

А. И. Божков

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Фундаментальные и промышленные
аспекты**

УДК 57 (075.8)

ББК 28я73

Б 76

ISBN 978-966-2920-11-6

Рекомендовано до видання:

Вченою радою Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.
Протокол №13 від 25 листопада 2005 року.

Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів

Підручник складається із двох частин. Перша частина присвячена фундаментальним проблемам біотехнології. Читач знайомиться із предметом і завданнями біотехнології, об'єктами й основними методами біотехнології, із принципами функціонування біологічних систем. Велика увага в цій частині книги приділена клітинним і молекулярним технологіям, імунобіотехнології, конструюванню й використанню біосенсорів.

Друга частина книги присвячена промисловій біотехнології. Вона складається із чотирьох глав, у яких послідовно розглядаються всі виробничі етапи біотехнологічного виробництва, а також випробування на нешкідливість продуктів біотехнології. У книзі знайшли відбиття й питання біоетики.

Для зручності сприйняття матеріалу він має велику кількість схем і малюнків. Автор приділив велику увагу поняттям, термінам і визначенням, які використовуються в сучасній біотехнології.

Книга рекомендована студентам, аспірантам, науковим співробітникам і фахівцям у галузі біотехнології й суміжних наук.

Рецензенти:

доктор технічних наук, професор М. Ф. Клещов,

зав. кафедрою біотехнології й аналітичної хімії національного технічного університету «ХПІ»;

доктор медичних наук, професор В. В. Давидов,

професор кафедри клінічної біохімії й судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України;

доктор біологічних наук, професор В. І. Ніколайчук,

заслужений діяч науки й техніки, декан біологічного факультету Ужгородського національного університету.

© Божков А. І., автор

© Федорко М. Ю., видавець

ISBN 978-966-2920-11-6

Предисловие

Специалисты утверждают, что нынешний век - это век биотехнологии. О биотехнологии сегодня говорят и пишут в средствах массовой информации и специальной литературе. Одни восторгаются потенциальными возможностями биотехнологии, другие пугают нас вероятной опасностью генетически измененных организмов. Некоторые специалисты рассматривают биотехнологию как практическое применение достижений биологии, химии и техники. Другие уверены, что биотехнология – это современный этап научно-технических исследований, направленных на разработку принципиально новых технологий. Новые биологические технологии не только позволяют решать глобальные проблемы нашего общества, они формируют новое мировоззрение и этические нормы.

Столь разнообразное видение возможностей и задач биотехнологии вполне обосновано и отражает современный этап развития, как самой биотехнологии, так и нашего общества. Этим объясняется разнообразие учебной литературы по биотехнологии. Автор пытался показать эволюцию взглядов и представлений в области биотехнологии, поэтому в книге приводится большое количество сведений из истории естествознания. Такой подход может позволить воспринимать существующие представления как этап развития знаний о биологических системах, который и привел к развитию биотехнологии.

Сегодня открываются новые кафедры и факультеты, на которых готовят специалистов-биотехнологов различных направлений – агrobiотехнологии, медицинской биотехнологии, экобиотехнологии, молекулярной биотехнологии и др. Однако основой всех существующих направлений в биотехнологии является биотехнологический объект. Именно он обеспечивает получение желаемых целевых продуктов. Без фундаментальных знаний свойств и возможностей биообъектов невозможна никакая современная биологическая технология. Это и побудило автора объединить в одном учебнике фундаментальные и промышленные аспекты биотехнологии.

О структуре учебника. Автор исходит из того, что деление науки на фундаментальную и прикладную условно и крайне неадекватно. Есть науки и новые технологии, которые и появляются в результате развития науки, т.е. это единая система знаний и конкретных их применений. Деление материала на две части: фундаментальные и промышленные аспекты, это скорее дань традиции.

В первую часть вошли данные о характеристике наиболее часто используемых объектах и методах биотехнологии. Конечно, данные об объектах необходимо пополнить из других специальных источников. Однако для специалистов-биотехнологов, не имеющих биологического образования эта глава крайне необходима. В эту часть книги включены наиболее часто используемого сегодня технологий: культуры растительных и животных клеток, лимфоидных гибридомы, технология рекомбинантных ДНК, инженерная энзимология и биосенсорика.

Наиболее трудно было написание III главы, посвященной принципам функционирования биологических систем. Однако без обобщений дальнейшее развитие биотехнологии, да и науки в целом вряд ли возможно.

Вторая часть книги посвящена характеристике основных производственных этапов биотехнологических производств и проблеме оценке качества продуктов биотехнологий. Для удобства восприятия учебник иллюстрирован большим количеством схем и фотографий. Автор уделяет большое внимание понятиям, терминам и определениям, они вынесены в правую колонку текста.

Об особенностях учебника. Некоторые повторения в тексте и на схемах сделаны умышленно, так как восприятие графического материала может быть эффективнее текстового. Каждая из глав написана как самостоятельный завершённый раздел и может быть использована не только биотехнологами. Количество материала выходит за рамки лекционного курса. Это позволит пользоваться учебником и аспирантам, и научным сотрудникам, и преподавателям. Для лучшего усвоения представленного материала автор рекомендует следующий алгоритм работы с учебником: 1. Познакомиться с текстом раздела, изучить схемы, рисунки и термины. 2. Выделить основные идеи, изложенные в тексте и сформулировать самостоятельно общую идею раздела. 3. Составить план прочитанного, выделив основные положения и сформулировать неясные вопросы. 4. Прочитать текст вторично, проверив правильность выделенных положений, и ответить на поставленные вопросы. 5. Составить окончательную схему усвоенного материала и сформулировать новые идеи.

Часть I

Фундаментальные аспекты биотехнологии

Современная биотехнология возникла как возможность использования фундаментальных знаний о биологии клетки и, прежде всего, бактериальной клетки в практической деятельности для получения полезного для человека целевого продукта. Однако биотехнологию не следует понимать только как прикладную сферу деятельности. Это, прежде всего, интеграция научной и технологической деятельности, направленной на модификацию, управление и реконструкцию биологических систем с целью получения ценных веществ естественного происхождения и сохранения окружающей среды. Пожалуй, именно в биотехнологии наиболее гармонично объединены фундаментальные знания с практической деятельностью. Используя биологические системы в качестве продуцентов, мы познаем новые свойства и особенности этих систем, именно в этом и проявляется интеграция науки и производства.

Первая часть книги посвящена знакомству с основными объектами биотехнологии, рассмотрению принципов функционирования биологических систем и основным направлениям молекулярной и клеточной биотехнологии.

Глава I

Биотехнология, этапы становления, задачи и перспективы

Этапы становления биотехнологии

XX век ознаменовался интенсивным развитием фундаментальных наук, техники и химических технологий. Особенностью этого этапа научно-технического прогресса явились специализация и дифференциация наук. К концу XX века специализация достигла такого уровня, что ее дальнейшее углубление не решало, а, напротив, приводило к формированию новых острых социальных, экологических и экономических проблем.

Дальнейший этап развития общества может быть обеспечен только на основе решения тех глобальных проблем, которые возникли перед современной цивилизацией. Это, прежде всего: сохранение природной среды, развитие здравоохранения, рациональное питание и другие. Эти проблемы не могут быть решены без привлечения огромных материальных средств, международного сотрудничества и интеграции различных научных направлений и технологий.

Современный этап научно-технического прогресса может быть обеспечен только на основе интеграции междисциплинарных научных исследований, направленных на развитие принципиально новых технологий, позволяющих решать экологические, экономические и социальные проблемы человечества. Комплексное решение столь различных и достаточно сложных задач может быть достигнуто только на основе интеграции знаний саморегулирующихся биологических систем и технических решений (рис. 1).

Сегодня мы живем в мире интеллектуальных машин и информационных технологий, в мире генов и нанотехнологий. Наш мир «порожденный» наукой, очень сильно повлиял на особенности развития самой науки.

Наука – это социальный институт, основной задачей которого является «производство» новых знаний, знаний об окружающем нас мире и самом человеке, тех знаний, которые позволяют обеспечить развитие во благо человека. Яркой особенностью развития современной науки является интеграция различных научных направлений с социальными аспектами жизни. В результате интеграции формируются не только новые научные направления, но и новые технологии. Это привело к возникновению нового понятия – коммерциализация науки. Коммерциализация науки является следствием интеграции науки и социально-экономической деятельности и направлена на создание механизма быстрого внедрения в практику научных разработок и, прежде всего, новых биотехнологий, направленных на решение наиболее глобальных современных проблем человечества (рис. 1).



Рис. 1. Биотехнология – интеграция научно-технических направлений.

Если в середине XX века на решение социальных задач была привлечена физика (только физика в то время была готова к такой интеграции с социальной жизнью), то сегодня новая интеграция с социумом происходит с генетикой и молекулярной биологией, результатом чего стало формирование биотехнологии и генной инженерии.

Впервые термин «биотехнология» был предложен в 1917 году венгерским инженером К. Эрике.

К Эрике предложил процесс крупномасштабного промышленного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. При этом Эрике рассматривал превращение сырья (свеклы) в целевой продукт, в данном случае свинину как ряд биотехнологических этапов. Этот процесс был назван им биотехнологией, поскольку целевой продукт получался в результате жизнедеятельности биологических систем (рис. 2).

Второе рождение и популярность этот термин приобрел после того, как в 1961 г. шведский микробиолог Карл Герен Хеден предложил заменить название научного журнала «Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology» (Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии) на «Biotechnology and Bioengineering» (Биотехнология и Биоинженерия»). Так как этот журнал публиковал работы по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, то с этого момента биотехнология оказалась связанной с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов». Именно эти представления и начали вкладываться в термин «биотехнология».

Следовательно, основой зарождающегося нового научного направления явилась интеграция микробиологических процессов и химической инженерии, что способствовало развитию крупномасштабного производства продуктов биологического происхождения. Однако эффективность производства зависит от «управления» продуктивностью микробиологических процессов. Это стало возможным только благодаря фундаментальным знаниям молекулярно-биологических процессов микробной клетки.

Благодаря интенсивному развитию молекулярной биологии и биохимии прокариотических клеток стали известны основные этапы синтеза белка в клетке, механизмы синтеза РНК на молекулах ДНК, механизмы репликации и конъюгации клеток бактерий. Были выделены и охарактеризованы плазмиды, осуществлен химический синтез генов и сформулированы представления о механизме мутагенеза. Итак, к 80-м годам XX века практически оформились молекулярно-генетические представления о жизнедеятельности бактериальной клетки, что стало одним из ведущих факторов в развитии современной биотехнологии.

В 70-80 г. г. XX века формируются научные общества биотехнологов, новые научные направления и производственные фирмы, занятые получением целевых продуктов в клетках бактерий.

Наука – это социальный институт, основной задачей которого является «производство» новых знаний об окружающем нас мире и самом человеке. Наука зародилась в древнем мире, с 16-17 в.в. превратилась в социальный институт, оказывающий влияние на все сферы общества.



Рис. 2. Основные этапы биотехнологического процесса в производстве свинины, предложенного Эрике в 1917 г.

Возникновение биотехнологии может быть отнесено к середине XX века, когда было налажено рентабельное производство очищенных препаратов, основанное на биосинтетической деятельности микроорганизмов.

Начиная с 80-х годов, наблюдается интенсивное развитие биотехнологии, которое привело к тому «биотехнологическому буму», свидетельством которого мы являемся. Однако в современное понятие «биотехнология» вкладывался новый смысл, характерной особенностью которого является использование технологии рекомбинантных ДНК, методов клонирования, крупномасштабного культивирования клеток животных и растений *in vitro* (вне организма).

Необходимо отметить, что границы биотехнологии очень быстро расширяются и в настоящее время биотехнология представлена различными научно-производственными направлениями.

Эти новейшие биологические технологии позволяют осуществлять реконструкцию генетического аппарата микроорганизмов, направленную на «сверхпродукцию» тех или иных ценных биологических веществ или синтез новых, не характерных для данного организма продуктов (инсулин, синтезируемый клетками *E. coli* и др.). Огромные промышленные возможности новых биологических технологий привели к росту популярности этого научного направления.

В 1984 г. Европейской Федерацией Биотехнологов дано такое определение биотехнологии: «Биотехнология – это интегральное использование биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей».

Годом раньше в Братиславе (1983 г.) на биотехнологическом Конгрессе было принято следующее определение: «Биотехнология – это наука, разрабатывающая научные основы крупнотоннажной реализации процессов получения с помощью катализаторов различных продуктов и защита окружающей среды».

В этом определении появился чрезвычайно важный аспект для биотехнологии – защита окружающей среды. Сегодня необходимо говорить о двух взаимосвязанных аспектах биотехнологии: как отрасли производства и как фундаментальной науки, изучающей принципы функционирования биологических систем, и разрабатывающей способы модификации и конструирования биологических систем и аналитических устройств.

С учетом этих особенностей биотехнологию можно определить как науку, изучающую и конструирующую биологические системы и аналитические устройства (биосенсоры), направленные на использование биологических систем различного уровня организации в промышленности для производства продуктов биологического происхождения и защиты окружающей среды.

Современная биотехнология является той формой интеграции науки и производства, которая может обеспечить познание окружающего мира через производство, т. е. производство и познание формируют единую систему (рис. 3).

Становление биотехнологии может быть условно разбито на несколько этапов. Выделим три основных этапа развития биотехнологии:

Мишер в 1869 г. выделил ДНК.

Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти в 1944 г. доказали, что ДНК, а не белок, переносит генетическую информацию при трансформации бактерий.

Уотсон и Крик в 1953 году предложили модель двойной спирали ДНК, которая была построена на основе рентгенограмм, полученных Франклин и Уилкинсон.

Земчанин в 1954 году разработал первую бесклеточную систему синтеза белка. Это позволило в последующие десятилетия расшифровать генетический код (Ниренберг, Очоа, Корана, 1961-1966 г.).

Мезельсон, Сталь и Виноградов в 1957 году разработали метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия, что обеспечило развитие метода разделения и исследования нуклеиновых кислот и белков.

Кендрю в 1960 году впервые подробно описал структуру белка-миоглобина кашалота с разрешением 0,2 нм, а Перутц – структуру гемоглобина крупного рогатого скота.

Ким, Рич и Клук в 1976 году на основании рентгеноструктурного анализа описали трехмерную структуру тРНК.

Биотехнология изучает и конструирует биологические системы и аналитические устройства, которые используются в промышленности для производства продуктов биологического происхождения и защиты окружающей среды.

Этап I – это формирование микробиологии, биохимии и бродильных производств как фундаментальной основы биотехнологии. Этап II – это разработка технологии рекомбинантных ДНК, моноклональных антител и рождение молекулярной биотехнологии. Этап III – современный этап развития биотехнологии.

Формирование микробиологии, биохимии и бродильных производств как фундаментальной основы биотехнологии

Одним из первых научных выводов в практике человечества был вывод о способности организмов передавать свои признаки потомству. Этот вывод основывался на эмпирических наблюдениях над животными и растениями в природе. Эти «научные достижения» древнего человека, основанные на интуитивном использовании биологических систем, обеспечили развитие цивилизации примерно за 8 000 лет до н. э. Однако человечество использовало не только животных и растения, но и микроорганизмы.

Используя микроорганизмы для получения продуктов (сыров, вина, пива и др.), наши предки не имели никакого представления о процессах ферментации. Первым, кто увидел и описал микроорганизмы, был голландский исследователь А. Левенгук (1632-1723). В это время появляются первые представления о бактериях.

Однако понадобилось около 200 лет для выяснения роли бактерий в брожении.

В XVIII веке были начаты исследования химических процессов, протекающих в организме. Изучение процессов гидролиза полисахаридов до моносахаридов привело к рождению энзимологии (науки о ферментах – биологических катализаторах белковой природы, «фермент» – производное от латинского «*fermentum*», т. е. «закваска»).

Сущность процесса гидролиза растительного сырья была открыта академиком Петербургской Академии наук К. С. Кирхгофом (1764-1833). Он показал, что процесс превращения крахмала в сахар осуществляется ферментами, содержащимися в солоде (пророщенные и специально подготовленные зерна ячменя).

В 30-х годах 19 века из солода были выделены препараты амилазы, что подтвердило открытие К. С. Кирхгофа. Спустя 80 лет после появления работ К. С. Кирхгофа, японский ученый Такамина Д. впервые использовал ферментативный препарат амилазы, выделенный из гриба *Aspergillus* для получения сахара из крахмала в промышленных масштабах, что создало основы промышленной микробиологии.

Огромную роль в создании основ микробиологических производств сыграли работы французского химика, микробиолога и иммунолога Л. Пастера (1822-1895). Он доказал ферментативную природу спиртового (1860), молочнокислого и масляно-кислого (1861) брожения. Л. Пастер установил, что и гниение вызывается деятельностью определенных видов микроорганизмов. Ряд

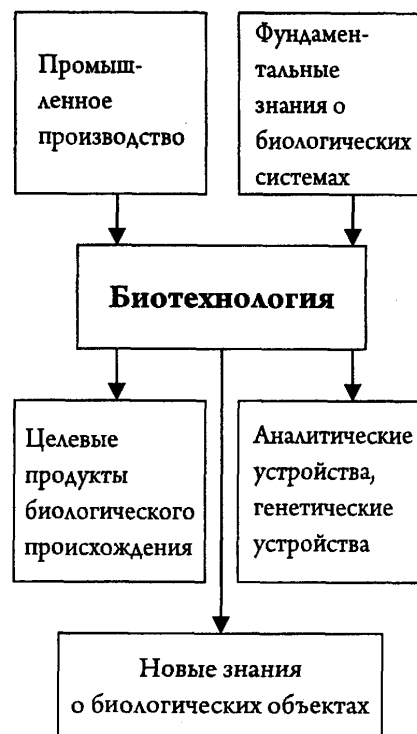


Рис. 3. Биотехнология в наиболее яркой форме использует фундаментальные знания в производстве, и наряду с этим является уникальной формой познания новых свойств биологических систем.

Левенгук достиг величайшего совершенства в шлифовке линз. Изготовив микроскоп собственной конструкции, который давал увеличение в 160-300 раз, и наблюдая в нем различные настои, он описал и зарисовал микроорганизмы, изучил способы их движения и размножения. В 1695 г. А. Левенгук опубликовал свой труд: «Тайны природы, открытые Антонием Левенгуком». Открытие Левенгуком нового микроскопического мира вызвало интерес к его изучению.

В 1897 г. Бюхнер показал, что экстракты дрожжей способны расщеплять сахара с образованием CO_2 и этилового спирта. Это заложило основы энзимологии.

крупнейших фундаментальных открытий, сделанных этим ученым, заложили основы технической и общей микробиологии. Исследования Л. Пастера послужили основой развития в конце 19 – начале 20 веков бродильных производств, в которых использовались разнообразные микроорганизмы: производство уксуса, этилового спирта, бутанола, изопропанола. Микробиология как научная дисциплина, изучающая закономерности жизни и развития микроорганизмов, а также изменения, вызываемые ими в других организмах и неживой природе, сформировалась во второй половине 19 века.

Важным периодом развития микробиологии и ее практических аспектов была разработка в 70-х годах 19 века метода получения чистых культур. (Кон Ф., Пастер Л. и др.), усовершенствование сред для чистых культур, в частности твердых сред, введенных в практику немецким бактериологом Р. Кохом.

Работы по селекции микроорганизмов, начатые Л. Пастером, оказали большое влияние на становление микробиологического производства.

С 30-х годов нашего века начались интенсивные работы по технической микробиологии. Применение чистых культур потребовало разработки нового оборудования, позволяющего выполнять технологические процессы в асептических условиях. В это время получили широкое распространение автоклавы.

В это же время были проведены фундаментальные исследования по культивированию микроорганизмов. Было показано, что рост популяции клеток при периодическом выращивании в ограниченном объеме не зависит от вида клеток, состава питательной среды и внешних условий и соответствует S-образной кинетической кривой. Важным достижением было создание в 1942 г. французским исследователем Ж. Моно модели процесса периодического культивирования микроорганизмов. Согласно этой модели, скорость ферментативной реакции можно отождествлять со скоростью роста популяции, так как в клетке скорость метаболизма зависит от скорости самой медленной реакции и определяется тем веществом, которое находится в наименьшем количестве в культуральной среде.

Скорость роста в такой закрытой системе должна стремиться к нулю, либо из-за использования компонентов субстрата, либо из-за накопления продуктов метаболизма. Поэтому в таком периодическом процессе культура находится в неустойчивом состоянии и трудно поддается регулированию продуктивности.

Крупным достижением в технологии микробиологических процессов была разработка технологии непрерывного брожения в батарее, состоящей из ряда сообщающихся бродильных аппаратов, при непрерывном притоке среды и оттоке сброженной жидкости.

Наиболее важным фактором, оказавшим влияние на формирование микробиологической промышленности, а впоследствии и биотехнологии, было создание производств антибиотиков.



Луи Пастер (1822-1895)

Родился в г. Арбуа (Франция).

В 1847 получил звание доктора по химии. Его первым научным трудом было открытие винной кислоты. Показал, что процесс брожения обусловлен микроорганизмами и, исследуя причины порчи вина, обнаружил, что прогревание до 60 °С предохраняло вино от порчи (эффект пастеризации). Пастер установил связь инфекционных заболеваний с микроорганизмами и впервые применил защитную прививку к человеку. В 1888 г. им был организован институт для исследования микроорганизмов в Париже. Ныне институт Пастера. После смерти Пастера научной работой института руководил И. Мечников.

В 1887 г. ассистент Р. Коха Р. Петри ввел в практику известную нам чашку Петри, используемую для культивирования микроорганизмов.

В 1882 г. Кох впервые использовал анилиновые красители для выявления бактерий, которые вызывали туберкулез и холеру. Используя этот подход в последующие 20 лет, бактериологи описали возбудителей многих болезней.

Впервые автоклав был разработан в конце 18 века французским предпринимателем Н. Аппером, установившим, что после кипячения в герметически закрытом сосуде срок хранения пищевых продуктов значительно удлиняется, что положило начало консервной промышленности.

В 1928 г. А. Флемминг наблюдал антибактериальное действие культуры гриба *Penicillium*, который случайно попал в чашку Петри, где росла культура стафилококка. Он выделил этот гриб, а полученный препарат – пенициллин применил в качестве антисептика для лечения гнойных ран. Однако пристальное внимание пенициллин привлек к себе только после исследований, проведенных г. Флори и Э. Чейном (1938), которые выделили его в чистом виде и показали его терапевтическую активность. В результате перед началом второй мировой войны в Америке, куда переехали Э. Чейн и Х. Флори из Оксфорда (Англия), было получено стойкое химическое вещество – пенициллин и организовано его производство.

Несколько позже, в 1956 г. анализируя исследования по антибиотикам и становление их промышленного производства, Дж. Бернал отмечал, что концентрация усилий в области химии, биологии и медицины была на таком уровне, который можно было сравнить только с уровнем работ при изобретении атомной бомбы /Бернал Дж. Наука в истории об-ва. М. :Из-во ин. лит. , 1956. -735 с. /

Проведенные работы стимулировали исследования по поиску новых антибиотиков, синтезируемых различными группами микроорганизмов. Огромные потребности в антибиотиках требовали организации рентабельных и стабильных производств, основанных на биосинтетической деятельности микроорганизмов, что явилось толчком к аппаратурному оснащению микробиологических производств.

Развитие крупномасштабного микробиологического производства потребовало научного обоснования всей новой технологии производства, в частности решения таких проблем как метод глубинного культивирования в асептических условиях с интенсивной аэрацией, выделением и очисткой веществ, содержащихся в субстрате в малых количествах, и генетические исследования микроорганизмов.

Технические науки стали играть совместно с микробиологией, генетикой, биохимией и физиологией важную роль в формировании промышленной микробиологии, ставшей впоследствии технической базой для современной молекулярной биотехнологии (рис. 4).

Итак, спустя 300 лет после открытия микроорганизмов, благодаря фундаментальным исследованиям этой группы организмов и в результате привлечения технических наук к разработке основ массового культивирования бактерий, сформировалась такая научно-техническая область как промышленная микробиология. В настоящее время микробиологическая промышленность производит с помощью микроорганизмов большое количество ценных продуктов (антибиотики, белки, витамины, лекарственные препараты, ферменты и др.) из непищевого сырья (углеводородов нефти и газа, гидролизатов древесины, а также отходов промышленности).

Микробиологическая промышленность стала основой современной биотехнологии.



А. Флемминг (1881-1955), английский микробиолог. В 1922 г. открыл лизоцим, а 1929 г. – пенициллин. В 1945 г. совместно с Х. Флори и Э. Чейном получил Нобелевскую премию за открытие пенициллина.

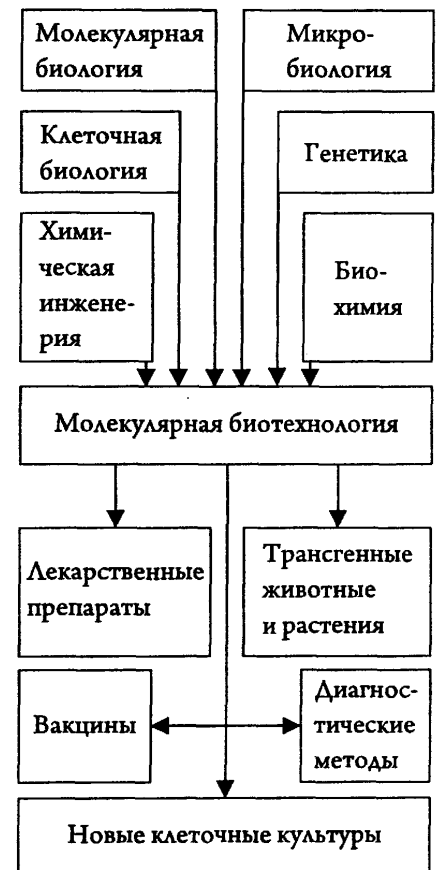


Рис. 4. Молекулярная биотехнология возникла на основе исследования молекулярных процессов биологических систем и создает новые продукты и методы.

Разработка технологии рекомбинантных ДНК и рождение молекулярной биотехнологии

В становлении технологии рекомбинантных ДНК большую роль сыграли исследования многих ученых, однако наиболее яркие работы выполнили в 1973 г. американские ученые Стенли Коэн и Герберт Бойер, которые разработали технологию получения рекомбинантных ДНК. Технология рекомбинантных ДНК позволяет, по словам Коэна, ввести в *E. coli* гены, которые ассоциированы с синтетическими функциями других биологических видов. Дальнейшее развитие технологии рекомбинантных ДНК привело к созданию огромного количества методик позволяющих выделять, клонировать и использовать гены для получения белков с различными свойствами. Этот новый экспериментальный подход оказал влияние на развитие практически всех биологических наук. Важным этапом в формировании технологии рекомбинантных ДНК было выделение в 1970 г. рестриктаз и создание в 1988 г. метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), выделение в 1973 г. Балтимором и Теминым РНК-зависимых ДНК-полимераз (ревертаз) и целый ряд других работ (табл. 1).

Использование этих новых методов и способов модификаций генома и привело к формированию нового научного направления – молекулярной биотехнологии.

Как отмечают Б. Глик и Дж. Пастернак, молекулярная биотехнология в период своего становления весьма амбициозна. Она достаточно быстро развивается, и, несомненно, в будущем будут разработаны методы создания живых систем, обладающих новыми функциями.

Конечной целью всех биотехнологических процессов является создание коммерческих продуктов и в этом смысле она связана с экономикой и коммерциализацией. Об этом свидетельствует интенсивное развитие коммерческих биотехнологических фирм. В 2000 г. только в США было зарегистрировано более 1500 крупных биотехнологических компаний, а в мире их насчитывалось более 3000 (табл. 2).

Современный этап развития биотехнологии

Основные задачи биотехнологии связаны с получением продуктов с помощью микроорганизмов и других биологических систем, а это возможно только на основе знаний структурно-функциональной организации биологических систем.

Современный этап развития биотехнологии связан прежде всего с разработкой новых методов молекулярного клонирования, клеточных технологий и их внедрения в различные направления биотехнологии и проведение фундаментальных исследований биологических систем.

Исследования биологических механизмов дифференцировки, явления тотипотентности, природы стволовых клеток и

Дата	Событие
1970	Выделена первая рестриктаза
1972	Корана и др. синтезировали ген тРНК
1973	Балтимор и Темин выделили ревертазу
1973	Бойер и Коэн предложили метод получения рекомбинантных ДНК
1975	Келлер и Миальштейн предложили способ получения моноклональных антител
1976	Разработан метод определения нуклеотидной последовательности ДНК
1983	Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды
1988	Создан метод полимеразной цепной реакции
1990	Начаты работы по проекту «Геном человека»
1997	Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки

Табл. 1. Некоторые этапы в становлении молекулярной биотехнологии.

1978	Фирма Genetech выпустила человеческий инсулин, полученный из <i>E. coli</i> на основе использования технологии рекомбинантных ДНК.
1981	Поступили в продажу автоматические синтезаторы ДНК
1981	В США разрешен к применению первый диагностический набор моноклональных антител
1996	Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка – эритропоэтина превысил 1 млрд. долларов США

Табл. 2. Некоторые шаги в коммерциализации молекулярной биотехнологии.

разработка клеточной трансплантации, индуцировало развитие нового научно-практического направления – клеточной инженерии и клеточной биологии.

Технология рекомбинантных ДНК и клеточная биотехнология – мощный, эффективный инструмент получения биологических систем с новыми, заданными свойствами. Этот подход открывает принципиально новые возможности в точной диагностике, профилактике и лечении множества инфекционных и генетических заболеваний, что позволяет обеспечить:

- значительное повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания растений, устойчивых к вредителям и негативным факторам среды;
- создание микроорганизмов, продуцирующих различные ценные соединения (антибиотики, аминокислоты, ферменты);
- создание пород сельскохозяйственных животных с улучшенными признаками;
- переработку отходов, загрязняющих окружающую среду;
- переработку и модификацию продуктов питания и разработку биологически активных добавок к пище;
- решение проблем энергетики и др.

Конечно, реализация этих открывающихся возможностей требует глубоких фундаментальных знаний, привлечения огромных материальных и интеллектуальных ресурсов. Развитие биотехнологии оказывает, а в будущем может привести к глубоким изменениям мировоззрения и этических норм в обществе. Это инициировало формирование биоэтических норм и представлений. Пока остаются без ответа такие важные вопросы: как генетически модифицированные организмы будут вести себя в природной среде; этично ли и правомочно ли использовать технологию рекомбинантных ДНК для человека; не разрушит ли развитие молекулярной биотехнологии традиционное сельское хозяйство; не создадим ли мы новых глобальных проблем, используя технологию рекомбинантных ДНК и т. д. и т. п.

Эти и целый ряд других вопросов рассматриваются на научных форумах, правительственных комиссиях, научных и публичных выступлениях ученых и политических деятелей. Сегодня разрабатываются необходимые правила, инструкции и принципы использования биологических знаний в практической деятельности человека, которые направлены на безопасное развитие биотехнологии.

Основные задачи и перспективы биотехнологии

По прогнозам специалистов к 2025 году население нашей планеты составит около 9 млрд. человек. Рост народонаселения приведет к значительному росту потребления продовольствия и энергетических ресурсов, возрастут потребности и требования к медицинскому обслуживанию.

Стволовая клетка – недифференцированная клетка, которая способна в зависимости от окружения дифференцироваться в различные дифференцированные клетки тела, т. е. стволовая клетка является тотипотентной.

Термин «стволовая клетка» был предложен А. Максимовым в 1908 г. В 1981 г. М. Эвансу впервые удалось выделить животную эмбриональную тотипотентную клетку из зародыша мыши. В 1998 г. Д. Томпсон и Д. Герхард получили стволовые клетки из эритроблеста человека, а в следующем 1999 г. было признано, что открытие эмбриональных стволовых клеток человека явилось третьим по важности событием в биологии XX века после установления структуры ДНК и реализации программы «Геном человека».

Этика от греческого – обычай, нрав, характер, является философской дисциплиной. Задачи этики не только в том, чтобы помочь человеку в выборе между добром и злом, но и адекватно оценить жизненную ситуацию и определить путь достижения добра.

Биоэтика – это не только современный этап развития медицинской этики, но и оценка возможности медицины и биологии в решении проблем качества жизни с сохранением гуманистических традиций.

Основные задачи биоэтики должны быть направлены на: 1 – разработку новой парадигмы природопользования; 2 – разработку системы научного прогноза потенциальной опасности от внедрения новых технологий; 3 – разработку образовательной системы биоэтической ментальности.

Удовлетворение растущих потребностей человечества требует роста промышленного и аграрного производства. Так, чтобы обеспечить потребности человечества в пище, воде и энергии к 2050 году на уровне современного европейского стандарта необходимо увеличить масштабы производства в 10 раз по сравнению с сегодняшним уровнем.

По мнению многих специалистов, осуществить это на основе существующих традиционных технологий невозможно. Кроме того, если это даже удастся выполнить на основе реконструкции существующих промышленных и аграрных технологий, то такая мощность приведет к необратимым нарушениям баланса в окружающей среде, т. е. к биосферному кризису.

Состояние биосферы является определяющим фактором в развитии цивилизации, так как плодородие почвы, состояние водного и воздушного бассейнов определяют продуктивность всего растительного покрова, т. е. обеспечивают планету органическими веществами и кислородом. Такие энергетические ресурсы как уголь, торф и нефть также имеют биогенное происхождение.

Проблема сводится к тому, что, с одной стороны, необходим рост производства, а, с другой, при существующих технологиях это неминуемо приведет к биосферной катастрофе. Инвайронментальный кризис может иметь столь большие планетарные последствия, которые приведут к радикальным изменениям в проявлении жизни на планете. Об этом впервые было заявлено на конференции в Стокгольме в 1972 г. В конференции приняли участие представители 106 стран.

Решение этой проблемы может быть достигнуто только путем создания таких новых технологий, позволяющих иметь высокий производительный потенциал и не оказывать существенного влияния на окружающую среду. По мнению многих специалистов наиболее перспективным в этом отношении являются технологии, основанные на свойствах биологических систем. Это объясняется тем, что биологические системы функционируют с высокой эффективностью при невысоких давлениях и температурах, поддаются контролю, и их активность может регулироваться. Они компактны и не загрязняют окружающую среду, так как могут быть безотходными. Более того, целый ряд организмов способны утилизировать разнообразные продукты, образующиеся в других производствах.

Фундаментальные исследования механизмов функционирования биологических систем различного уровня организации показали принципиальную возможность управления и конструирования новых биологических систем с заданными свойствами. В результате биологических исследований и технических разработок были созданы основы контроля биопроцессами в управляемых реакторных технологиях.

Новые технологии, основанные на использовании разнообразных, высокоспецифичных свойств биологических систем

Если для увеличения численности населения на 1 млрд. лет, то за последующие 75 лет численность населения достигла 2 млрд. Некоторые специалисты считают, что численность населения планеты может стабилизироваться на уровне 10-12 млрд. человек. Однако и такая численность чрезвычайно высока для ресурсов планеты.

Биосфера – оболочка Земли, которая включает части атмосферы, гидросферы и литосферы, заселенные живыми организмами. Первые представления о биосфере как зоне жизни принадлежат Жану Батисту Ламарку (1882 г.), а термин «биосфера» был предложен австрийским геологом Е. Зюсе в 1875 году.

Инвайронменталогия – наука, изучающая природную среду. Часто вместо этого понятия используют термин «экология» что не всегда верно. **Экология** – наука, изучающая взаимоотношения между растениями, животными и микроорганизмами и образованными ими сообществами между собой и окружающей средой. Термин «экология» был предложен в 1866 году Э. Геккелем. Первый научный сектор экологических исследований в Украине был организован в 1930 году в зооботаническом институте Харьковского госуниверситета В. В. Станчинским. Станчинский создал биогеоценологию, новое научное направление, которое исследует функциональное единство биоценозов и абиотических факторов.

позволяют комплексно решать самые насущные и глобальные задачи, стоящие перед человечеством:

1 – обеспечения пищевыми ресурсами – путем использования высокоэффективных технологий получения биомассы известного состава.

2 – охраны здоровья – путем разработки новых высокоэффективных диагностических тестов, новых лекарственных препаратов биологического происхождения, способов лечения и профилактики.

3 – обеспечения энергетическими ресурсами – путем получения энергии из быстро возобновляемых источников

4 – восстановления и сохранения состояния окружающей среды путем биологической утилизации отходов традиционных технологий и разработки безотходных технологий.

Необходимо учесть, что решение этих глобальных задач методами биотехнологии оправдано и целесообразно только при условии сохранения окружающей среды до состояния совместимости с жизнью.

Кроме этих основных задач биологические технологии находят применение и при решении ряда более частных задач, в частности, в промышленности при извлечении из обедненных руд редких химических элементов, таких как золото, платина, серебро и др.

Однако разработка новых технологий еще не является гарантией решения этих глобальных задач. Успех может быть обеспечен только быстрым обменом технологиями между фундаментальной наукой и производством. Это в свою очередь потребует от человека перехода на новые стандарты жизни, и, очевидно, выработать новую инвайронментальную идеологию.

Новая парадигма природопользования должна быть основана на использовании современных биотехнологий, которые могут позволить добиться уменьшения антропогенной нагрузки на биосферу и разработать коэволюционную систему выживания, т. е. совместной однонаправленной эволюции человека и окружающей среды.

По оценке специалистов объем мирового рынка иммунодиагностических тестов в 1993 году составил 3,4 млрд. дол. США. Продажа ДНК-диагностических тестов в 1994 г. в мире составила 80 млн. дол., а в 2000 г. уже 600 млн. долл.

Развитие и совершенствование диагностических тестов, и в частности использование биосенсоров в настоящее время интенсивно развивается. Ведь только ранняя и точная идентификация заболеваний может обеспечить эффективность лечения.

Термин **ноосфера** был предложен французским философом и математиком Э. Леруа после чтения Вернадским лекций в Париже. В. И. Вернадский принял этот термин и развил учение о ноосфере в 30-х годах XX века. Ноос – греческое слово, означающее разум в смысле гармонического отношения человека к окружающему его миру. Необходимо отметить, что такую трактовку этому термину давал еще неоплатоник Ямвлих, живший в конце III века нашей эры. Он указывал, что из греков, его предшественников, один Платон и обладал ноосом.

Глава II

Объекты биотехнологии

Общие характеристики объектов биотехнологии

Характеристики объектов

Понятие объект включает в себя несколько аспектов. Прежде всего, объект – это то, что существует независимо от нашего сознания, т. е. существует объективно. Когда мы говорим об объекте исследования, то понимаем биологическую систему, на которую направлена наша познавательная (исследовательская) деятельность. В практической деятельности под объектом понимают биологическую систему, использующуюся в производственной деятельности.

Объектами биотехнологии являются разнообразные биологические системы, от отдельных молекул до высокоорганизованных организмов и их сообществ, на которые направлена познавательная и практическая деятельность (рис. 5).

Следовательно, все многообразные объекты биотехнологии могут быть разделены по своему уровню организации на клеточные системы и их метаболиты. В этой связи «орудием труда» при получении целевого продукта в биотехнологии является клетка.

Все живые существа на Земле представлены 3 надцарствами. В основу этой классификации положена морфологическая организация генетической системы: безъядерные (Acaryotae) – предъядерные (Procaryotae) – ядерные (Eucaryotae). К acaryotae относятся вирусы и вириоды. К procaryotae относятся бактерии и сине-зеленые водоросли (цианобактерии). К eucaryotae относятся 3 царства: грибы (Mycota), растения (Plantae), животные (Animalia) (рис. 6).

Вирусы и вириоды

Вирусы позвоночных и беспозвоночных животных

Вирусы представляют собой уникальные биологические образования, не способные функционировать самостоятельно. Для репликации (размножения) они проникают в клетку и используют ее метаболический аппарат. По своей природе вирусы являются облигатными паразитами, так как их размножение происходит только в клетках хозяина.

Если исходить из того, что для биологических систем характерной особенностью является наличие генетического материала (ДНК или РНК), который обладает способностью воспроизводить себя, т. е. реплицироваться, то вирусы являются живыми, так как способны воспроизводить себя в клетках своего хозяина. Исследование биологии вирусов явилось еще одним экспериментальным доказательством клеточной теории.



Рис. 5. Объекты биотехнологии

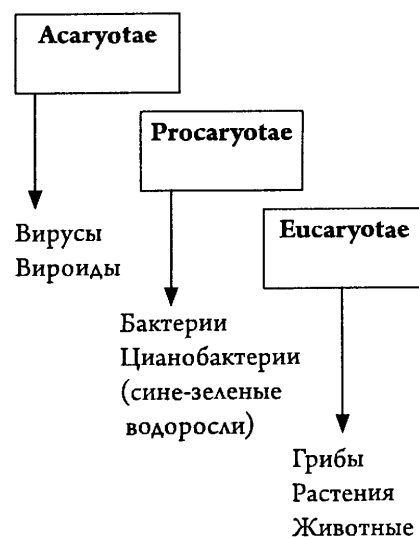


Рис. 6. По организации генома все живые организмы на Земле делят на 3 надцарства.

В 1852 г. русский ботаник Д. И. Ивановский впервые получил инфекционный экстракт из растений табака, пораженных мозаичной болезнью. Этот экстракт не содержал бактерий, так как бактерии были удалены фильтрацией. Для объяснения этого явления, т. е. сохранения инфекционной природы после удаления бактерий, голландский ученый Beijerinck (Бейеринк) в 1898 г. предложил понятие «вирус» (от латинского слова, означающего «яд»). Однако увидеть эти загадочные частицы удалось только в 30-х годах нашего столетия, когда биологи вооружились электронным микроскопом. Это связано с тем, что размер вирусов меньше, чем полудлина световой волны и, следовательно, их нельзя увидеть в световом микроскопе. Размеры вирусов варьируют в пределах от 200 до 300 нм. В среднем они в 50 раз меньше бактериальных клеток.

В состав вирусов входит нуклеиновая кислота, ДНК или РНК, они могут быть линейными или кольцевыми, однонитевыми или двухцепочечными. Нуклеиновая кислота формирует сердцевину вируса, которая окружена белковой оболочкой – капсидом. У некоторых вирусов в состав оболочки входят и липопротеиды. Зрелая вирусная частица вне организма получила название вириона. Оболочка вирусов часто представлена идентичными повторяющимися субчастицами – капсомерами, которые способны кристаллизоваться с высокой степенью симметрии. Вирион представляет собой истинный кристалл. Сформировавшиеся капсомеры в клетке хозяина обладают способностью к спонтанной самосборке в вирусные частицы. Самосборка является одним из фундаментальных свойств биологических систем (рис. 7) (этот принцип будет рассмотрен в главе 3).

