются методы выделения продуктов микробиологического синтеза из культуральной жидкости, если целевой продукт находится в твердой фазе?
5. Что такое осаждение биомассы и какова его скорость?
6. Какие вещества применяют для ускорения процесса осаждения биомассы?
7. В чем суть центрифугирования биомассы?
8. Каковы технологические особенности сепарирования и до какой влажности они позволяют сконцентрировать осадок?
9. Каковы области применения центрифугирования?
10. Что такое фильтрование?
11. От чего зависит скорость фильтрования?
12. Что такое экстракция культуральной жидкости?
13. Вследствие чего экстрагируемые компоненты переходят из исходного раствора в растворитель?
14. Что такое ионообмен, адсорбция, десорбция?
15. Какие молекулярные сорбенты Вам известны?
16. Что такое кристаллизация целевого продукта, и какими способами она достигается?
17. В чем преимущество кристаллизации, и в каких биотехнологических процессах она используется?
18. Что такое упаривание культуральной жидкости, его режим, достоинства и недостатки?

19. Что лежит в основе мембранных методов разделения жидких систем?
20. Из чего делают полупроницаемые мембраны и какие к ним предъявляют требования?
21. Что объединяют в себе мембранные биореакторы, и в чем их преимущество перед периодическими биореакторами?
22. Какие методы консервирования биологических препаратов Вам известны?
23. В чем суть методов естественного и искусственного высушивания? Какие методы искусственной сушки Вам известны?
24. Из каких этапов состоит лиофильное высушивание биопрепаратов, и в чем его преимущества?
25. При каких температурах и как долго хранятся биопрепараты, консервированные методом лиофильной сушки?
26. На каком этапе сублимации из материала удаляются свободная влага, а на каком – вязаная, и что является признаком окончания первого и второго периодов?
27. Какие газы используются при упаковке биопрепаратов в ампулы?
28. В чем суть конвективного метода высушивания биоматериала?
29. Каковы недостатки сушильных установок камерного типа?
30. В чем суть контактного метода высушивания? Вакуумсушильные шкафы и вальцовые сушильные установки непрерывного действия.
31. В чем суть терморadiационного метода высушивания?
32. Достоинства и недостатки метода сушки токами высокой частоты.

## 8. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

### 8.1. Общие сведения

Клеточная инженерия – это одно из наиболее важных направлений в биотехнологии. Она основана на использовании принципиально нового объекта – *изолированной культуры клеток или тканей* эукариотических организмов, которые способны существовать и размножаться на искусственной питательной среде (*in vitro*). Причем клеточная инженерия в большей степени изучает растительные клетки и ткани, поскольку клетки растений способны к регенерации и обладают уникальным свойством – тотипотентностью, т.е. способностью образовывать целое растение от одной исходной клетки. Кроме того, каждая клетка растения сохраняет все необходимые хозяйственно-полезные свойства материнского организма, в результате чего все искусственно полученные особи являются копией материнской.

На современном этапе сложились **3 основных направления** клеточной инженерии растений:

1. *Оздоровление и размножение* генетически ценных растений, при котором при культивировании *in vitro* переносчики систем болезней полностью устраняются, поэтому этот метод оказывается очень удобными для быстрого размножения и хранения растений, которые были поражены заболеваниями, особенно вирусными. В целом от одной меристемы можно получить сотни тысяч растений в год.

Кроме того, данный способ позволяет значительно сократить период вегетативного развития культивируемых растений. Так, вегетационный период груши в лабораторных условиях сократился с 25 лет до 4 лет.

2. Получение от культивируемых каллусных тканей *веществ вторичного синтеза*, которые используются в медицине, парфюмерии, косметике и других отраслях промышленности. Это алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Например, для медицины получают такие препараты, как болеутоляющее вещество кодеин из мака снотворного; дигоксин, тонизирующий сердечную деятельность – из наперстянки; стимулятор – кофеин – из растений чая и кофе; тонизирующие вещества – из клеток женьшеня и др.

3. *Криосохранение* диких видов растений с целью обеспечения притока генов диких растений селекционируемым сельскохозяйственным сортам.

В зависимости от цели использования растительных клеток и тканей применяется **2 метода культивирования**:

1) вегетативное клонирование растений (метод микроразмножения);

2) культивирование каллусных тканей.

Таким образом, роль культуры клеток и тканей огромна, а способы их культивирования являются мощным инструментом расширения возможностей селекционной работы.

## **8.2. Метод вегетативного клонирования растений (клональное микроразмножение)**

**Клональным микроразмножением** называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения, идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т.е. свойство *тотипотентности*.

Вегетативное клонирование имеет существенные преимущества перед традиционными способами размножения:

1) высокий коэффициент размножения. Одно растение при микроклонировании может дать до 1 млн новых растений в год, тогда как при обычных способах размножения – только 50-100 растений;

2) отсутствие генетической пестроты посадочного материала, а получение генетически однородного массива;

3) возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов;

4) возможность размножения растений, которые в естественных условиях репродуцируются с большим трудом;

5) воспроизведение посадочного материала круглый год, что значительно экономит площади, занимаемые маточными и размножаемыми растениями;

6) сокращение продолжительности ювенильного периода.



Однако было выявлено, что для большинства видов, в первую очередь для древесных пород, проблема вегетативного размножения остается до конца не решенной. Так, не все породы могут размножаться данным способом (дуб, сосна, ель, орехоплодные и др.), и, кроме того, практически невозможно с помощью черенкования размножать многие виды древесных пород старше 10-15 лет.

Процесс вегетативного клонирования включает следующие *этапы* (рис. 11):

- 1) выбор растения-донора и изолирование эксплантов.

*Эксплант* – это изолированный фрагмент ткани или органа растения, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса. В целом работать можно с любой меристематической тканью, потенциально способной сформироваться в растение. Это может быть как сам зародыш, так и кончик основного побега или образующегося позже пазушного побега, а также ткани из различных органов растения;

- 2) перенос стерильного экспланта на искусственную питательную среду;

- 3) подращивание стерильной культуры (рис. 12);

- 4) перенос проростков на среду, способствующую образованию корней (рис. 13).

Продолжительность роста меристематических тканей и формирование первичных побегов в течение первых четырех этапов составляет 1-2 месяца;

- 5) доращивание на гидропоне;

- 6) высадка в грунт. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений в грунт – весна или начало лета. Растения должны иметь 2-3 листа и хорошо развитую корневую систему.