Вирусы имеют круг хозяев и в зависимости от этого они делятся на вирусы бактерий (бактериофаги), вирусы растений (фитопатогенные вирусы) и вирусы животных. Для клеток животных (в отличие от клеток растений) один вид вируса поражает клетки только определенного органа, т. е. для него характерна тканевая избирательность. Вирусы имеют разнообразные формы (рис. 8, 9).

Эволюцию вирусов нельзя представить в виде родословного дерева, как это обычно делается для других организмов, потому что в настоящее время нет оснований утверждать, что они имеют единого предка. Вероятно, наиболее правдоподобной гипотезой о происхождении вирусов является та, согласно которой вирусы произошли из «беглой» нуклеиновой кислоты. Под «беглой» имеется в виду нуклеиновая кислота, которая приобрела способность реплицироваться независимо от клетки хозяина, которую она покинула, т. е. она реплицируется, используя компоненты репликации других типов клеток.

Обладая уникальной способностью к переносу ДНК через видовые барьеры, вирусы сыграли важную роль в эволюции других организмов. Ведь большинство вирусов вступают в рекомбинацию с геномом клетки-хозяина, захватывают фрагменты его ДНК и переносят их, а в ряде случаев вирусы остаются в клетке и кодируют полезные для клетки белки.

1931 г. – Руска с сотрудниками создали первый просвечивающийся электронный микроскоп.
 1939 г. – Сименс создал первый просвечивающийся электронный микроскоп, который был пущен в продажу.
 1945 г. – Портер, Клод и Фуллам использовали электронный микроскоп для исследования клеток в культуре.
 1952 г. – Паладе, Портер и Шестрад разработали методы фиксации и приготовления тонких срезов биологических образцов.

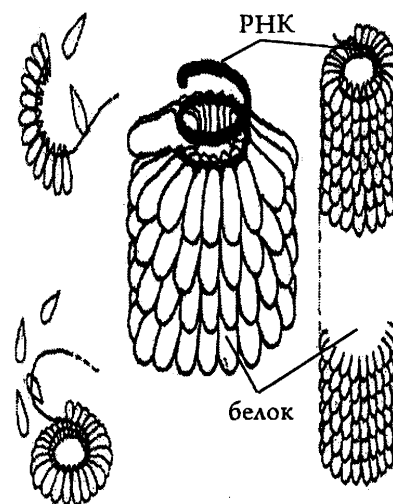


Рис. 7. Структура вируса табачной мозаики и самосборка из белковых субъединиц и молекул РНК. Цепь РНК состоит из 6600 нуклеотидов, к которым присоединены 2200 однотипных молекул белка. Диаметр 180 Å, ширина 3000 Å.

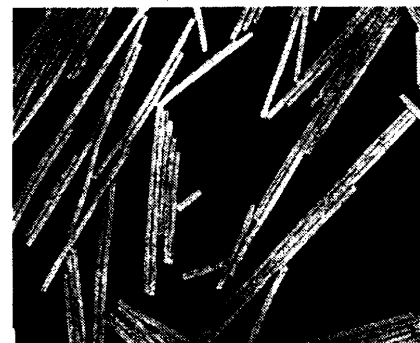


Рис. 8. Вирус табачной мозаики (x 10 000).

Так как в состав вируса входят разные типы нуклеиновых кислот можно полагать, что они произошли от разных предков. Если это так, то их нельзя рассматривать в качестве примитивных организмов, а скорее они произошли от клеточных организмов, т. е. организмов с клеточным уровнем организации.

На III Международном конгрессе вирусологов в Мадриде (1975) были выработаны принципы классификации вирусов. Деление на группы осуществляется в зависимости от круга хозяев, хотя при этом часто возникают затруднения, так как вирусы позвоночных могут размножаться и в клетках беспозвоночных. Вирусы растений могут поражать и насекомых, существуют и другие примеры смены хозяев.

В настоящее время описано 17 семейств вирусов позвоночных и 7 семейств вирусов беспозвоночных животных. Размеры вирусных частиц 200-300 нм. Спиральный нуклеокапсид, вирион, по форме напоминает кирпич. ДНК у него двухцепочечная с молекулярной массой (м. м.) $160 \cdot 10^6$. Вирион содержит несколько ферментов и около 30 белков, имеет оболочку. Типичные представители: вирус осповакцины, вирус натуральной оспы, вирус коровьей оспы, они вызывают различные патологии (табл. 3).

Вирусы растений

В настоящее время описано 20 родов вирусов растений и 5 родов вирусов грибов.

Вирусы растений изучены в меньшей степени и для них еще не выработана окончательная классификация. Их делят на группы, название группы образуется от названия наиболее характерного представителя. Для большинства вирусов растений характерно разделение их генома на несколько вирионов (два-три). В таких случаях инфицирование возможно тогда, когда присутствуют одновременно все вирионы, несущие полный геном вируса.

Вирусы бактерий (бактериофаги)

Бактериофаги, или просто фаги, являются вирусами бактерий. Они состоят из головки, которая имеет кубическую симметрию, и отростка, или хвоста, который имеет спиральную симметрию. На конце хвоста имеется приспособление, обеспечивающее фиксацию фага на поверхности клетки в процессе инфекции (рис. 10).

В головке фага находится нуклеиновая кислота (чаще всего это ДНК). Чехол отростка сокращается и ДНК инъецируется в бактериальную клетку, капсид остается на поверхности клетки.

Жизненный цикл бактериофага состоит из нескольких стадий: 1 – прикрепление к бактериальной клетке (рис. 11); 2 – внедрение вирусных ДНК в клетку бактерии; 3 – индукция синтеза ферментов, необходимых для репликации вирусных ДНК; 4 – синтез вирусных белков; 5 – сборка вирусных частиц из ДНК и капсида; 6 – разрушение клетки бактерии и освобождение вирусных частиц в среду.

В некоторых случаях происходит лизогения, когда вирусная ДНК встраивается в геном бактерии без размножения и разрушения самой бактериальной клетки. При этом цикла жизнедеятельности бактерий не изменяется и только под влиянием факторов

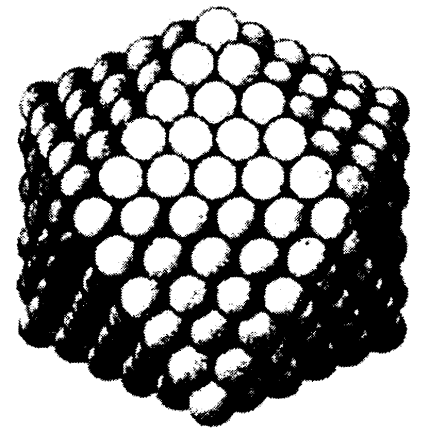


Рис. 9. Строение вируса с кубической симметрией

Капсид, окружающий нуклеиновую кислоту, имеет форму многогранника; каждая из составляющих граней – это равносторонний треугольник. Капсомеры, составляющие капсид имеют по 5-6 субъединиц белковой природы.

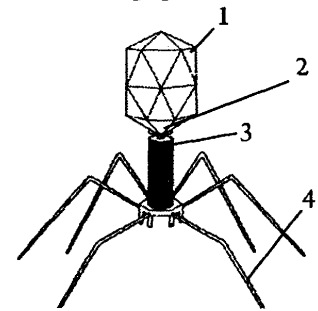


Рис. 10. Строение бактериофага. 1 – головка; 2 – воротничок; 3 – хвостовой чехол; 4 – хвостовые нити, выходящие из базальной пластинки.

Название болезни	Возбудитель
Грипп	Миксовирус, известны типы А, В, С, обладают разной степенью вирулентности
Оспа	Вирус натуральной оспы (ДНК-содержащий вирус)
Эпидемический паротит	Парамиксовирус (РНК-содержащий вирус)
Корь	Парамиксовирус (РНК-содержащий вирус)
Коревая краснуха	Вирус краснухи
Полиомиелит	Пикорнавирус (РНК-содержащий вирус)
Желтая лихорадка	Арбовирус (РНК-содержащий вирус)

Табл. 3. Некоторые вирусные заболевания человека.

среды – излучения, химических соединений и др. геном фага реплицируется и «запускается» жизненный цикл фага, который завершается лизисом (разрушением) клетки бактерии.

Вироиды

Первые субвирусный возбудитель веретеновидности клубней картофеля (вирион) был описан в 1971 г. американским исследователем Т. Дикером. Вироиды представляют собой одноцепочечные кольцевые молекулы РНК, не имеющие капсид, с молекулярной массой 107 000 и 127 000 и состоящие из 300-400 нуклеотидов. В 1978 г. была исследована нуклеотидная последовательность веретеновидности клубней картофеля.

Молекула вирионных РНК имеет многочисленные спаренные внутримолекулярные участки, которые отделены друг от друга внутренними петлями. В результате образуется гантелеобразная вторичная структура с соотношением осей 1:20, обладающая высокой стабильностью. Размеры вирионов находятся в пределах 15 нм. Вироиды обнаружены только у растений, как правило, уроженцев тропических и субтропических зон с континентальным климатом. Они способны размножаться при относительно высоких температурах (35 °С). Вироидные РНК обнаружены в хроматине клеточного ядра клеток хозяина, а также хлоропластах, митохондриях и рибосомах в виде белково-нуклеиновых комплексов. Они реплицируются автономно, используя ферменты (РНК-полимеразы) клетки хозяина. Продукты трансляции вирионных РНК не выявлены. В молекуле РНК вириона отсутствуют типичные иницирующие кодоны AUG, однако они содержат семь кодонов GUG, которые могут служить иницирующими кодонами.

Прокариотические организмы

К организмам с прокариотической (безъядерной) организацией генома относятся микоплазмы, бактерии и цианобактерии или сине-зеленые водоросли. Их генетический аппарат состоит из одной молекулы ДНК. Генетический аппарат не обособлен от остальной части клетки в виде ядра, что характерно для эукариотической организации. Клетки прокариот не имеют развитой системы внутриклеточных мембран, как у клеток эукариот (табл. 4).

Однако, несмотря на кажущуюся простоту организации, прокариотические клетки способны синтезировать огромное количество ферментов, обеспечивающих метаболизм разнообразных субстратов, и в этом смысле представляют интерес для биотехнологии.

Прокариоты являются объектами исследования в молекулярной биологии и основными продуцентами в биотехнологии.

Бактерии

Микоплазмы

Микоплазмы (рис. 12) имеют наиболее примитивную организацию клетки из известных нам самостоятельно живущих



Рис. 11. Электронная микрофотография бактериофагов, которые инфицируют клетку бактерии *E. coli*.

Показатели	Прокариоты	Эукариоты
ДНК	Кольцевая, не организована в хромосомы, находится в цитоплазме	Линейная, организована в хромосомы, находится в ядре
РНК	70S-рибосомы синтез белка ингибируется хлорамфениколом, но не циклогексимидом	80S-рибосомы
Внутриклеточные мембраны	отсутствуют	хорошо развиты

Табл. 4. Сравнительная характеристика прокариотических и эукариотических клеток.

одноклеточных организмов. Клетка микоплазмы не имеет клеточной стенки и окружена плазматической мембраной, содержит несколько сотен рибосом, геном представлен молекулой ДНК, которая расположена в цитоплазме в виде клубка. В клетках микоплазм синтезируется АТФ и осуществляется метаболизм, который обеспечивает им самостоятельное функционирование.

Размеры бактериальных клеток варьируют в пределах от 0,1 до 10 мкм. Строение типичной бактериальной клетки представлено на рис. 13. Формы бактериальных клеток достаточно разнообразны и используются в качестве одного из систематических признаков.

Их делят на четыре основных типа клеток: кокки, бациллы, спириллы и вибрионы.

Бактерии характеризуются высокими адаптивными способностями, что обеспечивает им существование в разнообразных средах: воде, воздухе, почвах, покровах животных, внутренних средах различных организмов. Они способны метаболизировать разнообразные продукты и быстро делиться. У быстрорастущих бактерий деление клеток осуществляется каждые 20-30 минут. Используя технологию рекомбинантных ДНК, можно получать клетки, способные синтезировать ценные для человека белковые продукты (гормоны, ферменты, факторы роста).

Большое разнообразие, высокая скорость размножения, возможность трансформации клеток бактерий, существующие технологии промышленного культивирования бактерий – все это привело к тому, что клетки бактерий являются основными объектами современных биотехнологий.

Строение бактериальных клеток

Клетки бактерий, как и клетки растений, имеют клеточную стенку, которая определяет форму, механическую прочность и препятствует осмотическому набуханию и разрыву клетки при попадании в гипотоническую среду. Клеточная стенка бактерий отличается от растительной клетки тем, что в ее состав входит муреин. Молекула муреина представляет собой сеть из параллельно расположенных полисахаридных цепей, сшитых между собой короткими пептидами. В клетках бактерий муреин выполняет ту же роль, что и целлюлоза в клеточной стенке растений.

По строению клеточной стенки бактерии делят на две группы: грамположительные (окрашиваются по Граму) и грамотрицательные (обесцвечиваются при отмывке красителя). В муреиновую сетку грамположительных бактерий (пример *Lactobacillus*) встроены белки и полисахариды. У грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*) наружная сторона клеточной стенки покрыта слоем липидов. Они защищают клетку от действия лизоцима.

Лизоцим катализирует гидролиз углеводных связей и тем самым расщепляет полисахаридную основу муреина. Лизоцим содержится в слюне, слезах и других биологических жидкостях.

Жгутики и пили бактериальных клеток

Многие бактерии имеют жгутики, которые обеспечивают им подвижность (рис. 14). Жгутики бактерий отличаются по своей



Рис. 12. Клетки микоплазмы, увеличенные в 68 000 раз.



Рис. 13. Бактериальные клетки *Micobacterium phlei*: x 80 000

клеточная стенка (1), мезосома (2), рибосомы (3), генетический материал представлен в виде клубка нитей ДНК (4).

структуре от жгутиков эукариот. Жгутики бактерий состоят из одинаковых сферических субъединиц белка флагеллина (сходен с мышечным актином), они расположены по спирали и формируют полный цилиндр с диаметром около 10-20 нм. Движение жгутиков обеспечивается вращательным движением его основания и сам жгутик «ввинчивается» в среду, что обеспечивает движение клетки. Необходимо отметить, что бактерии способны к таксису, т. е. передвигаются в ответ на действие раздражителей. Аэробные бактерии обладают положительным аэротаксисом (т. е. перемещаются в среду богатую кислородом).

У некоторых грамотрицательных бактерий обнаружены тонкие палочковидные белковые выступы, которые назвали пили или фимбрии (рис. 15). Они гораздо короче жгутиков и служат для прикрепления клеток друг к другу или поверхности. В настоящее время описаны разные формы пили. Так, выявлены так называемые F-пили, которые участвуют в половом размножении бактерий, и которые кодируются плазмидой бактериальной клетки.

Плазматическая мембрана

и мезосомы бактериальных клеток

Клетка бактерий, как и эукариотическая клетка, окружена плазматической мембраной, которая имеет сходное строение с мембраной эукариот. У некоторых бактерий плазматическая мембрана образует внутриклеточные впячивания, которые названы мезосомами. Сформировавшиеся мезосомы представляют собой складчатые мембранные структуры. На поверхности мезосом локализованы группы ферментов, обеспечивающие процесс дыхания. Мезосома может рассматриваться как «примитивная» органелла. В бактериальных клетках, способных к фотосинтезу, могут образовываться впячивания плазматической мембраны с формированием фотосинтетических мембран, т. е. мембран, содержащих бактериохлорофилл и принимающих участие в фотосинтезе (у бактерий нет хлоропластов). Некоторые виды бактерий способны к фиксации азота, которая осуществляется в мембранах, подобных фотосинтетическим.

Характеристика генетического аппарата прокариот

Генетический материал представлен одиночными кольцевыми молекулами ДНК длиной около 1 мм. Такая молекула состоит примерно из $5 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов. Молекула ДНК бактериальной клетки содержит несколько тысяч генов, это приблизительно в 500 раз меньше, чем в клетке эукариот. ДНК бактериальной клетки расположена в цитоплазме и не отделена мембраной, как в клетках эукариот. Рибосомы в клетках бактерий имеют коэффициент седиментации 70 S (в отличие от 80 S эукариот) и неравномерно размещены в цитоплазме (рис. 16).

Рост и размножение бактерий

Рост клетки означает увеличение массы бактерий в результате синтеза и накопления многообразных клеточных метаболитов (белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот). Достижение

В 1884 г. датский бактериолог Грам разработал метод окрашивания бактерий, суть которого сводится к тому, что клетки окрашивают основным красителем кристаллическим фиолетовым, после чего препараты фиксируют в растворе I_2 -KI и отмывают ацетоном или спиртом. В результате этой процедуры все клетки окрашиваются одинаково. Однако у некоторых видов (названных грамотрицательными) комплекс краситель- I_2 вымывается после обработки органическими растворителями. В то время как у других бактерий он удерживается (грамположительные). Причина различий бактерий по отношению к красителю была разгадана только в 1959 г. Залтоном, который показал, что клеточная стенка грамположительных бактерий образует непроницаемый барьер для комплекса красителя- I_2 .



Рис. 14. Степень развития жгутиков у *Proteus vulgaris*.



Рис. 15. Половые пили, образующиеся во время конъюгации бактерий

клеткой определенных размеров и состава является сигналом к размножению. Под размножением понимают способность клетки к самовоспроизведению. Бактерии размножаются простым делением (вегетативное размножение) и способны к половому процессу. Бесполое размножение сводится к образованию двух одинаковых дочерних клеток (бинарное деление). Необходимым условием деления клетки является удвоение генетического материала (репликация ДНК). Во время деления бактериальной клетки ДНК удерживается мезосомами в определенном пространственном положении, что обеспечивает правильное (равномерное) расхождение генетического материала в дочерние клетки.

Скорость роста и размножения клеток различна для разных видов бактерий и зависит от температуры, питательной среды (доступности питательных веществ), концентрации ионов водорода и других ионов. Важным фактором является концентрация кислорода и углекислого газа. По отношению к кислороду все бактерии делятся на облигатные аэробы, которым необходим кислород для жизнедеятельности и облигатные анаэробы, живущие в среде без кислорода. При благоприятных условиях скорость размножения бактерий очень высока. Интервал между делениями клеток называют временем генерации. Продолжительность генерации при оптимальных условиях для *Streptococcus faecalis* 15 мин, *E. coli* - 20-30 мин, для группы патогенных стрептококков – 30 мин.

Следовательно, бактерии размножаются почти в 100 раз быстрее, чем эукариотические клетки.

Как уже отмечалось, размножение бактерий (как и других типов клеток) зависит не только от вида, но и условий культивирования. Различают периодический способ культивирования (накопительная культура) и непрерывное культивирование.

Периодическая культура характеризуется выраженной цикличностью в своем развитии (рис. 17). Это так называемая экспоненциальная кривая роста. Во время лаг-фазы бактерии адаптируются к новым условиям обитания. Продолжительность этой фазы может быть разной, и это зависит от условий культивирования, вида бактерий, возраста культуры. В это время клетки синтезируют необходимые метаболиты, часть из которых может выделяться в среду в виде экзометаболитов. В конце лаг-фазы начинают активизироваться процессы деления клеток, и культура переходит в логарифмическую фазу роста. На этой стадии клетки растут и делятся с максимально возможной для данного вида скоростью. После достижения максимальной для данных условий концентрации клеток в среде, рост популяции замедляется и культура переходит в стационарную фазу, когда скорость роста равна нулю. Образование новых клеток компенсируется одновременной гибелью других клеток и, следовательно, суммарная численность живых клеток остается постоянной. Переход культуры из логарифмической в стационарную фазу обусловлен действием многих факторов: истощением среды, изменением ее физико-химических характеристик, накоплением экзометаболитов как продуктов жизнедеятельности, которые

Седиментация – осаждение частиц в жидкости или газе под действием гравитационного поля или центробежных сил. Различия частиц или молекул в скорости седиментации используются для их характеристик по размеру и плотности. Седиментация позволяет определить молекулярные массы молекул. Так, макромолекула в ультрацентрифуге ускоряется под действием центробежной силы, пока эта сила не уравновешивается силой трения ($F_{тр} + F_{ц} = 0$). Для характеристики скорости осаждения макромолекул введен коэффициент седиментации S – единица Сведберга, в честь Сведберга (Svedberg), который изобрел аналитическую центрифугу в 1926 г. и определил молекулярную массу гемоглобина.

Рибосома бактерий (70S) формируется из 2-х субчастиц, каждая из которых состоит из рибосомальной РНК и белков.

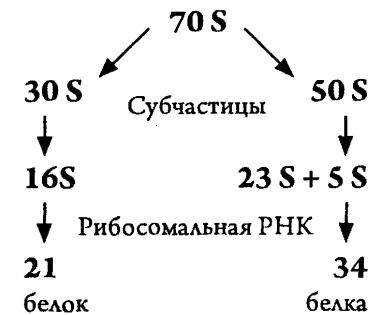


Рис. 16. Схема структурных компонентов рибосомы прокариот.

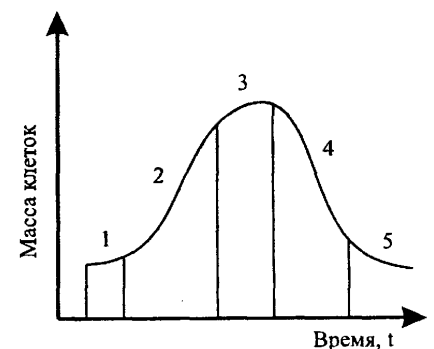


Рис. 17. Типичная кривая роста популяции бактерий при периодическом культивировании (по оси ординат масса клеток)

1 – лаг-фаза; 2 – логарифмическая фаза; 3 – стационарная фаза; 4 – фаза замедления роста; 5 – фаза отмирания.

могут обладать и токсичностью к самим клеткам. Стационарная фаза сменяется фазой замедления роста или ускоренной гибели, в это время ускоряется гибель клеток и прекращается их размножение. После массового отмирания клеток, часть оставшихся клеток может перейти в состояние покоя – фаза уменьшения скорости отмирания.

Непрерывное культивирование характеризуется тем, что при этом обеспечиваются условия длительного поддержания культуры на стационарной фазе роста (рис. 18). Это может быть достигнуто сохранением условий культивирования неизменными (состав среды, экзопродукты и количество клеток в культуре – поддерживаются на постоянном уровне).

Половое размножение и генетическая рекомбинация

Клетки бактерий способны к половому размножению. Половое размножение клеток бактерий отличается от полового размножения эукариот и сводится к обмену генетическим материалом между клетками. Этот процесс называют генетической рекомбинацией. При этом часть ДНК (очень редко вся ДНК) клетки-донора переносится в клетку реципиента. ДНК реципиента отличается от ДНК донора и в результате рекомбинации образуется комплекс генов обеих родительских клеток. Образовавшуюся таким способом ДНК называют рекомбинантной, а потомков, несущих такие молекулы – рекомбинантами. В результате генетической рекомбинации формируется генетическое разнообразие, являющееся важным процессом в эволюции вида.

В настоящее время известны три способа получения рекомбинантов: трансформация, конъюгация и трансдукция. При трансформации клетки донора и реципиента не контактируют друг с другом и передача генетического материала от донора к реципиенту происходит при помощи изолированной ДНК. Этот процесс был открыт Фредом Гриффитом в 1928 г. (Griffith), который исследовал бактерии, вызывающие пневмонию – пневмококки.

Так как эти исследования стали вехой в развитии молекулярной биологии и впоследствии и биотехнологии, еще раз обратимся к этим работам. Инъекция мокроты больного, вызывает гибель мыши в течение суток. Это сопровождается интенсивным развитием пневмококков и в крови мышей обнаруживается большое количество пневмококков.

Патогенность этих бактерий обусловлена их полисахаридной капсулой, которая состоит из глюкозы и глюкуроновой кислоты. Дикий тип S-штамм может давать мутантов, которые не способны синтезировать капсулы и поэтому теряют патогенность. Такой мутантный штамм был назван R-штаммом. Потеря способности синтезировать капсулу обусловлена мутацией в гене, контролирующем синтез УДФ-дегидрогеназы (уридиндифосфоглюконатдегидрогеназа). Под действием этого фермента УДФ превращается в УДФ-глюконовую кислоту.

Гриффит выделил R-штамм и показал, что он не способен вызывать гибель мышат (рис. 19). Однако когда он инъецировал такой

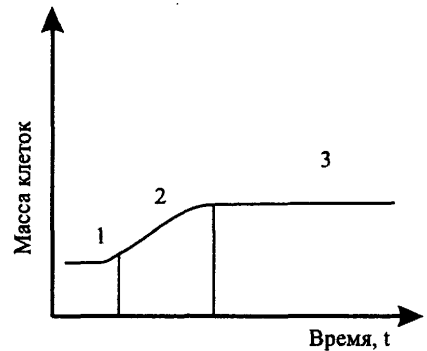


Рис. 18. Кривая роста популяции клеток при непрерывном культивировании.

1 – лаг-фаза; 2 – логарифмическая фаза; 3 – стационарная фаза.

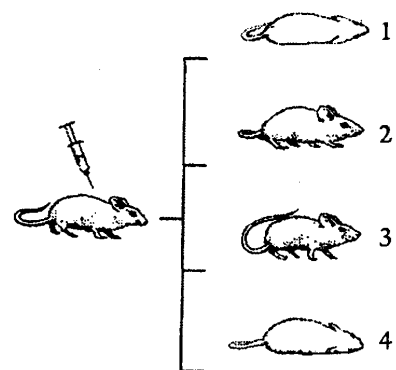


Рис. 19. Эксперимент Гриффита.

Мышам впрывскивали: 1 – живых пневмококков инфекционного типа. Мыши погибли от пневмонии. 2 – убитых пневмококков. Пневмония не развивалась. 3 – живых неинфекционных пневмококков. Пневмония не развивалась. 4 – убитых пневмококков инфекционного типа + живых неинфекционных пневмококков. Мыши погибли от пневмонии.

непатогенный штамм вместе с убитым нагреванием S-штаммом, мыши погибали (рис. 19). Он выделил из крови мышей бактерии и пришел к заключению, что убитые S-бактерии вызывали трансформацию живых R-бактерий: и у них восстанавливалась способность образовывать капсулы, которую они утрачивали в результате мутации.

Позже было показано, что организм мыши, в котором произошла трансформация, на этот процесс никакого влияния не оказывал и переход R→S может также происходить в культуре *in vitro*.

Следующий этап исследования эффекта трансформации сводился к исследованию трансформирующего начала, с целью установления его химической природы. Эвери, Мак-Леод, Мак-Карти (Avery, MacLeod, McCarty) удалили из бактериального экстракта белки, полисахариды и РНК, при этом экстракт не терял своей трансформирующей активности. Дальнейшая очистка трансформирующего начала позволила им прийти к выводу, что трансформирующим началом является ДНК. В дальнейшем было показано, что ДНК не только восстанавливает способность к образованию УДФГ-дегидрогеназы, но и реплицируется в реципиенте, т. е. наследуется. Публикация работы Эвери, Мак-Леода, Мак-Карти в 1944 г. доказывала генетическую роль ДНК.

Трансформация возможна лишь тогда, когда у реципиента возникает состояние «компетентности», при котором он способен воспринимать донорскую ДНК. Для этого необходимо появление фактора компетентности и специального фермента в мембране реципиента, который вызывает образование однонитевых разрывов в ДНК реципиента. После проникновения в клетку реципиента фрагмента донорской ДНК, одна ее нить распадается, а вторая встраивается в нуклеотид реципиента. Трансформирующая активность ДНК очень высока. Ее контакты с культурой в течение 10-12 мин достаточны для того, чтобы произошла трансформация, которая полностью завершается через 2 часа. Эффективность трансформации зависит от целого ряда факторов: температуры, УФ-лучей, химических мутагенов и других.

Конъюгация – перенос ДНК между бактериальными клетками, способных к контакту друг с другом. В результате конъюгации генетический материал от клетки-донора передается клетке-реципиенту. Этот половой процесс у бактерий был открыт в 1946 г. Ледербергом и Татумом, которые работали с *Escherichia coli*. Классический эксперимент Ледерберга и Татума сводился к следующему: два ауксотрофных мутантных штамма *E. coli*: А – неспособный синтезировать метионин (Met⁻) и биотин (Bio⁻), В – неспособный синтезировать треонин (Thr⁻), лейцин (Leu⁻) и тиамин (Thi⁻) Из каждого штамма (штамм – потомство одной клетки и, следовательно, генетически идентичное) было отобрано по 2 × 10⁸ клеток, которые выращивались вместе в течение одной ночи на полной среде (эта среда содержала биотин и все необходимые аминокислоты). Смешанную культуру клеток центрифугировали, клетки отмывали от среды, чтобы удалить аминокислоты и биотин,



Освальд Т. Эвери (1877-1955) в лаборатории Рокфеллеровского института.

В течение 10-ти лет работал над очисткой трансформирующегося вещества бактерий и доказал, что это ДНК.

С 1944 г., когда Фельген показал, что одним из компонентов хромосом является ДНК, существовало предположение, что ДНК выполняет какую-то функцию в наследственности. Но существовавшие тогда представления о природе ДНК не позволяли сделать вывод о том, что наследственность может быть записана в ДНК. ДНК приписывали структурную роль в хромосомах. В то время считали, что хромосомный белок передает информационную роль генов. Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти понимали трудность обоснования генетической роли ДНК и в заключении своей работы они высказали следующее утверждение: «Если результаты представленного исследования о природе трансформирующего начала подтвердятся, то придется признать, что нуклеиновые кислоты обладают биологической специфичностью, химическая основа которой еще не установлена». Необходимо признать, что это открытие было встречено с большим скептицизмом. Этот скептицизм был основан на том, что выделить ДНК полностью лишённой остатка белка практически невозможно, а этот белок и мог бы выполнять генетическую функ-

а после этого клетки высевали на минимальную агаризованную среду (среда минимальная: биотин Bio, Met, Thr, Leu, и Thi).

Теоретически используемые мутантные клетки не должны были расти на такой минимальной среде, так как они не способны синтезировать эти необходимые им для роста аминокислоты и биотин. Однако все же было получено несколько сотен колоний на минимальной среде. Клетки, способные расти в таких условиях, содержали все гены, отсутствующие у исходных штаммов. Частота появления прототрофных колоний около 1 на каждые 10^7 высевных родительских клеток.

Так как контрольные посеы на минимальной среде (посев каждого из родительских штаммов в отдельности) не приводили к появлению прототрофных колоний, то авторы сделали вывод о генетической рекомбинации, т. е. включению в геном генов met, bio штамма В и генов thr, leu, thi штамма А. Так как к этому времени уже была открыта трансформация, то полагали, что Ледерберг и Тагум столкнулись с другим случаем трансформации.

Однако было показано, что фильтрация среды не влияла на этот процесс. А в 1950 г. Дэвис провел свой эксперимент в U-образной пробирке и подтвердил вывод Ледерберга и Тагума. Позже было показано, что клетки *E. coli* могут вступать в контакты друг с другом, т. е. конъюгировать (рис. 20).

В 1952 г. Хейс в экспериментах с использованием высоких доз стрептомицина, которые могли «стерилизовать» штаммы *E. coli* показал, что если обработать антибиотиком штамм А, то это не влияет на рекомбинацию, однако если им обработать штамм В, то рекомбинация полностью предотвращалась. Это означало, что генетическая рекомбинация *E. coli* является однонаправленной (гетероталличной, т. е. родители в этом процессе играют неравноценную роль). Штамм А является донором генетического материала, а штамм В-реципиентом. Вскоре после завершения экспериментов Хейс узнал, что Ледерберг, его жена Эстер и Ковали пришли к подобным результатам. Они дали следующее общее объяснение полученным данным.

Штаммы А *E. coli* обозначили F^+ (fertility – плодовитость). Они несут половой фактор F, тогда как такие штаммы как В, не несущие такого фактора, обозначили F^- . В результате конъюгации половой фактор от бактерий F^+ передается к бактериям F^- , для которых необходим контакт клеток.

Природа F-фактора оставалась неизвестной, пока в 1961 г на основе использования радиоактивных изотопов не было доказано, что F-фактор содержит ДНК. Было установлено, что содержание ДНК в F-факторе составляет примерно 2 % от основной ДНК *E. coli* и имеет 6×10^4 нуклеотидных пар. Дальнейшие исследования показали, что F-фактор – это кольцевая молекула ДНК, гены которой кодируют белок специфических фибрилл, называемых F-пилями или половыми пилями (рис. 15, 20). При конъюгации одна из цепей ДНК F-фактора проникает через половую фимбрию из клетки донора (F^+) в клетки реципиента (F^-) (рис. 20).

цию. Такое возражение отчасти мотивировалось известной ошибкой, допущенной Вильштеттером 20-ю годами ранее, который сообщил о выделении фермента, лишённого белка (он считал, что ферменты не являются белками), а так как он был биохимиком, исследование ферментов затянулось на десятки лет.

Тень ошибки Вильштеттера также затянула исследования генов. Вторым возражением, выдвинутым против утверждения генетической роли ДНК, было то, что если ДНК и представляет собой активное начало, то не исключено, что она оказывает влияние лишь на образование капсулы и не является носителем генетической информации.

Штамм – буквально ствол, основа, род, племя – генетически однородная популяция клеток или организмов.



Рис. 20. Начальный этап конъюгации бактерий *E. coli* (x 65 000)

Между двумя клетками (донор – удлиненная форма, реципиент – сферическая форма) образуется цитоплазматический мостик, через который перемещается цитоплазматический материал от донора к реципиенту.

Большой вклад в изучение процесса конъюгации у бактерий внесли Вольман и Жакоб, которые смогли построить первую генетическую карту хромосомы штамма HfrH, используя для обозначения местоположения генов время переноса.

Клетки-доноры могут спонтанно утрачивать F⁺-фактор и становиться F⁻клетками. F-фактор имеет особенность встраиваться в молекулу ДНК клетки-хозяина (1 случай на 100 000 клеток). В таком случае при конъюгации в клетку-реципиент переносится не только F-фактор, но и часть ДНК клетки. Такие штаммы постоянно передают всю или большую часть своей ДНК, эти штаммы названы Hfr-штаммами (от High – высокая, frequency – частота, recombination рекомбинация).

Примером взаимодействия генов вирусов бактерий является трансдукция – перенос небольшого двуцепочечного фрагмента ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент вместе с генами бактериофага (Н. Циндер, Дж. Ледерберг, 1952).

Суть механизма трансдукции сводится к тому, что в процессе репродукции некоторых умеренных фагов небольшой фрагмент ДНК бактерии-донора встраивается в геном фага, который переносит их в другую клетку бактерии – бактерии-реципиента (рис. 21).

Интенсивно размножающийся паразит в конечном итоге убивает клетку – лизирует ее и образовавшееся потомство освобождается в среду. В таком случае выживание бактериофага зависит от гибели бактерий-хозяев. Однако это не единственный способ взаимоотношений бактерий и бактериофага.

Бактериофаги могут воспроизводиться в клетке бактерии как часть наследственного аппарата бактерии, именно такой «симбиоз» и обеспечивает обмен генетическим материалом между бактериальными клетками. В таком обмене участвуют бактериальная клетка – донор, трансдуцирующая – фаг и клетка бактерии – реципиент. Исследование процессов трансдукции, проведенное Джошуа Ледербергом и его учениками, позволили обнаружить в 1956 г. – специфическую трансдукцию. Оказалось, что профаг λ способен переносить или трансдуцировать исключительно гены gal, которые расположены поблизости от локуса прикрепления фага λ на хромосоме *E. coli*.

Впервые перенос фагом бактериальных генов был обнаружен Дж. Ледербергом и Н. Циндером в случае так называемой неспецифической трансдукции. Они обнаружили, что фаг Р 22 может трансдуцировать любой участок генома *Salmonella* в отличие от специфической трансдукции, затрагивающей только тот участок генома, который расположен поблизости от локуса прикрепления фагового генома.

Схема неспецифической трансдукции может быть таковой: при размножении фага Р 22 в чувствительных бактериях небольшой фрагмент бактериальной ДНК проникает в головку дочерней частицы фага (это происходит, когда молекулы фаговой ДНК извлекаются из фонда вегетативного фага при созревании инфекционных фаговых частиц). Впоследствии, когда такая фаговая частица вновь заражает бактерию-реципиент, эта ДНК бактерии проникает в клетку. Если не происходит литической реакции и бактерия выживает, между трансдуцированной бактериальной ДНК и

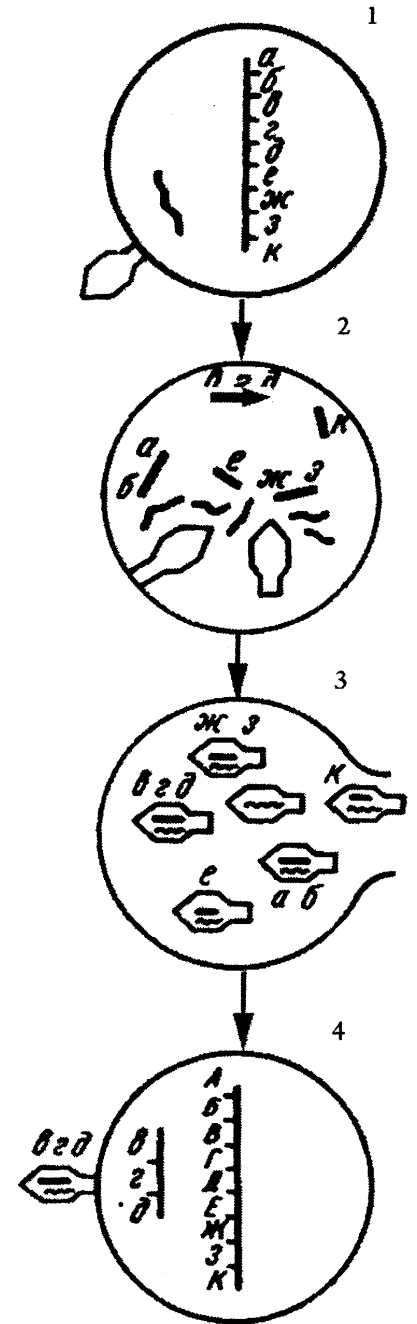


Рис. 21. Механизм трансдукции

1 – клетка с генотипом абвгдежзк, в которую проникла ДНК фага; 2 – разделение нуклеотида бактерии и образование частиц фага; 3 – захват частицами фага кусочков нуклеотида бактерии, лизис бактериальной клетки; 4 – проникновение комплекса фаг-частица нуклеотида вга;

гомологичным участком хромосомы реципиента может произойти обмен. В результате образуются рекомбинанты, несущие геном клетки-донора.

Генетические карты

Генетический аппарат бактерий и вирусов представлен одной молекулой нуклеиновой кислоты. Во время полового процесса, который может протекать у бактерий как трансформация, конъюгация, трансдукция или сексдукция (при которой фрагмент ДНК бактериальной клетки переносится в клетку реципиента половым фактором – плазмидой) постепенно переносится фрагмент хромосомы донора.

Оценка времени вхождения участка ДНК донора в клетку реципиент используется при картировании генома бактерий (составление генетических карт). Наиболее эффективный способ определения времени переноса генов основан на определении времени рекомбинации генов донора с хромосомой реципиента. Для этого через определенный промежуток времени после начала конъюгации ее прерывают встряхиванием, отбирают пробы и определяют какие гены донора успели перейти в клетку-реципиент и рекомбинировать с ее геномом (рис. 22).

Расстояние между генами на генетической карте выражается в минутах. У *E. coli* вхождение донорского генома, (который представлен 300 генами) в клетку реципиента занимает около 90 минут и ее карта разделена на 90 единиц, каждая из которых соответствует одной минуте.

Кольцевой характер бактериального генома был подтвержден прямым электронно-микроскопическим наблюдением.

Половое размножение бактерий довольно редкое событие, но так как число бактерий в каждой колонии огромно, его удается довольно часто наблюдать. Половое размножение бактерий имеет большое значение, так как этим способом передается устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам. Сведения, полученные при исследовании рекомбинации у бактерий и вирусов, сыграли большую роль в развитии хромосомной теории наследственности и становлении молекулярной биологии.

Плазмиды

У многих видов бактерий кроме собственного генома, представленного кольцевой молекулой ДНК (рис. 23), имеется еще один тип генетических элементов, который существует в бактериальной клетке независимо – плазмиды.

Бактериальные плазмиды – это внехромосомные генетические элементы, способные к автономной (независимой от основного генома) репликации. Некоторые плазмиды способны встраиваться в геном клетки бактерии в результате кроссинговера, ранее их называли эписомами.

Открытие внехромосомных генетических элементов у бактерий было осуществлено при исследовании генетической рекомбинации у *E. coli*. При скрещивании двух штаммов (W677 и 58-161) Hayes W. (1952) показал, что они неравноценны, и было высказано

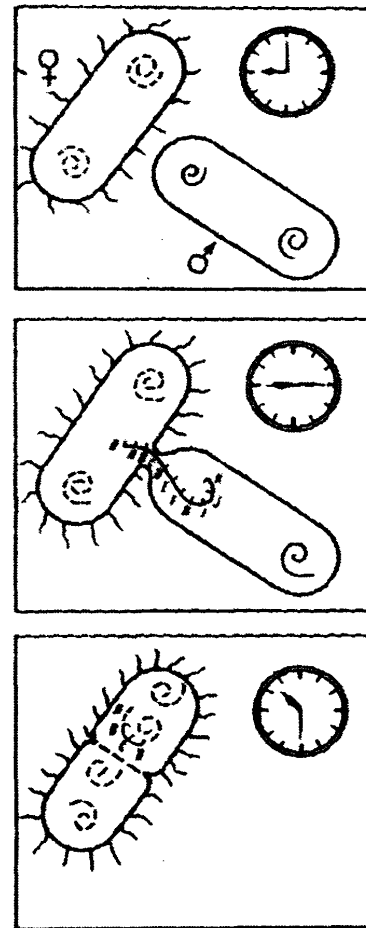


Рис. 22. Фрагмент схемы конъюгации Hfr – бактерий со жгутиками и F⁻ – бактерий без жгутиков, демонстрирующий время определения переноса ДНК из одной клетки в другую.