Например, чтобы получить растения, свободные от вирусных болезней, необходимо взять маленький кусочек в 0,3-0,5 мм верхушечной ткани стебля, состоящей из конуса нарастания и 2-3 листовых зачатков, поскольку было выявлено, что данная меристематическая ткань не содержит вирусов.

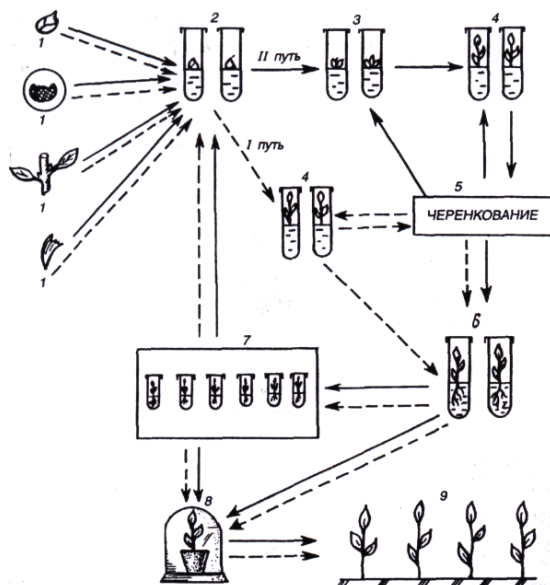


Рис. 11. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (1-й путь) и индукции возникновения адвентивных почек на экспланте (2-й путь): 1 – выбор исходного экспланта; 2 – получение стерильной культуры; 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 – рост почек и формирование микропобегов; 5 – размножение микропобегов (черенкование); 6 – укоренение микропобегов; 7 – депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре; 8 – перевод растений в тепличные условия; 9 – высадка растений-регенерантов в грунт

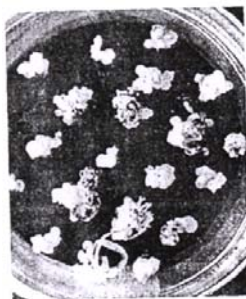


Рис. 12. Образование адвентивных почек в эпидермальном и субэпидермальном клеточных слоях экспланта



Рис. 13. Культура побегов картофеля, полученная из пересаживающихся узлов. Диаметр сосуда – 46 мм

*Необходимые условия работы:*

1. *Соблюдение строгой стерильности.* Для этого органы растений, из которых берут эксплант, моют щеткой в мыльном растворе и споласкивают дистиллированной водой, после чего помещают на несколько секунд в 70%-ный этанол. После этого снова тщательно промывают дистиллированной водой. Растения, из которых собираются получить культуры тканей, выращивают в возможно более чистой окружающей среде, избегая чрезмерного полива, забрызгивания листьев. Обычно внутренние ткани и сердцевины луковиц, клубней и корневищ являются достаточно стерильными, т.к. защищены верхними слоями листьев или чешуйками. Поэтому покрывающие структуры сначала протирают 70%-ным этанолом и осторожно удаляют их по одной, извлекая нужные для культивирования ткани.

Стерилизацию эксплантов более открытых органов и семян проводят выдерживанием в течение 5-20 минут в стерилизующих растворах (сулема, хлорамин, диацид, гипохлорид и др.) с последующим многократным обмыванием стерильной водой.

При необходимости используют антибиотики (тетрацилин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100-200 мг/л.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C с давлением 0,175-1 атмосфер в течение 20 минут.

Посуду заворачивают в фольгу или оберточную бумагу и стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 4 часов.

*Примечание. Стерилизацию оборудования, воздуха и других жидкостей смотреть в разделе 5.*

2. *Контроль качества питательных сред.* Питательные среды для культивирования должны содержать основные питательные вещества, микро- и макроэлементы. Обязательно контролируют наличие солей азота, сахарозы (не менее 3%), витаминов, некоторых аминокислот, факторов роста (ферменты и гормоны).

Кроме того, существенное значение имеет состояние среды. Обычно питательную среду делают твердой, добавляя агар (0,7-1% массы к объему), однако для некоторых растений (земляника, вишня, черная смородина, ананасы и др.) или на определенных стадиях культивирования предпочтительнее использовать жидкие среды. Чаще всего используют среды Т. Мурасиге, Ф. Скуга (1962), Нича и Уайта.

На первых трех этапах, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасиге и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. В случае, когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и др.), усилить их рост можно, используя антиоксиданты (аскорбиновая кислота (1-60 мг/л), глутатион (4-5 мг/л), поливинилпирролидон (5000-10000 мг/л) и др.). В некоторых случаях целесообразно добавлять в питательную среду адсорбент – древесный активированный уголь в концентрации 0,5-1%.

На четвертом этапе, добиваясь получения максимального количества мериклонов, используют среды, содержащие биологически активные вещества, а также регуляторы роста. При этом концентрация цитокининов (БАП) должна быть на уровне 1-10 мг/л, а ауксинов (ИУК и НУК) – до 0,5 мг/л.

На пятом этапе вегетативного клонирования с целью укоренения растений, а также адаптации их к почвенным условиям

перед высадкой в грунт используют среду Уайта, содержащую в 2-4 раза меньше минеральных солей и сахаров (до 0,5-1%). Кроме того, полностью исключается содержание цитокининов.

При пересадке растений-регенерантов в субстрат (грунт) корни отмывают от остатков питательной среды и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90°C в течение 1-2 часов. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1).

3. *Физические факторы.* Для улучшения вегетативного клонирования физические факторы необходимо подбирать с учетом естественного ареала произрастания культивируемых растений. В культуральной комнате должны поддерживаться следующие параметры: освещенность – 1000-5000 люкс; влажность – 50-70%, температура воздуха – 20...25°C в течение 14-16 часов в сутки. Это можно обеспечить с помощью климатических камер.

### **8.3. Культивирование каллусных тканей**

Культивирование изолированных тканей в лабораторных условиях осуществляется с целью получения продуктов вторичного синтеза. Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными или реже опухолевыми тканями.

*Каллусная культура* – это неорганизованно делящаяся ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. Каллус в переводе означает «мозоль». Каллус образуется в местах повреждения целых растений, а также в стерильной культуре на эксплантах.

*Дедифференцировка* – это возвращение клеток в меристематическое состояние (способность к микрочеренкованию), при котором они сохраняют способность делиться.

Интактные (готовые) растения состоят из дифференцированных клеток, которые утратили способность к делению. Только при ранениях выделяются гормоны (травматиновая кислота), которые вызывают образование каллуса. Поэтому обязательным условием дедифференцировки растительных клеток в лабораторных условиях является присутствие в питательной среде двух фито-гормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки, а цитокинины инициируют

деление клеток. Если в питательной среде их не окажется, то клетки не будут делиться, и каллусной ткани не образуется.