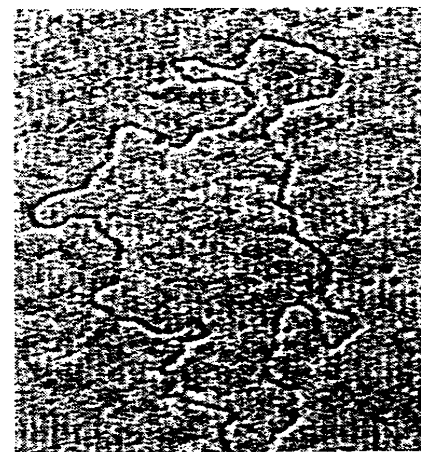


Рис. 23. Фото «кольцевая молекула ДНК».

предположение, что штамм W677 – реципиент, а штамм 58-161 – донор. Проверка разных штаммов в различных сочетаниях показала, что плодовитость является функцией, детерминированной геном F (фертильность), [Lederberg J. et al., 1952]. Ледерберг обнаружил, что фактор F способен к «внеядерному» переносу и ведет свободное цитоплазматическое существование. Открытие фактора F в 50-х годах стало важным этапом в исследовании внехромосомных генетических систем бактериальных клеток.

Несколько позже, в 1957 г. японские исследователи открыли факторы устойчивости к лекарственным препаратам (R-фактор). В настоящее время все внехромосомные бактериальные элементы объединяют в одно понятие «плазмиды».

Размеры встречающихся в природе плазмид варьируют от одной до нескольких сотен тысяч нуклеотидных пар. Число копий плазмид на одну бактериальную клетку строго определено и характерно для данного вида. Их количество в разных группах совместимости может быть от единиц до нескольких сот, а в некоторых искусственных условиях даже до нескольких тысяч. Контроль количества плазмид в клетке осуществляется специализированной системой, контролируемой самой плазмидой, т. е. плазмиды сами себя «считают».

Сейчас установлено, что этот процесс регулируется антисмысловыми РНК, которые способны к компенсаторному спариванию с РНК-праймером и тем самым регулируют амплификацию плазмиды.

Обычно бактериальные плазмиды представляют собой двухцепочечные ковалентно-замкнутые сверхспиральные ДНК. Генетическая информация, содержащаяся в плаزمиде, не является жизненно необходимой для бактерий-хозяев, т. е. клетки бактерии могут обходиться и без них. Однако плазмиды могут обеспечить выживание бактерий при некоторых неблагоприятных условиях.

Плазмиды придают устойчивость клеткам бактерий к антибиотикам и целому ряду лекарственных препаратов. Примером может служить пенициллиназная плаزمида стафилококков. В этой плазмиде содержится ген, кодирующий фермент пеницилиназу, который разрушает пенициллин и тем самым придает устойчивость клеткам, несущим плазмиду, к этому антибиотику.

Наличие плазмид в клетке определяют по проявлению детерминированной ими функции. К таким функциям плазмид относят: 1) устойчивость к сульфаниламидным препаратам или антибиотикам; 2) способность к переносу генов при конъюгации; 3) способность синтезировать белки оболочки, благодаря чему плазмиды могут передаваться от клетки к клетке в виде внеклеточной частицы, подобно бактериальному вирусу, и в этом смысле их рассматривают как внутриклеточных паразитов или симбионтов.

Плазмиды могут использоваться прежде всего при медицинских исследованиях резистентности к лекарственным препаратам и антисептикам, они имеют большое значение в фундаментальных

Lederberg J., Cavalli L.L. Lederberg E. M. Sex compatibility in *Escherichia coli* // Genetics, Princeton, 1952, 37, 720-730.

Плазмиды – внехромосомные факторы наследственности в клетках бактерий, которые обеспечивают им устойчивость к антибиотикам и другим лекарственным веществам. Кольцевые молекулы ДНК способны к автономной репликации.

Использование плазмид является примером применения фундаментальных знаний в практике. В 50 годах исследование полового процесса у бактерий могло показаться обывателю забавой ученых.

исследованиях генетических процессов, таких как репликация, рекомбинация и мутагенез. Так, в частности, изучение репликации плазмид представляет интерес по следующим причинам: они меньше, чем бактериальный геном и с ними легче работать, кроме того, клетка может без них обходиться, можно сравнительно легко изучать действие мутаций и ингибиторов репликации; сохранение количества плазмид на постоянном уровне, специфичного для данного вида бактерий, является уникальной моделью для исследования регуляции репликации. Плазмиды используются в качестве векторов в технологии получения рекомбинантных ДНК, они стали незаменимым инструментом в клонировании генов и секвенировании ДНК.

Выделение бактериальных плазмид

В настоящее время существует большое количество методов выделения бактериальных плазмид. Большинство методов выделения плазмид основано на том, что бактериальные плазмиды находятся в ковалентно-замкнутой форме. Для предотвращения действия нуклеаз в среду для выделения добавляют ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ЦДТА (циклогександиаминуксусная кислота), которые образуют хелатные комплексы с ионами металлов и тем самым, ингибируют катионзависимые нуклеазы. Первым этапом выделения является лизис клеточной стенки с помощью ЭДТА и лизоцима. ЭДТА разрушает наружную мембрану, а лизоцим – нуклеопротеидный слой и в результате образуются сферопласты. В дальнейшем сферопласты лизируют с помощью детергентов. Из полученного клеточного дебриса удаляют путем центрифугирования фрагменты связанных с клеточной оболочкой бактериальных хромосом.

Пожалуй, наибольшее распространение получил метод щелочной экстракции, который был предложен Бирнбоймом и Доли, суть которого сводится к следующему.

В щелочной среде (рН 12,0-12,5) происходит денатурация линейных молекул ДНК (т. е. разделение цепей двойной спирали), в то время как ковалентно замкнутые плазмидные ДНК не денатурируют. Если после денатурации раствор нейтрализовать, то при высоких концентрациях солей геномная ДНК осаждается. Большая часть клеточных РНК и белков тоже осаждается, так как в смесь вносят ДСН (додецилсульфат натрия), а плазмиды остаются в растворе. Метод, предложенный Бирнбоймом и Доли, представлен в табл. 5.

Способы питания бактерий

Все живые организмы не могут оставаться жизнеспособными и совершать работу без постоянного притока энергии и вещества из окружающей среды. Потребление биологическими системами веществ и энергии и называется питанием. Энергия необходима для совершения работы, направленной на осуществление метаболических процессов, субстратами в которых выступают питательные вещества. Необходимо помнить, что энергия не создается и не уничтожается, она существует в разнообразных формах (световая, химическая, тепловая, механическая и т. д.).

1. Клетки бактерий осаждают центрифугированием при 10000 об/мин, 10 мин в роторе GSA или аналогичном роторе.
2. Осадок клеток ресуспендируют в 100 мкл раствора I (50мМ глюкозы, 10 мМ ЭДТА, 25 мМ Трис), содержащего (2 мг/мл) лизоцима (лизоцим необходимо растворить в растворе I непосредственно перед использованием), и оставляют на 15 мин во льду.
3. Добавляют 200 мкл раствора II (0,2 М NaOH, 1% ДСН, использовать свежеприготовленный раствор) интенсивно встряхивают образцы и оставляют во льду на 5 мин.
4. Вновь добавляют 150 мкл раствора III (3 М ацетат натрия, рН 4,8, рН доводят уксусной кислотой, хранят при комнатной температуре), встряхивают и оставляют на льду на 30 мин.
5. Центрифугируют в микроцентрифуге 5 мин при максимальной скорости при 4 °С.
6. Супернатант переносят в другую пробирку и добавляют 1 мл этанола. Переносят в баню из смеси сухого льда с этанолом на 5 мин.
7. Центрифугируют в микроцентрифуге 10 мин при максимальной скорости при 4 °С.
8. Осторожно удаляют супернатант и осадок ресуспендируют в растворе IV (0,1 М ацетат натрия, 50 мМ Трис, рН до 8,0 доводят HCl).
9. К ресуспедированному осадку добавляют 250 мл этанола, встряхивают и оставляют на 5 мин на сухом льду с этанолом. Центрифугируют в микроцентрифуге 5 мин при 4 °С (в осадке плазмидная ДНК).
10. Супернатант отбрасывают. К осадку добавляют 400 мкл этанола, центрифугируют 2 мин в микроцентрифуге при 4 °С.
11. Супернатант отбрасывают, осадок подсушивают в эксикаторе и ресуспендируют в 30 мкл 10 мМ трис-HCl, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА. При необходимости плазмиды хранят при минус 20 °С.

Табл. 5. Основные этапы выделения плазмидной ДНК.

В зависимости от источника потребляемой энергии все организмы делятся на две большие группы: фототрофные (греч. photos – свет, throphe – пища) и хемотрофные (хемо – химия).

Фототрофные организмы способны превращать световую энергию в химическую энергию, которая используется в метаболизме клетки. Такой процесс питания обеспечивается в процессе фотосинтеза. Многие микроорганизмы, как и зеленые растения, являются фототрофами, так, пурпурные и зеленые бактерии, прохлорофиты, некоторые галобактерии, цианобактерии и микроводоросли, используют энергию света для обеспечения жизнедеятельности.

До недавнего времени считали, что фотосинтез облигатно связан с присутствием в клетках организмов хлорофилла, представляющего собой магнийсодержащие тетрапирольные пигменты (рис. 24). Однако у галобактерий, способных к фотосинтезу, этот процесс осуществляется при участии не хлорофилла, а пигментно-белкового комплекса бактериородопсина, в который входит C_{20} -каротиноид ретиноль (рис. 25). Этот комплекс подобен ретиноль-зрительному пигменту животных.

Хемотрофы способны получать энергию, окисляя различные химические вещества, как органические (иногда их выделяют в хемоорганотрофные), так и неорганические (хемолитотрофные). Ряд бактерий способен получать энергию в результате окисления молекулярного водорода, сероводорода, аммония, нитритов, солей двухвалентного железа и других неорганических веществ.

Источники углерода

Все живые существа используют два источника углерода – неорганический источник углерода (CO_2) и органические соединения. В зависимости от источника углерода организмы делятся на автотрофные (греч. autos – сам), использующие неорганические соединения и гетеротрофные (греч. «heteros» – другой), использующие в качестве источника углерода органические соединения.

С учетом источника энергии и источника углерода используемого в биосинтетических процессах, организмы могут быть представлены 4 группами (табл. 6). Однако, некоторые организмы способны как к автотрофному, так и гетеротрофному способам питания в зависимости от условий среды. Кроме того, микроорганизмы в отличие от макроорганизмов способны использовать гораздо больший набор химических веществ в качестве источников углерода.

Для многих микроорганизмов характерен лабильный метаболизм. Это выражается не только в их способности использовать разнообразные источники углерода, а и в способности переходить с одного типа питания на другой. Так, ряд бактерий, способных к хемолитоавтотрофии могут переходить к хемоорганогетеротрофии, такие организмы называют факультативными автотрофами. Среди них существуют облигатные автотрофы, облигатные хемотрофы.

Микроорганизмы способны получать азот из различных источников. Некоторые из них хорошо растут с пептоном и другими

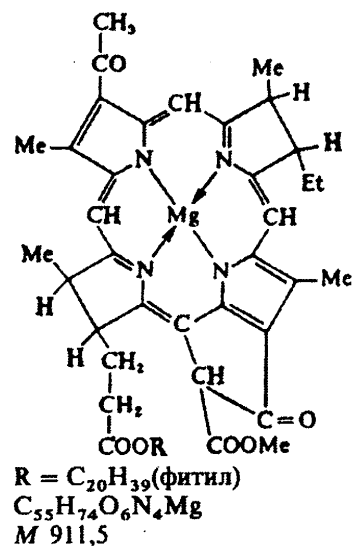


Рис. 24. Формула хлорофилла.

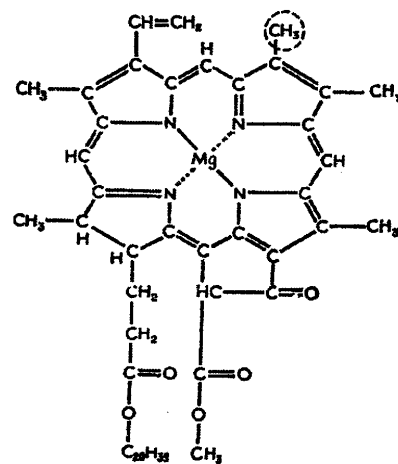


Рис. 25. Формула бактериородопсина.

ный азот (клубеньковые бактерии и цианобактерии).

Некоторые микроорганизмы растут на достаточно сложных органических средах, содержащих те или иные факторы роста, т. е. вещества, которые необходимы им в готовом виде, так как они не могут синтезироваться в клетках. Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют ауксотрофами. Виды, не обнаруживающие потребность в подобных веществах называют прототрофами.

Большинство бактерий ведут сапрофитный образ жизни, т. е. они извлекают питательные вещества из мертвого и разлагающегося органического вещества. Сапрофиты секретируют ферменты в субстрат, так что переваривание происходит вне организма.

Сапрофитные бактерии и грибы составляют группу редуцентов. Редуценты играют важную роль в разложении органических веществ и тем самым обеспечивают круговорот элементов в природе.

Наряду с сапрофитными бактериями, существуют бактерии, ведущие паразитический образ жизни. Паразит – это организм, живущий внутри или на другом организме. Организм хозяина обеспечивает паразита пищей и убежищем. Паразиты, как правило, наносят вред своему хозяину. Паразиты, которые могут вызывать различные заболевания, называются патогенными.

Исследование метаболизма бактерий показало разнообразие путей ассимиляции и диссимиляции микроорганизмов, различных соединений, включая и химические вещества.

Подбор и получение новых штаммов бактерий может позволить расширить сферу их использования в биотехнологии. Важным в этом отношении является получение мутантов, способных к образованию необходимых продуктов в большем количестве, чем исходные виды. Чрезвычайно перспективным в этом отношении является использование технологии рекомбинантных ДНК. Таким путем удалось получить продуцентов инсулина, интерферона и гормона роста человека и других белков.

Для дальнейшего использования микроорганизмов в биотехнологии важным является: 1 – изучение биологии микроорганизмов; 2 – разработка новых сред для их культивирования и 3 – создание биореакторов, позволяющих обеспечить высокую продуктивность бактерий.

Систематика бактерий

Все бактерии объединены в единое царство *Bacteria*. Вместе с тем, археобактерии существенно отличаются от эубактерий. Дендрограмма (от греч. dendron – дерево, gramma – описание) прокариот представлена на рис. 26.

Археобактерии обитают в среде с экстремальными условиями – высокие концентрации солей, высокие температуры, специфический атмосферный состав. К ним относятся галобактерии – термоцидофильные и метанообразующие бактерии. Галобактерии включают такие роды как *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*,

рода *Halobacterium*. Он находится в так называемых пурпурных мембранах, выполняет функцию протонного насоса, который преобразует энергию солнечного света в энергию, необходимую для жизнедеятельности галобактерий.

Источники энергии			
Фитотрофы Используют энергию света		Хемотрофы Используют химическую энергию	
Источники углерода			
Автотрофы	Гетеротрофы	Автотрофы	Гетеротрофы
Источники энергии и углерода			
Фитоавтотрофы	Фитогетеротрофы	Хемоавтотрофы	Хемогетеротрофы

Табл. 6. Классификация живых организмов в соответствии с основным источником углерода и энергии, которая используется в биосинтетических процессах.

Сапрофиты – бактерии, растения и грибы, питающиеся за счет готовых органических веществ и минеральных солей, т. е. гетеротрофы.

Паразитизм – жизнь за счет особей другого вида. Паразит тесно связан со своим хозяином (организмом, за счет которого он живет).

Natrobacterium, *Natrococcus*. Они встречаются в средах с концентрацией хлористого натрия 3,5-5 М.

Термофильные бактерии встречаются в горячих источниках при pH 2-3 и температуре 70-80 °С (*Sulfolobus coldarius*), в терриконах угольных шахт при температуре 50 °С и pH 1-2 *Thermoplasma acidiphilum*, при температуре 85-105 °С на склонах вулканов обитают *Thermoproteus tenex*, *T. neutrophilus*.

Среди метаногенных бактерий встречаются кокки (*Methanococcus vannielli*), палочки (*Methanobacterium formicicum*), сарцины (*Methanosarcina barari*), спирали (*Methanospirillum hungatei*), которые являются анаэробными микроорганизмами. Местами их обитания являются отстойники сточных вод, осадки прудов и рек, эстуарии (берег заливаемый приливом) и даже рубец жвачных животных.

Согласно определителю Д. Х. Берги (1986) археобактерии относятся к отделу мендосикутов, а эубактерии к трем отделам: грациликуты, фирмикуты и теперикуты (рис. 27).

К отделу грамикуты относят грамотрицательные бактерии с двухслойной клеточной стенкой. Формы клеток различны – от сферических до палочковидных, подвижных или неподвижных. Клетки не образуют эндоспор, размножаются делением, могут иметь пили. По типу питания к грациликутам относятся фототрофы (включая цианобактерии) и хемотрофы, по типу дыхания – аэробы, анаэробы, по патогенности – сапрофиты и паразиты.

К фирмикутам относят микроорганизмы с многослойным муреиновым каркасом. Формы клеток различны: круглые, палочковидные, ветвящиеся, нитевидные. Все они грамположительны, могут образовывать споры.

К теперикутам относят микоплазмы и спироплазмы. Это мельчайшие (диаметр 0,15-0,25 мкм), свободноживущие полиморфные бактерии, не имеющие клеточной стенки, входящие в класс *Mollicutes*. Воспроизводятся почкованием, делением, сегментацией.

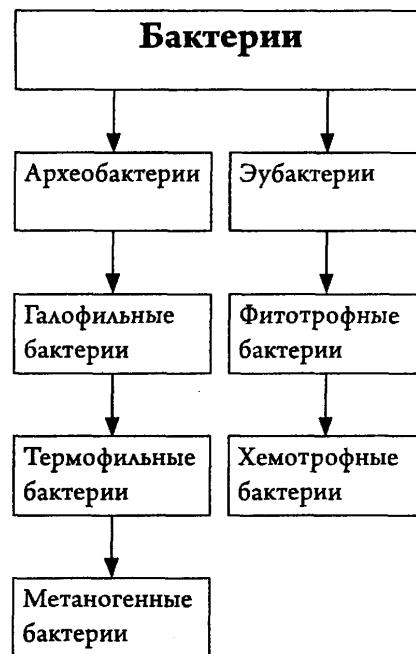


Рис. 26. Дендрограмма царства бактерий.

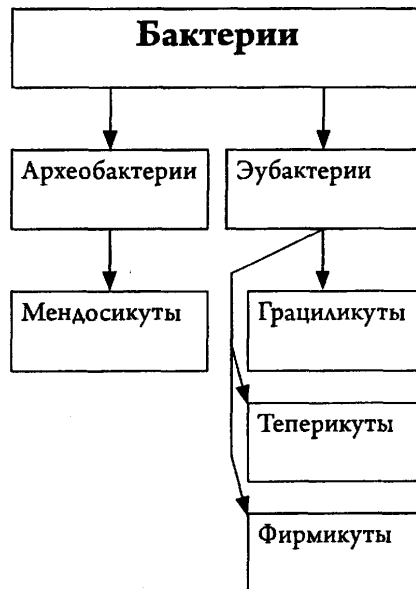


Рис. 27. Систематика бактерий по Берги.

Царство грибов (*Fungi*)

Особенности строения и метаболизм

Особенности строения грибов

Грибы – это эукариоты, не содержащие хлорофилл, т. е. по типу питания, как и животные, гетеротрофы. Их клетки окружены жесткой клеточной стенкой и по этому признаку их можно отнести к растениям. В настоящее время показано, что грибы, растения и животные столь разнообразны, что их выделяют в отдельные царства (рис. 28).

Царство грибов достаточно большое и процветающее, к нему относят около 80 000 видов. Места обитания грибов очень разнообразны. Грибы играют важную роль в биосфере, используются в медицинских и хозяйственных целях, являются важными и перспективными объектами биотехнологии.

Строение тела грибов уникально, оно состоит из большого количества тонких трубчатых нитей – гиф (в единственном числе – гифа), а масса гиф – мицелий (рис. 29). Каждая гифа окружена стенкой, основным клеточным компонентом которой является хитин – полисахарид, содержащий азот (рис. 30). Он является структурным компонентом не только грибов, но и скелета членистоногих. Протоплазма гиф может быть либо разделена поперечными перегородками – септами, либо септы отсутствуют. Септы делят протоплазму на отсеки (компартменты), в центре септы имеется пора, через которую содержимое протоплазмы обменивается между компартментами.

В каждом компартменте может присутствовать одно или несколько клеточных ядер. Гифы, имеющие перегородки, называются септированными, а не имеющие – несептированными. В цитоплазме гиф, как у эукариот, присутствуют митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, рибосомы и вакуоли. При определенных условиях гифы агрегируют с образованием плотных образований, которые называют плодовыми телами.

Питание грибов

Грибы являются гетеротрофами, им необходимы органические источники углерода, азота, неорганические ионы (K^+ , Mg^{2+} и др.), микроэлементы (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и др.), витамины. Каждый вид грибов нуждается в определенных химических компонентах.

Пищеварение у грибов, в отличие от животных, внешнее, т. е. оно осуществляется гидролитическими ферментами, выделяемыми в окружающую среду. Питательные вещества всасываются всей поверхностью гиф путем диффузии.

По типу питания среди грибов встречаются сапрофиты, паразиты и симбионты.

Сапрофиты – секретируют три группы ферментов: протеазы, липазы и карбогидразы, и способны использовать разнообразные субстраты. Эта особенность обеспечивает им широкий ареал распространения. Они встречаются на почве, гниющих фруктах и

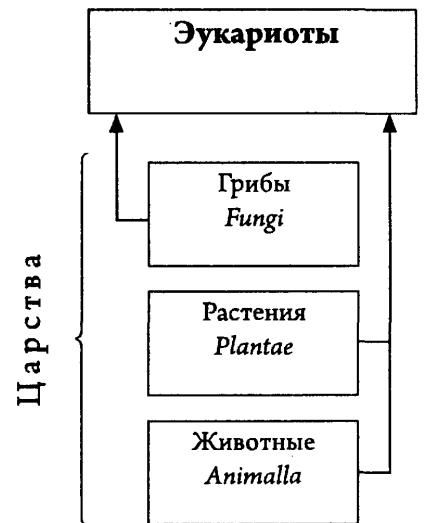


Рис. 28. Эукариотическая организация клеток объединяет столь различные организмы, которые разделяются на царства.

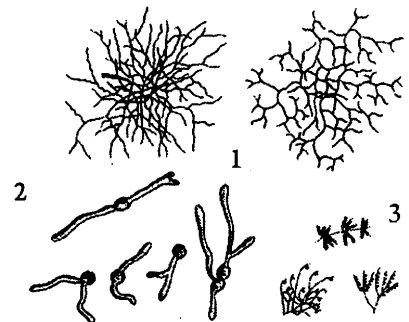


Рис. 29. Мицелий актиномицетов (1), прорастание спор мицелия (2), образование спороносцев (3).

овошах, и других объектах. Представителями сапрофитных грибов являются *Mucor*, *Penicillium*, *Agaricus*.

Сапрофитные грибы и бактерии образуют группу редуцентов, которые обеспечивают круговорот элементов в природе.

Грибы-паразиты могут быть облигатными или факультативными. Облигатные паразиты, как правило, не вызывают гибели своих хозяев. Они имеют узкий круг хозяев, которые обеспечивают их специфическим набором питательных веществ. К облигатным паразитам относятся настоящие и ложные мучнисторосяные, ржавчинные и головневые грибы.

Факультативные паразиты менее специализированы, они развиваются на разных субстратах и часто приводят к гибели хозяина, после этого живут сапрофитно на мертвых остатках. Факультативные паразиты продуцируют большое количество пектиназ, что вызывает «мягкую гниль» пораженной ткани.

Жизненные циклы у паразитических грибов могут быть очень сложными, состоять из нескольких стадий и включать более одного хозяина. При половом размножении образуются споры, которые очень устойчивы и могут сохраняться долго при экстремальных условиях. При благоприятных условиях (влажность, температура) они могут прорасти и образовывать гифы гриба (рис. 29).

Грибы, (как правило, сумчатые либо базидиальные) и водоросли – представители зеленых или сине-зеленых формируют лишайники, т. е. они симбионты. Полагают, что водоросли снабжают гриб органическими продуктами, а гриб – водой и минеральными компонентами. Как известно, лишайники растут очень медленно и очень чувствительны к загрязнению окружающей среды.

Ассоциацию гриба с корневой системой высших растений называют микоризой. При формировании микоризы гриб может образовывать чехол вокруг центральной части корня – экзотрофная микориза или же проникать в ткани корня – эндотрофная микориза.

Для питания грибов в качестве источника углерода наибольшее значение имеют углеводы, органические кислоты, жирные кислоты и аминокислоты.

Потребность грибов в углеводах

В природных условиях большинство грибов используют в качестве источника углерода полисахариды, которые гидролизуются до простых сахаров. Грибы различаются по степени усвоения моносахаров. Все грибы хорошо усваивают глюкозу и поэтому ее чаще всего включают в состав питательных растворов при культивировании грибов. Из пентоз большинство грибов усваивают арабинозу, значительно хуже рибозу. Хорошо усваиваются многоатомные спирты, которые дают при окислении соответствующие сахара. Из полисахаридов самый лучший источник питания – крахмал. Однако грибы, не содержащие амилазу (в частности большинство дрожжей), крахмал не усваивают.

Дереворазрушающие грибы используют целлюлозу, благодаря их способности гидролизовать ее до глюкозы с помощью фермента целлюлазы. Для дереворазрушающих грибов источником углерода является лигнин.

По своей структуре хитин близок к целлюлозе, однако при 2-ом атоме углерода гидроксильная группа (ОН) заменена группой NH-CO-CH_3

Хитин синтезируется из уридин-фосфат-N-ацетилглюкозамина при участии хитинсинтетазы. Синтез осуществляется в специализированных микровезикулах диаметром 40-70 нм – хитосомах. Хитосомы могут быть выделены из грибов. Расщепление хитина до глюкозамина осуществляется хитиназой.

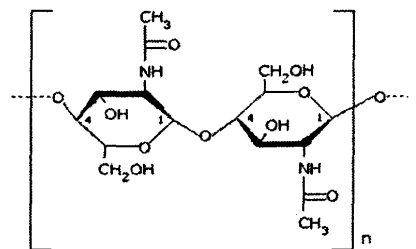


Рис. 30. Строение хитина

Лишайники делят на накипные, листовые и кустистые. Описано около 26 000 видов. Наиболее разнообразны в тропиках и субтропиках, обильны в тундре и высокогорье. Используют для получения антибиотиков и органических веществ.

Симбиоз от греческого (*simbiosos* – совместная жизнь) – одна из форм совместного существования двух различных организмов. Выделяют две разновидности симбиоза – мутуализм и комменсализм.

Мутуализм – взаимовыгодные отношения между двумя организмами.

Комменсализм (лат. *com* – с, вместе, *mensa* – стол, трапеза) (один из партеров извлекает пользу от совместного существования, а второй не получает ни пользы ни вреда).

Потребность грибов в жирных кислотах

Жиры являются хорошим источником углерода. Они усваиваются после ферментативного гидролиза триацилглицеридов на жирные кислоты и глицерин. Из жирных кислот хорошо усваиваются грибами стеариновая, пальмитиновая и олеиновая кислоты. Для некоторых грибов, в частности сапролегниевых (*Leptoporus lacteus*), жирные кислоты являются лучшим источником питания в сравнении с сахарами. Глицерин, который образуется при гидролизе жиров, хорошо усваивается многими грибами.

Аминокислоты служат источником углерода и азота. Грибы могут усваивать только L-аминокислоты. Степень усвоения аминокислот снижается с увеличением возраста мицелия. Виды грибов различаются по способности усваивать аминокислоты.

Потребность грибов в минеральных элементах и витаминах

У грибов на долю зольных элементов приходится до 10 % сухой массы. Наибольшую потребность они испытывают в фосфоре, кальции, магнии, сере, железе. Цинк, медь, марганец, кобальт, бор, никель, и др. выступают в качестве микроэлементов. Грибы способны синтезировать ряд витаминов.

Дыхание грибов

Грибы характеризуются очень интенсивным дыханием. К примеру, двухдневная культура *Aspergillus niger* за сутки выделяет CO_2 , равное 350 % массы мицелия. По интенсивности дыхания они могут сравниваться только с некоторыми видами птиц. Такая высокая активность метаболизма грибов сопровождается выделением тепла и повышением температуры самого гриба, что необходимо учитывать при их культивировании.

Для некоторых грибов, например дрожжей, мукоровых грибов характерно спиртовое брожение. Оба процесса – (дыхание и брожение не только обеспечивают их энергией, но и метаболитами, необходимыми для синтеза органических соединений. Процесс брожения по сравнению с дыханием энергетически менее выгоден, поскольку при нем образуется в 27 раз меньше энергии.

Глюкоза и ряд других гексоз в клетках грибов окисляются до углекислого газа и воды.

Образование пирувата (основной субстрат окисления CH_2COCOON) из гексоз может осуществляться гликолитически (цикл Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, рис. 31) или пентозофосфатным путем. Однако главная роль пентозофосфатного цикла в генерации

А. де Бари (1831-1888) – немецкий миколог, основоположник физиологической микологии. Изучив стадии размножения и особенности взаимодействия разных видов, цитологию и биохимические особенности грибов де Бари создал классификацию микро и макромицетов и основы микопатологии.

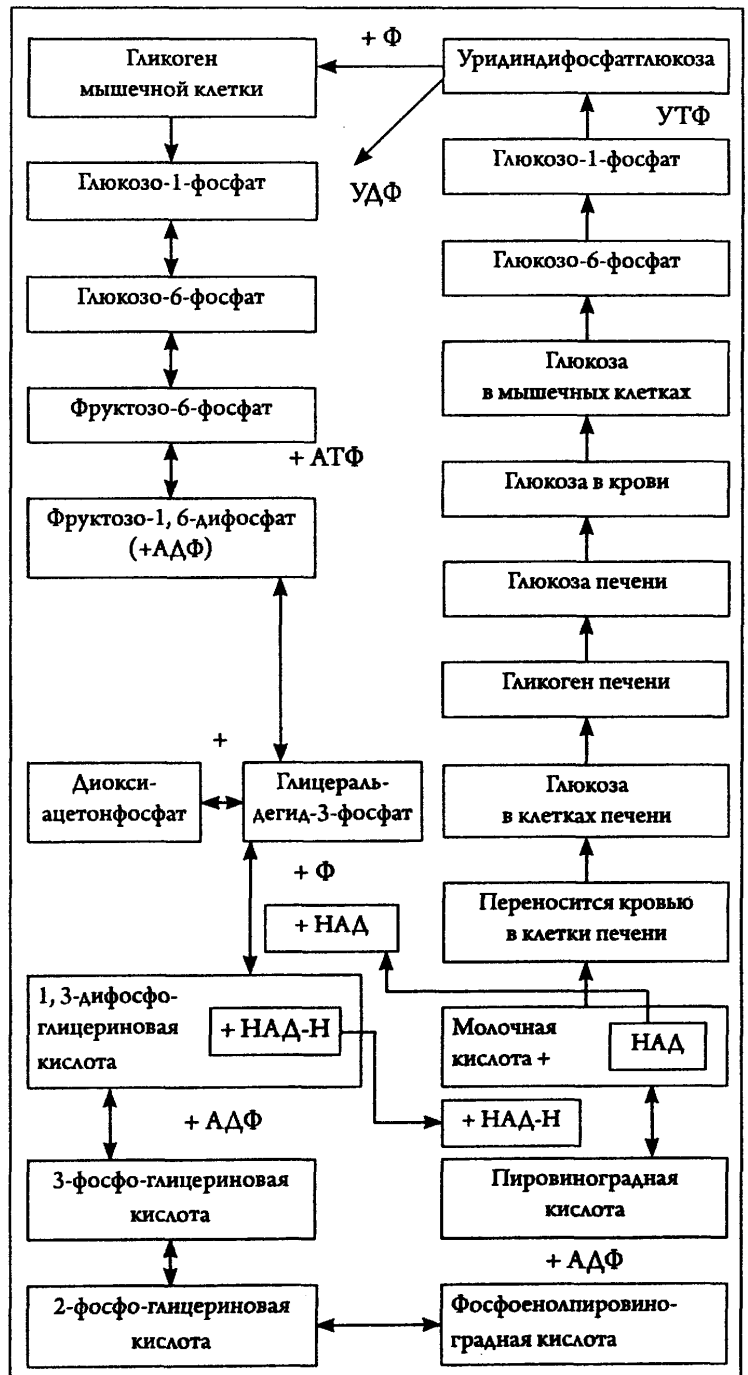
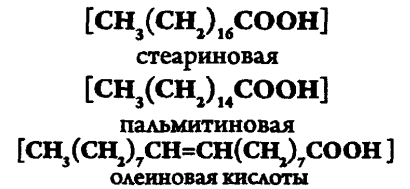


Рис. 31. Цикл Эмбдена-Мейергофа-Парнаса.

НАДФ. Н и образовании пентозы (в основном Д-рибозы), идущей на синтез нуклеиновой кислоты и эритрозы. При большом количестве кислорода у грибов преобладает пентозофосфатное расщепление глюкозы, а в анаэробных условиях осуществляется гликолитическое превращение.

Пировиноградная кислота окисляется в цикле трикарбоновых кислот (рис. 32), который протекает с разной интенсивностью у разных представителей. Так, у высших сумчатых он протекает интенсивней, чем у зигомикетов и дрожжевых клеток. В аэробных условиях пировиноградная кислота подвергается ступенчатому дезоксикарбоксилированию и дегидрированию, что приводит к образованию органических кислот, содержащих 4-6 атомов углерода.

При культивировании грибов на жидких питательных средах в их клетках накапливаются промежуточные продукты окисления, в частности лимонная, яблочная и другие органические кислоты, используемые в народном хозяйстве. Интенсивность образования органических кислот зависит от штаммов, фазы развития и условий культивирования.

Химический состав грибов

В грибах выявлено до 50 химических элементов, в наибольшем количестве – содержатся калий (до 50 % от массы зольных элементов) и оксид фосфора (до 25 %), на остальные: сера, железо, кальций, магний, медь, цинк и др. – приходится 25 % от суммы зольных элементов. Важная роль в росте и споруляции грибов принадлежит сере, на биологическое действие которой оказывают влияние формы ее соединения.

Так, стимулирующий эффект оказывает $(NH_4)_2SO_4$, тогда как $MgSO_4$ и $FeSO_4$ ингибируют развитие многих видов грибов, кроме *Septoria cueurbitacea* и *Botrytis cinerea*. Стимулирующее действие для некоторых грибов оказывают и органические соединения серы – метионин и глутатион.

Грибы способны синтезировать 18 аминокислот. Относительно недавно обнаружено, что некоторые грибы содержат и ряд необычных аминокислот – цитруллин, п-оксианид, агаритин, g-оксилайцин. Грибы богаты белками, так содержание белка у агариновых колеблется от 10 до 47 %. Содержание белка зависит от условий



Рис. 32. Цикл трикарбоновых кислот.

культивирования и стадий роста гриба. Как правило, содержание белка у молодых культур выше по сравнению с культурами на поздних стадиях развития.

Грибы богаты углеводами. Моносахариды представлены глюкозой, фруктозой, ксилозой, мальтозой и др. Наибольшее количество приходится на глюкозу и может составлять 2,2 % от сухой массы.

Олигосахариды представлены главным образом дисахаридом трегалозой, ее называют грибным сахаром (рис. 33). У некоторых грибов, в частности *Sparassis crispa*, ее содержание составляет 11 % от сухой массы.

Основным полисахаридом грибов является гликоген.

Содержание жиров у большинства грибов составляет 1-2 %, но у некоторых видов дрожжей их содержание достигает более 30 %. В состав трубчатых съедобных грибов входит 15-21 % липидов по сухому веществу, а у пластинчатых – 11-13 %. В плодовых телах многих агариковых грибов в состав липидов входят в основном ненасыщенные жирные кислоты: теристиновая, пентадекановая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая. В плодовых телах вешенки содержится до 56 % олеиновой кислоты от содержания остальных ненасыщенных жирных кислот.

В грибах содержится много органических кислот, образующихся в цикле Кребса. Так, фумаровую кислоту получают выращиванием *Rhizopus nigricans* на углеводной среде, при этом выход кислоты составляет 50 % от внесенного сахара. Глюконовую кислоту получают, используя штамм *Aspergillus niger*, молочную – *Rhizopus nigricans*, и таковую кислоту – *Aspergillus terreus*.

Грибы богаты разнообразными органическими соединениями с высокой биологической активностью. Среди них антибиотики и токсины. Из грибов выделено более 150 антибиотиков. Первый антибиотик пенициллин (рис. 34) получен А. Флемингом в 1928 г. Пенициллин ингибирует синтез клеточных стенок бактериальных клеток, блокируя реакцию транспептидирования, сшивая цепи протеогликанов.

Токсины грибов вызывают заболевания животных. Токсины склеродиев *Claviceps purpurea* используются в фармакологических препаратах эрготоксин, эргозин и др. Известный токсин бледной поганки *Amanita phalloides* α-аманитин является ингибитором РНК-полимеразы II, т. е. он ингибирует синтез мРНК в клетках эукариот.

Цианобактерии или сине-зеленые водоросли

Цианобактерии являются наиболее древней группой из известных нам живых существ. Их остатки находят в геологических отложениях, возраст которых достигает 3,5 млрд. лет. Сине-зеленые водоросли имеют сложное строение клетки (рис. 35), в частности имеют систему внутренних мембран и пигментов. Клетка цианобактерии окружена клеточной стенкой. У цианобактерий отсутствует

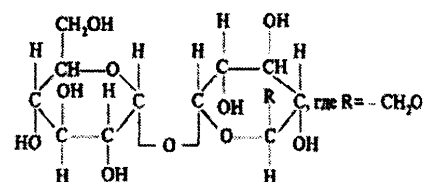


Рис. 33. Трегалоза.

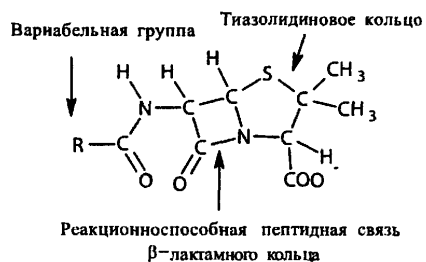


Рис. 34. Формула пенициллина.

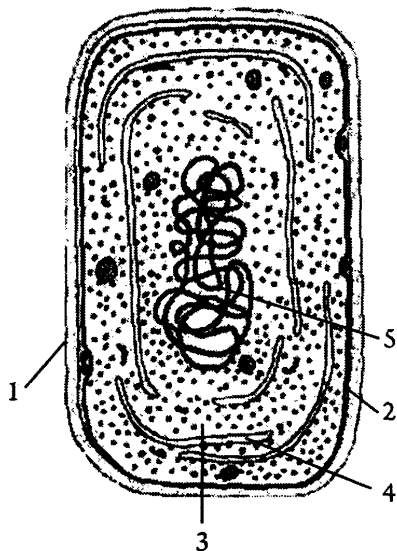


Рис. 35. Схематическое представление структурной организации цианобактерий: 1 – клеточная стенка; 2 – плазматическая мембрана; 3 – тилакоид; 4 – рибосомы; 5 – геном – ДНК.

половое размножение. При делении в клетке образуется поперечная перегородка. Дочерние клетки остаются соединенными друг с другом, образуя длинные нити, которые могут разрываться.

Можно утверждать, что цианобактерии занимают особое место в эволюции. Некоторые специалисты считают их вершиной биохимической эволюции автотрофных прокариот. Это самостоятельная тупиковая ветвь растительной эволюции. Несмотря на древность этой формы организации жизни, цианобактерии чрезвычайно хорошо приспособлены к жизни в современных условиях. Они достаточно быстро заселяют места после ядерных взрывов, встречаются в пустынях и Арктике. Способны в отличие от других водорослей и растений усваивать свободный азот, могут использовать CO_2 как единственный источник углерода.

Интенсивное размножение цианобактерий вызывает «цветение» воды, что сопровождается выделением в водную среду токсических веществ. Цианобактерии являются очень перспективным объектом биотехнологии. В настоящее время наибольшее применение находит *Spirulina*. Многие виды синезеленых водорослей являются продуцентами биологически активных веществ.

Характеристика водорослей

Водоросли – биологическая группа низших (слоевищевых, бессосудистых, споровых) организмов, способных к фотосинтезу. Большинство отделов водорослей относятся к организмам с эукариотическим типом клеток. К прокариотическим водорослям относятся сине-зеленые (*Cyanophyta*) и первичные (прокариотические) зеленые (*Prochlorophyta*).

Водоросли чрезвычайно разнообразная группа организмов, которая насчитывает не менее 100000 видов, а наука, исследующая систематику, биохимию, физиологию, генетику водорослей, и разрабатывающая основы практического использования водорослей, выделена в самостоятельное направление – альгологию или фикологию. Большой вклад в развитие альгологии внесли ученые Харьковской альгологической школы: Г. А. Коршиков, Л. С. Ценковский, А. М. Матвиенко, Т. В. Догадина

Размножение водорослей

Водоросли способны как к бесполому, так и к половому размножению. Водоросли с крупным таллом могут образовывать новые дополнительные талломы, которые дают начало новым организмам. В качестве примера такого способа размножения можно привести *Fucus*. У *Spirogyra* (нитчатая водоросль) нить расщепляется вдоль продольной оси, образуя две новые нити. *Euglena* делится митотически и образует два организма. Некоторые виды водорослей способны образовывать зооспоры (подвижные споры, имеющие жгутики или напланоспоры – неподвижные споры).

В жизненных циклах водорослей происходит чередование стадий полового и бесполого размножения (рис. 36).