В качестве эксплантов используются фрагменты стебля, корня, листа, лепестков, тычинок и др., являющихся ценными для культивирования (рис. 14).

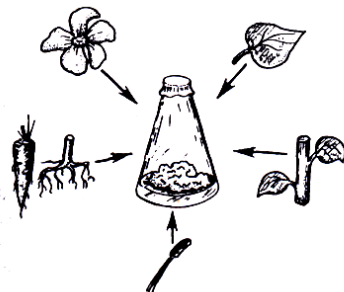


Рис. 14. Получение культуры каллусной ткани из различных эксплантов: фрагментов стебля, корня, листа, лепестков, тычинок

### *Цикл развития каллуса*

1. Подготовка клеток к делению с помощью фитогормонов. При этом под действием ауксинов (чаще всего 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты) исходная ткань утрачивает свои характерные черты. Клетки теряют запасные вещества: крахмал, белки, липиды; в них разрушаются специализированные клеточные органеллы, такие как хлоропласты, аппарат Гольджи, перестраивается эндоплазматическая сеть. Через несколько часов (на искусственной питательной среде) начинается новый синтез белка. В результате клетки становятся способными к делению, и образуется каллус.

2. Фаза интенсивного роста клеток (деление митозом) (рис. 15, 16).

3. Фаза замедленного роста клеток.

4. Стационарная фаза, при которой каллус не делится.

5. Отмирание каллуса.

Обычно каллусная ткань бывает белого или желтого цвета. При старении каллусных клеток цвет может быть темно-корич-

невым. Поэтому во избежание старения ткань необходимо пересаживать через каждые 3-4 недели на новую питательную среду, содержащую фитогормоны.

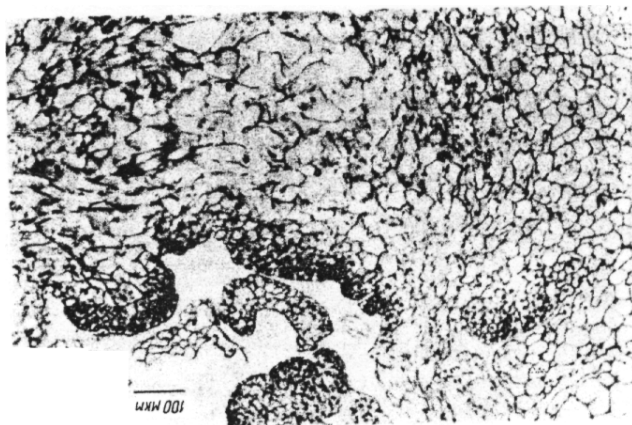


Рис. 15. Микрофотография каллуса *Friesia*

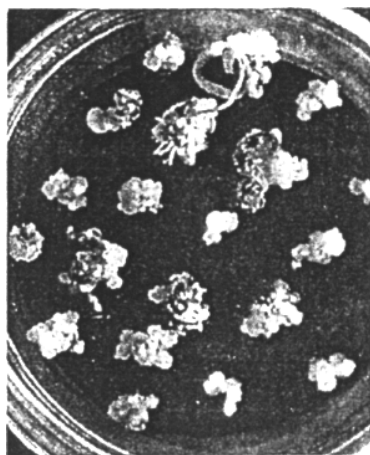


Рис. 16. Морфогенетические реакции каллусной ткани

Необходимыми условиями работы при культивировании каллуса являются те же требования, что и при вегетативном клонировании, однако большинство каллусных клеток не нуж-

дается в свете, т.к. они не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно за счет питательной среды. Исключение составляет люцерна.

*Примечание. Культивирование тканей – не совсем простая задача, т.к. не все выращенные клетки схожи с материнской особью. Этому мешает ряд факторов. Так, при многократных пересаживаниях культуры на свежие питательные среды способность ткани регенерировать побеги снижается, и, кроме того, среди клеток появляются полиплоиды и другие генетически aberrантные клетки, что вызывает несхожесть клеток с родительскими формами.*

### Семинарское занятие 5

**Цель работы:** изучить особенности культивирования изолированной культуры клеток и тканей растений в зависимости от целей их использования.

**Порядок выполнения работы:**

1. Изучить и законспектировать основные этапы метода вегетативного клонирования генетически ценных растений.
2. Познакомиться с основными параметрами вегетативного клонирования растений в лабораторных условиях.
3. Усвоить основные требования при культивировании каллуса в лабораторных условиях. Законспектировать этапы развития каллусной ткани.

### Семинарское занятие 6

**Цель работы:** изучить механизм воздействия фитогормонов на дифференцированные клетки экспланта растений; научиться определять выход жизнеспособных побегов растений по результатам культивации за год.

**Порядок выполнения работы:**

1. Прочитать и законспектировать механизм воздействия фитогормонов на дифференцированные клетки экспланта растений.
2. По результатам культивирования вишни разных сортов рассчитать полученное количество готовых жизнеспособных



растений в год при условии, что после обработки фитогормоном ИМК (50 мг/л) сорт вишни Шубинка полноценно укореняется на 52%; сорт Владимирская – на 18%; сорт Любская – на 13%. Известно, что число побегов, пересаженных на среду для окончательного укоренения, составляет по 100 тысяч побегов каждого сорта в год.

## Лабораторная работа 5

### Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

**Цель работы:** ознакомиться с составом различных питательных сред и научиться готовить одну из них.

**Материалы и оборудование:** стаканы химические на 1 л 4 шт.), склянки с притертыми пробками для хранения маточных растворов (на 1 л – 3 шт., на 100 мл – 1 шт.), стеклянные пипетки из под пенициллина (10 шт.), мерные пипетки на 10 и 1 мл, весы технические, весы торсионные или аналитические, электроплитка, химреактивы.

*Объяснение. Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; микроэлементы: бор, цинк, медь, марганец и др., а также витамины, углеводы, фитогормоны. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах pH.*

Для получения каллусной ткани в отдельных случаях к питательной среде добавляют жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), каштана и др.

Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей,

так как в большинстве случаев последние не способны к авто-трофному питанию. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2-3%.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть ауксины, вызывающие дедифференцировку клеток экспланта, и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза. На средах без гормонов растут опухольные и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать гормоны.

В качестве ауксина в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4 Д), индолилуксусную кислоту (ИУК),  $\alpha$ -наортилуксусную кислоту (НУК). ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4 Д. Для индукции каллуса обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще это 2,4 Д), при последующих пересадках их уменьшают.

В качестве цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензилалминопурин (6-БАП), зеатин. Зеатин и 6-БАП по сравнению с кинетином более активны в отношении поддержания роста изолированных тканей и индукции органогенеза. В состав некоторых питательных сред входит аденин.

Кроме ауксинов и цитокининов, отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК). Присутствие ГК в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани.

Твердые питательные среды готовят на агар-агаре. Он представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержит бактериальный агар (Bacto Agar или отечественного производства). Обычно к среде добавляют 0,7% агара.

В таблице 7 приведены составы наиболее распространенных питательных сред.

Таблица 7

Состав питательных сред, применяемых  
при культивировании клеток и тканей по Р.Г. Бутенко (1999)

Компонент сред	Концентрация питательных сред, мг/л			
	Мурасиге и Скуга, 1962	Гамборга и Эвеле- га, 1968	Уайта, 1939	Нича и Нич, 1974-1975
$\text{KNO}_3$	1900	3000	81	950
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	-	-	720
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	-	-	142	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	500	74	185
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	166
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	-	-
$\text{CaCl}_2$	-	-	65	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	12	68
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	10	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	-	-	25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	-	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	2	-	10
$\text{H}_3\text{BO}_4$	6,2	3	-	10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,075	-	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	-	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	-	-	27,8
$\text{Na EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	-	-	37,3
Секвестрен 330-Fe	-	28	-	-
Мезоинозит	100	-	-	200
Аскорбиновая ки- слота	-	-	-	3
Тиамин-НСI	0,5	-	-	3
Пиридоксин-НСI	0,5	-	-	1
Никотиновая ки- слота	0,5	-	-	-
Сахароза	30 000	20 000	2000	60 000
Агар «Дифко», гельрит, агароза	-	-	-	7000

Среда Мурасиге и Скуга – самая универсальная. Она пригодна для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений.

Так, изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию либо корней (преобладание ауксина), либо стеблевых культур (преобладание кинетина).

Среда Гамборга и Эвелега хорошо подходит для культивирования клеток и тканей бобовых растений и злаков, среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича Нич пригодна для индукции андрогенеза в культуре пыльников.

С целью экономии времени растворы макросолей, микросолей, витаминов и фитогормонов готовят концентрированными, что позволяет их многократно использовать. Маточные растворы хранят в холодильнике (причем для хранения витаминов нужна отрицательная температура).

**Задание.** Приготовить питательную среду Мурасиге-Скуга (М-С).

### *Ход работы*

Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде и имеют следующий состав:

1)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, а затем сливают и объем доводят до 1 л, причем раствор  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  вливают последним без нагревания в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка);

2)  $\text{CaCl}_2$ ;

3) хелат железа (раствор  $\text{FeSO}_4$  и  $\text{Na}_2$  ЭДТА необходимы для образования хелата железа), нагретый до кипения;

4) микроэлементы.

Полученные растворы макро- и микроэлементов сливают в склянки с притертой пробкой (хелат железа – в темную склянку), снабжают этикеткой и помещают в холодильник.

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их (каждый витамин в отдельности) в 10 мл воды; 1 мл содержит порцию вита-

мина, необходимую для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга. Хранят растворы во флаконах из-под пенициллина в замороженном состоянии.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом: берут 10 мг вещества, ауксины (2,4 Д, ИУК, НУК) растворяют в 0,5-2,0 мл этанола, цитокинины (кинетин, зеатин, БАП) – в небольшом количестве 0,5 н. HCl или KOH, абсцизовую кислоту (АБК) – в 70%-ном этаноле. Затем растворы подогревают (кроме АБК) и заливают водой до объема 100 мл. В холодильники их можно хранить при температуре 4<sup>0</sup>С не больше 1 месяца. На основе маточных растворов готовят питательную среду М-С, которая будет использована на последующих занятиях.

Ход приготовления питательной среды следующий: в химический стакан емкостью 1 л помещают 30 г сахарозы, доливают дистиллированной водой примерно до 400 мл и после растворения сахарозы добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей, витаминов и гормонов. Необходимо обязательно измерить pH раствора. Если pH превышает 5,5-5,6, в питательную среду вносят 0,1%-ный раствор HCl. Одновременно в другом стакане предварительно замоченный для набухания агар-агар нагревают, помешивая на электроплитке до полного растворения. Затем его сливают с приготовленным раствором и доводят объем до 1 л (табл. 8).

Таблица 8

Расчет для приготовления маточных растворов по М-С

Макросоли	г на 1 л маточного раствора	Количество маточного раствора для приготовления 1 л среды, мг
1	2	3
KNO <sub>3</sub>	38	50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4	
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	7,4	
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	8,8	5

Окончание табл. 8

1	2	3
<b>Микросоли</b>	мг на 100 мл ма- точного раствора	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	1
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	2230	
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	860	
KJ	83	
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	25	
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	2,5	
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	2,5	
Fe-хелат	мг на 100 мл ма- точного раствора	
FeSO <sub>4</sub>	557	5
Na <sub>2</sub> ЭДТА	745	

Питательную среду разливают в пробирки (примерно на 1/3 объема), закрывают их ватными пробками или алюминиевой фольгой и стерилизуют в автоклаве.

### Вопросы для самоконтроля

1. Каковы основные составные части питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей?
2. Какие углеводы и для чего используют в питательных средах?
3. Какие гормоны и для каких целей используют для приготовления питательных сред?
4. Какие ткани растут на питательных средах без гормонов?
5. В какие питательные среды вносят агар-агар и из чего его получают?
6. На что воздействует ауксин и кинетин при индукции морфогенеза?

## Лабораторная работа 6

### Методы стерилизации при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений

**Цель работы:** усвоить способы стерилизации органов растений и экспланта.

**Материалы и оборудование:** чашки Петри (3 шт., одна с фильтровальной бумагой, стаканы химические на 300-500 мл (2 шт.), колба на 1 л с дистиллированной водой, пробки с питательной средой М-С без гормонов и с гормонами (2,4-Д-2, кинетин – по 0,2 мг/л), пинцеты, скальпели (2 шт.), целлофан, шпагат, ножницы, крафт-бумага для матрасиков.

**Объяснение.** Основным условием успешного культивирования изолированных культур является стерильность питательной среды, посуды, материалов, инструментов, посадочного материала. Все опыты проводят в стерильных помещениях-боксах или ламинар-боксах.