Половое размножение характеризуется тем, что происходит объединение генетического материала двух особей одного вида. Гаметы (половые клетки) у водорослей могут быть различными. Если гаметы (мужские и женские) морфологически идентичны, то такой половой процесс называют изогамией, а гаметы – изогаметами. К изогамным относятся *Spirogyra* и некоторые виды *Chlamydomonas*.

Если одна из гамет менее подвижна или крупнее, чем другая, то тогда половой процесс называют анизогамией. Встречается еще один вариант полового процесса у водорослей, когда одна гамета большая и неподвижная, а вторая – небольшая и подвижная. Тогда неподвижную гамету называют женской, а подвижную – мужской, а половой процесс – оогамией. Оогамны *Fucus* и некоторые виды *Chlamydomonas*.

Роль водорослей в биосфере

Посуществующим оценкам, на долю мирового океана приходится не менее половины мировой первичной продукции. Первичную

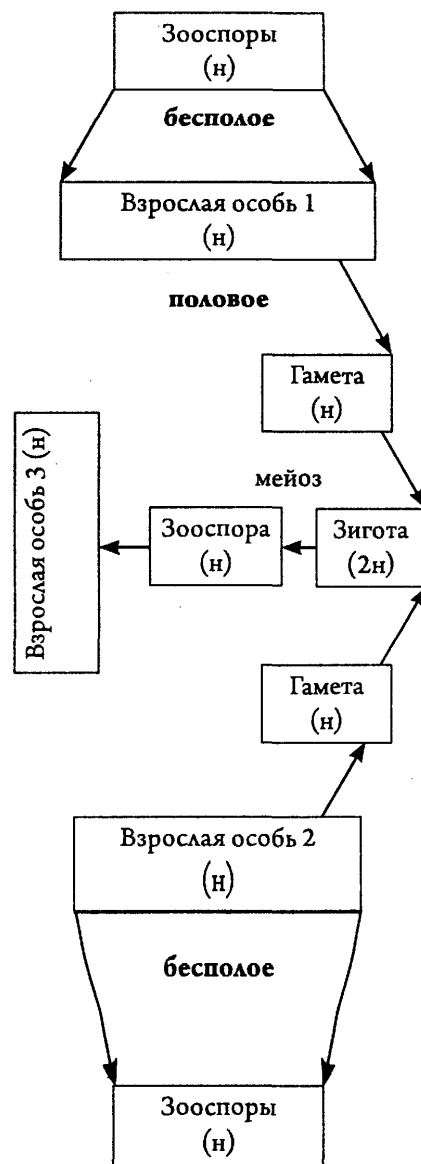


Рис. 36. Схема жизненного цикла *Chlamydomonas*, демонстрирующая сочетание полового и бесполого размножения. Гаплоидный набор хромосом обозначен – n, а диплоидный – 2n.

продукцию выражают в количестве фиксированного углерода. Единственные растения, образующие первичную продукцию в океане, это – водоросли.

Большинство пищевых цепей начинается с водорослей. Они составляют основной компонент фитопланктона (планктон – это мельчайшие растения и животные, которые свободно плавают в поверхностных слоях океанов и озер).

Благодаря фотосинтезу водорослей осуществляется не только фиксация углерода, но и поддерживается уровень кислорода в атмосфере. Более половины всего кислорода атмосферы выделяется водорослями, и их вклад в этот процесс значительно больше, чем лесов. Водоросли являются источником многообразных полезных для человека продуктов (рис. 38).

Когда в воде много питательных веществ для водорослей и температура воды соответствует оптимуму для их размножения, то начинается интенсивное размножение водорослей, и они скапливаются в огромных количествах. Это явление называют «цветением воды». При «цветении» интенсивный рост сменяется массовой гибелью клеток водорослей. Интенсивное разложение остатков водорослей сопровождается массовым размножением аэробных бактерий, что приводит к истощению кислорода в среде и гибелью гидробионтов.

Использование водорослей

Из водорослей получают полисахариды (агар, альгиновую кислоту, каррагенон, диатомит (кизельгур), витамины, каротиноиды, аскорбиновую кислоту, витамины группы В) и другие компоненты (рис. 37).

Практическая ценность полисахаридов связана с их способностью изменять свойства водных растворов, образовывать гели, стабилизировать медицинские препараты и продукты питания.

Альгиновая кислота и ее производные (альгинаты) – полисахариды экстрагируются из клеточных стенок таких бурых водорослей как *Laminaria*, *Ascophyllum* и *Macrocystis*. Альгинаты нетоксичны и легко образуют гели. Их используют в косметике при изготовлении кремов; в качестве эмульгаторов при приготовлении мороженого; при изготовлении лаков, красок и лекарственных препаратов.

Альгинат состоит из двух уроновых кислот – маннуровой и глюкуроновой, соотношение которых может быть от 4:1 до 20:1. Альгинаты способны образовывать гели в реакциях с солями кальция. Скорость образования геля, его качество и консистенция зависят от количества кальция. В промышленности водорослей альгинаты занимают самую большую долю. В настоящее время в мире производится около 20-25 тыс. т альгината в год. Альгинаты можно получать также из бактериальных клеток, а не только из водорослей. В качестве бактериальных продуцентов альгинатов могут быть использованы: *Azotobacter vinelandii* и *Pseudomonas alruginosa*.

Из красных водорослей получают агар. Он образует гели также как и альгинаты и используется при приготовлении твердых питательных сред для культивирования бактерий и грибов. Для этого готовят питательные растворы и вносят агар из расчета 0,6-1,0 %

Планктон – это мельчайшие растения и животные, которые свободно плавают в поверхностных слоях океанов и озер.

Продукт	Стоимость US \$ за кг
Пигменты	
Бета-каротин	> 1000
Ксантофил	200-500
Фикоцианин	> 100
Фикоэритрин	> 10000
Биомасса	—
Пицца	10-20
Пищевые добавки	1-130
Арахидоновая	400-10000
Эйкозопентаеновая	400-10000
Токоферол	25
Супероксиддисмутаза	> 1000

Рис. 37. Продукты, которые получают из микроводорослей в промышленных количествах.

раствора, стерилизуют и дают ему остыть. Наряду с этим, агар может применяться для тех же целей, что и альгинаты.

Еще одним полисахаридом, получаемым из клеточных стенок красных водорослей *Chondrus crispus*, является каррагенан (карраген). По своим химическим свойствам он похож на агар.

Диатомовые водоросли, относящиеся к отряду *Bacillariophyta*, характеризуются особым строением клеточной стенки, в состав которой входит кремний. После гибели клеток образуется так называемая «диатомовая земля», которая содержит до 90 % кремния. После очистки «диатомовая земля» (диатомит или кизелькур) может использоваться как хороший фильтрующий материал при очистке сахара, осветлении пива, как наполнитель при изготовлении изоляционных материалов.

Некоторые виды водорослей используются в качестве пищевых продуктов. Красную водоросль *Porphyra* и бурую водоросль *Laminaria* используют в пище как в сыром виде, так и для приготовления различных блюд. Интенсивное развитие промышленного культивирования водорослей может позволить увеличить количество водорослей, используемое в пищу. В этом отношении наибольший интерес представляют: из сине-зеленых – *Spirulina*, а из зеленых – *Chlorella* и *Dunaliella*.

Эффективность использования разных классов водорослей в биотехнологии различна (рис. 38). В настоящее время в мире работает не менее 40 крупных фирм – производителей витаминов. В промышленных масштабах микробиологическим путем получают витамины B_{12} , B_2 , D_2 и β -каротин. Это связано с тем, что химический синтез этих витаминов чрезвычайно сложен. Так, химический синтез корнестерона – строительного блока корринового кольца витамина B_{12} , осуществляется через 37 стадий.

Использование водорослей в научных исследованиях

Одноклеточные водоросли являются идеальным объектом для научных исследований структурно-функциональной организации растительных клеток. Для них характерны все типичные признаки растений, их можно выращивать в больших количествах в строго контролируемых условиях, для этого не требуется дорогих питательных сред и сложного оборудования. Примером таких объектов могут служить *Chlorella*, на которой проводятся исследования фотосинтеза, транспорта ионов, *Dunaliella*, которая является классическим объектом в исследованиях каротиногенеза, синтеза глицерина и механизмов адаптации к высоким концентрациям солей, и цианобактерии, которые используются при исследовании механизмов азотфиксации и т. д.

Характеристика, выделение и использование клеток растений в биотехнологии

Клеточные стенки. Функции клеточной стенки

Клетки растений имеют те же органеллы, которые обнаружены в клетках животных, за исключением центриолей. Наряду с этим, в

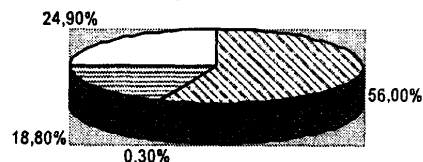


Рис. 38. Эффективность использования разных классов водорослей. Бурые водоросли – 56,0 %; красные водоросли – 24,9 %; другие классы водорослей – 18,8 %; зеленые водоросли – 0,3 %. Общий объем продаж продуктов из водорослей составляет около 4,9 млрд. долларов в год.

В последние годы ведутся исследования по использованию водорослей в технологии рекомбинантных ДНК для получения белков животного происхождения.
Zhang X. N., Wang H., Ou Z. C., Ye M. M., Shen D. L. /Cloning and prokaryotic expression of a salt-induced cDNA encoding a chloroplasmic fructose-1-6-diphosphate aldolase in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) DNA Seq. -2002. -13 (4). -195-202.

растительных клетках имеются специфические, характерные только для них структуры: клеточные стенки, плазмодесмы, вакуоли и пластыды. В этом разделе будут рассмотрены именно эти структуры.

Растительные клетки, как и клетки бактерий и грибов, окружены жесткой клеточной стенкой (рис. 39). Клеточная стенка образуется из компонентов (целлюлозы, пектиновых веществ и гемицеллюлозы), синтезирующихся самой клеткой и секретируемых на ее поверхность. По химическому составу клеточная стенка растительных клеток отличается от клеточных стенок прокариотических клеток и грибов (клеточные стенки прокариот содержат полисахариды и аминокислоты, упрочняющий компонент – муреин (рис. 40); основной упрочняющий компонент клеточной стенки растений – целлюлоза, а у грибов – хитин).

Клеточная стенка, образующаяся во время деления растительных клеток, называется первичной клеточной стенкой. В дальнейшем клеточная стенка может утолщаться благодаря дополнительному синтезу ее компонентов, такую клеточную стенку называют вторичной клеточной стенкой.

Первичная клеточная стенка состоит из целлюлозных микрофибрилл, погруженных в полисахаридный матрикс. Целлюлоза является полисахаридом. Множество полисахаридов образуют между собой водородные связи и в результате формируют микрофибриллы. Погруженные в матрикс микрофибриллы образуют каркас клеточной стенки. Матрикс формируется из полисахаридов, в состав которых входят пектины и гемицеллюлозы. Пектины образованы из моносахаров – арабинозы, галактозы, галактуроновой кислоты и метанола. Соседние клетки соединяются между собой срединной пластинкой, которая состоит из студнеобразующих пектатов кальция и магния.

Как известно, при добавлении сахаров к растворимому пектину образуются гели, которые используются в пищевой промышленности.

Гемицеллюлозы – это смешанная группа полисахаридов, растворимых в щелочах (в их состав входят полимеры ксилозы, галактозы, маннозы, глюкозы и глюкоманнозы). В отличие от целлюлозы, цепи гемицеллюлоз значительно короче, менее упорядочены и сильно разветвлены.

Клетки склеренхимы, трахеальные элементы ксилемы подвергаются интенсивной лигнификации (одревеснение). Это связано с тем, что все слои целлюлозы пропитываются лигнином (рис. 41). Лигнин усиливает прочность клеточных стенок, и тем самым обеспечивает дополнительную защиту клеток от неблагоприятных физических и химических факторов.

Клеточная стенка обеспечивает клеткам и растению в целом механическую прочность, она обуславливает тургесцентность клеток, когда в них поступает вода осмотическим путем. Ориентация целлюлозных микрофибрилл регулирует рост и форму клеток. Клеточные стенки связываются между собой и формируют апопласт. По апопласту передвигается вода и минеральные вещества.



Рис. 39. Стенка растительной клетки. Корешок гороха (x 45000).
1 – срединная пластинка клеточной стенки, которая состоит из кислых полисахаридов,
2 – плазматическая мембрана.

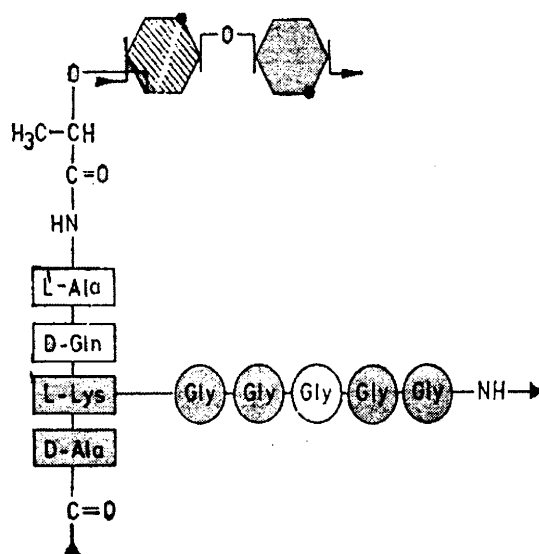


Рис. 40. Структурная единица пептидогликана (муреина).

В клеточных стенках имеются поры, сквозь которые проходят цитоплазматические тяжи – плазмодесмы (рис. 41). Плазмодесмы связывают протопласты в единую систему клеток – симпласт. И в этом смысле клеточная стенка не препятствует клеточной интеграции.

Наружные клеточные стенки эпидермальных клеток покрыты кутикулой, которая состоит из кутина -воскообразного вещества, что позволяет снизить потери воды и уменьшает способность бактерий проникать в клетки. Клеточные стенки сосудов ксилемы, трахеид и ситовидных трубок принимают участие в транспорте веществ по растению.

У некоторых клеток клеточные стенки выполняют функцию накопления запасов питательных веществ.

Следовательно, клеточная стенка выполняет важную структурную, защитную и регуляторную функцию растительных клеток.

Вакуоли

Вакуоль представляет собой «мешок», стенки которого состоят из мембраны (топопласт) (рис. 42). Жидкость, заполняющую центральную вакуоль, называют клеточным соком. Клеточный сок – это раствор, содержащий минеральные соли, органические кислоты, сахара. В состав клеточного сока могут входить и различные «вторичные» продукты метаболизма.

Вакуоли встречаются и в клетках животных: пищеварительные, сократительные, фагоцитозные, однако они небольшие по сравнению с вакуолями растительных клеток.

Вакуоли в растительных клетках выполняют различные функции:

1. Поддерживают тургорное давление в клетке. Вода поступает в концентрированный клеточный сок путем осмоса через избирательно проницаемый топопласт. В результате в клетке формируется тургорное давление и цитоплазма «прижимается» к клеточной стенке. Это играет важную роль при растяжении клеток во время их роста и в водном режиме питания растения.
2. Играют роль в окраске цветов, плодов и листьев. В вакуолях присутствуют пигменты (антоцианы), которые имеют красную, синюю или пурпурную окраску. Окраска играет важную роль в привлечении опылителей.
3. У некоторых растений вакуоли, содержащие гидролитические ферменты, выполняют функцию лизосом, т. к. обеспечивают автолиз растительной клетки.
4. Могут выполнять функцию «хранилища» вторичных продуктов метаболизма, в частности кристаллов оксалата кальция, алкалоидов, танинов, млечного сока, как у одуванчика и т. д.
5. Могут выполнять функцию запаса питательных веществ в частности, сахарозы, инсулина, минеральных веществ и др.

Пластиды

Пластиды – это органеллы, встречающиеся только в растительных клетках. Все пластиды образуются из пропластид, которые выявляются в меристеме. Пластиды имеют двойную мембрану (оболочку). В результате биогенеза пропластиды могут формировать

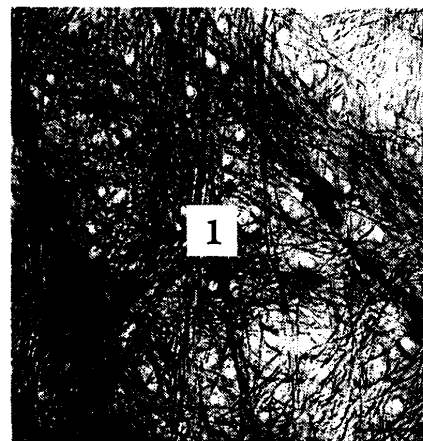


Рис. 41. Целлюлозный остов клеточной стенки; (x 30 000).

1- плазмодесмы.

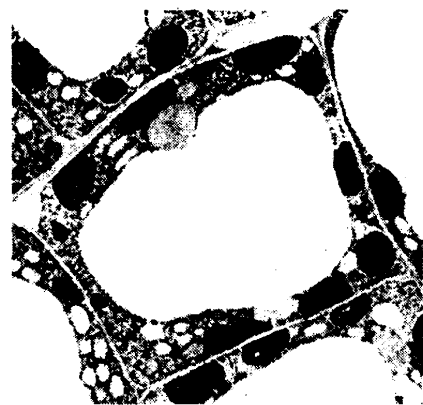
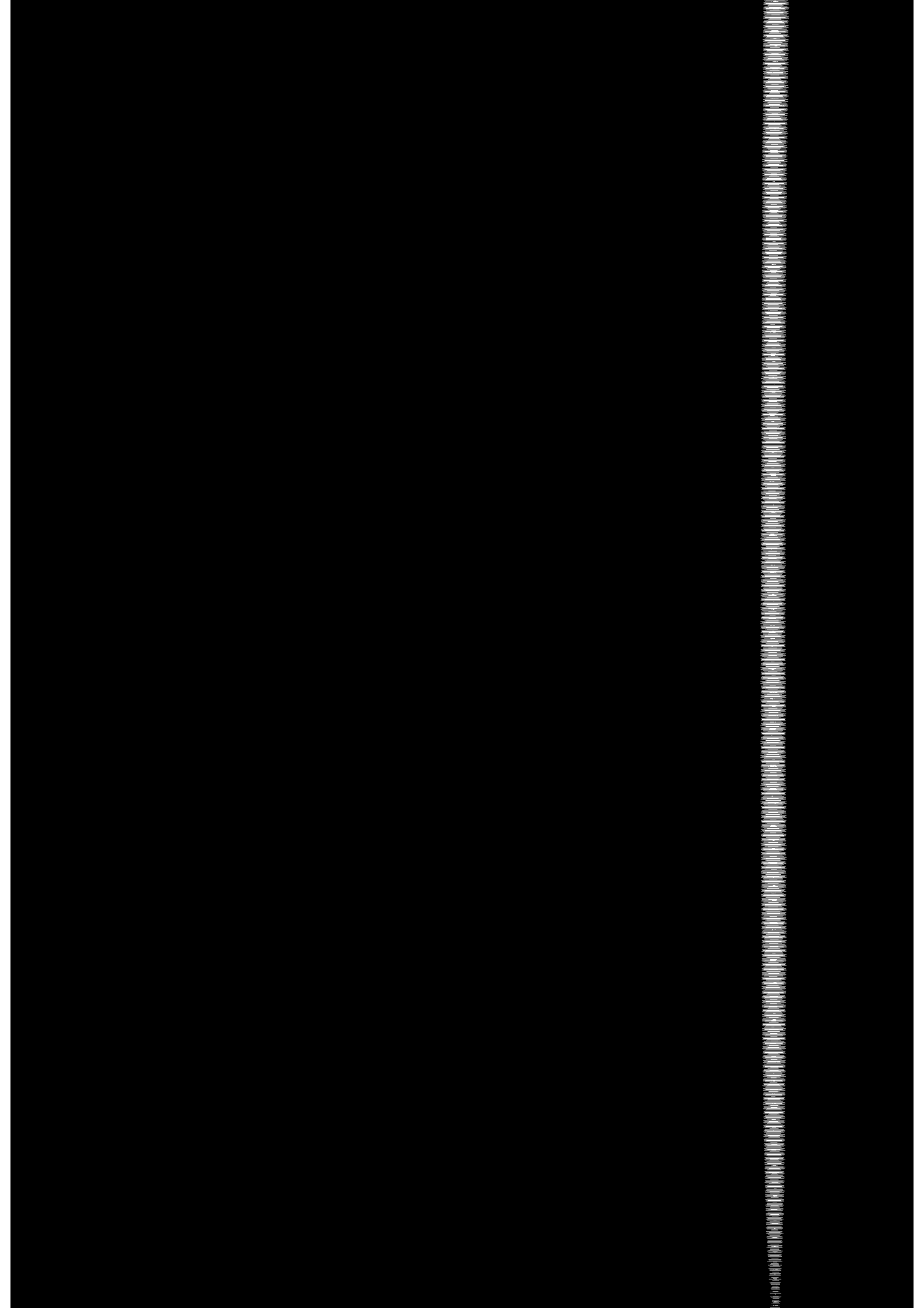


Рис. 42. Вакуоль в растительной клетке.

Вакуоли в дифференцированных клетках могут занимать до 90 % объема клеток. Исследование состава вакуолей представляет большой интерес, так как они накапливают различные вторичные метаболиты. Существуют различные методы выделения «вакоропластов».



Техника культивирования растительных клеток

Методы стерилизации растительных объектов

Одним из условий культивирования клеток или тканей является соблюдение строгой стерильности, так как в питательной среде очень быстро размножаются микроорганизмы, которые поражают эксплантаты. Поэтому необходимо стерилизовать как питательные растворы, так и сами эксплантаты и все манипуляции с тканями проводить в асептических условиях (ламинар-боксе) и стерильными инструментами.

Перед тем, как погрузить эксплантат в стерилизующий раствор необходимо его тщательно вымыть мыльным раствором со щеткой и интенсивно промыть дистиллированной водой, после этого погрузить его на несколько секунд в 70 % этиловый спирт. Если в работе используют семена, то их погружают в раствор 70 % спирта на 1-2 мин. Использование спирта важно не только потому, что он обладает стерилизующим эффектом, но и потому, что он повышает эффект других стерилизующих растворов.

Для стерилизации растительных эксплантатов и семян их выдерживают в течение 5-20 мин в стерилизующих растворах (диацид, сулема, гипохлориты или пероксид водорода).

Время стерилизации определяется особенностями эксплантата и активностью инактивации бактерий стерилизующим раствором (табл. 15). После извлечения объекта из стерилизующего раствора его тщательно промывают стерильной дистиллированной водой. Необходимо учесть, что описанный способ стерилизации обеспечивает только поверхностную стерилизацию. Питательные среды стерилизуются в автоклаве (0,75 –1 атм) при температуре 120 °С в течение 20 мин. В том случае, если в питательных средах содержатся термолабильные соединения, то тогда их стерилизацию проводят с помощью бактериальных фильтров (диаметр пор таких фильтров 0,22-0,45 мкм).

Посуду стерилизуют сухим жаром при температуре 160° С в течение 2 часов.

Характеристика питательных сред

Культивирование тканей и клеток растений требует правильного подбора питательных сред. Все питательные среды состоят из следующих основных групп веществ (рис. 111):

- 1) минеральные соли (макроэлементы – азот, фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо и микроэлементы – бор, цинк, медь, молибден, марганец и др.);

Объект	Время стерилизации, мин			
	Диацид, 0,1 %	Сулема, 0,1 %	Гипохлориты (Na, Ca), 5-9 %	Пероксид водорода, 10-12 %
Семена сухие	15-20	10-15	15-20	12-15
Набухшие	6-10	6-8	10-15	6-8
Ткани мясистого корня, клубня	20-30	15-25	15-20	-
одревесневшего стебля	2-40	20-25	20-25	-
Листья	1-3	1-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	1-7	3-15	2-7

Табл. 15. Рекомендуемые режимы стерилизации исходного растительного материала.



Рис. 111. Основные компоненты питательных сред, использующиеся в культуре растительных клеток.

- 2) сахара (сахароза и глюкоза в концентрации 2-3 % от объема среды);
- 3) некоторые витамины группы В (тиамин 0,4 мг/л – 1; пиридоксин – 0,1-0,5; никотиновая кислота – 0,5-1; инозит – 20-80);
- 4) стимуляторы роста (типа ауксинов-β-индолилуксусная кислота 0,1-1 мг/л; α-нафтилуксусная кислота – 1-2; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота – 1-2 (2,4-Д) и цитокины, такие как кинетин или б-бензиламинопурин или аденин в концентрации 0,2-0,5 %.

Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, аминокислоты, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевую соль, которая улучшает доступность железа для клеток.

Изолированные клетки и ткани в большинстве случаев неспособны к автотрофному питанию, поэтому в питательные среды вводят углеводы, которые являются в этом случае необходимым компонентом питания.

Фитогормоны необходимы для дифференцировки клеток и для индукции пролиферации. Дифференцировка обеспечивается ауксинами, а цитокины индуцируют деление клеток. В том случае, когда необходимо индуцировать стеблевой морфогенез, содержание ауксинов в среде снижают.

Опухолевые клетки растений способны сами синтезировать гормоны, поэтому они способны расти без внесения гормонов в питательную среду.

В настоящее время имеется достаточно большое количество различных питательных сред. Однако наиболее часто для выращивания растительных тканей и клеток применяют среду Г. Мурасиге и Ф. Скуга, которая была предложена этими авторами в 1962 г. (табл. 16). Эта среда хорошо сбалансирована и отличается от других сред соотношением аммонийного и нитратного азота. Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар (полисахарид, который получают из морских водорослей).

Для удобства при работе с питательными растворами готовят так называемые маточные растворы, это, как правило, в 10 раз более концентрированные растворы по сравнению с рабочим. Они хранятся в холодильнике, а перед использованием их разводят дистиллированной водой.

Хотя сегодня используется достаточно большое количество питательных сред: среда Уайта и среда Эглера, среда Гамборга, среда Шенна-Хильдербранта, однако по-прежнему остается наиболее часто используемой среда Мурасиге и Скуга.

Условия культивирования клеток

Успешное культивирование растительных клеток и тканей требует соблюдения определенных условий культивирования (рис. 112).

Влажность воздуха в комнате, где осуществляется культивирование, должна составлять 60-70 %. В том случае, если воздух суше, то это будет приводить к интенсивному испарению питательных

Компонент среды	Концентрация, мг/л
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₄	6,2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Na EDTA 2H ₂ O	37,3
Мезоинозит	100
Тиамин-HCl	0,5
Пиридоксин-HCl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Сахароза	30 000

Табл. 16. Состав питательной среды Мурасиге и Скуга.

Маточный питательный раствор – это раствор, концентрация необходимых компонентов в котором, как правило, в 10 раз выше необходимого питательного раствора – рабочего раствора.

разные типы пластид. На характер биогенеза пропластид большое влияние оказывает их местонахождение.

Хлоропласты – это пластиды, содержащие хлорофилл и каротиноиды (рис. 43). В хлоропластах происходит фотосинтез. Хлоропласты рассеяны в цитоплазме растительной клетки. В одной клетке может содержаться от одного хлоропласта (как у *Chlorella*, *Chlamydomonas*) до ста. Диаметр хлоропласта от 3 до 10 мкм, средний размер около 5 мкм.

Форма хлоропластов в клетках водорослей очень разнообразна в отличие от клеток высших растений. Так, у *Spirogyra* хлоропласты имеют спиралевидную форму, а у *Chlamydomonas* они чашевидные. Хлоропласт имеет развитую систему мембран, где протекают световые реакции фотосинтеза, а в строме происходят темновые реакции фотосинтеза. В строме находятся растворимые ферменты, в том числе и ферменты цикла Кальвина. Избыток углеводов, который образуется в процессе фотосинтеза, запасается в хлоропластах в виде зерен крахмала.

В 60-х годах было показано, что в хлоропластах, как и в митохондриях содержится своя ДНК и рибосомы. На основании сравнительного анализа свойств ДНК, рибосом, прокариотических и эукариотических клеток была высказана гипотеза эндосимбиоза, согласно которой митохондрии и хлоропласты – это прокариотические организмы, которые внедрились в клетки эукариот на ранних этапах эволюции жизни.

Кроме того, у фотосинтезирующих прокариот (сине-зеленые водоросли) и некоторых бактерий, фотосинтезирующий аппарат локализуется не в хлоропластах, а в мембранах, расположенных в цитоплазме.

Однако собственная ДНК хлоропластов и митохондрий не обеспечивает биогенез этих органелл, и большая часть белков этих органелл кодируется ядерным геномом. Это положение не дает оснований считать гипотезу эндосимбиотического происхождения этих органелл доказанной.

Хромопласты – пластиды, содержащие красные, оранжевые или желтые пигменты (каротиноиды). Больше всего хромопластов содержится в плодах (томаты, красный перец, морковь) и цветах.

Лейкопласты – пластиды, не содержащие пигментов и участвующие в хранении запасов питательных веществ. Их много в запасающих органах – корнях, семенах. В зависимости от того, какие вещества они накапливают, их делят на группы: амилопласты (запасные углеводы); липидопласты (липиды в виде масел – семена подсолнечника, плоды ореха) и протеинопласты (белки).

Выделение и культивирование растительных клеток

Культивируемые протопласты, клетки и ткани растений являются перспективными объектами современной биотехнологии. Перевод растительных клеток в культуру позволяет применять к ним аппаратуру и логику хорошо разработанного микробиологического эксперимента. Клетки растений даже при длительном

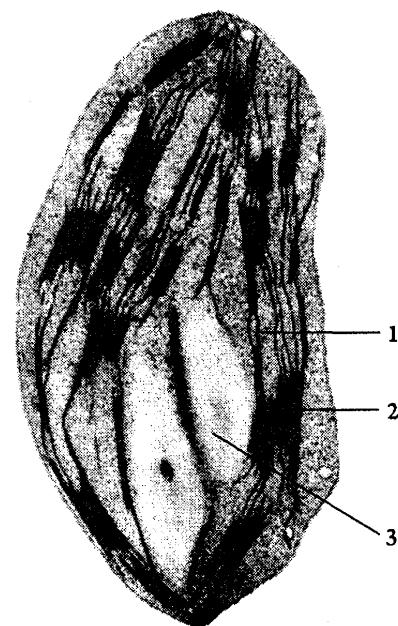


Рис. 43. Фото хлоропласта: $\times 72000$
1 – тилакоиды, свободно расположенные в строме, 2 – грани тилакоидов, 3 – включение крахмала.

Тотипотентность растительной клетки впервые постулировал Габерландт в 1902 г. Однако экспериментальное подтверждение способности дифференцированной растительной клетки обеспечивать развитие целого растения было доказано относительно недавно.

Тотипотентность клеточных ядер (но не целых клеток) животных показал Гердон в экспериментах лягушек в 1963-1968 г.г.

выращивании в системе *in vitro* сохраняют свои генетические характеристики и некоторые особенности дифференцированных соматических клеток растений из которых они были получены.

Наряду с этим, культивируемые клетки растений сохраняют тотипотентность, т. е. способность давать начало целому растению, способному к нормальному росту и размножению.

Эта особенность растительных клеток позволяет создавать на их основе различные технологии, направленные на решение фундаментальных проблем и практических задач. Можно выделить три направления в технологии на основе культивируемых клеток и тканей растений.

Первое – получение из культур клеток и тканей промышленным способом ценных биологически активных веществ растительного происхождения.

Второе – применение тканевых и клеточных культур для быстрого клонального микроразмножения и оздоровления растений.

Третье – использование методов клеточной и генной инженерии для генетического изменения клеток и получения на их основе целых растений, т. е. получение трансгенных растений.

Глубинное культивирование клеток растений

Скорость размножения растительных клеток не так высока, как бактериальных и дрожжевых, и время удвоения растительных клеток равно 1-3 суткам, против 20-30 мин для бактерий. Однако, если перевести растительные клетки в суспензионную культуру и обеспечить им непрерывное (хемостатное) культивирование, то можно добиться высокой продуктивности.

Перевод растительных клеток в суспензионную культуру достаточно сложный процесс и удается не всегда. Это связано с медленным ростом клеток в асептических условиях, их высокой чувствительностью к механическим повреждениям, особенностью межклеточных взаимоотношений. Для успешного культивирования растительных клеток в глубинном культиваторе необходимо учитывать следующие требования: способность клеток размножаться в дезагрегированном состоянии, морфологическую однородность клеток, способность клеток в суспензии сохранять присущие им метаболические пути.

Исходные клеточные суспензии лучше всего получать из каллусных культур (рис. 44). Для дезинтеграции клеток (отделения их друг от друга) используют ферменты пектиназу и полигалактоураназу, и из используемых растворов исключают ионы кальция, которые участвуют в межклеточных контактах. Полученные клетки переводят в питательную среду, содержащую ауксин-2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту. В качестве клеток для глубинного культивирования могут быть использованы протопласты (рис. 45) с реконструированными клеточными стенками, что позволяет обеспечить их рост в суспензии. Для стимуляции деления протопластов используют обогащенные питательные среды или гомологические ткани («кормящий слой»), находящиеся в состоянии активного роста.

Под оздоровлением растений понимают способ получения безвирусных растений. Суть проблемы в том, что растительные вирусы поражают все ткани растения, кроме меристемы и избавиться от них практически невозможно. Эффективным способом удаления вирусов является получение растений из стерильных культур клеток.



Рис. 44. Фото культуры каллуса

Каллус – клеточная ткань с нерегулярной структурой, формирующаяся на раневой поверхности растения. Он состоит из клеток с различной скоростью роста. Хорошо растет в культуре и может в определенных условиях регенерировать целое растение.

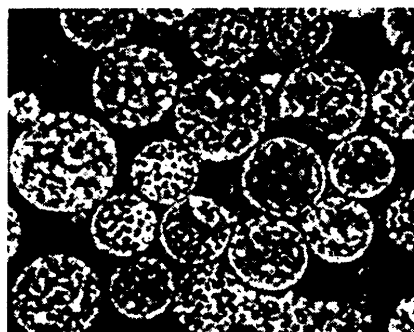


Рис. 45. Фото протопластов.

В качестве примера использования суспензионных культур растительных клеток можно привести опыт компании Mitsui-Petrochemical Industries, которая осуществила в начале 80-х годов крупномасштабное глубинное культивирование клеток воробейника (*Lithospermum erythrochizon*) для получения шиконина. Шиконин используется в качестве красителя (красный цвет).

На первой стадии клетки воробейника выращивают в биореакторе емкостью 200 л, в стерильных условиях с подачей стерильного воздуха в течение 9 суток. После этого культуру переводят в биореактор меньшего объема на среду М9, стимулирующую синтез шиконина, и на последней, третьей стадии, которая осуществляется при культивировании клеток в биореакторе емкостью 750 л на протяжении 2-х недель осуществляется накопление целевого продукта.

Протопласт – растительная клетка лишенная клеточной оболочки, т. е. клетка, окруженная клеточной мембраной.

В 1970 г. Такебе получил (регенерировал) из протопласта полноценные растения табака. Развитие таких растений продолжалось 100-120 дней, и за это время они образовывали семена. В 1978 г. Ю. Ю. Глеба (Киев) разработал метод культивирования протопластов в микрокаплях.

Глава III

Принципы функционирования биологических систем

О биологических теориях, концепциях и принципах функционирования

Закон – это необходимое, существенное, устойчивое и повторяющееся отношение между явлениями в природе. В зависимости от характера явлений, на которые распространяется закон, все законы могут быть разделены на категории: частные законы (закон сложения скоростей в механике, закон Бойля и т. д.); общие законы (закон сохранения и превращения энергии и др.) всеобщие законы (закон единства и борьбы противоположностей, законы диалектики).

Биологические системы слишком далеки от идеальных систем, в том смысле, что они чрезвычайно разнообразны и динамичны. Такое разнообразие объясняется непрерывным процессом адаптации к изменяющимся условиям среды. И с этих позиций биологические системы являются вероятностными, высоко динамичными системами. Сегодня в биологии более актуальным является не установление законов и формирование теории, а установление наиболее общих принципов функционирования биологических систем как основы развития теоретических знаний.

Установление научных принципов (принцип, от латинского, начало, основа) – это исходное положение какой-либо теории или учения. В целом принципы определяют систему научных знаний и лежат в основе методологии науки. Наши знания определяются набором известных нам принципов и исходных положений.

Одним из принципов классического естествознания является принцип механицизма, суть которого сводится к тому, что при изучении любого сложного явления его следует разлагать на более простые элементы, и это позволяет понять работу всей системы.

В биологии этот подход получил название принципа редукционизма, т. е. упрощения, сведения сложного к более простому, более доступному для анализа. Необходимо признать, что на основе редукционистского подхода и получила такое интенсивное развитие молекулярная биология, генетика, биохимия, микробиология и стал возможным современный этап развития биотехнологии.

Задачи биотехнологии могут успешно решаться только в том случае: 1) если мы будем располагать такими биологическими системами (объектами биотехнологии), которые характеризуются высокой скоростью образования полезного для человека целевого продукта; 2) если мы будем обладать знаниями о наиболее общих закономерностях регуляции функционирования этих биологических систем и умело их использовать.

С объектами биотехнологии мы уже знакомы. В этой главе мы рассмотрим наиболее общие закономерности функционирования биологических систем.

Реальный прогресс в знаниях о мире может быть достигнут только на пути использования принципов обобщений. Наиболее принятыми формами обобщений являются законы, теории и концепции.

Закон – это необходимое, существенное, устойчивое и повторяющееся отношение между явлениями в природе.

Парадигма – это базовая информационная инфраструктура, которая включает предположения, гипотезы, концепции, на основе которых развиваются знания в рамках определенной научной дисциплины.

Именно в форме законов отражены наиболее общие закономерности явлений природы.

Как правило, естественные законы выводятся из экспериментальных наблюдений и в этом смысле закон есть краткое изложение результатов эксперимента. Причем в формулировке закона эти результаты не объясняются. Так, вспомним закон Бойля-Мариотта, который указывает на связь объема и давления газа, без объяснения этой связи (рис. 46).

Закон выражает наиболее общие отношения, связи, присущие всем явлениям данного рода. В зависимости от характера явлений, на которые распространяется закон, все законы могут быть разделены на категории: частные законы (закон сложения скоростей в механике, закон Бойля и т. д.); общие законы (закон сохранения и превращения энергии, закон естественного отбора и др.) всеобщие законы (закон единства и борьбы противоположностей, законы диалектики).

Если рассмотреть естественные науки с позиций установленных законов, то наибольшие достижения в этом отношении имеют физика, химия и математика.

Именно физические законы: а) фиксируют устойчивые повторяющиеся связи, которые объединяются логическими связями в единую форму закона; б) установленные законы образуют единую теорию, которая допускает эмпирическую проверку и имеет предсказательную силу; в) степень упрощений и уровень идеализации в физике укладываются в строгие математические конструкции, что позволяет осуществлять точные математические описания и при этом не терять информации об изучаемых объектах.

Необходимо учесть, что математические конструкции относятся к идеальным, воображаемым, абстрактным объектам и могут иметь отдаленное отношение к естественным биологическим объектам.

Одной из особенностей математики является то, что она оперирует точными величинами, а наши знания о функционировании биологических систем не дают подобных характеристик, и это объясняется не только недостаточной изученностью биологических систем, а и особенностью их функционирования.

Биологические системы слишком далеки от идеальных систем, в том смысле, что они чрезвычайно разнообразны и динамичны. Такое разнообразие объясняется непрерывным процессом адаптации к изменяющимся условиям среды. И с этих позиций биологические системы являются вероятностными, высоко динамичными системами.

Существующий математический аппарат не позволяет строго описывать такие системы.

Сложившаяся ситуация в методологии биологических исследований не позволяет обеспечить развитие теоретической биологии по образцу теоретической физики. Бесспорно, это тормозит развитие биотехнологии и других биологических наук.

Как отмечал лауреат Нобелевской премии И. Пригожин, понятие закона досталось нам в наследство от науки XVII века. Это понятие формировалось в результате изучения простых систем,

В 1862 г. в работе по сжимаемости газов Роберт Бойль показал, что при постоянной температуре объем V постоянной массы данного газа обратно пропорционален его давлению $PV = \text{const}$.

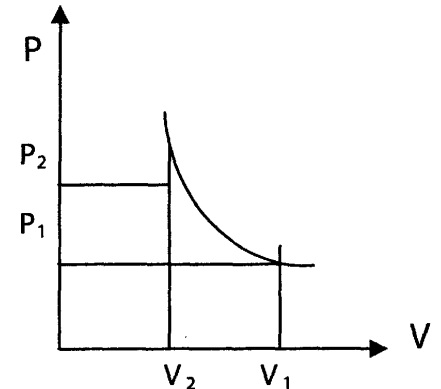


Рис. 46. Графическое представление зависимости объема и давления газа.



Пригожин И. (1917-2003) бельгийский физик и физико-химик, лауреат Нобелевской премии, один из основоположников термодинамики неравновесных систем. В 1947 г. сформулировал теорему термодинамики неравновесных процессов: при внешних условиях, препятствующих достижению системой равновесного состояния, стационарное состояние системы соответствует минимальному производству энтропии.

таких как движение планет или маятника. Именно простые системы являются тем случаем, в котором становится достижимым идеал исчерпывающего описания. В случае же динамических систем такой подход, основанный на полном описании задающих мгновенных состояний системы, становится невозможным. Для динамических неустойчивых систем такое описание как для идеальных физических систем невозможно в силу не только ограниченности наших возможностей, а, прежде всего особенностями внутренней структуры биологических явлений.

С другой стороны, биотехнология как интегральная сфера научно-технического процесса стимулирует развитие исследований наиболее общих закономерностей функционирования биологических систем, т. е. теоретической биологии. Как же может быть разрешен этот парадокс?

Пожалуй, наиболее продуктивным подходом в биологии в этом отношении является установление не столько законов и формирования теории, а установление наиболее общих принципов функционирования биологических систем как основы развития теоретических знаний.

Принцип, от латинского, начало, основа. Установление научных принципов – это исходное положение какой-либо теории или учения. В целом принципы определяют систему научных знаний и лежат в основе методологии науки. Наши знания определяются набором известных нам принципов и исходных положений, именно они и определяют особенности типов мышления.

Принципы отражают явление на различных уровнях организации и в этом смысле они могут быть расположены в виде пирамиды принципов. В качестве примеров рассмотрим два известных принципа: принцип Ле Шателье и принцип механицизма.