**Стерилизация ламинар-бокса.** Ламинар-боксы предназначены для культуры изолированных клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности. Стерильность обеспечивается с помощью бактериальных фильтров, установленных в ламинар-боксе, через которые нагнетается воздух. За 2 ч до начала работы ламинар-бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую горелку, спички, фарфоровый стакан с 96%-ным спиртом и стерильной водой, а при вычленении меристем – и бинокулярную лупу. Внутреннюю поверхность ламинара, лупу, спиртовку, пробирки с питательной средой протирают 70%-ным спиртом.

Работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной марлевой косынкой.

**Стерилизация посуды.** Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов (порошок «Прогресс» и др.), а также раствора двуххромовокислого калия в серной кислоте (хром-пик). Вымытую посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерилизаци-

ей их заворачивают в оберточную бумагу (у стаканов и колб достаточно обернуть только горлышко).

Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при  $160^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч (с момента установки нужной температуры). За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор. Посуду (стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки) заворачивают в фольгу или оберточную бумагу, сверху – в целлофан; верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватой, каждую заворачивают в бумагу. Автоклавируют под давлением 2 атм. в течение 25-30 мин.

*Стерилизация инструментов.* Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при  $140^{\circ}\text{C}$ . Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавируют, т.к. под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизуют в ламинаре, помещают их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигают в пламени спиртовки. После этого каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенной в пачку. Стерильные инструменты используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвия) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

*Стерилизация материалов.* Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу, халаты, козыньки стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25-30 мин.

*Стерилизация растительного материала.* Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: 0,1%-ной сулемы (двухлористая ртуть), 0,1%-ного диацита, 13-20%-ного пергидроля, 10%-ного хлорамина, 8%-ного гипохлорита натрия или кальция.



Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолмеркур-хлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (около 300 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте. Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожу (у корней и корнеплодов), кору (у листьев), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена – на 1-2 минуты) в 70%-ный этиловый спирт. Обработка тканей этанолом повышает эффект основного стерилизующего раствора. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в стерильной воде.

Пергидроль рекомендуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), сулемы – для томатов, тыквы и др. Продолжительность стерилизации семян сулемой составляет 10-15 минут, пергидролем – 30 минут, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в 2 раза меньше времени. Опушенные семена (хлопчатник) обрабатывают концентрированной серной кислотой в течение 5 минут. Легче всего семена отмываются от пергидроля. После сулемы и диацида воду меняют 5-6 раз.

Семена помидоров, яблони, тыквы, бобов и табака ко времени созревания заключены в мясистые, деревянистые или костяковидные покровы. Поэтому здоровые, с неповрежденной поверхностью плоды этих культур следует достаточно тщательно промыть мыльной водой, затем несколько раз спиртом, после чего в строго асептических условиях их разрезают. Стерильным пинцетом вынимают семена и помещают их в стерильные чашки Петри для проращивания.

*Стерилизация питательных сред.* Разлитые в пробирки питательные среды закрывают ватными пробками, заворачивают в целлофан и автоклавируют при температуре 120<sup>0</sup>С и давлении 1 атм. в течение 20 мин.

*Холодная стерилизация.* Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождаются от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

### *Ход работы*

Простерилизовать инструменты, посуду и питательные среды, необходимые для проведения работ по выращиванию стерильных проростков и получению каллусных тканей.

1. Завернуть в плотную бумагу и простерилизовать сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 160<sup>0</sup>С следующую посуду: чашки Петри (2 шт.), химические стаканы на 300-500 мл (2 шт.).

2. Подвергнуть предварительной стерилизации в сушильном шкафу скальпели и пинцеты. Перед помещением в сушильный шкаф завернуть инструменты в плотную бумагу.

3. Простерилизовать в автоклаве бумажные матрасики и дистиллированную воду в колбе. Матрасики завернуть в плотную бумагу, а сверху – в целлофан. Для получения стерильной воды в колбу налить 1/3 части объема дистиллированной воды, закрыть ватной пробкой или фольгой, сверху – плотной бумагой и целлофаном. Автоклавировать материалы при давлении 2 атм. в течение 30 минут.

4. Простерилизовать в автоклаве в течение 20 минут при давлении 1 атм. пробирки с питательной средой, закрытые ватными пробками. Перед автоклавированием со средой завернуть их по 10-20 шт. в целлофан или оберточную бумагу и автоклавировать под давлением 1 атм. в течение 20 минут.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Для чего проводят стерилизацию питательных сред, материалов, инструментов, посуды и посадочного материала?
2. Где проводятся работы по культивации клеток и тканей?
3. Как стерилизуют ламинар-боксы?
4. Как должен быть одет и подготовлен человек, работающий в ламинар-боксе?
5. Каким образом стерилизуют посуду?
6. Как осуществляют стерилизацию инструментов?
7. Как обрабатывают инструменты перед повторным использованием?
8. Каким образом стерилизуют марлю, ватные тампоны, халаты, косынки и другие материалы?

9. Как осуществляется стерилизация посадочного материала?
10. Каким образом стерилизуют питательные среды?
11. Что такое холодная стерилизация?

## **Лабораторная работа 7**

### **Получение и культивирование каллусной ткани из корнеплодов моркови**

**Цель работы:** научиться получать каллусную ткань из вегетативных органов растений.

**Материалы и оборудование:** корнеплоды моркови; пробкобуры, стерильный скальпель, стерильный пинцет, стерильная чашка Петри, стерильные листы бумаги, чашка Петри со стерильной питательной средой М-С с добавлением 2 мг 2,4-Д и 0,2 мг кинетина на 1 л.

Объяснение. *Образование каллуса происходит в области первичных или вторичных меристем, а также из паренхимы, прилегающей к этим меристемам или вторичным сосудистым тканям. Инициация каллуса из паренхимы или камбия активируется наличием в экспланте зрелой сосудистой ткани.*

*Процесс каллусообразования зависит от размера экспланта. Чем он крупнее, тем разнообразнее набор клеток. Первичный эксплант обычно имеет размер 5-10 мм<sup>3</sup> и массу 20-100 мг.*

#### *Ход работы*

Отобрать здоровые корнеплоды моркови, тщательно вымыть щеткой с мылом, затем отмыть водопроводной водой и погрузить для стерилизации в 96%-ный этанол и на 5 минут без дальнейшей отмывки стерильной водой.