Принцип Ле Шателье отражает характер поведения системы в ответ на внешние воздействия. Однако он не объясняет механизмы, лежащие в основе такого поведения системы.

Объекты, с которыми мы имеем дело, как правило, достаточно сложны и состоят из множества взаимодействующих и взаимосвязанных элементов. Ученые это понимали достаточно давно, однако понятие «системы» сформировалось только в конце XIX, начале XX века.

Одним из принципов классического естествознания является принцип механицизма, суть которого сводится к тому, что при изучении любого сложного явления его следует разлагать на более простые элементы, и это позволяет понять работу всей системы.

Знания о функционировании системы можно получить на основе характеристик отдельных элементов, формирующих эту систему. Такой подход был обусловлен впечатляющими успехами классической механики и физики. Сведение сложного к простому, целого к части, было обоснованным и рациональным способом научного познания мира.

В биологии этот подход получил название принципа редукционизма, т. е. упрощения, сведения сложного к более простому, более доступному для анализа.

Принцип Ле-Шателье

Ле Шателье сформулировал этот принцип в 1884 г. Суть принципа сводится к тому, что он отражает характер поведения системы в ответ на внешние воздействия. Если на систему, которая находится в равновесии, воздействуют внешние факторы (давление, температура и др.), то, протекающие в ней процессы будут смещаться в таком направлении, которое будет уменьшать воздействие внешних факторов.

Система не в состоянии полностью «устранить» (скомпенсировать) эти воздействия, однако ее изменения всегда направлены на уменьшение этого воздействия.

Ле-Шателье исследовал химические реакции, и этот принцип он сформулировал в отношении химических превращений. В качестве примера приведем реакцию образования аммиака: $N_2 + 3H_2 \leftrightarrow 2NH_3$

$$\Delta H = -92 \text{ кДж/моль}^{-1}$$

Согласно принципу Ле-Шателье, если давление равновесной смеси азота, водорода и аммиака возрастает, то равновесие будет смещаться в направлении уменьшения давления. В данной системе уменьшение давления будет происходить за счет уменьшения общего числа присутствующих молекул в смеси. Это может быть достигнуто путем увеличения молекул аммиака, т. е. смещение равновесия в сторону образования аммиака (вправо). Если давление в этой смеси будет уменьшаться, то тогда в системе аммиак будет разлагаться на азот и водород, равновесие реакции сместится влево и давление будет, напротив, повышаться.

Этот принцип применим не только к химическим, но и к физическим превращениям. Ле Шателье рассматривал не характеристику отдельного элемента реакции, а поведение всей системы, только с такой позиции он смог сформулировать этот фундаментальный принцип.

Необходимо признать, что на основе редукционистского подхода и получила такое интенсивное развитие молекулярная биология, генетика, биохимия, микробиология и стал возможным современный этап развития биотехнологии.

Однако сегодня мы хорошо понимаем, что функционирующие биологические системы принципиально отличаются от стабильных систем тем, что взаимное расположение и взаимодействие подсистем и элементов в системе непрерывно меняются. В динамичных системах, к которым относятся и биологические системы, изменяются не только взаимодействия элементов системы, но и сами элементы, входящие в систему, которые изменяются количественно и качественно.

Следовательно, для функционирующих динамичных систем необходимо знать не только характеристику их исходных элементов, но и типы действующих в них преобразований и характер взаимодействия. Необходимо уметь выделить наиболее устойчивые отношения между элементами, именно такие устойчивые отношения и определяют особенности структуры системы.

Редукционизм позволил получить достаточно полные характеристики элементов системы, однако он не позволил понять механизмы функционирования системы в целом. Так, например, зная структурную организацию генетической системы клеток, мы не можем вывести особенности регуляции экспрессии генома в клетке.

Сегодня в биологии нет ни одной теории, которую можно было бы сравнить с теориями физики, химии или других наук. Признанные теория эволюции и клеточная теория отличаются по своему предсказательному и методическому представлениям от строгих теорий других естественных наук. Почему так мало теорий в биологии?

Это объясняется тем, что теория не является простым описанием результатов наблюдений. Она является системой основных идей, дающей целостное представление о наиболее общих закономерностях и существенных связях действительности.

В этой главе мы выделим и сформулируем некоторые принципы, характерные для молекулярного уровня функционирования биологических систем. Однако прежде мы рассмотрим наиболее общие свойства биологических систем.

Свойства биологических систем или критерии живого

Как ни парадоксально может показаться на первый взгляд, провести четкую границу между живыми и неживыми системами очень сложно, а порой почти невозможно. Примечательно то, что чем ниже уровень биологической организации мы рассматриваем, тем в большей степени стирается грань между живой и неживой системами.

Рассмотрим несколько примеров. Вирус, если он находится вне организма, неперемещается, не дышит, в нем не идут биохимические процессы, т. е. его нельзя отнести к живым системам. Оказавшись

Система – совокупность элементов, формирующих единое целое. По отношению к биологическим объектам понятие «система» является достаточно сложным. Развитие системного подхода в биологии связано с биологом Л. фон Берталанфи (1901 –1972). Большой вклад в развитие представлений о функциональных системах организма внес советский физиолог П. К. Анохин (1898-1974). Он впервые указал на системообразующий фактор в функциональных системах организма. Таким фактором является полезный приспособительный для системы результат.

Адаптация (приспособление, прилаживание) – совокупность морфологических, физиологических, поведенческих и других особенностей данного биологического вида, которая обеспечивает возможность выживания в определенных условиях внешней среды. Различают общие адаптации и частные адаптации. Результатом адаптации является формирование соответствия организма среде, что трактуется как проявление целесообразности.

в клетке, он, используя генетическую систему хозяина, интенсивно размножается, т. е. он «оживает». Как образно выразился известный биолог В. Стенли: «В клетке вирус ведет себя как живое вещество, а вне клетки он мертв, как камень».

По химическому составу вирусы могут быть отнесены к химическим соединениям, так как они содержат только белки и нуклеиновые кислоты, т. е. являются нуклеопротеидами. Однако в биологическом отношении вирусы это внутриклеточные паразиты. Примеров паразитизма в неживой природе нет, это явление сугубо биологическое и может рассматриваться как результат эволюционных изменений.

Следовательно, биологические системы эволюционируют. Другой пример. Если клетку разрушить и выделить органеллы, перевести их в оптимальные для них среды, то они способны определенное время выполнять характерные для них функции – рибосомы синтезировать белки, митохондрии – АТФ, клеточные ядра – РНК и т. д. Можно ли назвать отдельные органеллы живыми? Или ферменты, способные осуществлять превращение субстратов в продукты вне организма и т. д.?

Пытаясь выделить наиболее общие критерии живого, мы сталкиваемся с цепью градаций, неуловимо приближающейся к некоторому пределу, подлинная граница которого не поддается фиксации, так писал известный ученый, один из основателей молекулярной биологии, академик В. А. Энгельгард. Именно они, эти неуловимые тонкие особенности и не позволяют дать безупречного ответа на вопрос: что такое жизнь?

Как указывал еще великий Аристотель, базовые понятия, каковым является и понятие жизни, изначально неопределяемы и о них мы судим только по проявлению характерных для них свойств.

Мы хорошо знакомы с наиболее общими свойствами биологических систем: 1 – расти; 2 – размножаться; 3 – активно реагировать на изменения окружающей среды – адаптироваться; 4 – развиваться, т. е. изменяться в процессе онтогенеза; 5 – стареть; 6 – эволюционировать, т. е. изменяться в ряду поколений.

Живой система будет являться только в том случае, если она способна проявлять все указанные выше свойства. Именно этот набор уникальных свойств «делает» биологические системы универсальными в решении любых биологических задач. Однако использование этих свойств в биотехнологиях возможно только в том случае, если нам будет доступно управление этими процессами и направленная модификация их свойств. А для достижения этой цели нам необходимы знания о структурах и процессах, определяющих эти свойства.

Основой проявления этих фундаментальных свойств биологических систем является обмен веществ, т. е. метаболизм. Метаболизм – это единство трех потоков: потока веществ, потока энергии и потока информации. Эти три потока, принципиально различаются между собой, однако они сливаются в единое



Энгельгард Владимир Александрович (1894-1984), основоположник молекулярной биологии в СССР. В 1953 г. был избран академиком СССР, а 1944 г. – академиком АМН. Был организатором и первым директором института молекулярной биологии АН СССР (1959 г.). Основоположник современной биоэнергетики и механохимии. Он открыл процесс дыхательного фосфорилирования.

После участия в гражданской войне в 1921 г. он начал научную деятельность под руководством крупного ученого организатора науки Баха А. Н. Первые исследования были посвящены исследованию антител. Он сформулировал принцип «фиксированного партнера». Дело в том, что исследование процесса формирования иммунных комплексов всегда проводили в растворе. Энгельгард обнаружил, что антитела способны связывать антигены и в том случае, если их перевести из раствора в адсорбированную форму на какой-либо носитель (каолин, гидроокись алюминия). Эта работа является предвестницей столь популярного и перспективного сегодня направления биотехнологии – инженерной энзимологии.

В начале 30-х годов XX века огромный интерес вызвали работы по участию фосфорной кислоты в биологических процессах. В то время было известно, что АТФ синтезируется в результате гликолиза, о биохимических превращениях при дыхании тогда (продолжение на след. стр.)

«биотическое триединство» (по словам В. А. Энгельгарда), что и обеспечивает метаболизм биологических систем (рис. 47).

Поток вещества составляет основу таких сторон жизнедеятельности как питание, обмен веществ и выделение. В обеспечении потока веществ определяющую роль играют белки, именно они обеспечивают и расщепление продуктов питания до мономеров, и синтез из этих мономеров макромолекул необходимых организму.

В потоке энергии в биологических системах важную роль играют липиды и углеводы (это не значит, что другие полимеры в этом процессе не принимают участия). Для энергетического обмена биологических систем характерна унификация с одной стороны, и многообразие форм трансформации энергии с другой.

Унификация энергетического обмена проявляется в том, что для биологических систем независимо от уровня организации характерно использование универсального источника энергии, макроэргических соединений и, прежде всего, АТФ (аденозинтрифосфорная кислота). Энергия, освобождающаяся в результате расщепления макроэргической связи, обеспечивает все энергетические потребности организма. Универсализм энергетического потока в биологических системах проявляется еще и в том, что весь поток энергии, который поступает в биологические системы в виде продуктов питания, процесса фотосинтеза, экзотермических реакций обмена, проходит стадию синтеза АТФ (рис. 48).

Однако наряду с унификацией энергетического потока в живых системах имеет место и многообразие форм превращения энергии. Например, существуют механизмы превращения химической энергии в механическое движение, сокращение мышц, сокращение жгутиков у простейших.

В потоке информации в живой системе первостепенную (однако, не единственную) роль играют нуклеиновые кислоты. Понимание принципиальных основ передачи информации на уровне молекулярных структур в биологических системах стало величайшим достижением биологии XX века.

Бесспорно, хранение и передача генетической информации в биологических системах играет ведущую роль в проявлении жизни. Это стало возможным благодаря возникновению гигантских информационных молекул (нуклеиновых кислот, рис. 49). Генетический код универсален, он обеспечивает сохранение, изменение и передачу информации не только в онтогенезе (в процессе индивидуальной жизни организма), но и в ряду поколений, т. е. обеспечивает эволюционное развитие.

Принципиально важным в потоке информации является существование принципа матричного синтеза. Именно матричный принцип обеспечивает сохранение информации в ряду поколений с одной стороны, и индивидуальное развитие – с другой стороны.

Итак: биологические системы способны к росту, размножению, адаптации, развитию, старению и эволюции. Это возможно благодаря наличию в биологических системах триединства: потока вещества, потока энергии и потока информации.

не было известно практически ничего. Это было связано с тем, что в качестве экспериментальных объектов использовался очень узкий круг объектов: дрожжи и печеночная ткань. Ученые словно не учитывали высказывания замечательного биолога Кропа о том, что успех решения проблемы определяется умением ученого найти подходящий объект. Энгельгард выбрал достаточно удачный объект исследований – эритроциты птиц, которые в отличие от эритроцитов животных содержат ядра. Они обладают интенсивным дыханием в отличие от эритроцитов млекопитающих, и в эритроцитах птиц очень высокое содержание АТФ, соизмеримое с таковым в мышечной ткани.

Энгельгард показал, что содержание АТФ остается на постоянном уровне пока продолжается дыхание. Остановка дыхания сопровождается быстрым дефосфорилированием. Этот эффект был им объяснен и экспериментально подтвержден наличием процесса окислительного фосфорилирования.



Рис. 47. Метаболизм – это единство трех потоков.



Рис. 48. Схема трех метаболических потоков, которые принимают участие в синтезе АТФ в клетке.

Наиболее общим и фундаментальным свойством биологических систем является способность к трансформации одних веществ в другие, т. е. метаболизм. Все остальные свойства можно рассматривать как производные этого явления.

Обеспечение метаболизма возможно только в случае соблюдения условий упорядоченности. В свою очередь, пространственная упорядоченность достигается при развитии структурной целостности биологических систем. Организация молекулярных структур в биологических системах обеспечивается макромолекулярными компонентами систем и, прежде всего, 4-мя основными типами полимеров, входящих в состав всех биологических систем: белков, липидов, нуклеиновых кислот и углеводов (рис. 50).

Пространственная упорядоченность биологических систем создает: 1) компактность, 2) иерархичность структур и 3) временную упорядоченность метаболизма. Необходимо отметить, что упорядоченность и компактность в живых организмах достигает столь высокого уровня, что ни одна неживая система не имеет такой системы упорядоченности.

Иерархичность организации биологических систем обеспечивает не только процессы регуляции, но и лежит в основе биологического разнообразия, т. е. биологические системы, обладая однообразием исходных макромолекул, создают бесконечное разнообразие благодаря структурной иерархичности.

Иерархичность выражается в том, что отдельные макромолекулы образуют ассоциаты, последние формируют мультиферментные комплексы и, наконец, морфологические структуры. Макромолекулы, формируя различные структуры, создают разнообразие в окружении и, как следствие, различие конформации. Изменение конформации макромолекул влияет на их функциональные свойства, т. е. иерархичность биологических структур лежит и в основе регуляции функциональной активности макромолекул.

Принципиально важно то, что пространственная упорядоченность макромолекул в биологических системах создает и упорядоченность во времени. Упорядоченность во времени обеспечивает определенную временную последовательность метаболических превращений. Обеспечивая определенную последовательность биохимических реакций в процессе онтогенеза, система способна вести отсчет времени, т. е. способна отличать прошлое от настоящего, что и является основой развития и старения систем.

Итак, пространственная упорядоченность биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов) является основой метаболизма, т. е. потока вещества, энергии и информации.

Именно пространственная структура макромолекул обеспечивает: 1 – компактность; 2 – иерархичность; 3 – конформационную регуляцию функциональной активности макромолекул; 4 – временную упорядоченность метаболизма и 5 – отсчет времени развития, т. е. онтогенез. Функционирование биологических

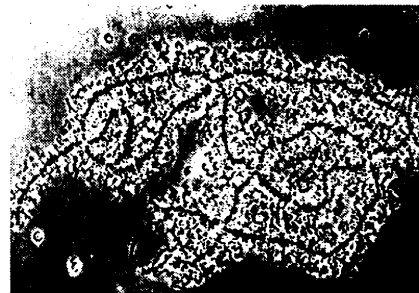


Рис. 49. Хромосома, выделенная из ядра клетки ооцита тритона на стадии профазы мейоза. На этой стадии она формирует петли в виде так называемых ламповых щеток. Это демонстрирует функциональную активность гена, т. е. процесс транскрипции гигантской молекулы ДНК.

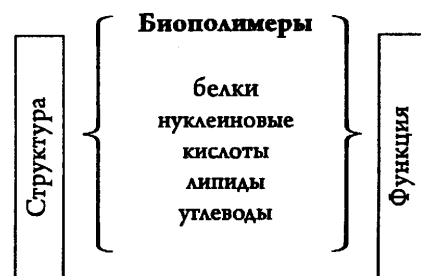


Рис. 50. 4 типа биополимеров способны обеспечить структурно-функциональную целостность и упорядоченность биологических систем.

структур и проявляется в росте, размножении, адаптации, старении и эволюции.

Благодаря специфичной организации, биологические системы обладают еще одним уникальным свойством. Они способны создавать порядок (организованность) из хаотического (случайного) набора макромолекул. Как образно и точно выразился И. Пригожин, биологические системы способны создавать порядок из хаоса. С позиций 2-го закона термодинамики они способны противостоять росту энтропии и это еще одно отличительное свойство живых систем от неживых. Обеспечивать «борьбу» с энтропией способны только открытые системы, каковыми и являются живые системы.

Итак, критерием живых систем является универсальный макромолекулярный состав, способный формировать пространственную организацию в виде иерархических структур, которые являются открытыми системами и обеспечивают метаболические превращения в этих структурах. Все известные нам свойства живых систем являются производными структурной организации макромолекул.

В следующих разделах мы рассмотрим основные теории и принципы функционирования биологических систем.

Клеточная теория

Основные этапы формирования клеточной теории

Основой или единицей всех биологических структур является клетка. Сегодня это кажется столь очевидным, что не требует никаких доказательств. Это не совсем точно, клеточная теория еще находится на пути своего развития. Мы относительно хорошо знаем особенности структурной организации некой «идеализированной» клетки, очень мало знаем об особенностях структурной организации разных типов специализированных клеток. И еще меньше знаем о регуляции функции клетки. Поиски решения этих важных вопросов привели к формированию интегрального научного направления – биологии клетки.

Размер клеток оценивается в микрометрах (1 мкм – одна миллионная часть метра), а молекулы в нанометрах (1 нм – одна миллиардная часть метра). Столь малые частицы невозможно увидеть невооруженным глазом. Если представить среднюю клетку эукариотов, (неравномерно сферическую по форме), то ее диаметр равен 25 мкм. Диаметр бактерий (прокариотической клетки) составляет около 1 мкм, т. е. в одну клетку эукариотов, как образно говорил К. Де Дюв, может поместиться свыше 10 000 бактерий. Вирусы еще меньше, тысячи их могут занять одну бактериальную клетку. Увидеть мир клеток возможно было только сконструировав оптические приборы, позволяющие увидеть столь малые объекты как клетки.

Началом проникновения в мир клеток можно считать тот момент, когда Роберт Гук направил зеркальце усовершенствованного им микроскопа на кусочек самой обыкновенной пробки и увидел

Первый закон термодинамики устанавливает, что общая сумма энергии материальной системы остается постоянной величиной, независимой от изменений, происходящих в самой системе; изменение энергии системы возможно только в результате обмена энергии с окружающей средой. Таким образом, первый закон термодинамики является количественным выражением закона сохранения энергии, который гласит, что энергия не исчезает и не возникает, она только переходит из одной формы в другую в эквивалентных количествах. Первый закон не говорит о том, в каком направлении будет происходить превращение энергии в системе.

Второй закон термодинамики указывает, что все процессы превращения энергии протекают с рассеиванием части энергии в тепло. Внутренняя энергия системы (U) равна сумме свободной энергии (F) и связанной энергии (TS).

$$U = F + TS$$

Свободная энергия – это та часть энергии системы, которая может быть использована для совершения работы. Связанная энергия не может использоваться для совершения работы и рассеиваться в виде тепла.

Связанная энергия TS определяется энтропией.

Энтропия – это мера рассеивания, деградации энергии, а также мера необратимости процесса.

Следствием второго закона термодинамики является то, что все процессы в природе протекают в направлении уменьшения свободной энергии и увеличения энтропии. Процессы превращения энергии и совершения работы в закрытой системе будут протекать до тех пор, пока свободная энергия не станет равной нулю, а энтропия максимальной, такое состояние системы называется термодинамическим равновесием.

1 метр	= 10 ³ мм (миллиметров)
	= 10 ⁶ мкм (микрометров)
	= 10 ⁹ нм (нанометров)
	= 10 ¹⁰ Å (ангстрем)

мертвые клетки растений, точнее, сохранившиеся клеточные стенки. Происходило это в 1665 г. в Англии и отнюдь не случайно.

Гук предложил ряд идей, впоследствии развитых его великими современниками. И, тем не менее, основной его труд, принесший ему наибольшую известность – книга «Микрофотография или некоторые физиологические описания мельчайших тел, исследованных при помощи микроскопа», вышедшая в 1665 г. Гук первый дал рисунок ячеистого строения пробки и ввел в оборот термин «клетка», он первый установил клеточное строение некоторых частей растений (стебель репейника, ворсинки папоротника, сердцевина кедра). И, хотя Роберт Гук, в сущности, заложил основу всей современной биологии, и был человеком умным и образованным, многое знал и еще большим интересовался, он не мог глубоко сосредоточиться на изучаемых им явлениях.

Гук бросается на все, что можно поместить под объектив микроскопа, и в результате он накопил огромное количество разнообразных и разрозненных в то время данных, которые он не смог обобщить.

В то же время в Голландии жил другой увлеченный человек, талантливый дилетант, не прошедший никакой «школы», но проводивший свои исследования тщательнее и лучше Гука – Антони ван Левенгук. Все свободное время он посвящал шлифовке линз, как это делали современные ему оптики. Со временем он достиг необыкновенного совершенства, его линзы увеличивали предметы от 40 до 270 раз. Королевское научное общество в Лондоне приняло его в свои члены, а с течением времени Левенгук стал одним из самых знаменитых его членов наряду с Робертом Бойлем и Исааком Ньютоном. К нему приезжал царь России Петр Великий, чтобы лично убедиться в чудесах, открытых простым суконщиком из небольшого голландского городка Дельфта. В Дельфт прибыла и английская королева, пожелавшая посмотреть в чудесные стекляшки микроскопа Левенгука.

Открытие нового микроскопического мира, давшего начало мощному развитию науки, стало возможно благодаря: 1 – созданию новых приборов; 2 – расширению объектов наблюдения; 3 – системности и тщательности наблюдений, т. е. созданием нового метода исследования. Типичным примером ведущей роли методической базы на темпы развития науки является история создания клеточной теории и возникновения на ее основе современной биотехнологии.

Несмотря на чрезвычайно важные открытия, сделанные благодаря микроскопу Гука и увеличительным стеклам Левенгука, – с их помощью можно было увидеть только «очень» крупные клетки, тонкое строение клетки оставалось недоступным для наблюдения.

Основной недостаток этих приборов был связан с оптической aberrацией линз, которая давала настолько расплывчатое изображение, что большинство деталей приходилось домысливать. Это продолжалось довольно долго, пока в 1827 г. итальянскому физику Джованни Батисте Амичи не удалось избавиться от оптической

Роберт Гук (1635-1703). Он был чрезвычайно разносторонним ученым (математиком, минерологом, физиком, астрономом, геологом, биологом). Гук был членом знаменитого Лондонского Королевского Общества, а в 1663 г. (в 28 лет) он был избран секретарем этого общества. Гук открыл вращение Марса, первый обратил внимание на двойные звезды, открыл закон, который назван его именем. Он обладал глубокой интуицией и богатым воображением. К сожалению, он был в крупной ссоре с Исааком Ньютоном, оспаривая корпускулярную теорию света. Он изменил конструкцию микроскопа (первый микроскоп был изобретен Галилеем в 1609-1610 г. г.) и значительно его усовершенствовал. Гук считал себя очень некрасивым и не позволял себя рисовать, его портрет не сохранился.

Антони Ван Левенгук (1632-1723). Родился в Нидерландах, никакого специального образования не получил. Его увлечением, которое он сохранил на всю жизнь, была шлифовка линз и, благодаря своему трудолюбию и таланту, он достиг небывалого мастерства. Лежа на смертном одре в 91 г он просит своего друга перевести свои научные отчеты и отправить их Королевскому научному обществу в Лондон.

Рассматривая капельки речной воды, бродившего вина, крови, мелких насекомых и другие объекты, он открыл никому неизвестный мир микроскопических существ. Левенгук открыл простейшие (1674), бактерии (1676), сперматозоиды (1677), клеточные ядра в красных кровяных тельцах лягушки (1680), паразитирующих жгутиковых (1681) и других микроскопических «противных существ», как он их называл. В 1695 году Левенгук опубликовал книгу «Тайны природы, открытые Антони Левенгуком», в которой он с присущей ему тщательностью и систематичностью (в отличие от Гука) описал свои наблюдения и опыты.

абберации линз. Это техническое решение стимулировало развитие исследований на клеточном уровне. Выдающийся немецкий ботаник Матиас Якоб Шлейден (1804-1881) занялся микроскопическими исследованиями растений. Мрачный и раздражительный характер послужил поводом считать Шлейдена величайшим чудаком XIX века, вместе с тем он был самым трудолюбивым творческим представителем тогдашней науки. Он считал, что в образовании клеток решающая роль принадлежит ядру. Он впервые установил существование ядрышка в ядре (1842). Главный труд Шлейдена «Основы научной ботаники» был опубликован в 1842-1843 г. г. и оказал влияние на реформу морфологии растений на основе онтогенеза. Он доказал, что все живые существа ведут свое происхождение от одной клетки.

Эта работа послужила толчком для Теодора Шванна (1810-1882) заняться длительными и тщательными микроскопическими исследованиями. Шванн был первым ученым, который пришел к выводу, что все животные ткани, все органы, кости и кожа, и даже микроскопические существа состоят из клеток. Ознакомившись с трудами Шлейдена, он пришел к выводу, что животные и растения развиваются на одинаковой основе, и строение клеток у них также одинаковое. И, хотя Шванн сделал много важных открытий, описал оболочку нервных волокон (Шванновская оболочка), открыл пепсин в желудочном соке (1836), его основной труд, принесший ему и Шлейдену широкую известность, был опубликован в 1839 г. и назывался «Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений». Именно эта работа стимулировала морфологический уровень исследований в биологии. В ней была обоснована одна из биологических теорий – клеточная теория. В основу клеточной теории Шванн положил несколько предпосылок: а) растениям и животным свойственно единство строения; б) в основе структуры всех организмов находится клетка; в) образование новых клеток – это принцип органического роста и развития растений и животных; г) клетка является элементарной биологической единицей; д) организм в целом есть сумма образовавших его клеток.

Хотя многие идеи Шлейдена и Шванна относительно строения, функции и происхождения клеток оказались ошибочными, они впервые обобщили многообразный экспериментальный материал, указав на то, что клетки, содержащие ядро, представляют собой структурно-функциональную основу всех живых существ. Именно это легло в основу нового биологического мышления, сосредоточив внимание исследователей на той единственной структуре, которую следует понять, для того, чтобы биология смогла выйти из чисто описательной стадии и перейти в экспериментальную область.

Немного позже клеточная теория была дополнена патологом Рудольфом Вирховым, который в 1855 г. сформулировал известное сегодня положение: «*Omnis cellula a cellula*» – «каждая клетка происходит из клетки», что является перефразированным

Матиас Якоб Шлейден (1804-1881) родился в Гамбурге. В 1824 г. поступил в Гейдельбергский университет и готовился стать адвокатом. Философию и медицину изучал в Геттингенском университете. В 1839 г. в Иенском университете получил степень доктора философии и стал экстраординарным профессором. С 1863 г. профессор фитохимии. Основная научная заслуга Шлейдена в отчетливой постановке вопроса относительно возникновения клеток в организме, а это было принципиально важно в изучении клеточной структуры с позиции развития. Он впервые назвал клетку организмом. Шванн исходил из работ Шлейдена при работе над клеточной теорией.



Теодор Шванн (1810-1882) родился в г. Нейс. После окончания в 1833 г. Боннского университета в 1834-1838 гг. работал ассистентом знаменитого физиолога И. Мюллера (1801-1858). В 1838 г. профессором анатомии в Мзвене (Бельгия). Позже перешел в Льеж, где возглавлял кафедру физиологии. В 1836 г. открыл пепсин, а в 1838 г. описал оболочку нервных волокон (Шванновская оболочка). Разработал клеточную теорию и доказал, что клетки как растений, так и животных принципиально сходны (гомологичны), ибо все они возникают единообразным путем.

выражением: *Omne vivum ex ovo* – «любой живой организм происходит из яйца», которое принадлежит Уильяму Гарвею, впервые обнаружившему циркуляцию крови. Необходимо отметить, что Шванн считал, что клетки образуются путем кристаллизации из аморфной плазмы.

В середине XIX века клеточная теория стала общепризнанной и послужила основой создания новой науки – цитологии, от греческого *kytos* – полость. В 1884 г. Жаном Батистом Карнуа была создан первый научный журнал, посвященный клеточной биологии и названный «*Le cellule*» («Клетка»).

К концу XIX столетия был открыт ряд компонентов клетки. В 1866 г. Геккель установил, что хранение и передачу наследственных признаков осуществляет ядро. В 1880-1883 – открыты хлоропласты, в 1890 – митохондрии, в 1898 – аппарат Гольджи.

Однако исследователи, пытаясь проникнуть в тонкую организацию клетки, вновь столкнулись с новым, казалось непреодолимым препятствием, обусловленным законами физики. Нельзя увидеть структуры, размеры которых меньше половины длины волны света.

Так как в световых микроскопах использовался видимый свет с длиной волны около 0,25 мкм, то это не давало возможности увидеть тонкую организацию клетки. Эта проблема была преодолена благодаря новому техническому решению – использованию в качестве светового потока – потока электронов, и разработкой в 1931 г. Руска с соавторами первого просвечивающего электронного микроскопа. Исследования физиков показали, что с увеличением скорости движения электронов их длина волны уменьшается.

Современный электронный микроскоп с ускоряющим напряжением 100 000 В дает длину волны электрона 0,004 нм. Теоретическое разрешение такого микроскопа составляет около 0,002 нм, однако, учитывая эффекты абберации электронных линз, проблемы приготовления образцов и контрастирования, предел разрешения для биологических тканей составляет около 2 нм (20 Å), а это в 100 раз превышает возможности светового микроскопа. Получение такого разрешения стало возможно благодаря разработке специальных методов приготовления биологических образцов. Пионерская работа в этой области была выполнена Портером, Клаудом и Фуллом (Porter, Claude, Fullam) и опубликована в *Journal of Experimental Medicine* за 1945 г. К 1952 г. Паладе, Портер и Шестранд (Palade, Porter, Sjöstrand) разработали методы фиксации и приготовления тонких срезов для электронной микроскопии.

Это позволило начать всестороннее изучение ультраструктуры клетки. Благодаря успехам электронной микроскопии было установлено, что в протоплазме существует «разделение труда» и, что каждая обособленная структура выполняет свою особую функцию.

Такие ультраструктурные образования были названы оргanelлами, что означает «маленькие органы». Хотя многие органоиды – ядро, хлоропласты, митохондрии, аппарат Гольджи были открыты

Вирхов Рудольф (1821-1902) – выдвинул теорию клеточной патологии, согласно которой патологический процесс – сумма нарушений жизнедеятельности отдельных клеток. Внес большой вклад в понимание роли клеток в физиологических и патологических процессах.



Уильям Гарвей (1578-1657) рано стал членом Лондонской коллегии врачей и был приглашен придворным врачом к Якову I, а потом и к Карлу I. Сочинение об открытии большого круга кровообращения вышло в 1628 г. Много работал в области эмбриологии, им был предвосхищен биогенетический закон и провозглашен принцип «*Всякое живое – из яйца*».

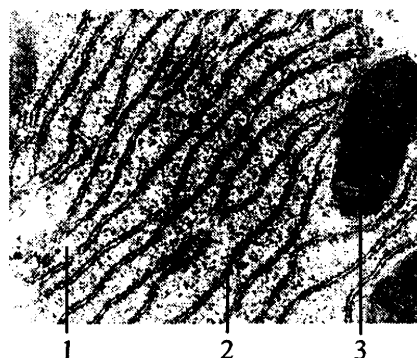


Рис. 51. Фото фрагмента гепатоцита (x 30000).

Видны эндоплазматическая сеть (1), рибосомы (2), митохондрии (3).

до появления электронного микроскопа, их тонкое строение стало известно только с его появлением (рис. 51).

Становление цитологии как науки, изучающей структуру клетки, определялось развитием оптических методов исследования клетки. Однако эти методы еще не позволяют определить молекулярный состав и установить механизмы функционирования органоидов в клетке. Исследование молекулярного состава и функциональных аспектов клетки стало возможным благодаря развитию биохимии. Не останавливаясь на истории развития этой науки, необходимо отметить, что принципиально важным для изучения биологии клетки была разработка методов хроматографии, использование меченых атомов для исследования процессов метаболизма и фракционирование клеточных структур.

Феномен хроматографии основан на различии в скорости движения разных веществ в потоке растекающейся по носителю жидкости. Впервые этот феномен был использован в 1903 г. русским физиологом-биохимиком растений М. С. Цветом для разделения основных пигментов листьев – зеленого и оранжевого. Сейчас существует множество вариантов хроматографии, позволяющих проводить аналитическое разделение большинства известных веществ. Эти методы, наряду с методом электрофореза, произвели подлинный переворот в области химического разделения и анализа биологических структур.

Изучение физиологических процессов в клетке стало возможно с применением метода изотопного мечения. Этот метод сводится к специфическому мечению определенных молекул и позволяет выявлять эти молекулы без нарушения биологической структуры. Наиболее плодотворно этот метод используется при анализе биосинтетических процессов в клетке.

В частности, с получением меченых аминокислот появилась возможность изучать их в составе белков в живом организме.

Широкое распространение этот метод получил с появлением атомных реакторов и производством широкого спектра радиоактивных изотопов. Без указанных методов современные достижения в клеточной и молекулярной биологии были бы невозможны.

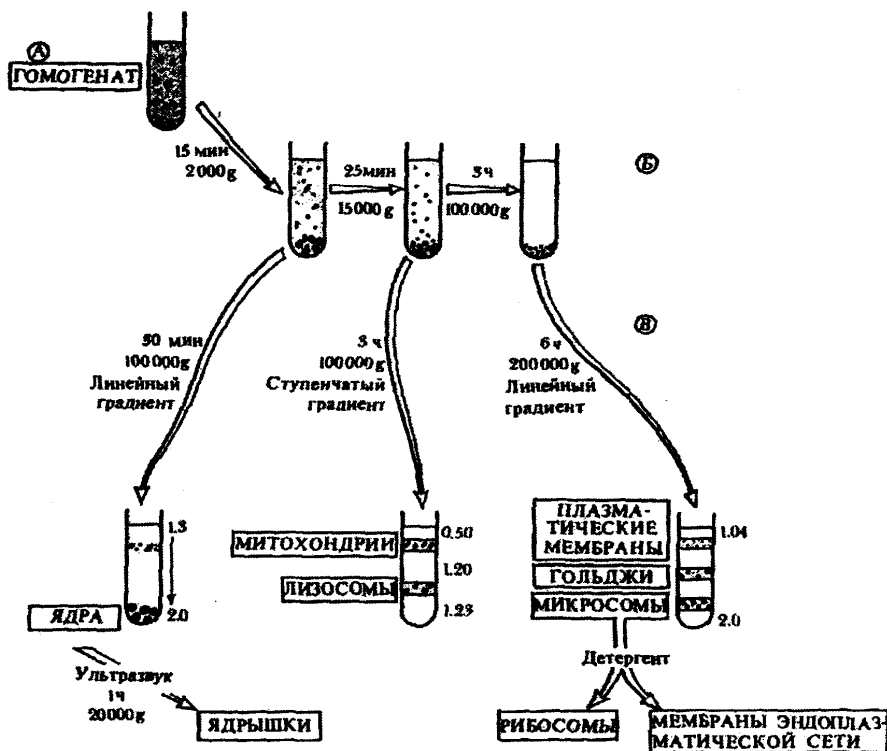


Рис. 52. Упрощенная схема метода дифференциального центрифугирования печени крыс

Гомогенизацию ткани (А) и последующие этапы центрифугирования проводят при температуре 0°C в буферном растворе сахарозы. Растворы с различной молярной концентрацией создают градиент, в котором клеточные органеллы распределяются в соответствии с их плотностью (цифры означают величины молярной концентрации растворов сахарозы).

Б. Разделение фракций посредством центрифугирования с возрастающей скоростью.

В. Очистка фракций при помощи центрифугирования в градиенте плотности.

Однако эти биохимические методы могли быть применены к клетке как объекту исследования только после разделения клетки на отдельные органоиды. Это стало возможным благодаря созданию центрифуг и ультрацентрифу г. В 60-70-х годах XX столетия были разработаны методы фракционирования клеточных структур (рис. 52), что, по сути, позволило объединить элементы цитологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики, направленные на изучение всех аспектов жизнедеятельности на клеточном уровне, в одну отрасль науки – клеточную биологию.

Следовательно, открытие клетки, осуществленное более 300 лет назад, привело к созданию новой отрасли науки – клеточной биологии. Современные взгляды на жизнедеятельность клетки – это общий итог работы многих поколений ученых. Современная интерпретация клеточной теории сводится к трем положениям.

Жизнь существует только в форме клеток. Все организмы состоят из клеток и активность организма определяется активностью составляющих его клеток. Клетка поглощает, превращает и запасает вещества и энергию, в ней осуществляется реализация генетической информации.

Непрерывность жизни (каждая клетка из клетки) обеспечивается точной передачей генетического материала в процессе деления клеток.

В клетке существует зависимость между структурой и функцией – упорядоченное поведение и упорядоченные структуры тесно связаны друг с другом. Все биохимические функции клеток осуществляются в организованных определенным образом структурах, изменение которых приводит к изменению функции и наоборот.

Клетка – структурированная система биополимеров

Клеточная теория констатирует, что клетка является единицей живого. Это означает, что жизни вне клетки не существует, а в самой клетке заключены все свойства, которые обеспечивают все проявления жизни. Из сказанного следует, что только клеточная организация биополимеров способна обеспечить трансформацию веществ, т. е. метаболическую функцию, следствием которой и является проявление роста, развития, адаптации и эволюции. Или, говоря другими словами, биополимеры, организовавшись в структуры, которые мы называем клетками, приобрели способность к саморегуляции, самосборке, самовоспроизводству, т. е. перешагнули в разряд живых. Уникальность клеточной организации заключается в том, что интеграция биополимеров в структуры создала систему, способную к проявлению не отдельных свойств (рост или адаптация), а всех многообразных свойств характерных для живого одновременно, т. е. системно.

Необходимо уточнить, что под саморегуляцией, самосборкой мы понимаем такие свойства, которые проявляются автоматически на основе проявления принципов физики, химии и

Говоря о клеточной теории, французский микробиолог А. Львов (лауреат Нобелевской премии совместно с Ф. Жакобом и Л. Моно (1965) за работы по регуляции синтеза белка) отмечал (1962), что весь живой мир на клеточном уровне обнаруживает единство:

1 – единство строения – каждая клетка содержит ядро и протоплазму;

2 – единство функций – обмен веществ в основном сходен во всех клетках;

3 – единство состава – главные макромолекулы у всех живых существ состоят из одних и тех же малых молекул.

Клетка – это такая динамично структурированная организация биополимеров и молекул воды, пространственно ограниченная мембраной, которая способна к формированию межклеточных ассоциаций и обеспечивает:

1 – трансформацию органических веществ (метаболизм);

2 – обмен веществ, обмен энергией и информацией с окружающей средой;

3 – формирование межклеточных ассоциатов и межклеточных взаимоотношений.

биологии. Необходимо знать, как формируются биологические структуры, каково их разнообразие, какие принципы и законы определяют эти процессы.

Мы достаточно часто используем понятие «структура». Структура – это устойчивые связи объекта, которые обеспечивают ему целостность и тождественность самому себе, а это означает сохранение основных свойств при различных внешних и внутренних изменениях.

Для биологических систем характерна динамичность. Под динамичностью структуры следует понимать такие изменения структуры во времени (направления изменений могут быть различны), которые направлены на уменьшение влияния различных факторов на функционирование системы (вспомним принцип Ле-Шателье).

Несколько сложнее дать определение клетки, так как для клеток характерны как общие, так и специфические свойства. Основываясь на наиболее общих свойствах клетки (идеальной или обобщенной клетки), можно дать такое определение клетки.

Клетка – это такая динамично структурированная организация биополимеров и молекул воды, пространственно ограниченная мембраной, которая способна к формированию межклеточных ассоциаций и обеспечивает трансформацию веществ, обмен энергией и информацией со средой.

В функциональном отношении клетка это: 1 – система, обеспечивающая внутриклеточный метаболизм (трансформацию органических веществ); 2 – система обмена веществ, энергией и информацией со средой, т. е. обеспечение открытости системы; 3 – система, обеспечивающая формирование межклеточных ассоциатов, т. е. образование межклеточных ассоциаций и, как следствие, способность к непрерывным изменениям, направленным на соответствие «требованиям» изменяющихся условий среды или адаптации.

Из изложенного следует, что структура клетки способна не только обеспечивать рост, размножение и адаптацию, она способна специализироваться на выполнении определенных функций, формировать многоклеточные ассоциаты и тем самым обеспечивать бесконечное развитие, при этом всегда оставаться адекватной среде обитания. Можно сказать, что структура клетки является динамичной матрицей жизни.

Размеры клеток варьируют в относительно широких пределах и определяются физико-химическими особенностями, лежащими в основе динамической регуляции метаболизма и обмена веществ со средой и функциональной специализацией клеток.

Разгадка явлений жизни немыслима без знаний принципов структурно-функциональной организации клетки. В этом отношении можно выделить две взаимосвязанные концепции: концепцию межмолекулярных взаимодействий и концепцию метаболизма (рис. 53).

Если первая позволяет понять структурную организацию биополимеров, то вторая – их функциональные особенности. Однако

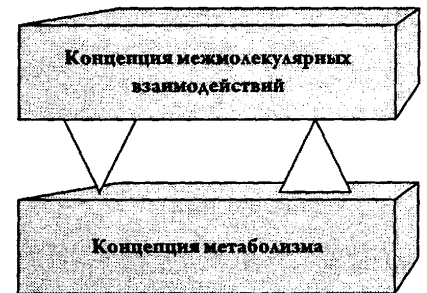


Рис. 53. Клеточный уровень функционирования обеспечивается благодаря единству двух концептуальных основ.

такое разделение оправдано только с позиций анскретности наших понятий, в то время как структура и функция едины, и эти две концепции формируют единство в биологических системах.

Межмолекулярные взаимодействия – это формирование комплексов макромолекул, которые удерживаются системой слабых связей.