В стерильных условиях отрезать верхнюю часть корнеплода моркови и стерильным пробкобуром извлечь цилиндры из ткани. Эксплант корнеплода моркови должен содержать ксилемму, флоэмную паренхиму и камбий. Вычлененные цилиндры поместить в стерильную чашку Петри и разрезать на диски шириной 1-2 мм, сделать надсечки и перенести с помощью пинцета на питательную среду М-С, содержащую 2,4-Д и кинетин. Культивировать в термостате при температуре 25<sup>0</sup>С. Через три недели рассмотреть каллусную ткань.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. На каких свойствах эукариотических клеток базируется клеточная инженерия растений?
2. Основные направления клеточной инженерии растений.
3. Дать понятия экспланта и меристематической ткани.
4. Охарактеризовать основные этапы вегетативного клонирования растений.
5. Охарактеризовать условия работы при культивировании вегетативных клонов растений.
6. Особенности стерилизации эксплантов и органов растений.
7. Требования к питательным средам для культивирования изолированных культур клеток и тканей растений.
8. Дать понятие каллуса. Механизм его образования в естественных условиях произрастания растений.
9. Фитогормоны и их функции.
10. Цикл развития каллуса.
11. Необходимые условия культивирования каллуса в лабораторных условиях.

## 9. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ

Трансплантация – метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных путем получения и переноса одного или нескольких эмбрионов от высокоценных животных (доноров) к менее ценным животным (реципиентам). Использование трансплантации позволяет получать от одной генетически ценной самки в десятки раз больше потомства.

Работу по трансплантации проводят в следующем порядке:

- отбор доноров и реципиентов;
- синхронизация полового цикла реципиентов с половым циклом доноров;
- вызывание множественной овуляции (суперовуляции) у доноров и их осеменение;
- получение зародышей от доноров;
- оценка, культивирование и хранение зародышей;
- пересадка зародышей на стадии морулы или бластоцисты реципиентам.

Донор – это высокоценное, выдающееся животное, от которого после гормонального вызывания полиовуляции и осеменения спермой проверенного производителя-улучшателя получают несколько зародышей. Отбирают только тех животных, которые обладают способностью к множественной овуляции и дают в течение длительного срока их использования большое количество зародышей, пригодных к пересадке. В качестве доноров лучше использовать здоровых коров в возрасте от 4 до 5 лет с хорошо развитой молочной железой, пригодной к машинному доению, у которых не было каких-либо осложнений родов и послеродового периода. Первая стадия возбуждения полового цикла после родов должна быть синхронной и полноценной, с ярко выраженными феноменами: течки, полового возбуждения и охоты. Операция пересадки зародышей экономически выгодна только в том случае, когда в качестве доноров берут выдающихся в племенном отношении животных.

Реципиент – животное, которому трансплантируют (пересаживают) в матку одного или двух зародышей на ранней стадии их развития. Реципиентов отбирают в количестве 6-8 голов на каж-

дого донора из числа животных, не имеющих большой племенной ценности. При этом используют телок в возрасте 16-18 лет с массой 350-380 кг или коров не старше 7 лет. Животные должны быть здоровыми, без признаков нарушения обмена веществ. Успех пересадок в значительной степени зависит от физиологически полноценного течения половых циклов и правильного определения охоты у реципиентов. Половые циклы должны протекать регулярно, быть полноценными, с синхронным формированием стадии возбуждения. Реципиенты должны быть в состоянии средней упитанности, с хорошим физическим развитием, имеют крупный, правильной формы таз. Яичники и матка должны быть нормально развиты, без патологических изменений.

Вызывание суперовуляции. Самки млекопитающих рождаются с большим (несколько десятков и даже сотен тысяч) числом половых клеток. Большинство из них постепенно погибают в результате атрезии фолликулов. Однако практически все растущие фолликулы реагируют на гонадотропную стимуляцию, которая приводит их к конечному созреванию. Обработка самок гонадотропинами в фолликулярной фазе полового цикла или в лютеиновой фазе цикла в сочетании с индуцированием регрессии желтого тела простагландинами  $\Phi_2$  (ПГ $\Phi_2$ ) или его аналогами приводит к множественной овуляции или так называемой суперовуляции.

Суперовуляцию считают достигнутой, если произошло выделение не менее трех яйцеклеток (в отдельных случаях у животных их овулирует 100 и более). Однако основная цель гормональной обработки – получение в результате суперовуляции 10-20 яйцеклеток. У коров и телок для вызывания множественной овуляции применяют гонадотропины гипофизарного и плацентарного происхождения; для обработки используют разнообразные схемы. Наиболее эффективны гонадотропные сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК).

Извлечение зародышей. Эмбрионы крупного рогатого скота поступают из яйцевода в матку между 4-м и 5-м днем после начала охоты (между 3-м и 4-м днем после овуляции). Сроками продвижения эмбрионов в половом тракте коровы и определяется извлечение их из яйцевода или рогов матки.

В связи с тем, что нехирургическое извлечение возможно только из рогов матки, то эмбрионы извлекают не ранее 5-го дня после начала охоты.

Несмотря на то, что при хирургическом извлечении эмбрионов у крупного рогатого скота достигнуты отличные результаты, этот метод неэффективен, т.к. относительно дорогостоящий, неудобный для применения в условиях производства.

Нехирургическое извлечение эмбрионов состоит в следующем. Гибкий катетер с надувной манжеткой вводят во влагалище и через шейку матки в один из рогов матки. Манжетка надувается и закрывает выход рога матки, тем самым ограничивая промывную полость.

Катетер может быть двухканальным, что позволяет проводить проточное прохождение промывной жидкости. При использовании одноканального катетера промывная жидкость вводится несколько раз (5-8 раз) и затем вытекает из рога матки. В обоих случаях вводят 200-300 мл фосфатного буфера Дюльбекко.

Наиболее оптимальные сроки для извлечения эмбрионов – 6-8-й день после начала охоты, так как ранние бластоцисты этого возраста наиболее пригодны для глубокого замораживания и могут быть с высокой эффективностью пересажены нехирургическим способом. Корову-донора используют 6-8 раз в год, извлекая по 3-6 эмбрионов.

У овец и свиней нехирургическое извлечение эмбрионов невозможно ввиду трудности прохождения катетера через шейку в рога матки. Однако хирургическая операция у этих видов животных относительно проста и непродолжительна.

Пересадка эмбрионов. Параллельно с разработкой хирургического метода извлечения эмбрионов у крупного рогатого скота значительный прогресс был достигнут и в нехирургической пересадке эмбрионов. В пайету набирают свежую питательную среду (столбик длиной 1,0-1,3 см), затем небольшой пузырек воздуха (0,5 см) и далее основной объем среды с эмбрионом (2-3 см). После этого засасывают немного воздуха (0,5 см) и питательную среду (1,0-1,5 см). Пайету с эмбрионом помещают в катетер Кассу и до момента пересадки хранят в термостате при 37<sup>0</sup>С. Далее под ректальным контролем катетер пропускают через шейку мат-

ки и осторожно вводят в рог матки на расстоянии 5-7 см от ее тела. Нажатием на шток катетера выдавливают содержимое пайеты вместе с эмбрионом в рог матки.