Концепция межмолекулярных взаимодействий

Основные понятия

Все клеточные структуры: мембраны, цитоскелет, ядерный матрикс, хроматин, рибосомы, липопротеиды, рибонуклеопротеиды и др. надмолекулярные комплексы формируются в результате межмолекулярных взаимодействий.

Все функциональные процессы в клетке и организме: метаболизм, обмен веществ со средой, формирование межклеточных ассоциатов, функционирование иммунной системы, генетического аппарата и другие процессы также обеспечиваются межмолекулярными взаимодействиями.

Особенности межмолекулярных взаимодействий могут быть объединены в единую концепцию межмолекулярных взаимодействий (рис. 54).

В основе концепции межмолекулярных взаимодействий лежат физико-химические закономерности взаимодействия между макромолекулами. Межмолекулярные взаимодействия обеспечиваются: силами Ван-Дер-Ваальса, электростатическими силами, водородными связями, гидрофобными взаимодействиями.

Реализация физико-химических закономерностей межмолекулярных взаимодействий обеспечивается на основе принципа комплементарности, принципа кооперативности, принципа самосборки, принципа структурно-функциональной взаимосвязи и принципа иерархичности, которые мы рассмотрим в этом разделе.

Все многообразие биологических систем строится из небольшого числа строительных блоков (мономеров). Напомним, что в состав биополимеров входит 20 аминокислот, 2 пуриновых и 3 пиримидиновых основания, несколько моносахаров, несколько жирных кислот, уксусная кислота, глицерин, фосфорная кислота

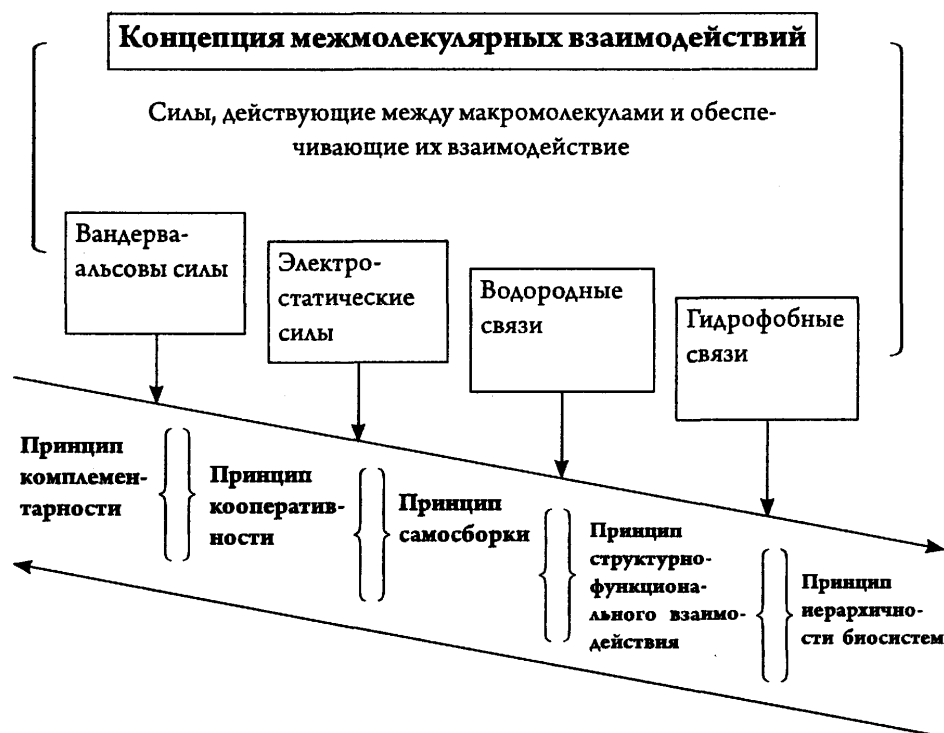


Рис. 54. Схема, демонстрирующая взаимосвязь концепции межмолекулярных взаимодействий и принципов структурной организации клетки. Фигурные стрелки указывают на взаимосвязь между различными принципами, антипараллельность, которой обозначены принципы, отражает то, что их количество не ограничивается пятью и формирует систему или пирамиду принципов.

и относительно небольшое количество ионов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} и др.).

Принцип образования ковалентных связей стал понятен после создания в 20-х годах XX века квантовой теории атома [Н. Бор, 1913]. Скорость химической реакции пропорциональна частоте столкновения между атомами. Однако атомы не просто сталкиваются, они притягиваются друг к другу за счет электростатических сил. Во всех атомах имеются протоны и электроны. Если число протонов в атоме не равно числу электронов, то атом несет электрически некомпенсированный заряд и называется ионом. Так как такой ион несет заряд, то он создает вокруг себя электрическое поле.

Электрическое поле может создаваться и вокруг атомов или молекул, суммарный заряд которых равен нулю, если при этом центры их положительных и отрицательных зарядов не совпадают. Между атомами всегда происходит электрическое взаимодействие, которое сводится к шести возможным типам: ион – ион, ион – постоянный диполь, ион – индуцированный диполь, постоянный диполь – постоянный диполь, постоянный диполь – индуцированный диполь, индуцированный диполь – индуцированный диполь. Силы взаимодействия во всех этих случаях оказываются различными.

Взаимодействуя между собой, атомы образуют молекулы. Для оценки химических связей используют различные характеристики: межатомные расстояния, углы между связями, распределение электронных зарядов. Наиболее четкой характеристикой химической связи является ее прочность.

Потенциальная энергия притяжения (или отталкивания) зарядов изменяется обратно пропорционально расстоянию между ними. Силу притяжения при взаимодействии ион – ион можно рассчитать по закону Кулона.

Образование связи между двумя частицами всегда сопровождается освобождением некоторого количества энергии атомов. Чем прочнее связь, тем большее количество энергии выделяется при ее образовании. Единицей измерения этой энергии принята калория.

Из второго закона термодинамики следует, что при самопроизвольных химических реакциях свободная энергия всегда уменьшается (т. е. ΔG – отрицательна). Когда система достигает равновесия, ее свободная энергия в дальнейшем не изменяется ($\Delta G=0$) и остается минимальной. Или, другими словами, состоянием равновесия для замкнутой системы является такое состояние, при котором ее свободная энергия находится в минимуме.

Так как замкнутая система всегда стремится к равновесию, т. е. к стабильности, этот принцип можно назвать принципом минимальной свободной энергии.

Однако необходимо помнить, что образовавшиеся химические связи могут постоянно разрушаться. Так, повышение температуры (увеличение тепловой энергии) может способствовать разрушению химических связей. Из первого закона термодинамики



Нильс Генрих Бор (1885-1962)

В 1920 г. на средства крупнейшего датского пивовара основал институт теоретической физики в Копенгагене, который сыграл исключительную роль в создании квантовой механики и электродинамики.

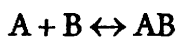
Закон Кулона
 F (сила) = $Q_1 Q_2 / D r^2$, где Q_1 и Q_2 суммарные заряды частиц, D – диэлектрическая постоянная среды, в которой находится частица, r – расстояние между взаимодействующими частицами.

следует, что количество энергии, необходимое для разрушения химической связи, равно количеству энергии, которое выделялось при ее образовании.

Следовательно, каждая химическая связь является результатом действия двух противоположных сил – силы электростатического взаимодействия и силы, направленной на разрушение этих связей. Разрушение химической связи в молекуле приводит к образованию двух атомов



Следовательно, образование молекул и их разрушение является динамичным процессом.



Константа равновесия определяется уравнением:

$$K_f = [AB] / [A], [B]$$

Мера прочности химической связи выражается в литрах на моль (M^{-1}). Чем больше константа образования, тем сильнее взаимодействие. Прочность химической связи характеризуется изменением стандартной свободной энергии (ΔG_0) реакции, чем более она отрицательна (чем она меньше), тем прочнее химическая связь.

Все типы химических связей условно могут быть разделены на прочные (ковалентные) и слабые (не ковалентные) связи.

Макромолекулы формируют ассоциаты на основе слабых связей. Межмолекулярные взаимодействия обеспечиваются слабыми связями: силами Ван-Дер-Ваальса, электростатическими взаимодействиями, водородными связями и гидрофобными взаимодействиями.

Количественными характеристиками суммарного действия всех сил являются константа равновесия, энтальпии и энтропии рассматриваемой системы.

Характеристика слабых связей

Изменение свободной энергии при возникновении ковалентных связей (образование молекул из отдельных атомов) очень велико (G_0 в пределах 50-100 ккал/моль) Из этого следует, что концентрация свободных ионов очень низкая, так как они все будут стремиться к образованию молекул.

Так, если $\Delta G = 100$ ккал/моль, то после достижения равновесия лишь один атом из 10^{40} атомов остается несвязанным в молекулы. Ковалентные связи являются прочными связями. Слабыми являются связи, которые имеют ΔG в пределах 1-7 ккал/моль, т. е. почти в 100 раз менее прочные по сравнению с ковалентными связями.

Наиболее слабыми являются Ван-Дер-Ваальсовы силы, их энергия составляет 1-2 ккал/моль, что незначительно превышает кинетическую энергию теплового движения. Энергия водородной и ионной связи лежит в пределах 3-7 ккал/моль.

Молекулы могут образовывать различные типы слабых связей и стремятся к образованию максимально возможного количества связей.

Свободная энергия (ее обозначают G) означает энергию, которая способна производить работу. К понятию свободной энергии пришли независимо Гиббс и Гельмгольц.

Приращение свободной энергии при постоянной температуре равно $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Это означает, что при постоянной температуре (T), свободная энергия Гиббса ΔG зависит от приращения энтальпии (ΔH) и приращения энтальпии ΔS . Так как в биологических системах объем и давление постоянны, то $\Delta H = \Delta E$.

ΔE – изменение внутренней энергии. Свободная энергия системы будет уменьшаться, если внутренняя энергия системы (ΔH) будет уменьшаться, а энтальпия увеличиваться. Энтальпия есть функция состояния, т. е. способность системы изменяться зависит от ее свойств, а не от ее предыстории.

Понятие **ковалентной связи** было сформулировано в 1916 г. Льюисом. Ковалентная связь возникает между атомами в результате обобществления одной или нескольких пар электронов.

Калория – количество теплоты, термодинамический потенциал (внутренняя энергия, энтальпия, изохорно-изотермический потенциал), теплота фазового превращения, теплота химической реакции.
Кал – 4,186 8 Дж.

Слабые связи настолько непрочны, что они постоянно образуются и разрушаются. Это объясняется тем, что кинетическая энергия теплового движения при 25 °С составляет 0,6 ккал/моль, а самые прочные из слабых связей 7 ккал/моль, т. е. всего лишь в 10 раз больше энергии теплового движения. Из этого следует, что при физиологических температурах всегда существуют условия, обеспечивающие разрушение слабых связей.

Среднее время жизни слабой связи составляет доли секунды – в клетке отсутствуют ферменты, ускоряющие и разрушающие слабые связи, т. е. это определяется физико-химическим процессом.

Несмотря на такую высокую динамичность, слабые связи обеспечивают сохранение структур клетки, и это возможно за счет их количественных характеристик. Более того, именно благодаря высокой динамичности слабых связей, они и обеспечивают саморегуляцию структурных компонентов и высокую адаптивность биологических систем, структурно-функциональное соответствие и такие важные принципы как принцип комплементарности, принцип кооперативности, принцип самоорганизации, принцип структурно-функциональной взаимосвязи. Однако прежде чем мы рассмотрим эти принципы, познакомимся с характеристикой и классификацией слабых связей.

Силы Ван-Дер-Ваальса

Голландский физик Ян Дидерик Ван-дер-Ваальс (1837-1923) установил, что благодаря тому, что молекулы имеют определенные размеры, то при их сближении на определенные расстояния они начинают сильно отталкиваться друг от друга. Так как каждый атом имеет положительно заряженное ядро и отрицательно заряженные электроны, то в том случае, если два атома, не имеющих заряда, находятся на определенном небольшом расстоянии друг от друга, то электроны одного атома будут притягиваться ядром другого атома и удерживаться друг с другом. Эти силы называют силами Ван-Дер-Ваальса, они обеспечивают взаимодействие незаряженных частиц.

Между атомами, не имеющими заряда, может установиться такое расстояние, при котором силы притяжения и отталкивания будут уравновешиваться и это расстояние называется Ван-Дер-Ваальсовым радиусом (табл. 7, рис. 55). Если какие-либо факторы приведут к уменьшению расстояния между атомами, то они начинают отталкиваться. Отталкивание обусловлено взаимопроникновением электронных оболочек взаимодействующих атомов.

Так как заряды ядра атомов экранированы собственными электронами, силы притяжения между двумя атомами (силы Ван-Дер-Ваальса) невелики. В среднем величина энергии силы Ван-Дер-Ваальса около 1 ккал/моль, лишь незначительно превышает энергию теплового движения (0,6 ккал/моль).

Силы Ван-Дер-Ваальса могут возникать как между полярными, так и не полярными молекулами. Ван-Дер-Ваальсовы силы

Время жизни молекулы – это время от момента ее образования (синтеза) из отдельных атомов до момента ее распада на отдельные атомы. Оно определяется комплексом физико-химических условий окружения молекулы.

Некоторые значения Ван-Дер-Ваальсовых радиусов, Å	
элемент	Радиус, Å
H	1,2
N	1,5
O	1,4
P	1,9
S	1,85
Cl	1,8
Se	2,0

Табл. 7. Примеры Ван-Дер-Ваальсовых радиусов в ангстремах (Å) для некоторых химических элементов.

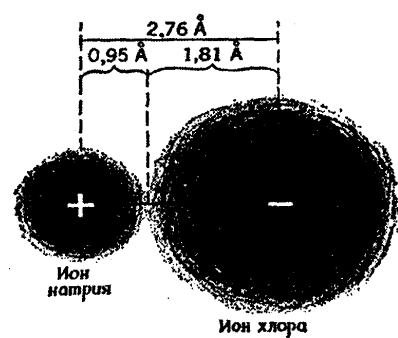


Рис. 55. Расстояние, на которое ион натрия подходит к иону хлора.

при физиологических температурах эффективны только в том случае, если атомы одной молекулы взаимодействуют с большим числом атомов другой молекулы. В таком случае, энергия взаимодействия, обеспечиваемая силами Ван-Дер-Ваальса, может обеспечивать достаточно высокую эффективность взаимодействия. Учитывая то, что эффективность сил Ван-Дер-Ваальса в большей степени зависит от расстояния между атомами, то эти силы играют важную роль в обеспечении так называемых элементарных и других взаимодействий, которые мы рассмотрим в следующем разделе.

Электростатические силы

Как известно, фиксированные положительные и отрицательные заряды притягивают друг друга. Сила взаимодействия в этом случае определяется законом Кулона. Как мы уже отмечали, электрические взаимодействия могут быть разделены на 6 типов. Сила взаимодействия во всех случаях будет различной. Электростатические силы

играют очень важную роль во взаимодействиях между молекулами и, в частности, между группами COO^- и NH_2^+ , которые обеспечивают формирование структуры белков.

Ионы кальция и магния, являясь двухвалентными, способны формировать так называемые «мостики», которые могут соединять две карбонильные или полярные группы (рис. 56).

Важным является то, что в биологических системах электростатические взаимодействия осуществляются в водной среде. В водной среде происходит гидратация ионов, т. е. каждая заряженная частица окружена определенным образом ориентированными молекулами воды. Гидратация ионов оказывает очень сильное влияние на электростатическое взаимодействие молекул в растворе. Она оказывает влияние на свободную энергию гидролиза АТФ, фермент-субстратное взаимодействие и другие важные биологические процессы.

Многие макромолекулы несут разное количество заряженных групп. Так, например, фосфатные группы (PO_3^{2-}) создают отрицательный заряд мононуклеотидов, карбонильная группа (COO^-) и аминогруппа (NH_2^+) обеспечивает заряд аминокислот и белков. Если заряженные группы располагаются близко, то они нейтрализуют друг друга, благодаря электростатическим взаимодействиям. Средняя энергия ионной связи в водных растворах составляет 5 ккал/моль, т. е. в 5 раз прочнее Ван-Дер-Ваальсовых сил.

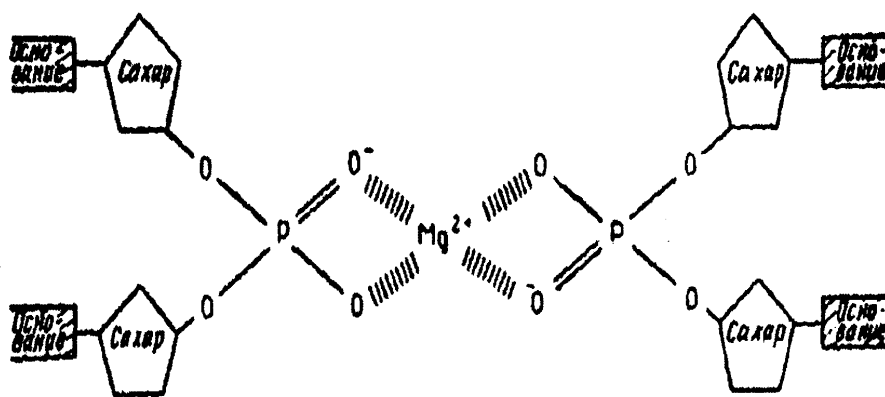


Рис. 56. Схема демонстрирующая как Mg^{2+} образует связь между отрицательно заряженными фосфатными группами.

Водородные связи и структура воды

Водородные связи являются одними из наиболее важных типов связи в формировании структур биомолекул, так как они образуются в больших количествах. Именно они обеспечивают структурную конформацию белков, нуклеиновых кислот и углеводов.

Водородная связь образуется вследствие притяжения ковалентно связанных атомов водорода (обладающих некоторым положительным зарядом) и отрицательно заряженным ковалентно связанным акцептором (кислородом или азотом). Наиболее важными для биологических молекул является водородная связь (H-O) между водородом и кислородом и водородом и азотом (H-N) (рис. 57). В физиологических условиях молекулы воды редко диссоциируют на ионы H^+ и OH^- , чаще они существуют в форме полярных молекул H-O-H. Между атомами водорода и кислорода разных молекул образуются водородные связи. Каждая молекула воды стремится к образованию связи с 4-мя другими молекулами, расположенными в вершинах тетраэдра. Молекулы воды образуют водородные связи не только друг с другом, но и другими полярными группами растворенных соединений, и тем самым они играют исключительно важную роль в структуре макромолекул.

В кристаллах льда молекулы воды ориентированы в пределах гексагональной структуры и сохраняют свободу вращения в разных направлениях (рис. 58). Такая неупорядоченность структуры воды сохраняется даже при низких температурах. Поэтому лед одно из немногих веществ, обладающих даже при абсолютном нуле остаточной энтропией.

В воде структура, формирующаяся за счет водородных связей, непрерывно формируется и распадается, поэтому структуру воды называют мерцающей структурой. Водородные связи весьма динамичны, они легко могут распаться и вновь формироваться, и это обеспечивает динамичность структуры макромолекул и быстрые структурно-функциональные взаимодействия.

Водородные связи обеспечивают не только динамичность биологических структур, они обеспечивают комплементарность поверхности взаимодействующих молекул, играют важную роль в функционировании принципа самосборки биологических структур, принципа кооперативности.

Рассмотрим основные свойства водородной связи.

- энергия водородной связи лежит в пределах 3-7 ккал/моль;

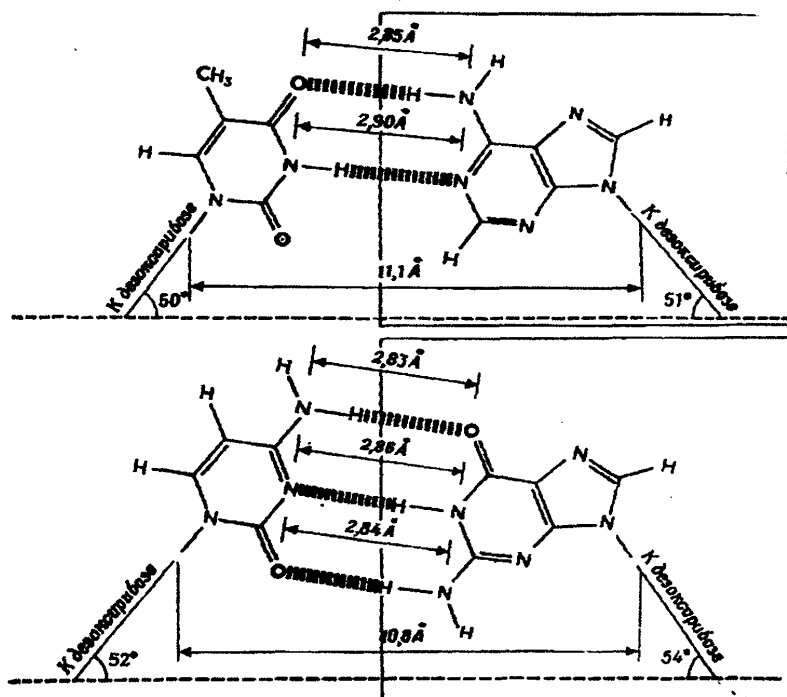


Рис. 57. Водородные связи, которые образуются между аденином и тиминем и между гуанином и цитозином в молекуле ДНК. АТ пары имеют две водородные связи, а ГЦ — три водородные связи, которые и удерживают нити ДНК в виде спирали.

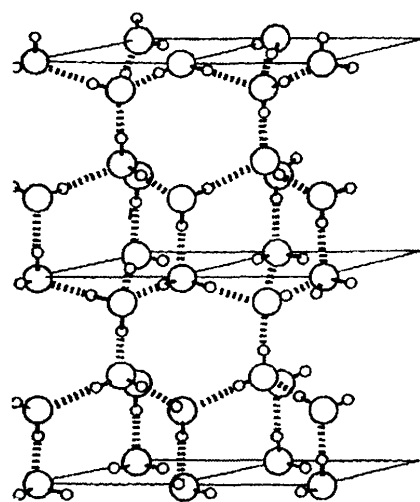


Рис. 58. Расположение молекул воды в кристалле льда. Молекулы воды располагаются в решетке из смежных тетраэдров.

- водородная связь сближает атомы, формирующие эту связь на расстояние, меньшем, чем сумма их Ван-Дер-Ваальсовых радиусов, но большим, чем длина ковалентных связей;
- водородные связи имеют направленный характер (в отличие от вандерваальсовых сил) и прочность их связи зависит от направленности;
- водородные связи более специфичны, чем Ван-Дер-Ваальсовы силы, так как они возникают только тогда, когда в молекуле имеются акцепторные и донорские группы, способные образовывать водородные связи;
- водородные связи могут легко разрушаться, и разрыв водородных связей происходит последовательно, как и диссоциация молекул;
- дейтерий может образовывать такие же связи, как и водород;
- водородные связи играют важную роль в формировании биологических структур, наблюдается тенденция к образованию максимально возможного числа водородных связей. Такие структуры динамично устойчивы;
- способность веществ растворяться в воде обеспечивается их способностью образовывать водородные связи. Органические растворители не способны образовывать водородные связи и не растворимы в воде.

Гидрофобные взаимодействия

Гидрофобные связи – это связи, возникающие между неполярными молекулами (т. е. между незаряженными молекулами с очень низким дипольным моментом) в водной среде. Этот тип связи обеспечивает формирование липидных мицелл, поддержание структуры ДНК, структуры белковых молекул и различные межмолекулярные комплексы.

Каузман указывал, что гидрофобные взаимодействия имеют энтропийную природу. Поясним это на примере. Представим себе, что гидрофобная молекула переводится из органического растворителя (четырёххлористый углерод) в воду. В этом процессе можно выделить две стадии: на первой – в воде образуется «полость», размер которой соответствует размеру растворенной молекулы. Свободная энергия (G) образованной полости велика, так как это сопровождается разрывом большого числа водородных связей.

На второй стадии молекулы воды будут изменять свою ориентацию, «приспосабливаясь» к присутствию неполярной молекулы. Новая ориентация молекул воды будет обусловлена тем, что молекулы будут стремиться к образованию максимально возможного числа вандерваальсовых взаимодействий и водородных связей. В результате такой переориентации число водородных связей может даже увеличиться, так как водородные связи в воде могут образовываться самым разным образом. Структурированность воды еще в большей степени увеличивается при понижении температуры.

Растворимость – максимальное количество вещества, которое может раствориться в данном объеме растворителя.

Для воды характерна сильная способность отталкивать неполярные группы, что ведет к тому, что неполярные группы стремятся так расположиться, чтобы не контактировать с водой и это выражается в том, что они «собираются» вместе. Это принято называть **гидрофобными связями**, т. е. это формирование упорядоченности гидрофобных молекул в водном растворе. Строго говоря, термин гидрофобные связи не верен, так как речь идет не об образовании связей, а, напротив, об их отсутствии. Неполярные группы стремятся ассоциировать – это явление называется **гидрофобным взаимодействием**.

Энтропия – функция состояния термодинамической системы, изменение которой (dS) в равновесном процессе равно отношению количества теплоты (dQ), сообщенного системе или отведенного от нее, к термодинамической температуре (T) системы. Неравновесные процессы в изолированной системе сопровождаются ростом энтропии, они приближают систему к состоянию равновесия, в которой энтропия максимальна. Понятие энтропия введено в 1865 году Р. Клаузиусом.

В большинстве случаев самым важным результатом действия гидрофобных сил является возрастание структурированности воды, окружающей гидрофобные группы.

Уменьшение подвижности молекул воды приводит к уменьшению энтропии, т. е. дает отрицательное значение ΔS . Поскольку $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, член $T\Delta S$ – положителен, изменение свободной энергии при переходе гидрофобной молекулы в воду также является величиной положительной, т. е. такой переход невыгоден с энергетической точки зрения. Этим и объясняется плохая растворимость углеводов (гидрофобных молекул) в воде.

Такая ситуация приводит к тому, что гидрофобные молекулы стремятся образовывать агрегаты в воде. Процесс образования гидрофобных связей можно представить себе как перемещение неполярных частей молекулы из воды в «гидрофобные» области. В результате неполярные части оказываются в непосредственной близости друг от друга, что ведет к росту энтропии раствора. Поэтому говорят, что гидрофобные связи имеют энтропийную природу. Особый интерес представляет пример образования мицелл и мембран на основе бифильных молекул (фосфолипидов). Эти соединения обладают асимметричной структурой, на одном конце которой находится полярная группа, а на другом – гидрофобная часть (рис. 59).

Формирование мицелл (липосом) объясняется гидрофобным эффектом, за счет неполярных углеводородных цепей. На размеры мицелл оказывают влияние электростатические силы отталкивания между соседними полярными группами (рис. 60).

Гидрофобные взаимодействия играют важную роль в структуре ДНК, благодаря так называемым стэкинг-взаимодействиям между соседними парами оснований – вдоль оси молекулы ДНК.

Слабые связи обеспечивают динамичность биологических структур

Благодаря свойствам слабых связей, они обеспечивают биологические системы целым рядом уникальных свойств, характерных только для живых систем. Несмотря на то, что слабые связи являются энергетически слабыми, они могут образовываться в больших количествах и тем самым обеспечивать высокую прочность связей при физиологических температурах.

Слабые связи обеспечивают высокую молекулярную динамичность. Так, молекулы различаются по способности образовывать различные типы слабых связей. А это приводит к тому, что данная молекула будет стремиться к перемещению до тех пор, пока она не образует с другой молекулой максимально возможное количество слабых связей. Все многокомпонентные растворы высокодинамичны, что объясняется возможностью образования большого количества разнообразных связей, а на формирование устойчивых состояний требуется время. И под влиянием теплового движения и химических взаимодействий молекулы меняют свою конфигурацию и формируют новые слабые связи.

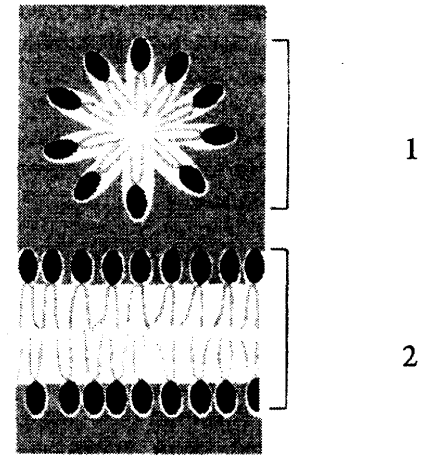


Рис. 59. Схематическое изображение фосфолипидной мицеллы (1) и фосфолипидного бислоя (2). Полярная группа выделена темной головкой, а гидрофобная часть – хвостом.

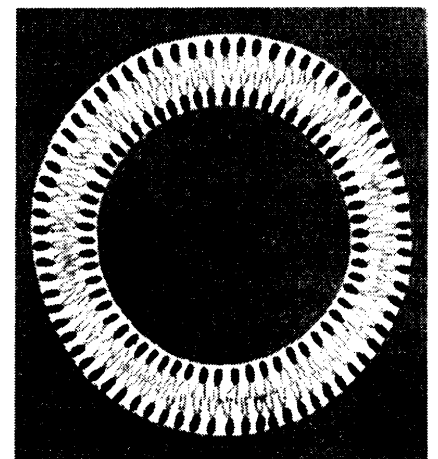


Рис. 60. Схема сферической липосомы в поперечном разрезе. Фосфолипидная молекула самопроизвольно образует подобные структуры в воде.

В процессе метаболизма непрерывно происходят превращения одних веществ в другие, и это сопровождается автоматическим изменением характера слабых связей.

Следовательно, биологические системы высокодинамичны и в обеспечении этой динамики большую роль играют слабые межмолекулярные связи. Благодаря тому, что они являются слабыми, т. е. легко разрушаются, они способны обеспечить динамичность и достаточную прочность при их большом количестве, что и лежит в основе функционирования принципов: комплементарности, кооперативности, самоорганизации, структурно-функциональной взаимосвязи и иерархичности.

Принцип комплементарности

Основные понятия

Как мы уже знаем, биологические структуры формируются благодаря разнообразным межмолекулярным взаимодействиям. Потенциально такие взаимодействия могут происходить между любыми типами макромолекул. Однако надмолекулярные комплексы, функционирующие в биологических системах, высокоспецифичны. Такая высокая специфичность обеспечивается принципом комплементарности.

Межмолекулярные комплексы будут стабильными и функционально активными только в том случае, если количество образующихся слабых связей (прежде всего, водородных) будет достаточным для обеспечения стабильности в водных растворах при физиологических температурах. Это возможно только в том случае, если поверхности (структура) двух молекул будет соответствовать друг другу (рис. 61), т. е. они будут комплементарными.

Итак, такое соответствие поверхностей (структуры) макромолекул, которое обеспечивает им максимально возможное сближение, и удерживается формирующимися слабыми межмолекулярными взаимодействиями, называют комплементарностью.

Комплементарность – это такое структурное соответствие между макромолекулами, которое обеспечивает формирование относительно стабильных надмолекулярных комплексов.

Принцип комплементарности является одним из основных принципов биохимии и означает: две молекулы, поверхности которых комплементарны, стремятся взаимодействовать друг с другом, тогда как молекулы, не содержащие комплементарных поверхностей, не способны формировать относительно стабильные надмолекулярные комплексы.

Так, если на поверхности одной из взаимодействующих молекул имеется «выступ» (например, группа – CH_3), то на комплементарной ей поверхности другой молекулы должно быть углубление; напротив положительного заряда должен быть расположен

Специфическое взаимодействие между ферментом и субстратом обеспечивается благодаря слабым связям. Необходимо отметить, что энергия образования фермент-субстратного комплекса – небольшая, благодаря этому эти комплексы могут быстро образовываться и распадаться под действием беспорядочного теплового движения. Если бы связь между ферментом и субстратом была более прочной, то ферменты не могли бы катализировать реакции перехода с такой скоростью (до 10^6 актов катализа в секунду).

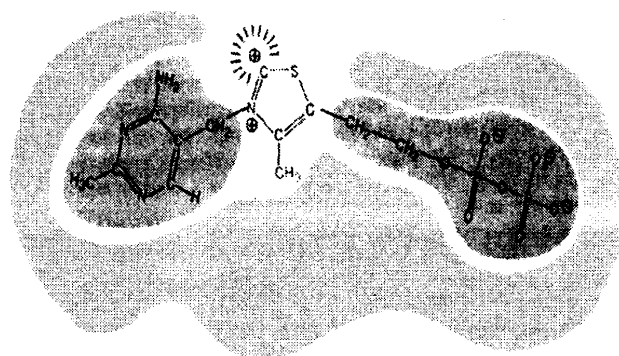


Рис. 61. Соответствие поверхности фермента тиаминпирофосфатазы позволяет удерживать кофермент в правильном положении.

Комплементарность – структурное соответствие между геометрией макромолекул и надмолекулярных комплексов.

отрицательный. Для образования гидрофобных связей неполярные группы должны располагаться одна против другой.

Принцип комплементарности обеспечивает высокую специфичность в образовании и функционировании надмолекулярных комплексов.

Приведем примеры. Механизм передачи наследственной информации (репликации) обеспечивается благодаря принципу комплементарности. Родительская ДНК копируется путем комплементарного спаривания оснований аденина (А) с тимином (Т) (А-Т), гуанина (Г) с цитозином (Ц) (Г-Ц) в виде комплементарной последовательности нуклеотидов (рис. 62). Этот процесс осуществляется путем узнавания каждого нуклеотида ДНК свободным (неполимеризованным) комплементарным нуклеотидом. Для того чтобы этот механизм репликации (удвоения) ДНК мог быть реализован необходимо разделение двух цепей ДНК на одинарные нити (образование репликативной вилки) (рис. 62).

Следовательно, свободные, одиночные нуклеотиды (аденин, тимин, гуанин, цитозин) выстраиваются в определенном порядке (формируют последовательность, которая соответствует последовательности нуклеотидов в матрице – матричный принцип). Во время репликации могут образовываться на короткое время с частотой 10^4 - 10^5 редкие не комплементарные пары всех четырех оснований. Появление таких неправильных пар ведет к появлению мутаций. В эволюции сформировался механизм исправления подобных ошибок (репарация), что и обеспечивает высокую точность копирования генетической информации. На 3×10^9 пар оснований приходится одна ошибка.

Принцип комплементарности лежит и в основе механизма транскрипции (синтеза РНК на ДНК).

Молекула РНК-полимеразы присоединяется к промотору и начинает перемещаться вдоль ДНК-матрицы в направлении $5' \rightarrow 3'$ путем присоединения к матрице по одному нуклеотиду по принципу комплементарности А-У, Г-У. После достижения на участке ДНК терминирующей последовательности РНК-полимераза отделяется от матрицы ДНК. Двойная спираль восстанавливается, при этом образовавшаяся РНК освобождается от матрицы. Принцип комплементарности обеспечивает функционирование и белоксинтезирующего аппарата.

Перенос информации от молекул мРНК к белку осуществляется на основе принципа спаривания комплементарных последовательностей. Рибосома организована так, что она обеспечивает присоединение и движение молекул, мРНК триплет за триплетом так, что нуклеотидная последовательность (транслируется) переводится в соответствующую последовательность аминокислот, в результате создается белковая молекула.

Роль «главных» агентов в процессе трансляции играют молекулы тРНК. Это малые молекулы, которые имеют специфическую структуру и состоят из 60-90 нуклеотидов (рис. 63). Достаточно сложная структура тРНК поддерживается комплементарным взаимодействием определенной части нуклеотидов (рис. 63).

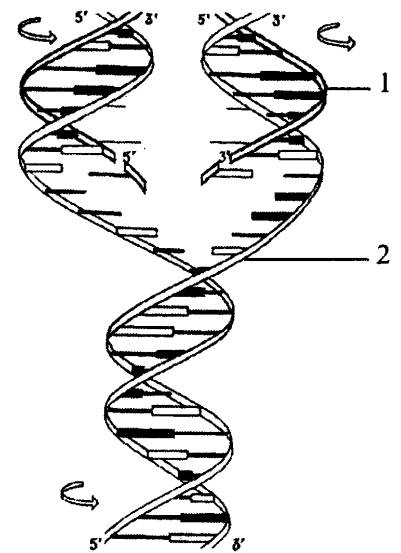


Рис. 62. Модель репликативной вилки.

1 – родительская, 2 – дочерняя цепи

Коррекция ошибок (репарация) возможна благодаря особым свойствам ДНК-полимеразы. ДНК-полимераза не способна продолжить синтез ДНК,

Т Т Т Т

||| |

А А А А ДНК-полимераза не способна к дальнейшему синтезу, если 3-ОН конец последнего нуклеотида не спарен с матрицей. Когда ДНК-полимераза встречается с такой ситуацией, она отщепляет (путем гидролиза, она обладает $3' \rightarrow 5'$ – экзонуклеазной активностью) такой неспаренный нуклеотид. ДНК-полимераза отщепляет столько нуклеотидов, сколько требуется для того, чтобы у затравки появился спаренный конец. Благодаря тому, что ДНК-полимераза способна продолжить синтез только при наличии свободных $3'$ -ОН конца у спаренного с матрицей нуклеотида и благодаря наличию у нее $3' \rightarrow 5'$ – экзонуклеазной активности, она способна к «самоконтролю». Это уникальная система контроля точности репликации. Интересно то, что РНК-полимераза не обладает подобным самоконтролируемым свойством. В РНК-транскриптах допускается достаточно большое число ошибок. Ошибки при транскрипции, как и при трансляции, встречаются с частотой 10^{-4} .

В процессе синтеза белка соответствующий триплет мРНК связывает только тот антикодон соответствующей тРНК, который комплементарен кодону (рис. 63). Способность клетки сохранять высокую структурную упорядоченность обеспечивается благодаря функционированию генетической системы. Для простоты понимания этого единого процесса его делят на ряд стадий: репликации, транскрипции и трансляции. Все эти процессы способны функционировать благодаря принципу комплементарности, он же, в свою очередь, «обязан» слабым химическим связям.

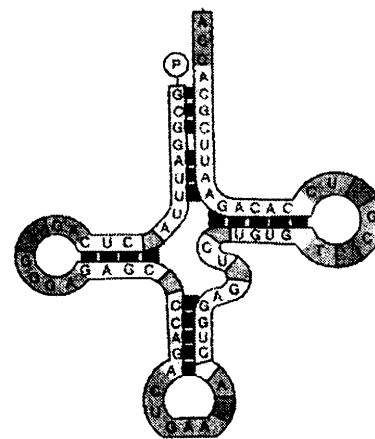
Именно это обеспечивает достаточную прочность, необходимую лабильность и динамичность. В качестве точности и высокой лабильности можно привести пример эффективности работы рибосомы: за 1 сек одна бактериальная рибосома обеспечивает присоединение 20 аминокислот.

Все процессы надмолекулярных комплексов реализации генетической информации одномерны: в каждом из них информация, заключенная в линейной последовательности нуклеотидов, используется для образования линейных последовательностей нуклеотидов (РНК) и аминокислот (белка). В этом отношении генетические события проще для понимания и они изучены гораздо лучше, чем другие процессы метаболизма, которые характеризуются сложной многомерной пространственной организацией. Об этих сложных процессах мы знаем гораздо меньше.

Ферментативный катализ является одним из характерных свойств биологических систем. Именно ферментативный катализ обеспечивает временную регуляцию метаболизма. В образовании фермент-субстратного комплекса важную роль также играет принцип комплементарности. Наличие комплементарности между активным центром и субстратом обеспечивает образование комплекса и протекание ферментативной реакции. Высокая гибкость белков (ферментов) и изменения субстрата легко изменяют конформацию комплекса, что ведет к «нарушению» принципа комплементарности и освобождению фермента от субстрата. Это пример функционирования еще одного фундаментального биологического принципа – принципа структурно-функциональной взаимосвязи (с этим принципом познакомимся позже).

Для объяснения высокой специфичности фермент-субстратного взаимодействия в свое время была высказана гипотеза «замка и ключа». Согласно этой гипотезе для осуществления ферментативной реакции необходимо такое тесное структурное соответствие между субстратом и активным центром фермента, как между ключом и замком. Экспериментально было показано, что это действительно так. Однако оказалось, что связывание фермента с необходимым субстратом часто индуцирует дополнительные конформационные изменения фермента так, что фермент как бы «укладывается» вокруг субстрата, обеспечивая тем самым более точное соответствие и, следовательно, формирование максимально возможного количества слабых связей и реализации принципа комплементарности.

ОН Акцепторный
конец



антикодон

Рис. 63. Модель фенилаланиновой тРНК дрожжей. Взаимно комплементарные участки нуклеотидов формируют водородные связи, которые обеспечивают структурные особенности молекулы.

Стереоспецифичность – объемная или пространственная специфичность биологических структур.

Под **узнаванием** будем понимать формирование устойчивых связей после встречи молекул или надмолекулярных комплексов.

Под **структурированностью** воды – следует понимать реализованную способность молекул воды формировать структуры типа тетраэдров, которые удерживаются водородными связями.

Следовательно, принцип комплементарности в данном случае обеспечивает дополнительное «индуцированное соответствие» фермент-субстратного комплекса.

Исследование механизма действия ферментов показало, что молекулы фермента способны безошибочно различать правую и левую сторону молекулы субстрата, т. е. отличать один атом водорода из пары, входящей в CH_2 -группу. Стереоспецифичность ферментов является следствием комплементарности поверхностей фермента и субстрата. Эти примеры убедительно свидетельствуют о чрезвычайно важной роли принципа комплементарности в функционировании молекулярных процессов биологических систем.

Образующиеся белок-белковые взаимодействия (например, олигомеры гемоглобина или комплекс трипсин-белковый ингибитор трипсина) становятся возможными благодаря комплементарности их поверхностей, что обеспечивает образование максимального количества водородных и ионных связей. Принцип комплементарности обеспечивает взаимное распознавание белков.

Итак, принцип комплементарности является одним из основных принципов биологии – он обеспечивает высокую специфичность в формировании различных надмолекулярных комплексов; играет важную роль в реализации механизмов молекулярного узнавания.

Факторы, определяющие молекулярное узнавание

Тепловое движение обеспечивает отбор комплементарно связанных молекул

Геометрическое соответствие молекул не может быть реализовано само по себе, оно осуществляется под влиянием комплекса факторов, обеспечивающих «встречу» комплементарных компонентов. Рассмотрим некоторые факторы, обеспечивающие молекулярное узнавание.