Эффективность пересадки эмбрионов в значительной степени определяется синхронностью проявления охоты у донора и реципиента. У крупного рогатого скота максимальное число беременностей получают после синхронной пересадки.

Введение эмбрионов в оба рога матки обеспечивает высокую эффективность пересадки. Этот прием успешно используют для получения двойности. Процедура получения двойности включает пересадку 7-дневных эмбрионов осемененному животному в рог, противоположный яичнику с желтым телом.

## **Лабораторная работа 8**

### **Оценка качества и хранение зародышей**

**Цель работы:** изучить методы, с помощью которых оценивают качество полученных зародышей, технологию их хранения.

**Материал и оборудование:** фотографии зародышей разного качества.

#### **9.1. Общие сведения**

Для определения полноценности и жизнеспособности зародышей применяют следующие методы: а) визуальную морфологическую оценку, б) прижизненное окрашивание, в) культивирование вне организма в течение 24-48 ч, г) цитологическую и цитогенетическую оценку.

Наиболее широкое распространение получили способы оценки качества и жизнеспособности зародышей по морфологическим признакам и по результатам их культивирования.

При этом учитывают следующие основные морфологические признаки полноценности зародышей: целостность и равномерность развития бластомеров, прозрачность перивителлинового пространства, целостность зоны пеллюцида, соответствие стадии развития возрасту зародыша. Зародыши с признаками дегенерации, уродств и недоразвития для пересадок непригодны.



Зародыши оценивают в баллах с помощью специальной таблицы 9 (шкала оценки качества зародышей) и рисунка 17: полноценные – 5 баллов; с незначительными дефектами – 4 балла; замедленные (ретардированные) – 3 балла; неполноценные – 2 и 1 балл.

Таблица 9

Шкала оценки качества зародышей

Стадия развития	Морфологическая характеристика	Оценка	Балл
1	2	3	4
Морула ранняя (МО-1)	Шаровидная форма, прозрачная оболочка, целая; перивителлиновое пространство прозрачное, бластомеры четкие, одинаковых размеров с наличием полигональной связи, цитоплазма мелкозернистая, равномерно заполняет цитоплазматическую оболочку	Отлично	5
Морула поздняя (МО-2)	В перивителлиновом пространстве гранулы, включения, бластомеры разных размеров, расположены несимметрично, несколько сжаты	Хорошо	4
	В перивителлиновом пространстве гранулы, включения, незначительное сжатие бластомеров, единичное разрушение	Удовлетворительно	3
	Деформация прозрачной оболочки, частичное разрушение бластомеров, нарушение связи между ними, фрагментация цитоплазмы, сжатые бластомеры	Условно годные	2
	Несоответствие стадии развития возрасту зародыша, дефекты прозрачной оболочки (трещины, сколы), распад бластомеров, их сильное сжатие	Непригодные	1
Бластула (БЛ-1)	Шаровидная форма, перивителлиновое пространство узкое, прозрачное, клетки трофобласта и эмбриобласта четко дифференцированы, хорошо различима полость бластулы	Отлично	5

1	2	3	4
Бластула поздняя (БЛ-2)	Зона пеллюцида утончена, перивителлиновое пространство отсутствует, полость бластулы большая с гладкой поверхностью и четкой дифференциацией клеток. В перивителлиновом пространстве полость бластулы не видна, гранулы, включения, клетки трофобласта сжаты незначительно	Хорошо	4
	Перивителлиновое пространство увеличено, имеет включения, гранулы, полость бластулы не выражена, нет дифференциации между клетками трофо- и эмбриобласта	Удовлетворительно	3
	Дефект прозрачной оболочки (трещен, наличие гранул), в перивителлиновом пространстве частичные разрушения клеток, сжатие бластомеров	Условно годные	2
	Значительный дефект прозрачной оболочки, распад бластомеров	Непригодные	1

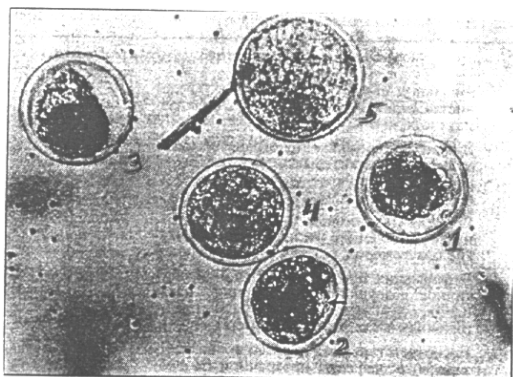


Рис. 17. Зародыши разного качества

Хранение зародышей. Для кратковременного хранения в течение 1-5 ч используют среду Дюльбекко, в которую добавляют 100 ЕД пенициллина на 1 мл и 4 мг/мл 20%-ной сыворотки крови

теленка или альбумина бычьей сыворотки. Зародышей помещают на часовое стекло с 0,5 мл питательной среды, переносят в чашку Петри, дно которой покрыто увлажненной фильтровальной бумагой, и хранят в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С.

Для длительного хранения применяют метод замораживания в жидком азоте.

Замораживают с помощью приборов НПС «Эмбрион» и ЗЭМ Харьковского СКТБ. Отбирают зародышей с оценкой 4-5 баллов. На основе среды Дюльбекко, содержащей ФБС, готовят растворы с увеличивающейся концентрацией глицерина и выдерживают зародышей по 10 минут в каждом из них:

1) 1,4 М раствора содержит 10% глицерина (к 1 мл глицерина добавляют 9 мл среды Дюльбекко с 20% ФБС);

2) 0,92 М раствор содержит 6,6% глицерина (к 2 мл раствора № 1 добавляют 1 мл среды Дюльбекко с 20% ФБС);

3) 0,46 М раствор содержит 3,3% глицерина (к 1 мл раствора № 1 добавляют 2 мл среды Дюльбекко с 20% ФБС).

Зародыши выдерживают в растворах глицерина в порядке повышения их концентрации: 0,46 М (3,3%); 0,92 М (6%); 1,4 М (10%).

При замораживании зародышей в ЗЭМ используют специальные контейнеры: стеклянные пробирки длиной 50 мм и диаметром 5 мм, стеклянные ампулы на 1 мл, пластиковые соломинки длиной 130 мм и диаметром 2 мм. В каждой пробирке (ампуле) может находиться до 4 зародышей от одного донора в 0,3-0,4 мл среды с криопротектором. Пайеты заправляют с помощью шприца на 1 мл с резиновым или пластиковым переходом в следующем порядке: среда – 2/5 объема пайеты, пузырек воздуха – 5 мм, зародыш в среде – 1/5 объема пайеты, воздуха – 5 мм и среда – 2/5 объема пайеты.