Молекулы воды формируют, благодаря водородным связям, структуру воды (рис. 58). Если в область, состоящую из структурированной воды, попадает гидрофобная молекула (молекула липида), которая нарушает структуру воды, то вода стремится вытолкнуть гидрофобную молекулу. Такое действие воды по отношению к гидрофобным молекулам приводит к упорядочению гидрофобных молекул и обеспечивает вероятность встречи комплементарных молекул. Этот фактор молекулярного узнавания можно назвать поддержанием структурированности молекул воды в биологических системах.

Следующим фактором, влияющим на молекулярное узнавание, является явление диффузии. Комплементарное взаимодействие может быть реализовано только в том случае, если эти молекулы пришли в соприкосновение, чему и способствует диффузия.

Все свободные молекулы в клетке осуществляют диффузию. Диффузия – это случайное блуждание молекул в растворе. Оно осуществляется благодаря тепловому движению. Сталкаясь с

Диффузия – случайное, хаотическое движение молекул в растворе, которое осуществляется благодаря энергии теплового движения.

Определение коэффициента диффузии небольших молекул в растворителях осуществляют по уравнению Уилки-Чанга:

$$D = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{T(\text{Хам})^{1/2}}{\mu \text{Vm}^{0,6}} \text{см}^2 \cdot \text{с}$$

где m – лин. масса растворителя;
 Vm – молекулярный объем растворителя при нормальной температуре его кипения, $\text{см}^3/\text{гмоль}$;
 μ – вязкость жидкости, сП;
 Ха – коэффициент ассоциации растворителя, для воды он равен 2,6.
Коэффициент диффузии зависит от ионной силы, концентрации растворенных веществ, влияющих на вязкость раствора и от присутствия в растворе клеток. Так, было показано, что в процессе увеличения времени культивирования микроорганизмов коэффициент диффузии O_2 уменьшается по сравнению с чистой водой в 5-20 раз. Такое изменение проникновения кислорода к клеткам может угнетать их дальнейший рост в культуре.

другими случайными молекулами, они отталкивают друг друга и продолжают двигаться уже в других направлениях до тех пор, пока не столкнутся с комплементарными поверхностями других молекул, что приведет к образованию надмолекулярных комплексов.

Исследование процесса диффузии показало, что среднее расстояние, пройденное молекулой пропорционально квадрату корня времени, т. е. если перемещение молекулы на 1 мкм осуществляется за 1 с, то перемещение на 2 мкм потребует 4 с. Следовательно, диффузия – это эффективный способ перемещения молекул на большие расстояния. Так, было показано, что АТФ перемещается на 10 мкм за 0,2 с. Необходимо напомнить, что 10 мкм – это диаметр небольшой клетки. Хотя крупные молекулы (макромолекулы) перемещаются медленнее, они сталкиваются с другими молекулами чаще, чем мелкие, однако и для них это эффективный способ молекулярного узнавания.

Если в процессе столкновения встретились молекулы с комплементарными поверхностями, то они образуют комплекс. Комплексы могут образовываться немедленно, т. е. одновременно или для этого потребуются время, которое необходимо на некоторую подгонку (изменение) структур, обеспечивающих полное комплементарное взаимодействие. Кроме того, взаимодействия могут быть случайными и неустойчивыми. В биологических системах существует удивительно простая и эффективная система отбора стабильных и нестабильных комплексов. Такой системой отбора является тепловое движение, которое связано с выделением тепла в процессе метаболизма, т. е. выделяемое тепло выполняет работу по поддержанию принципа комплементарности.

Если связи, т. е. их энергия образования (константа сродства или константа равновесия) между молекулами слабее, чем энергия теплового движения, то они распадаются.

Следовательно, специфичность или комплементарность взаимодействия молекул может зависеть от хаотического теплового движения и других случайных факторов.

<p>Самосборка – это спонтанный упорядоченный процесс объединения в единые биологические структуры. Он определяется законами слабых молекулярных взаимодействий.</p>
--

Принцип самосборки биологических структур

Силы, обеспечивающие самосборку молекул в структурах

Как мы уже отмечали, клетка – это динамическая структурная организация биополимеров и воды. Четыре биополимера формируют различные специализированные структуры: рибосомы, мембраны, микрофиламенты, микротрубочки, и т. д.

Нам хорошо известно, что все существующие надмолекулярные структуры не синтезируются в виде целых гигантских молекул или структур. Они собираются из отдельных макромолекул в результате нековалентных, слабых взаимодействий или агрегаций. Как осуществляется такой процесс сборки, или формирования надмолекулярных структур, долгие годы оставалось неясным, до тех пор пока не был изучен процесс сборки бактериофагов (рис. 7).

Прежде чем мы рассмотрим возможные механизмы самоорганизации, остановимся на некоторых особенностях структурной организации биологических систем.

Организация биомолекул и биологических структур на основе отдельных субъединиц или мономеров является одним из фундаментальных свойств биологических систем, которое можно определить как принцип структурной иерархии (рис. 64). Сам принцип иерархии мы рассмотрим позднее, а сейчас отметим преимущества сборки структур из отдельных субъединиц.

При образовании биологических структур из отдельных субъединиц: 1 – требуется меньше генетической информации (так как многие молекулы повторяются); 2 – такая сборка может регулироваться, так как она обеспечивается огромным количеством слабых межмолекулярных связей и обеспечивает структурно-функциональную взаимосвязь этих надмолекулярных структур (принцип структурно-функциональной взаимосвязи будет рассмотрен дальше); 3 – сборка структур из субъединиц позволяет сводить к минимуму количество ошибок, возникающих в процессе сборки, так как в процессе сборки могут устраняться измененные по каким-либо причинам субъединицы, а не вся гигантская структура.

Итак, биологические структуры строятся из отдельных однотипных или различных субъединиц. Этот процесс назван самосборкой, или самоорганизацией, и обеспечивается теми же слабыми межмолекулярными взаимодействиями.

Интенсивные исследования структуры белков в 50-60-х годах XX века [Pauling, Corey, 1950; Porter, 1962; Schechman, 1963] показали, что некоторые полипептидные цепи склонны к спонтанной упорядоченности, которая приводит к формированию геометрически упорядоченных форм. Именно тогда возник вопрос об определении термина этого явления. В 1963 г. было предложено несколько терминов для определения этого явления – «агрегация», «ассоциация», «полимеризация», однако наиболее удачным, и

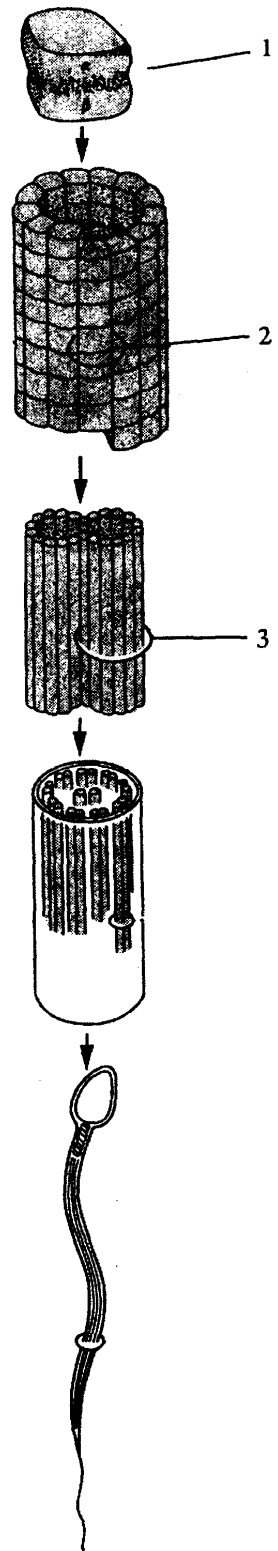


Рис. 64. Схема иерархичности формирования надмолекулярных комплексов на примере сборки аксонемы. Тубулиновый димер (1) формирует микротрубочки (2), которые собираются в дуплет (3), комплекс которого формирует аксонему (хвостовую часть спермия).

отражающим суть этого явления оказался термин «самосборка». Иногда используют термин «самоорганизация», однако это менее удачно, ибо организация гораздо шире «сборки».

Итак, самосборка – это спонтанный упорядоченный процесс объединения субъединиц в единые биологические структуры.

В процессе самосборки участвуют все те же слабые взаимодействия: электростатическое взаимодействие, водородные связи, гидрофобные взаимодействия, Ван-Дер-Ваальсовы силы. В некоторых случаях в процессе самосборки могут участвовать и ковалентные связи типа дисульфидных и тиоэфирных связей. Упорядочение процесса самосборки обеспечивается функционированием принципа комплементарности. Он обеспечивает стерическую комплементарность поверхностей субъединиц. При образовании всех возможных слабых связей в надмолекулярных комплексах обеспечивается эффект аддитивности (суммирования), т. е. обеспечение максимальной стабильности и термодинамической устойчивости комплексов.

Некоторые особенности самосборки биологических структур

Так как каждая молекула имеет характерную только для нее форму, то она может образовывать комплементарные взаимодействия и достаточное количество водородных связей только с определенными молекулами. Комплементарность обеспечивает сильные вторичные взаимодействия и аддитивный эффект.

Таким образом, если центры связывания белка комплементарны другому участку на своей поверхности, то это приведет к образованию цепи субъединиц. При определенных взаимных ориентировках образующиеся цепи субъединиц могут замыкаться в кольца или спирали. Таким примером может служить актиновая нить. Она состоит из двух обвитых одна вокруг другой спиральных цепей, собранных из глобулярного белка – актина.

Образование замкнутых структур таких как кольца, трубки или сферические частицы обеспечивают дополнительную стабилизацию комплексов. Такие стабильные оболочки образуются при сборке вирусных частиц, которые состоят из сотен идентичных белковых субъединиц, окружающих нуклеиновую кислоту вируса (рис. 7).

Многие клеточные структуры состоят из большого количества разных белков, а также разных типов молекул (нуклеиновых кислот и белков и т. д.). Рибосомы бактерий состоят из белковых молекул трех типов рРНК. Существуют данные, что информация о сборке многих из этих сложных комплексов содержится в самих макромолекулах. В пользу этого свидетельствует то, что в соответствующих условиях изолированные субъединицы могут самопроизвольно собираться в необходимые структуры.

В некоторых случаях процесс самосборки достаточно сложен и сопровождается образованием так называемых промежуточных структур, которые определяют дальнейший процесс образования

Процесс самосборки может быть обратимым. В качестве примера можно вспомнить агрегацию молекул гемоглобина.

Молекула гемоглобина состоит из 2 α цепей и 2 β цепей. Если в раствор добавить мочевины (разрушающую слабые связи), то молекула распадается на 2 субъединицы. Удаление мочевины вновь приводит к объединению субъединиц в один ансамбль.

Гидролитические ферменты – группа ферментов, катализирующих реакции гидролиза (расщепления) макромолекул на мономеры.

структур. Так происходит самосборка вируса табачной мозаики. Такими промежуточными структурами являются двойные белковые кольца, которые присоединяются к растущей оболочке вируса.

Сборка рибосом происходит упорядоченно. На первом этапе сборки с рРНК соединяются определенные белки, только после этого другие типы белков узнают образовавшиеся комплексы и так последовательно идет формирование полной структуры рибосом.

В настоящее время показано, что существует еще один способ самосборки, который основывается на использовании матриц или шаблонов. В таком случае информация для сборки субчастиц заключена в ферментах или других молекулах, выполняющих функцию матриц.

Сборка таких сложных структур как митохондрии, реснички, аппарат Гольджи и других управляется во времени и пространстве с помощью других компонентов, и включает в себя стадии необратимого созревания, которое обеспечивается гидролитическими ферментами.

Процесс самосборки клеточных структур является фундаментальным принципом структурной организации и функциональной активности биологических систем. Многие особенности и механизмы самосборки остаются неясными, и эта область исследований активно развивается, ибо этот принцип лежит в основе биогенеза – образования биологических структур. Можно утверждать, что самосборка клеточных структур подчиняется законам термодинамики и обеспечивает высокую специфичность, характерную для биологических систем.

Принцип структурно-функциональной взаимосвязи

Как мы уже отмечали, наиболее характерным свойством биологических систем является их способность к метаболизму, который обеспечивает проявление таких свойств как рост, размножение, адаптация, развитие, старение и способность к эволюционным изменениям. Способность реализовывать эти биологические свойства возможна только при условии саморегуляции или самонастройки метаболических циклов согласно требованиям «среды».

Одним из принципов саморегуляции является принцип структурно-функциональной взаимосвязи. Под структурно-функциональной взаимосвязью следует понимать диалектическую взаимосвязь между структурой и активностью, это означает, что изменение структуры биологически активных молекул всегда сопровождается изменением их функциональной активности. С другой стороны, функциональные нагрузки на биологическую систему сопровождаются изменением в структуре биологических макромолекул.

Принцип структурно-функциональной взаимосвязи является общебиологическим, он проявляется на различных уровнях

Биогенез – образование органических соединений живыми системами.

Биогенез – эмпирическое обобщение, которое утверждает, что все живое происходит от живого.

Функция – исполнение, осуществление, внешнее проявление свойств какого-либо объекта.

биологической организации, от молекулярного до организменного и даже популяционного. В этом разделе мы рассмотрим только молекулярный аспект этого принципа.

Структура – общее базовое понятие. Его используют для характеристики очень разных систем и образований. Структура (от латинского *structura* – строение, расположение или порядок), означает совокупность устойчивых связей объекта, которая обеспечивает его целостность и тождественность самому себе при различных внешних условиях.

Одним из самых важных и фундаментальных свойств молекул является их способность изменять свои структурные характеристики в ответ на изменение окружения. Такая динамичность молекул лежит в основе таких фундаментальных свойств биологических систем как способность к адаптации и системы регуляции функций. Необходимо отметить, что способность к динамичным изменениям структуры зависит от состава макромолекул. Так, молекулы мочевины или аминокислоты имеют гораздо меньшую вариабельность в изменении своей структуры по сравнению с белками, которые имеют несколько структурных уровней организации (рис. 65).

Структура молекул будет определяться различиями в конфигурации (расположением ковалентно связанных атомов в пространстве), конформации (ориентацией различных групп молекул в пространстве, которое обусловлено их вращением вокруг одинарных связей), изменением валентных углов и длины связей.

Остановимся на некоторых примерах. Так, длиной связи является расстояние между ядрами связанных атомов.

C–C связь имеет длину 0,154 нм (1,5 Å); C–H равна 0,109 нм. Длина двойной связи C=C на 0,020 нм короче одинарной связи. При наличии явления резонанса связь становится двойной лишь частично, ее длина становится промежуточной. Изменение длины связей в «больших» молекулах имеет большое значение в формировании структуры, что влияет на функцию этих макромолекул. Так, карбоксильные группы (COOH) полиакриловой кислоты в щелочной среде подвергаются ионизации (COO⁻) и цепочка отрицательно заряженных групп частично отталкивается, и тем самым удлиняя нить полиакриловой кислоты. Если среду, в которой содержится эта кислота, подкислить, то COO⁻, H⁺ восстанавливается в COOH и тогда молекула уменьшит свою длину. Об эффекте таких сокращений свидетельствуют результаты создания искусственной мышцы (сокращается в результате последовательных изменений pH среды), которая способна поднимать груз до 50 кг.

Для описания конфигурации атомов в молекуле в 1956 г. Кан, Ингальд и Прелог предложили способ описания хирального центра. Обычно этот способ применяют, когда не установлено к какой конфигурации D- или L- относится молекула. Согласно этому способу четыре группы, которые окружают атом углерода (или другой центральный атом) располагаются в порядке

Структура – строение, расположение или порядок, означает совокупность устойчивых связей объекта, которая обеспечивает его целостность и тождественность самому себе при различных внешних условиях.

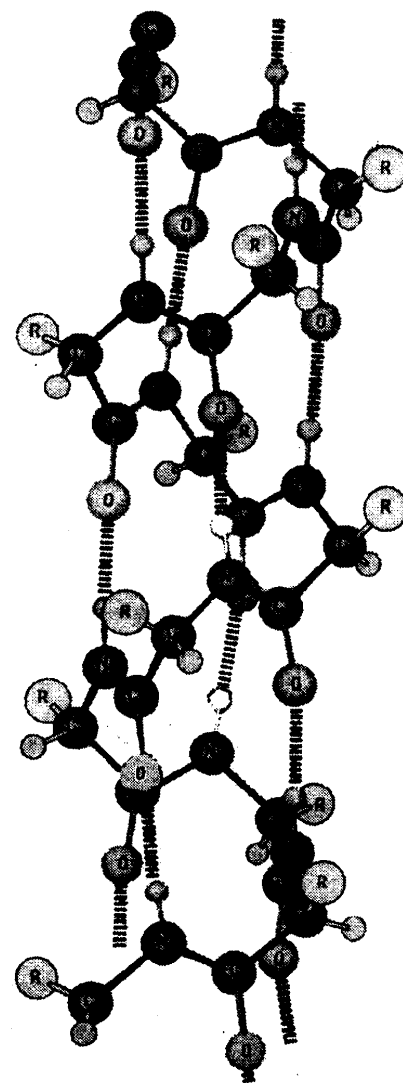


Рис. 65. Модель α -спирали белка вторичной структуры, которая была предложена Полингом и Кори. 3 аминокислоты формируют один виток спирали. Все – C=O- и –NH- группы образуют водородные связи.

приоритета. Приоритет устанавливается из правила: больший атомный номер становится перед меньшим. В таком случае последовательность групп может располагаться как по часовой стрелке, так и против.

Для функционирования биологических систем большое значение в структурной организации играет конформация, и мы рассмотрим это на примере белков.

Белок – это цепочка аминокислот, которые связаны между собой пептидной связью. Наиболее распространена в белках транс-пептидная связь (рис. 66). В белках могут встречаться и цис-пептидные связи, однако они менее устойчивы, примерно на 8 кДж. моль⁻¹.

Конформация аминокислотного звена в белке определяется торсионными углами относительно каждой из упомянутых одинарных связей (рис. 66). Эти углы обозначаются как α и ψ . Торсионные углы могут изменяться, поэтому белки могут принимать различные конформации. Однако, некоторые конформации стерически невозможны.

Как известно, при формировании структуры белков образуется максимально возможное число водородных связей между C=O и N–H группами. Как известно, полипептидные цепи могут укладываться параллельно, и тогда это так называемая складчатая β -структура, а водородные связи образуются между цепями (рис. 67). Необходимо отметить, что торсионные углы α и ψ в таком случае = 180°.

В том случае, когда оба торсионные угла, α и ψ около 60°, то область углов соответствует спиральной структуре, которая стабилизирована внутрицепочечными водородными связями. Такая структура была названа α -спиралью. Структура α -спирали была предложена Л. Полингом (рис. 65).

Большинство белков имеют более сложную конформацию по сравнению с фибриллярными белками. Первым белком, для которого была установлена полная трехмерная структура (методом рентгеноструктурного анализа) был миоглобин, кислородсвязывающий белок, 153 аминокислотных остатка миоглобина распределены по 8-ми α -спиральным участкам разной длины. Спиральные участки расположены в пространстве нерегулярно. Пространства между спиральными стержнями заполнены боковыми цепями аминокислот, имеющих гидрофобную природу. Большинство полярных боковых цепей выступают из спирали наружу, в водную среду. Если в пространстве молекулы имеется свободное пространство, то оно заполняется водой.

Мы привели пример структурной организации миоглобина для того, чтобы представить себе достаточно сложную пространственную организацию белков и роль в этой структуре слабых связей и воды.

Без слабых связей не могла бы поддерживаться структура таких больших молекул, с одной стороны, а с другой стороны, слабые связи обеспечивают высокий динамизм структуры этих молекул. Практически любые изменения физико-химических условий

Конформация – (форма, расположение) различные пространственные формы, которые принимают молекулы при свободном вращении отдельных фрагментов молекул вокруг простых связей.

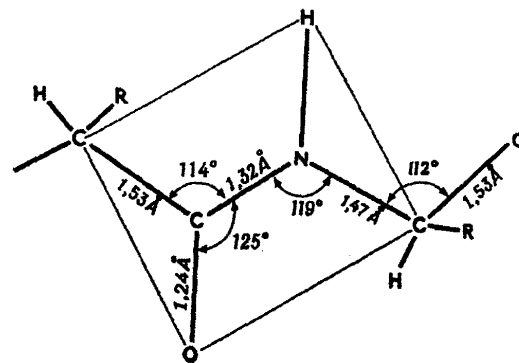


Рис. 66. Амидная группа полипептидной цепи. Амидная связь имеет транс-конфигурацию: два асимметричных атома углерода располагаются в противоположных углах амидной группы.

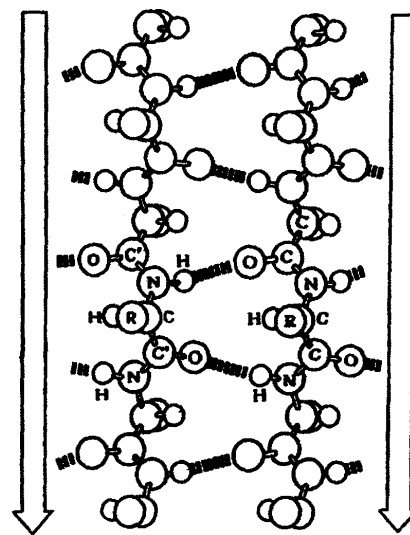


Рис. 67. Складчатый слой с параллельным расположением полипептидных цепей.

окружения молекул (рН среды, температура, концентрации ионов и т. д.), связь лигандов с молекулами неизбежно будет сопровождаться изменением конформации, а в конечном итоге – структуры молекул.

Изменение структуры молекул всегда сопровождается функциональными изменениями этих молекул, т. е. имеет место принцип структурно-функциональной взаимосвязи. Этот принцип и обеспечивает функционирование механизма адаптации и саморегуляции биологических систем. Приведем несколько примеров взаимосвязи структуры и функции в биомолекулах.

Если соседние аминокислоты в полипептидной цепи будут взаимодействовать, то это может привести к изменению в реакционноспособных цепях аминокислот. Следовательно, конформационные изменения ведут к изменению функций этих белков. Как могут реализовываться эти изменения? В некоторых случаях это может выражаться в том, что взаимодействие в белковых цепях белка приведет к ограничению доступа воды к другим участкам белка, а это, в свою очередь, будет приводить к увеличению прочности водородных связей между лигандами и ферментом, так как может уменьшиться конкуренция связывания.

В других случаях, соседние полярные аминокислоты могут образовывать кластеры, а это приведет к изменению реакционной способности боковых цепей. Так, например, полипептидная цепь, под влиянием факторов, изменяющих ее конформацию, может свернуться так, что сблизит ряд отрицательно заряженных аминокислот, несмотря на их взаимное отталкивание. Если такое происходит, то возрастает сродство каждой из боковых групп к положительно заряженному иону.

Следовательно, даже незначительные изменения конформации белков могут привести к резкому изменению ее химических свойств.

Конформационные изменения – это, по сути, перестройка водородных связей и гидрофобных взаимодействий между боковыми группами молекулы. Молекула принимает одну из наиболее энергетически выгодных конформаций в данных условиях. Не исключен вариант перехода в другие конформационные состояния с почти такой же энергией (т. е. близкой к энергетически выгодной).

Высокая динамичность структурных состояний макромолекул обеспечивает и функционирование клеточной сигнализации. Как известно, аллостерические ферменты (регулирующие свою активность по принципу обратной связи) имеют, по меньшей мере, два центра связывания. Один из них связывает субстрат, а другой – лиганд, регулирующий активность фермента. Эти центры находятся на разных участках молекулы. Но связывание одного лиганда с ферментом приведет к изменению его конформации, и тем самым изменит связывающую способность для субстрата или другого лиганда (рис. 68).

Следовательно, макромолекулы могут беспрепятственно переходить из одного конформационного состояния в другое и, тем самым, динамично изменять свою функциональную активность.

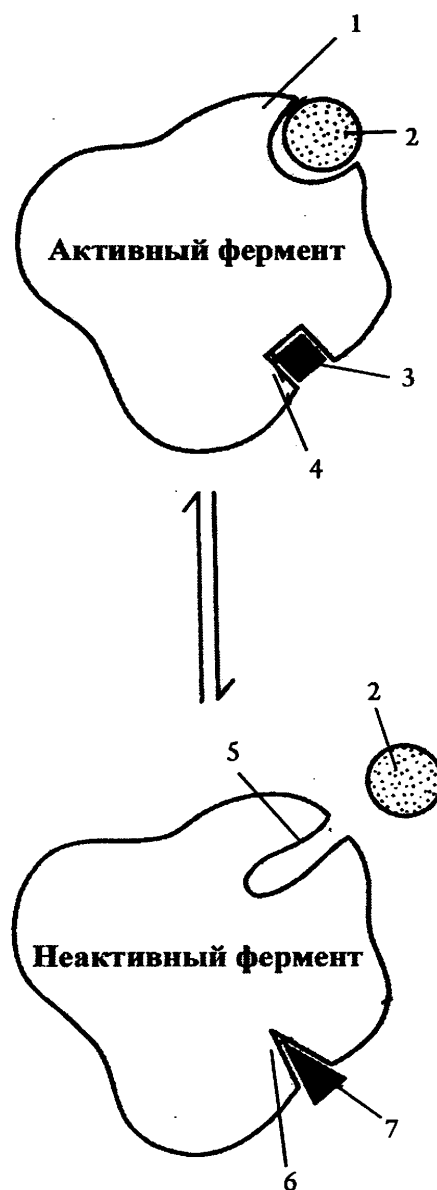


Рис. 68. Схема, демонстрирующая функционирование аллостерических ферментов. 1 – активный центр (правильная конформация для субстрата); 2 – субстрат; 3 – аллостерический активатор; 4 – место связывания активатора; 5 – активный центр (неправильная конформация для субстрата); 6 – место связывания ингибитора; 7 – аллостерический ингибитор, так изменяющий активный центр, что он становится недоступным для субстрата.

Принцип кооперативности

Кооперативность белковых молекул

Структурная организация биологических систем является основой, обеспечивающей биологическую специфичность, однако функционирование метаболизма возможно только при упорядоченности многообразных функций не только в пространстве, но и во времени.

Кооперативность – это один из принципов, обеспечивающих упорядоченное поведение сложных систем (принцип многоуровневости или иерархичности организации мы рассмотрим в следующем разделе).

Кооперативность означает коллективное поведение. Из физики известно, что кооперативными называют такие системы, в которых состояние одного элемента зависит от состояния соседнего элемента, при этом система является совокупностью взаимодействующих элементов.

Кооперативность в отношении макромолекул означает, что реализация определенной конформации данного мономерного звена зависит от конформации соседних мономеров.

Когда говорят о кооперативном переходе (мы на нем остановимся), часто подразумевают скачкообразный переход, который может осуществляться по принципу «все или ничего». Такие скачкообразные переходы происходят при изменении фазовых состояний.

Для принципа кооперативности характерен эффект умножения, что выражается в многократном повышении чувствительности к регуляторным факторам.

Следовательно, кооперативность – это взаимовлияние и согласованное конформационное поведение макромолекул и биологических систем, обеспечивающее высокую чувствительность биосистем к регуляторным факторам.

Рассмотрим функционирование принципа кооперативности на некоторых примерах.

Когда аллостерический фермент состоит из нескольких идентичных субъединиц, лиганд, связывающийся с одной из субъединиц фермента, будет приводить к изменению конформации этих субъединиц, а это, в свою очередь, повлечет за собой (так как субъединицы взаимодействуют) изменение соседних субъединиц (рис. 69). Такие кооперативные изменения могут умножаться, так как они могут происходить в нескольких связанных субъединицах.

Так как лиганд связывается с белком достаточно слабо, он легко может диссоциировать (освобождаться) в случае изменения конформации, поэтому эти связывания легко обратимы.

Известно, что аспараткарбамоилтрансфераза имеет 6 центров связывания аспарагиновой кислоты и для этого фермента характерен сигмоидный характер ферментативной кинетики (рис. 70).

Кооперативность – это такое состояние системы, при котором состояние одного элемента зависит от состояния других элементов этой системы, т. е. коллективное поведение элементов системы. Кооперативность обеспечивает взаимовлияние и согласованное конформационное поведение макромолекул в биологических системах, что обеспечивает высокую чувствительность биосистем к регуляторным факторам.

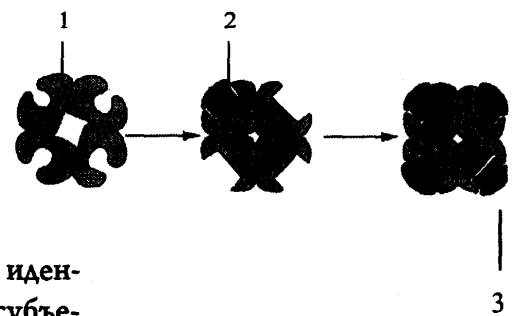


Рис. 69. Схема, демонстрирующая кооперативные изменения при связывании субстрата с ферментом. Состояние одной субъединицы влияет на конформацию соседних субъединиц. 1 – фермент без субстрата; 2 – связывание одной молекулы субстрата приводит к кооперативному изменению остальных центров связывания, что обеспечивает увеличение вероятности трех дополнительных субстратов; 3 – фермент с 4-мя молекулами субстрата.

Такой характер кинетики фермента объясняется кооперативным характером его действия. Показано, что даже малые приращение концентрации субстрата все больше и больше влияют на скорость ферментативной реакции, т. е. связь между концентрацией субстрата и активностью фермента не линейна, а положительна относительно второй переменной. Это объясняется тем, что последовательность конформационных превращений фермента под влиянием субстрата изменяется так, что способность к реакции сильно (кооперативно) возрастает. Или другими словами, последовательное превращение фермент-субстратного комплекса ведет к такому кооперативному изменению структуры фермента, что дальнейшее связывание с субстратом облегчается, а это приводит к увеличению скорости реакции. Подобное поведение называют бесконечной кооперативностью, и в случае функционирования такой модели, субъединицы фермента либо реагируют с субстратом все одновременно, либо не реагируют вовсе (принцип «все или ничего», рис. 70).

Большой вклад в исследование кооперативности аллостерических эффектов внесли Моно, Уаймен и Шанже (Monot, Wyman, Changeux, 1965).

Функционирование принципа кооперативности исследовано пока для относительно простых ферментных систем. Этот принцип определяет молекулярную упорядоченность биологических систем. Белки способны к большому разнообразию в поведении, они являются молекулярно узнающими системами, и это позволяет тонко регулировать метаболизм. Кооперативные свойства характерны не только для ферментов, но и для других белков, и они проявляются при различных структурных переходах.

Многочисленные эксперименты по исследованию структурных переходов белков показали, что для многих из этих переходов характерна S-образная кривая. Это означает, что для белков характерна универсальная способность существовать в нескольких дискретных структурно-функциональных состояниях, и переход от одного состояния в другое осуществляется по принципу кооперативности, скачкообразно, без образования переходных форм. Кооперативные переходы осуществляются в узком интервале физиологических условий.

Проявление кооперативных свойств на уровне клеточных органелл

Так как для кооперативных процессов характерна S-образная форма перехода (эффект-доза), т. е. переход имеет скачкообразный характер, то можно полагать, что кооперативные системы должны быть способны находиться в двух и более структурных состояниях и, основываясь на принципе структурно-функциональной взаимосвязи, можно ожидать, что скачкообразные изменения структуры будут приводить к скачкообразным изменениям функции.

Рассмотрим несколько примеров кооперативного поведения на уровне органелл. Достаточно большое количество работ по

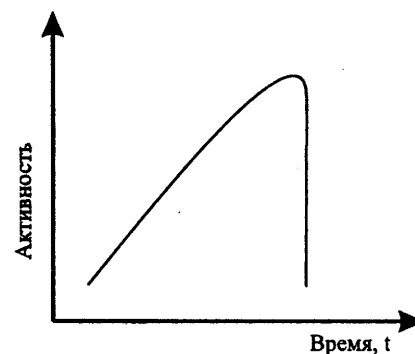


Рис. 70. Сигмоидный характер ферментативной активности аспарат-карбамоилтрансферазы.

исследованию возможных структурно-функциональных состояний органелл проведено на митохондриях.

Как известно, митохондрии могут находиться как минимум в двух состояниях: в активно фосфорилирующем (энергизированное) и разобщенном состоянии процесса фосфорилирования (неэнергизированное). Каждое из этих состояний различается по функциональному и конформационному состоянию. Переход одного состояния в другое возможен только в том случае, если сохраняется физическая непрерывность внутримитохондриальных белков.

Исследование запуска конформационных переходов неэнергизированное – энергизированное состояние показало, что инициатором структурного перехода является электронный транспорт по дыхательной цепи. Более того, для индукции перехода достаточно запуска лишь в одном из 4-х комплексов каскада, т. е. наблюдается эффект генерализации структурных переходов. Важно то, что для конформационной перестройки необходима некоторая критическая масса. Эффект критической массы кооперативных переходов указывает на необходимость сохранения целостности достаточно большого количества белково-липидных компонентов и митохондрий. Закономерности кооперативных переходов митохондрий являются их универсальным свойством.

Следовательно, в настоящее время убедительно доказано существование нескольких дискретных уровней структурно-функциональной организации митохондрий. Переход от одного структурно-функционального состояния к другому осуществляется генерализовано и имеет S-образный характер. Такой скачкообразный переход от одного состояния в другое индуцируется агентом, действующим на небольшую локальную часть мембраны, и этот принцип является одним из факторов авторегуляции.

Все биологические системы построены из субъединиц, что может быть названо блочным принципом. Каждая рибосома состоит из двух субъединиц. Благодаря этому удается снизить вероятность возникновения ошибок, так как при использовании этого принципа возникает несколько дополнительных уровней контроля, одним из которых и является принцип кооперативности.

Пожалуй, наиболее убедительно и наглядно это продемонстрировано в классических работах А. С. Спирина на примере рибосом. Рибосомы представлены двумя субъединицами ($70S \leftrightarrow 50S + 30S$ – прокариоты и $80S \leftrightarrow 60S \leftrightarrow 40S$ – эукариоты). Процесс ассоциации \leftrightarrow диссоциации имеет выраженный кооперативный характер и зависит от концентрации ионов Mg^{2+} . Если концентрация $Mg^{2+} 5 \cdot 10^{-3} M$ и более, а концентрация моновалентных катионов $10^{-2} M$, то субчастицы рибосом ассоциированы в рибосоме и она стабильна. Если концентрация Mg^{2+} ниже этих пределов, а концентрации одновалентных ионов (они вытесняют Mg^{2+}) выше, то рибосома диссоциирует на субчастицы. Существующий дозо-зависимый эффект указывает на кооперативную природу этого процесса.



Спирин А. С. , 1931 г. рождения, академик АН России. Основные исследования посвящены биохимии нуклеиновых кислот и механизмам биосинтеза белка. Сравнительные исследования А. С. Спирина и А. Н. Белозерского состава нуклеиновых кислот бактерий позволили предсказать в 1957 г. существование мРНК. Основные исследования посвящены структуре и функции рибосом и механизму синтеза белка. Дал первое качественное описание макромолекулярной структуры высокополимерных РНК (1959-61). Установил структурные превращения рибосом (разворачивание в рибонуклеопротеидный тяж) и сформулировал один из основных принципов их строения (1963). Обнаружил возможность искусственной реконструкции (самосборки) рибосом (1963-1966). Открыл информосомы (1964). Предложил модель молекулярного механизма работы рибосомы в процессе синтеза белка (1968). Совместно с Л. П. Гавриловой экспериментально показал возможность биосинтеза белка на структурно модифицированных рибосомах вне клетки («неэнзиматическая» трансляция).

Вторым типом кооперативных изменений рибосом является сборка и разборка самих субчастиц. Упорядоченная пространственная организация субчастиц рибосом поддерживается кооперативной системой слабых связей. Так же как диссоциация субъединиц разворачивания 50 S (60 S) и 30 S (40 S) осуществляется дальнейшим уменьшением концентрации ионов Mg^{2+} . Уменьшение ионной силы сопровождается скачкообразным переходом в менее комплексное состояние с уменьшением коэффициента седиментации (рис. 71).

Необходимо отметить, что при разворачивании и при сборке субчастиц рибосом отсутствуют промежуточные структурные формы, т. е. переход осуществляется по принципу «все или ничего». Для этих процессов характерен узкий интервал ионных концентраций, обеспечивающих эти переходы.

Скачкообразный характер перехода одной формы в другую при отсутствии критических состояний и необходимости критических концентраций солей для каждой среды перехода свидетельствуют о том, что эти процессы осуществляются как типичные фазовые переходы.

В заключение необходимо отметить, что структурно-функциональная особенность рибосом обеспечивается кооперативными слабыми взаимодействиями. Вероятно, это характерно не только для рибосом, но и для других органелл, просто структурные особенности рибосом таковы, что они облегчили доказательства упорядоченности их структурных элементов, объединенных в единую систему интегральными слабыми связями.

Проявление кооперативных свойств на клеточном уровне

Как уже отмечалось, клеточные мембраны могут существовать, как минимум, в двух и более дискретных конформационных состояниях. Это свойство и является основой реализации генерализованных кооперативных переходов, захватывающих не только внутриклеточные мембраны, но и клеточные ансамбли. Для демонстрации кооперативных свойств, проявляющихся на клеточном уровне, рассмотрим несколько примеров.

Прежде всего, остановимся на уже классических работах по механизму действия колицинов на бактериальные клетки.

Бактериоцины очень разнообразны и достаточно хорошо изучены. Колицины – это бактериоцины, вырабатываемые одним штаммом *E. coli* и губительно действующие на другие штаммы. Колицины разделены Фредериком на 17 классов и обозначены буквами латинского алфавита. Наиболее изучены E1, E2, E3 и K. Колицины имеют белковую, полисахарид-белковую или белково-липоуглеводную природу. Однако действующим началом колицинов является белковая часть. Действие колицинов на клетки других штаммов приводит к прекращению размножения и гибели клеток, однако механизмы гибели клеток различны.

50S	Mg^{2+}	30S
↔	0,3-0,2	↔
35S		26S
↔	0,1-0,01	↔
22S		15S

Рис. 71. Кооперативное разворачивание рибосомальных субчастиц, которое индуцируется ионами магния.

Бактериоцины – это высокомолекулярные антибиотики, синтезирующиеся клетками бактерий. Известны они достаточно давно, однако механизм их действия оставался загадкой долгие годы. В 1965 г. Конев С. В., а позже Шанже, высказали мысль, что эффект бактериоцинов, проявляющийся в гибели клеток, обусловлен структурными изменениями мембранной системы клетки, которые имеют кооперативный характер.

Так E1 и K ингибируют синтез ДНК, РНК и белка, E2 ведет к деградации ДНК и РНК, избирательно повреждая только белок-синтезирующий аппарат.

Важной особенностью действия колицинов является их высокая эффективность действия. Всего один микrogramм E2 приводит к гибели $2 \cdot 10^{13}$ бактериальных клеток, т. е. нужно несколько молекул для гибели клетки. Было показано, что молекулы колицина вызывают гибель, не проникая внутрь клетки. Такое «дистанционное» действие колицинов может быть объяснено рецепторным механизмом передачи сигнала с поверхности клетки на внутриклеточные мишени.

Крупнейший исследователь колицинов Номура высказал предположение, что колицины, связываясь с плазматической мембраной, передают внутрь клетки сигнал, который и вызывает в конечном итоге гибель клетки.

Не останавливаясь на многочисленных экспериментальных исследованиях действия колицинов, отметим, что сигнал от рецептора поверхностной мембраны является волной конформационных преобразований в белково-липидной структуре, передающейся на другие белки клетки. В результате конформационных изменений такие мишени как ДНК, РНК, рибосомы, митохондрии подвергаются структурным изменениям и переходят в новое функциональное состояние, которое реализует патологическое проявление. Наиболее строгие доказательства о передаче структурного сигнала от рецепторов к мишеням были получены при исследовании мутантных форм *E. coli*.

Необходимо учитывать, что изменение структурного состояния мембран ведет к изменению чувствительности клеток не только к колицинам, но и к другим факторам: температуре, УФ-свету и т. д.

Подобный механизм действия имеют и интерфероны.

Существует точка зрения, что кооперативный генерализованный сигнал в клетке может определять и переход клетки к делению.

Известный ученый Жакоб высказал идею, согласно которой состояние мембран эволюционирует во времени, и после достижения определенного критического уровня в них регенерируется сигнал, который инициирует деление клеток.

Следовательно, не только внутриклеточные надмолекулярные комплексы и мембраны органелл, но и вся мембранная система клеток способна находиться в различных дискретных структурных состояниях, которые характеризуются минимумом энергии слабых взаимодействий, переходящих друг в друга по кооперативному принципу.

Вся структура клетки является единой кооперативной системой, более того, межклеточные взаимодействия также имеют кооперативный характер. В результате этого структурная модификация одной клетки может кооперативно передаваться на соседние клетки.

Следовательно, принцип кооперативности наряду с принципами комплементарности, самосборки и структурно-

Как отмечали в свое время С. В. Конев, С. Л. Аксентев, Е. А. Черницкий слабые кооперативные связи обеспечивают:

1. механизм усиления (генерализации) процессов регуляции при переходе в новые функциональные состояния;
2. механизм интеграции различных биологических явлений;
3. механизм стабилизации надмолекулярных структур (память);
4. трансформацию энергии в биологических системах.

Конев С. В., Аксентев С. Л., Черницкий Е. А. Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970.

Жакоб Франсуа – французский микробиолог, генетик. Один из авторов гипотезы переноса генетической информации и регуляции синтеза белка в бактериальной клетке (предложил концепцию оперона). Совместно с Ж. Моно и А. Львовым получил Нобелевскую премию в 1965 г.

функциональной взаимосвязи обеспечивает функционирование биологических систем. Наряду с этим, для биологических систем характерен и принцип иерархичности.

Принцип иерархичности организации биологических систем

Иерархия структурной организации белков

Мы хорошо знаем, что все системы имеют различные уровни организации, которые представлены некой иерархией.