Замораживают по программе с автоматическим сидингом: 1-й этап – стабилизация при температуре 20<sup>0</sup>С без ограничения времени; 2-й – охлаждение со скоростью 1<sup>0</sup>С/мин от 20<sup>0</sup>С до -7<sup>0</sup>С; 3-й – стабилизация при -7<sup>0</sup>С в течение 2 минут; 4-й – охлаждение со скоростью 0,3<sup>0</sup>С/мин от -7 до -32<sup>0</sup>С; 5-й – стабилизация при -32<sup>0</sup>С в течение 30 минут; 6-й (последний) этап – помещение зародышей, замороженных в пайетах, в хранилище с жидким азотом (Ф.И. Осташко и др.).

Второй метод – замораживание зародышей с эквilibрацией. Зародыши насыщают в течение 10 минут в 1,4 М растворе, затем переносят в 0,9 М раствор на 60-90 минут, после чего помещают в пайетту: раствор № 2 – воздушный пузырек – раствор № 2 с зародышем в середине пайетты – воздушный пузырек – пробка. Пайетту с зародышем в растворе № 2 погружают в жидкий азот пробкой вверх до прекращения кипения, а затем переносят в канистры и хранят до использования.

Размораживание зародышей. Размораживают на водяной бане при 37<sup>0</sup>С в течение 3-5 с. При переносе пайетты из жидкого азота в водяную баню пробку из пайетты извлекают. Зародыши помещают в 0,5 М раствор сахарозы (к 1,7 части сахарозы добавляют 10 мл среды Дюльбекко с 20% ФБС). После насыщения сахарозой зародыши отмывают в среде Дюльбекко, содержащей 20% ФБС. Используют 4 чашки Петри; отмывают путем последовательного переноса с экспозицией по 5 минут.

При трансплантации зародышей на фермах используют одноступенчатый метод удаления криопротектора. В этом случае при замораживании компоненты размещают в пайетте таким образом: раствор сахарозы – 0,25 мл или 0,5 мл (2/5 объема), воздух – не более 5 мм, зародыш в ФБС с содержанием 1,0 М или 1,04 М раствора глицерина – 1/5 объема, воздух – 5 мм, раствор сахарозы – 0,25 М или 0,5 М (2/5 объема).

### **Задание:**

1. Изучить методы оценки качества зародышей.
2. Изучить шкалу оценки качества зародышей.
3. Сделать оценку изображенных на фотографиях зародышей по пятибалльной системе.
4. Изучить технологию хранения зародышей.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Что понимают под трансплантацией эмбрионов?
2. Назовите этапы трансплантации.
3. Каковы требования к донору?
4. Каковы требования к реципиенту?
5. Каковы методы стимуляции донора и реципиента?

6. Какие Вы знаете гонадотропные гормоны, где они вырабатываются и на что воздействуют?
7. Что такое половой цикл и каковы его фазы?
8. Феномены периода возбуждения.
9. Когда и как осеменяют донора?
10. Какие Вы знаете методы извлечения эмбрионов?
11. Какие манипуляции можно проводить с эмбрионом?
12. Оценка качества эмбрионов.
13. Хранение эмбрионов.
14. Синхронизация полового цикла реципиентов и доноров.
15. Методы пересадки эмбрионов реципиентам.
16. Каково влияние трансплантации эмбрионов на селекционный процесс?

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / под ред. Р.Г. Бутенко. М., 1991.
2. Биотехнология в животноводстве / В.Ф. Красота, Б.П. Завертяев, Е.К. Меркурьева, А.К. Никитин. М.: Колос, 1994. 127 с.
3. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, В.Я. Никитин и др.; под ред. В.Я. Никитина и М.Г. Миролубова. 7-е изд., перераб. и доп. М.: Колос, 2000. 495 с.
4. Грин Н. Биология: в 3 т. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. М.: Мир, 1990.
5. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 208 с.
6. Красота В.Ф. Биотехнология в животноводстве / В.Ф. Красота, Б.П. Завертяев, Е.К. Меркурьева, А.К. Никитин. М.: Колос, 1994. 127 с.
7. Лабораторный практикум по процессам и аппаратам пищевых производств / под ред. А.С. Гинсбурга. М.: Агропромиздат, 1990.
8. Мишустин Е.Н. Микробиология / Е.Н. Мишустин, В.Т. Емцев. М.: Колос, 1978. 351 с.
9. Практикум по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных / В.Я. Никитин, М.Г. Миролубов, В.П. Гончаров и др. М.: Колос, 2003. 208 с.
10. Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин и др.; под ред. В.С. Шевелухи. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 2003. 469 с.
11. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
12. Тихонов И.В. Основы биотехнологических процессов: учебно-методическое пособие по биотехнологии / И.В. Тиханов, Е.С. Воронин, Т.Н. Грязнева, Д.А. Дервинов, А.В. Васильев, А.Д. Чекмарев, С.А. Маслов. М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябин, 2002. Ч. I-III. 136 с.

13. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro* // Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С. 105-133.

14. Чуканова Т.И. Организация и развитие исследований по биотехнологии в зарубежных странах / Т.И. Чуканова, Л.И. Мурая. М.: Агропром, 1988. 59 с.

15. Эрнст Л.К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных / Л.К. Эрнст, Н.И. Сергеев. М.: Агропромиздат, 1989. 302 с.

*Учебное издание*

***Коростелева Наталья Ивановна  
Громова Татьяна Викторовна  
Жукова Ирина Геннадьевна***

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ**

*Учебное пособие*

Редакторы: Н.Н. Есипова, О.А. Самтынова  
Технический редактор Н.С. Муравьева

ЛР № 020648 от 16 декабря 1997 г.

---

Подписано в печать 25.05.2006 г. Формат 60х84/16. Бумага для множительных аппаратов. Печать ризографная. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. 8,5. Уч.-изд. л. 6,4. Тираж 200 экз. Заказ №

Издательство АГАУ  
656049, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98,  
тел. 62-84-26

Отпечатано в типографии ООО «Аз Бука»  
Лицензия на полиграфическую деятельность  
ПЛД № 28-51 от 22.07.1999 г.  
г. Барнаул, пр-т Красноармейский, 98а  
тел. 62-91-03, 62-77-25  
E-mail: azbuka@rol.ru