Для наглядности вспомним известные нам уровни организации биологических систем, которые подчиняются принципу иерархичности. Это молекулярный уровень, он обеспечивает осуществление всех биохимических реакций. Надмолекулярный – это уровень создания структур (мембран, рибосом, митохондрий), фермент-субстратных комплексов и других. Клеточный уровень – на этом уровне формируются клетки, которые включают в себя как молекулярный, так и надмолекулярный уровень организации. Далее клетки могут существовать как самостоятельные, автономные системы, но могут входить и в состав более высокого уровня организации, формируя многоклеточность. При этом клетки специализируются на выполнение отдельных функций – формируют ткани, которые входят в состав организма – организменный уровень.

Необходимо отметить, что все уровни организации взаимосвязаны между собой и оказывают влияние друг на друга, при этом они «подчиняются» единым принципам организации и функционирования.

Принцип иерархичности можно представить и как некий принцип блочности, т. е. одни и те же блоки способны формировать огромное многообразие новых систем высшего порядка. А из этого следует, что системы, имеющие иерархичность организации, способны эволюционировать или развиваться, что мы видим на примере биологических систем, т. е. благодаря иерархичности обеспечивается развитие и эволюция биологических систем.

Принцип иерархичности проявляется как в структурной, так и в функциональной организации.

Рассмотрим несколько примеров иерархии структурной и функциональной организации биологических систем.

На долю белков в клетке приходится более половины ее сухого остатка. Белки играют центральную роль в структурной организации и функциональной активности клетки. Один класс соединений белков может выполнять огромное количество функций и тем самым обеспечивать многообразные проявления жизни потому, что белки могут образовывать бесконечное многообразие структурных форм. Структура белков может быть представлена как иерархическая организация.

В состав белковых молекул входят 20 различных аминокислот. Серией фундаментальных исследований, которые были

Иерархия от греческого hieros – священный и arehe – власть. Это означает, что части или элементы целого располагаются в определенном порядке от «высшего» к «низшему» и все уровни подчиняются единому принципу регуляции.

Впервые первичная структура белка была расшифрована для молекулы инсулина. Инсулин – это белковый гормон, который имеет молекулярную массу 5733 Да. Он состоит из двух полипептидных цепей. Последовательность аминокислотных остатков была расшифрована в период с 1945 по 1952 г. г. Фредом Сангером (род. в 1918 г.) Молекула инсулина состоит из 2-х полипептидных цепей, соединенных между собой двумя S-S связями. Их обозначают как А и В цепи.

А – цепь содержит 21 аминокислотный остаток, а В – 30 аминокислотных остатков. Молекула инсулина достаточно консервативна. Так, инсулин свиньи отличается от инсулина человека тем, что в цепи лишь один аминокислотный остаток в положении 30 имеет вместо Thr Ala. Такое сходство позволяет использовать свиной инсулин для инъекции человеку.

Аминокислоты могут иметь L-конфигурацию или D-конфигурацию (изомеры), т. е. аминокислоты могут быть представлены двумя энантиомерами.

L – левая и D – правая формы, эти формы являются зеркальным отражением друг друга. В состав молекул всех живых организмов входят только L-аминокислоты. Этот загадочный факт пока не имеет строгих объяснений, не ясно почему организмы не построены из D-аминокислот, они не отличаются по своим свойствам от L-аминокислот, когда они взаимодействуют с обычными веществами. Вместе с тем, они различаются в том случае, когда они взаимодействуют с правыми и левыми формами других молекул. И в этом отношении на Земле могли быть живые организмы, построенные из D-аминокислот, так же как и организмы, построенные из L-аминокислот.

проведены с 1900 по 1910 г. г. немецким химиком Э. Фишером (1851-1912) было доказано, что аминокислоты в белках соединены в длинные цепи, которые он назвал полипептидными цепями. Если две молекулы аминокислот соединяются между собой, они образуют пептидную связь (рис. 66).

Порядок образования аминокислотных остатков в полипептидной цепи называют первичной структурой белка.

Последовательность аминокислотных остатков в белках определяется последовательностью нуклеотидов в молекулах мРНК (три нуклеотида определяют положение одной аминокислоты).

В полипептидной цепи аминокислотные остатки способны свободно вращаться вокруг многих химических связей. Такая особенность позволяет каждой молекуле принимать огромное количество различных конформаций. Из многих конформаций одна является наиболее стабильной. Стабильность конформаций зависит от первичной последовательности аминокислотной цепи.

Формирование стабильной конформации белковой молекулы определяется слабыми связями. Каждая полипептидная цепь формирует вторичную и третичную структуру самопроизвольно (принцип самосборки).

Вспомним эти особенности. В процессе синтеза белка многочисленные гидрофобные (неполярные) боковые группы стремятся собраться внутри белковой глобулы («спрятаться» от воды). В то же время, автоматически все полярные группы стремятся расположиться на поверхности молекулы белка, где они способны взаимодействовать с водой и другими полярными группами. В процессе стабилизации конформации белка основную роль играют водородные и гидрофобные связи.

Важную роль в стабилизации белковой молекулы могут играть дисульфидные связи (S-S-мостики), которые образуются между двумя SH-группами цистеина, оказавшимися по соседству в свернутой полипептидной цепи (рис. 72). Любопытно, что в белках цитозоля редко образуются дисульфидные связи, так как в цитозоле содержится много глутатиона, который быстро восстанавливает SH-группы.

Хотя пространственная структура каждого белка уникальна, несколько способов укладки цепи повторяются и встречаются практически у всех типов белков. Такие периодические структуры называют β -складчатым слоем и α -спиралью, которая была предложена Л. Полингом (рис. 66).

β и α -структуры формируют вторичный уровень структурной организации белков. Большинство глобулярных белков представлены участком β -структуры и α -спиралями, которые перемежаются. Так, β -складчатый слой может формировать сердцевину (core) большинства глобулярных белков. α -спираль образуется так, что каждая пептидная группа связывается водородными связями с другой пептидной группой цепи (рис. 72).

Уровни организации белковых молекул имеют определенную «логику». Формирование вторичной структуры белков

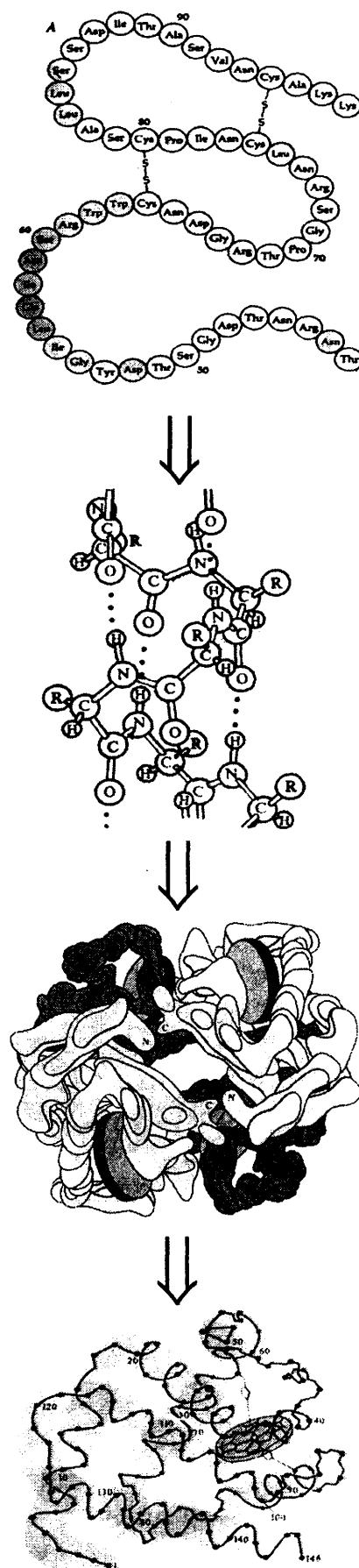


Рис. 72. Схема, отражающая иерархию структурной организации белка: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структура белка.

определяется возможностью формирования водородных связей между смежными участками полипептидной цепи.

Более высокие уровни организации белков – это доменная организация или третичная структура. Домены – это сравнительно небольшие глобулярные образования, если они являются модулями, из которых состоят глобулярные белки. Обычно глобулярные белки состоят из нескольких различных доменов, которые отделены друг от друга сравнительно открытыми участками полипептидной цепи.

Следующим уровнем структурной организации белков является формирование белковых агрегатов, иногда такие структуры называют четвертичной структурой (рис. 72).

Итак, белки способны формировать различные иерархические уровни организации. Каждый последующий уровень строится на основе предыдущих уровней организации. Благодаря иерархичности структурной организации белков решается несколько проблем. Во-первых, возможно формирование бесконечного многообразия белковых молекул и соответственно бесконечное многообразие функций. Во-вторых, все это многообразие имеет строгую логику функционирования и подчиняется одним принципам регуляции, т. е. достигается бесконечное многообразие в относительном однообразии (только 20 структурных аминокислот).



Розалинд Франклин (1920-1958)
английский физикохимик и кристаллограф

Иерархия структурной организации генетического аппарата эукариотических клеток

Одним из наиболее ярких и принципиальных различий между клетками эукариот и прокариот является наличие у эукариот клеточного ядра. Следствием этих структурных различий является пространственно-временное разделение синтеза РНК (транскрипции) и синтеза белка (трансляции). Это, в свою очередь, ведет к принципиальным отличиям структурной и функциональной организации их генетических аппаратов – про- и эукариот. С этими данными можно ознакомиться в многочисленных учебниках и учебных пособиях по молекулярной биологии и генетике. В этом разделе мы рассмотрим только пример иерархической организации генетического аппарата эукариотической клетки.

Структурной основой генома чаще всего является молекула ДНК. Генетическая информация клетки – это информация, определяющая последовательность аминокислотных остатков в молекулах белка и синтез нетранслируемых РНК (рРНК, тРНК, низкомолекулярных РНК). Молекула ДНК – это линейный полимер, образованный нуклеотидами, которые расположены в нерегулярной последовательности. Последовательность нуклеотидов – это кодовая запись информации о последовательности нуклеотидов РНК, которые в результате кодового прочтения в процессе трансляции переписываются в последовательность аминокислотных остатков белков, т. е. информация передается в цепи полимеров.

Молекула ДНК в типичном гаплоидном геноме клетки человека состоит из $3 \cdot 10^9$ нуклеотидов, (если записать эту информацию

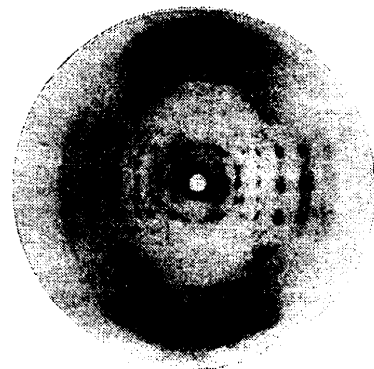


Рис. 73. Рентгенограмма кристаллической А-формы ДНК.

в привычной для нас системе букв, то это была бы книга, состоящая из 1 млн. страниц). Вся информация, записанная в молекуле ДНК, может быть разбита на две категории: кодирующая часть ДНК (последовательность нуклеотидов аминокислотных остатков в белках и не транслируемые типы РНК) и некодирующая часть.

Функции некодирующих участков ДНК еще исследуются и мы еще узнаем об их значении в жизнедеятельности клетки. Однако сегодня мы можем говорить, что некодирующие участки играют важную роль в компактной иерархической упаковке молекул ДНК.

В результате компактизации ДНК «решаются» две принципиально важные проблемы в жизнедеятельности клетки. Компактизация позволяет упаковать невероятно длинную молекулу ДНК в небольшой фрагмент ($3,4 \cdot 10^5$ нм, 0,034 см) и объем 10^6 нм³ (10^{-15} см³). Кроме того, компактизация является уникальным способом регуляции активности генетической системы (вспомним принцип структурно-функциональной взаимосвязи).

На основании рентгеноструктурных исследований молекулы ДНК, проведенных в лаборатории Уилкинса Розалинд Франклин, Уотсон и Крик смогли увидеть в ее рентгенограмме (рис. 73) двойную спираль ДНК. Итак, в 1953 г. была предложена модель структурной организации ДНК, согласно которой ДНК – это двойная спираль, составленная сахарофосфатным остовом, внутри которого расположены азотистые основания (рис. 74). Основания расположены так близко друг к другу, что они способны формировать между собой водородные связи, и тем самым удерживать две цепи вместе. Однако оптимальное соответствие цепей и формирование устойчивой структуры возможно только в том случае, если основания нуклеотидов спариваются не случайным образом, а строго комплементарно, это означает, что аденин связывается водородными связями с тиминном, а гуанин с цитозином (принцип комплементарности) в молекуле ДНК. При таком спаривании между указанными парами оснований образуется максимально возможное количество водородных связей. (между А=Т – 2, а Г≡У – 3 водородных связи). Именно принципом комплементарности объясняется правило Чаргаффа, который экспериментально показал, что $A/T=1$, $G/C=1$.

Итак, уникальность структуры ДНК обеспечивает запись, хранение, передачу и модификацию генетической информации, т. е. поток информации от ДНК к белку (рис. 75). Регуляция функций генетического аппарата осуществляется на основе универсальных принципов структурно-функциональной взаимосвязи.

Нуклеосомная организация хроматина

Линейная молекула ДНК в клетке должна быть упакована, и это осуществляется с помощью специфических белков. Белки, принимающие участие в структурной организации генома, условно делят на два класса: гистоны и негистоновые белки. В группу негистоновых белков входит большое количество разнообразных белков. Так, белки IMG выполняют структурную функцию

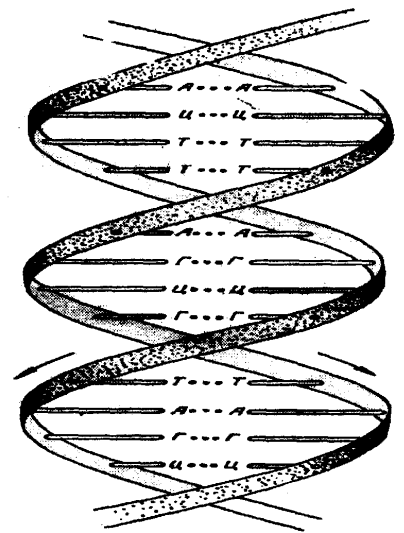


Рис. 74. Схематическое изображение молекулы ДНК.

ДНК \longleftrightarrow РНК \longrightarrow Белок

Рис. 75. Схема, отражающая последовательность передачи генетической информации от молекулы ДНК на РНК и синтез белковых молекул. Необходимо отметить, что в своих классических работах Уотсон и Крик постулировали односторонность потока генетической информации. Это стало основой трактовки этой схемы как центральной догмы молекулярной биологии. Открытие РНК-зависимой ДНК-полимеразы у вирусов в 1973 г. Балгимором и Теминым показало, что генетическая информация может передаваться и от РНК на ДНК.

в организации хроматина, а ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и другие ферменты участвуют в регуляции функционирования хроматина.

Гистоны – это белки с небольшой молекулярной массой, в состав которых входит большое количество лизина и аргинина (это положительно заряженные аминокислоты). Гистоны прочно связаны с молекулой ДНК и играют важную роль в компактной упаковке ДНК и регуляции ее матричных свойств. В эукариотических клетках присутствуют 5 типов гистонов. Для удобства их делят на нуклеосомные гистоны – H2A, H2B, H3 и H4 и не нуклеосомный гистон H1.

Все 4 нуклеосомных гистона формируют нуклеосому (рис. 76). Каждая нуклеосома состоит из 8-ми молекул гистонов, по 2 молекулы соответственно H2A, H2B, H3 и H4, эта часть нуклеосомы покрыта белковой сердцевинной или гистоновым кором, на который наматывается фрагмент ДНК (рис. 76). На одну нуклеосому приходится 146 пар оснований ДНК. На электронно-микроскопической фотографии хроматиновые нити выглядят как бусины на нитке. Бусины – это гистоновые коры, а ниточка – молекула ДНК (рис. 77).

Расстояние между двумя коровыми частицами, которое занимает участок ДНК, называют линкерным участком, он может иметь различную длину, однако в среднем составляет около 60 нуклеотидов ДНК. С линкерными участками ДНК связывается гистон H1.

В результате такой структурной организации генетического аппарата на одну нуклеосому приходится до 200 пар оснований ДНК. Весь гаплоидный геном человека ($3 \cdot 10^9$ пар оснований) упакован в $1,5 \cdot 10^7$ нуклеосом. Такая структурная организация обеспечивает упаковку молекулы ДНК длиной в 5 см, в длину, имеющую несколько микрометров, и обеспечивает регуляцию матричной активности на основе принципа структурно-функциональной взаимосвязи компактизации хроматина, который можно определить как формирование фибрилл диаметром около 30 нм – 30 нм-хроматиновые фибриллы.

В формировании хроматиновых фибрилл центральную роль играет гистон H1. Центральная глобула гистона H1 присоединяется к специфическому участку на поверхности нуклеосомы, а вытянутая часть молекулы H1 примыкает с одной стороны к линкерной ДНК в области ее контакта с нуклеосомной частицей, а, с другой стороны, к гистонному кору соседней нуклеосомы, он стягивает две соседние нуклеосомы.

Молекулы гистонов обеспечивают кооперативное связывание, что проявляется в склонности гистона H1 связываться с ДНК группами по 8 и более молекул.

Хроматин, как и многие другие биологические комплексы, имеет блочное строение, каждый из блоков может изменять свою структуру независимо от других блоков, что обеспечивает дифференциальную активность генов. Однако при этом конформационные изменения одного блока кооперативно могут приводить к изменению структурной организации и других блоков.

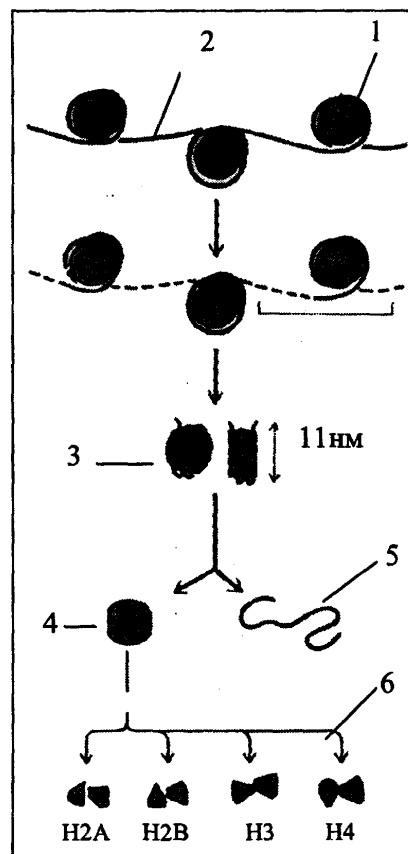


Рис. 76. Схема, иллюстрирующая нуклеосомную организацию хроматина. Нуклеосома – это гистоновый кор – (1), с которым связана ДНК. Участки ДНК между нуклеосомами называют линкерной ДНК – (2). После гидролиза линкерной ДНК можно выделить свободные нуклеосомные частицы – (3), которая представлена гистоновым кором (4) и фрагментом ДНК (146 пар оснований) – (5) и четырьмя типами гистонов – (6).

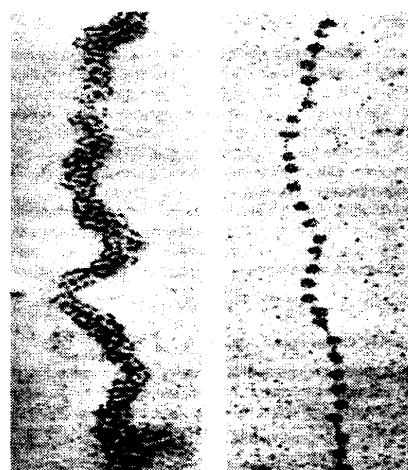


Рис. 77. Электронные микрофотографии хроматиновых нитей, демонстрирующих нативный хроматин (слева) и после его деконденсации (справа), видна нуклеосомная организация.

30-нм хроматиновые фибриллы формируют петельную структуру хроматина

30-нм хроматиновые фибриллы еще не могут обеспечить упаковку ДНК в клеточном ядре так, чтобы уместить ее в объеме клеточного ядра и обеспечить функционирование механизмов регуляции ее матричной активности.

На различных объектах: ооцитах, хромосомах насекомых в 1972 г. было показано, что даже ДНК *E. coli*, которая не содержит гистонов, тоже уложена в петли. Такая петельная организация хроматина вероятнее всего является общей формой компактизации генетического аппарата.

Существуют данные, что петли хроматина формируются и поддерживаются с помощью ДНК-связывающих белков. Эти белки способны узнавать специфические нуклеотидные последовательности ДНК, которые отдалены друг от друга и при взаимодействии этих белков они сближаются и формируют петли (рис. 78).

Размеры петель близки даже у таксономически отдаленных организмов. Обычно в состав петли входит от 20000 до 80000 пар оснований ДНК. По расчетам типичная хромосома человека может содержать около 2 600 петель. Если представить себе диаметр петель, то он в среднем будет составлять 400 нм (0,4 мкм).

Мы рассмотрели три уровня структурной компактизации хроматина, которые имеют место в интерфазном клеточном ядре эукариот. Напомним, что интерфазой называется функциональное состояние ядра в период между двумя митозами. В состоянии интерфазы ДНК выполняет функцию матрицы в синтезе разных типов РНК. В интерфазном ядре ДНК связана с нуклеосомами и другими белками, и этот комплекс называют хроматином. Хотя хроматин достаточно плотно упакован, для формирования митотических хромосом необходима дополнительная конденсация. Митотические хромосомы хорошо видны в световой микроскоп. Геном человека состоит из 23 пар хромосом, и каждая из них в митозе имеет характерную форму (рис. 79).

Суперспирализация хроматина в хромосомы пока не ясна до конца. Известно, что при формировании хромосом все молекулы гистона H1 фосфорилируются по пяти различным остаткам серина. Возможно фосфорилирование гистона H1 играет ключевую роль в конденсации хроматина в хромосомы.

Известно, что хромосомы несут на своей поверхности большое количество рибонуклеопротеидов. После завершения митоза происходит обратный процесс деспирализации митотических хромосом в интерфазный хроматин, т. е. осуществляется обратимый процесс компактизации хроматина, или другими словами, структурная иерархия – высокодинамичный процесс. Эти особенности мы рассмотрим в разделе, посвященном регуляции метаболизма.



Рис. 78. 30 нм хроматиновая фибрилла формирует петельный домен из 20-80 тыс. пар оснований. Петельные домены конденсируясь формируют метафазные хромосомы.



Рис. 79. Хромосомный набор человека.

Биохимия – наука, изучающая химические вещества, входящие в состав организмов, их структуру, распределение, превращение (метаболизм) и их функции в организме. Принципиальное значение для развития биохимии имели работы Ф. Велера по синтезу мочевины, который он осуществил в 1928 г. В 19 веке биохимия сформировалась в самостоятельное научное направление. С изобретением центрифуг (Сведберг), методов хроматографии (Цвет), биохимия интенсивно развивается, а с использованием методов физики и химии в исследовании биомолекул в середине 20 века биохимики исследуют структуру генетического аппарата клетки, молекулярные механизмы мышечных сокращений и других процессов, что привело к отделению от биохимии молекулярной биологии.

Концепция метаболизма

Основные понятия

Биохимические исследования состава клетки и пищи показали, что клетка способна синтезировать макромолекулы самостоятельно, используя компоненты пищи как базовые субстраты (аминокислоты, ненасыщенные жирные кислоты, углеводы, нуклеотиды). Синтезируя свои «собственные» макромолекулы из исходных мономеров, клетка или организм создают свою биохимическую и биологическую индивидуальность. Следовательно, вещества пищи трансформируются в вещества организма. Такая трансформация одних веществ в другие является уникальной способностью всех биологических систем. И этот процесс называется метаболизмом.

Метаболизм (от греческого *metabole* – перемена, превращение) в широком смысле, это обмен веществ в организме, который обеспечивается комплексом реакций синтеза, модификационных изменений и распада соединений в организме.

В узком смысле метаболизм понимают как промежуточный обмен, т. е. превращение определенных веществ в клетке с момента их поступления до образования конечных продуктов (например, гликогена, белков, липидов и др.).

Исследование механизмов регуляции метаболизма является разделом биохимии. Мы не будем рассматривать традиционные темы биохимии, а сформулируем наиболее общие положения концепции метаболизма, которыми необходимо руководствоваться при решении задач биотехнологии.

Трансформация одних веществ в другие в клетке, как правило, осуществляется путем последовательных превращений (рис. 80). На каждом этапе метаболической цепи образуется промежуточный продукт. Существует мнение, что промежуточные продукты не несут каких-либо функций в клетке, они являются звеньями в цепи образования конечного продукта. Однако исследования последних лет показывают, что многие промежуточные продукты – метаболиты могут играть роль регуляторов в метаболизме клеток.

Всю совокупность биохимических реакций, протекающих в клетке, и называют метаболизмом, а молекулы, участвующие в этих реакциях, называются метаболитами. Различные метаболические реакции могут взаимодействовать.

Система метаболизма организована достаточно сложно и у разных организмов она имеет свои особенности. Необходимо учитывать, что выведение общих принципов и закономерностей функционирования метаболизма неизбежно будет вести к упрощению этих представлений, однако это дает возможность выявить наиболее общие правила его организации.

Организационно все метаболические процессы могут быть представлены как сопряженные (связанные) между собой блоки (рис. 81).

Молекулярная биология как самостоятельное научное направление за 50 лет своего развития достигла огромных результатов и стала ведущим направлением современных биологических исследований.

Именно развитие биохимии, молекулярной биологии, генетики и микробиологии способствовало формированию биотехнологии как интегрального научного направления, направленного на разработку технологий на основе фундаментальных знаний биологических систем.

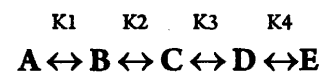


Рис. 80. Принципиальная схема последовательных метаболических реакций, обеспечивающих образование продукта E. А-субстрат; В, С, D – промежуточные продукты; E – конечный продукт; k_1 – k_4 – ферменты, обеспечивающие протекание прямых и обратных реакций.

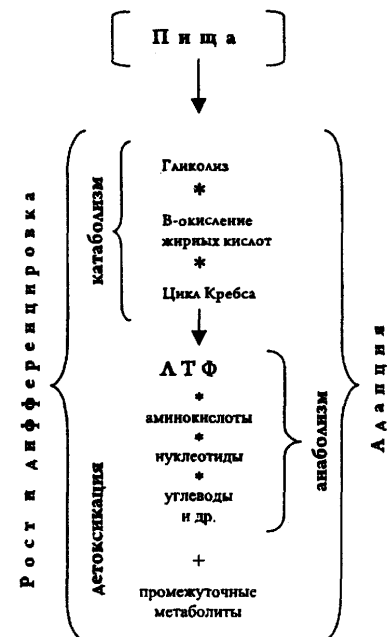


Рис. 81. Схема единства функциональных блоков метаболических процессов; блок катаболизма (распада или расщепления); блок анаболизма (синтеза) и блок детоксикации (обезвреживания). Эти три блока обеспечивают рост, дифференцировку и адаптацию биологических систем.

Функциональные блоки метаболизма и способы их сопряжения

Первый блок метаболизма представлен огромным количеством реакций распада различных веществ – катаболический блок. В этот блок могут быть включены все реакции расщепления продуктов пищи до конечных продуктов CO_2 и H_2O . Большая часть освобождающихся при этом электронов используется в окислительном фосфорилировании – синтезе АТФ.

В том случае, если отсутствует кислород, или его недостаточно, то окисление не идет до конца и это ведет к накоплению различных продуктов обмена.

В процессе катаболизма кроме освобождения электронов образуются мономеры: аминокислоты, жирные кислоты, сахара, нуклеотиды, которые используются в качестве предшественников всех биохимических процессов.

Еще одной особенностью катаболического блока метаболизма является то, что в результате его функционирования могут образоваться потенциально токсические вещества, которые способны ингибировать или изменять многие метаболические реакции, эти соединения должны обезвреживаться в блоке детоксикации.

Итак, основные катаболические процессы: гликолиз, β -окисление жирных кислот, цикл Кребса, распад аминокислот обеспечивают синтез в клетке АТФ, т. е. макроэргических соединений; образование мономеров для синтеза из них макромолекул клетки, а, как следствие, в процессе катаболизма образуются относительно токсические продукты, которые выводятся из организма благодаря наличию системы детоксикации (рис. 81).

Следующий блок метаболизма чрезвычайно сложен и в него могут быть включены сотни реакций синтеза и модификаций соединений. Для удобства он может быть назван блоком анаболизма или биологического синтеза. Все процессы биосинтеза осуществляются с использованием энергии, заключенной в молекулах АТФ (рис. 82), которые образуются в блоке катаболизма. АТФ не только обеспечивает клетку энергией, но и является источником образования вторичных мессенджеров (цАМФ) (рис. 83).

Универсальным компонентом многих реакций являются ионы водорода. Они используются в огромных количествах в процессах синтеза, в клетке их источником является никотинамидадениннуклеотид фосфат (NADPH).

Сопряженность этих трех блоков обеспечивает рост, дифференцировку и адаптацию биологических систем.

В процессах образования клеточных структур расходуется достаточно большое количество АТФ и можно говорить, что АТФ

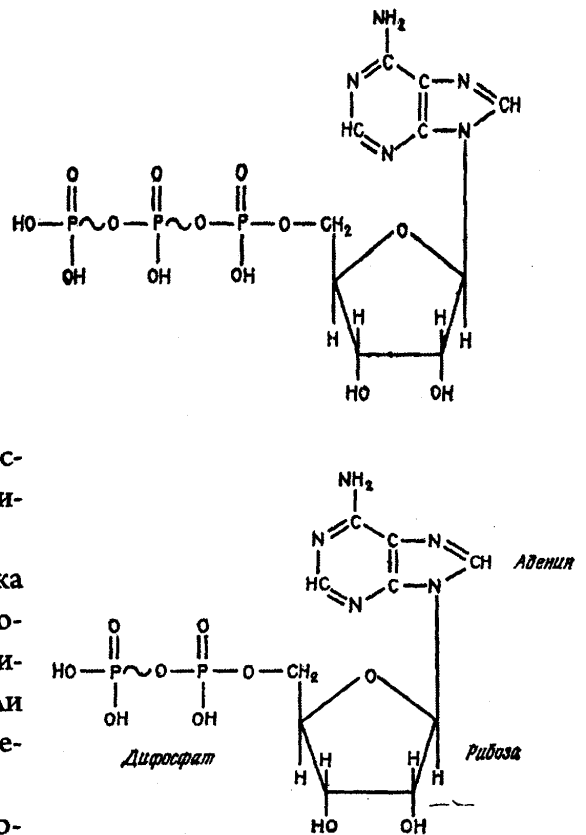


Рис. 82. Молекула аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). При отщеплении одного остатка фосфорной кислоты освобождается энергия и образуется молекула АДФ и в конечном счете АМФ.

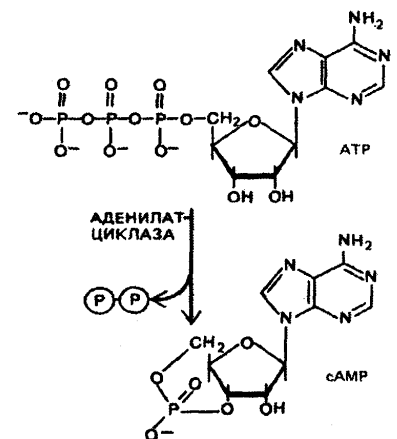


Рис. 83. Синтез цАМФ.

Из АТФ может синтезироваться циклический АМФ. цАМФ, является универсальным вторичным мессенджером. Принимает участие в регуляции многих процессов клетки.

циркулирует между всеми тремя метаболическими блоками и эта особенность может рассматриваться как механизм сопряжения всех блоков метаболизма (рис. 81).

Клетка функционирует на основе информации, имеющейся в самой клетке, и информации о своем окружении. И с этой точки зрения клетка может рассматриваться как познающая система, т. е. система способная расти, развиваться и адаптироваться с учетом особенностей среды (температуры, давления, освещенности, уровня радиации, характера питательных веществ и др.).

Или, говоря другими словами, клетка как бы «обучается», т. е. ее действия «согласованы» и определяются особенностями внутриклеточной и внеклеточной информации, это явление мы чаще всего называем адаптацией.

С этой позиции процесс адаптации может пониматься как изменение метаболизма (в рамках генетической вариабельности), направленного на обеспечение «наибольшей» биологической устойчивости в конкретных условиях среды. Однако механизм выбора того или иного метаболического пути остается малоисследованным явлением.

Практически все эвристические правила формируются через принцип отбора. Однозначного решения принципа отбора того или иного метаболического пути (да и отбора в широком смысле) не существует. В связи с этим выработанные нами правила случайны и во многом произвольны. Такая произвольность описания биологических систем сильно затрудняет раскрытие общих закономерностей организации и функционирования биологических систем. Знание закономерностей регуляции метаболизма является основой управления продуктивностью биологических систем в биотехнологии. В связи с этим мы рассмотрим некоторые центральные положения концепции метаболизма.

Общая концепция метаболизма должна объяснять принципы функционирования и регуляции метаболизма. В рамках концепции метаболизма выделим 5 наиболее общих принципов функционирования метаболической системы клетки (рис. 84).

Необходимо напомнить, что с количественной точки зрения функционирование метаболических систем обеспечивает примерно 70 мономерных соединений. Это 4 рибонуклеотида и 4 дезоксирибонуклеотида; 20 аминокислот; 15 моносахаридов и около 20 жирных кислот и других предшественников и так называемых молекул регуляции – ионов, витаминов, гормонов и др.

Принцип общего предшественника (ацетатное правило)

Вопрос синтеза макромолекул занимает одно из центральных мест в биохимии. Экспериментальные подходы в решении этого вопроса начали формироваться в конце XIX, начале XX веков, тогда и было высказано предположение, согласно которому многие

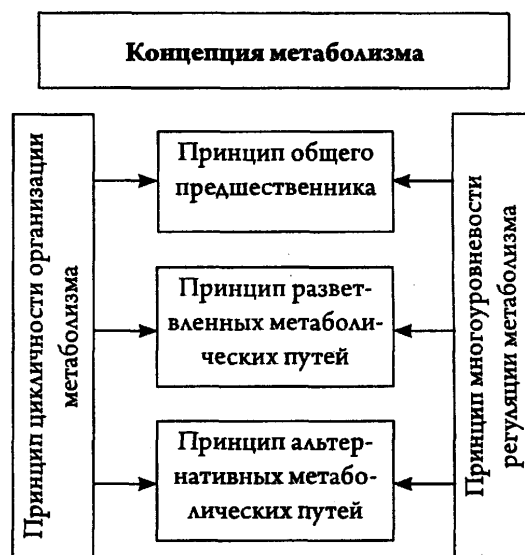


Рис. 84. Схема, демонстрирующая единство 5-ти основных принципов функционирования метаболизма клетки.

Липман предположил (1945), что для реакции биологического ацетилирования должен существовать особый кофермент. Для его выделения он разработал специальную тест-систему, а именно способность экстрактов свежей ткани печени катализировать ацетилирование сульфаниламида. Он обнаружил, что для этой реакции необходима АДФ, которая превращалась в АДФ. После проведения диализа экстракт терял способность к ацетилированию. Он предположил, что ацетилирование обеспечивается каким-то неизвестным коферментом (КоА-кофермент ацетилирования). Позже он выделил Ко А в чистом виде из дрожжей и печени.

природные полимеры могут образовываться из остатков уксусной кислоты. Однако строгие экспериментальные доказательства этого начали появляться только после того, когда было показано, что синтез макромолекул – это не простая конденсация мономеров.

Оказалось, что прежде чем мономер будет вступать в реакцию синтеза полимера, он должен быть активирован макроэргами, т. е. превращен в активный мономер и только тогда с помощью фермента он может участвовать в реакциях синтеза.

Многочисленные исследования метаболизма ацетата в клетке показали, что ацетат активируется с помощью кофермента А, который достаточно широко встречается в клетках животных и растений. В результате такой активации образуется ацетил-КоА (рис. 85). Впервые ацетил-коэнзим А был выделен Липманом из клеток дрожжей и печени. Дальнейшие исследования показали, что ацетил-КоА является тем общим промежуточным соединением, которое образуется в результате окислительного распада жирных кислот, углеводов и аминокислот. Независимо от происхождения ацетил-КоА может быть исходным строительным элементом для биосинтеза углеродного скелета многих органических соединений.

При участии ацетата осуществляется биосинтез аминокислот, жирных кислот и гликогена.

Расщепление пировиноградной кислоты, белков, жиров приводит к образованию ацетил-КоА. Остаток уксусной кислоты обеспечивает и синтез соединений изопренового ряда (холестерин, эргостерин, каротиноиды и др.).

Одна из характерных особенностей ацетил-КоА – это образование богатых энергией соединений с остатками органических кислот. Образующаяся при этом тиоэфирная связь содержит большое количество энергии. При участии КоА «ацильные группы» могут быть перенесены с одного субстрата на другой. Это одна из трансферазных реакций, при которой переносится не атом водорода, как в окислительно-восстановительных реакциях, а целая

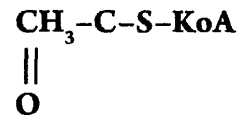


Рис. 85. Ацетил-коэнзим А

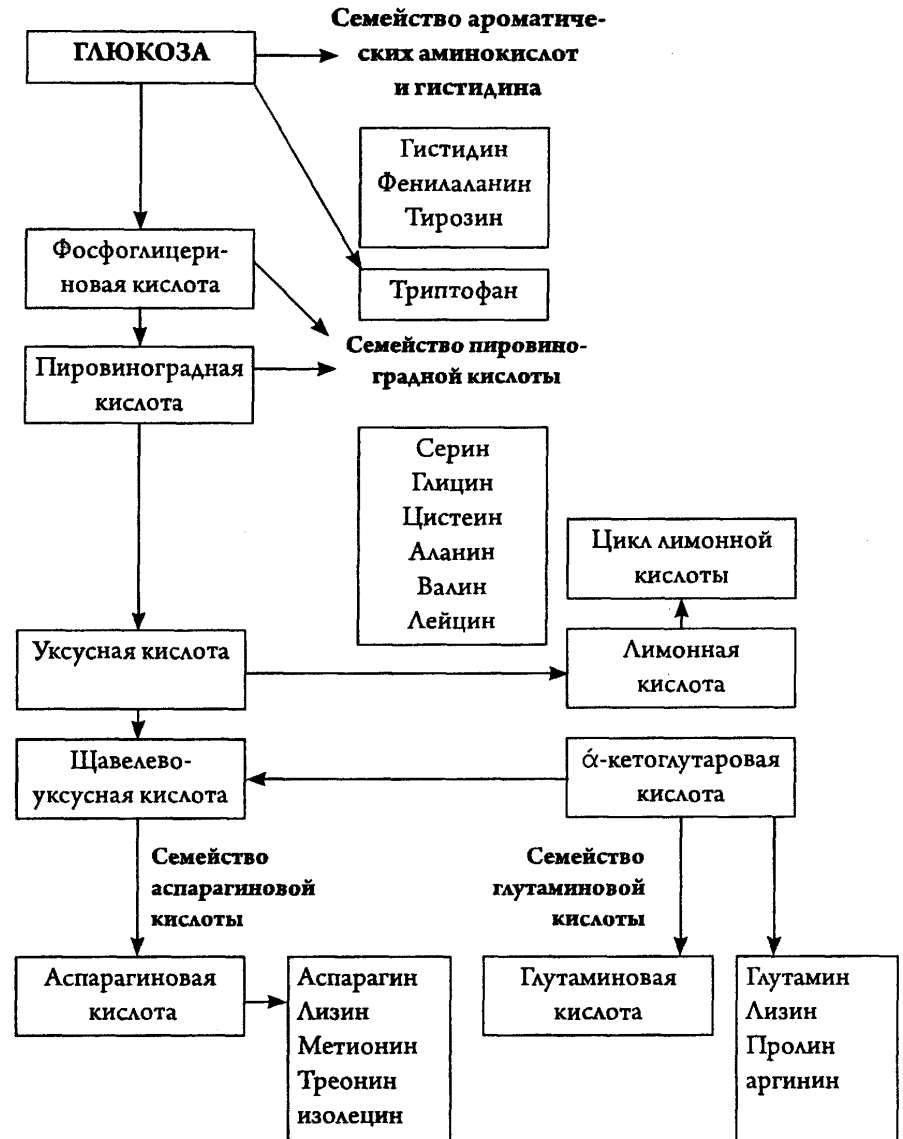


Рис. 86. Схема, демонстрирующая участие глюкозы в синтезе аминокислот. На этой схеме можно видеть и разветвленность метаболических путей.

молекула как функциональная группа. Кофермент А является универсальным ацилирующим коферментом, необходимым для активирования карбоксильной группы.

Синтез разнообразных соединений из одних и тех же предшественников является одним из фундаментальных принципов функционирования метаболизма. В качестве еще одного примера общего предшественника можно привести глюкозу, которая может обеспечивать синтез аминокислот, а они в свою очередь синтез нуклеотидов и липидов (рис. 86).

Следовательно, принцип общего предшественника обеспечивает выраженную метаболическую индивидуальность даже при наличии небольшого однотипного набора предшественников. Однако формированию метаболической индивидуальности способствует функционирование еще одного принципа – принципа разветвленных метаболических путей.

Принцип разветвленных метаболических путей

Пути биосинтеза и распада молекул в клетке формируют непрерывные циклы или петли. Одной из особенностей метаболических петель является то, что часто нельзя сказать, в какой точке заканчивается биосинтез и в какой начинается распад, т. е. эти «противоположно» направленные процессы включены в единую систему. Одним из фундаментальных принципов организации метаболизма является принцип разветвленности метаболических путей. Весь метаболизм можно рассматривать как сложную систему разветвленных и взаимосвязанных метаболических путей. В результате разветвленных метаболических путей из одного и того же субстрата могут образоваться различные конечные продукты, т. е. один субстрат – и много конечных продуктов. Как уже указывалось, молекула глюкозы может приводить к образованию аминокислот, нуклеотидов или жирных кислот (рис. 87).

Каждый из указанных субстратов может участвовать в различных метаболических превращениях.

Какой из взаимосвязанных путей превращения будет реализован зависит от регуляторных систем в клетке в данный момент. Необходимо отметить, что поскольку взаимодействие молекул чрезвычайно разнообразно, то и механизмы регуляции метаболизма так же разнообразны.

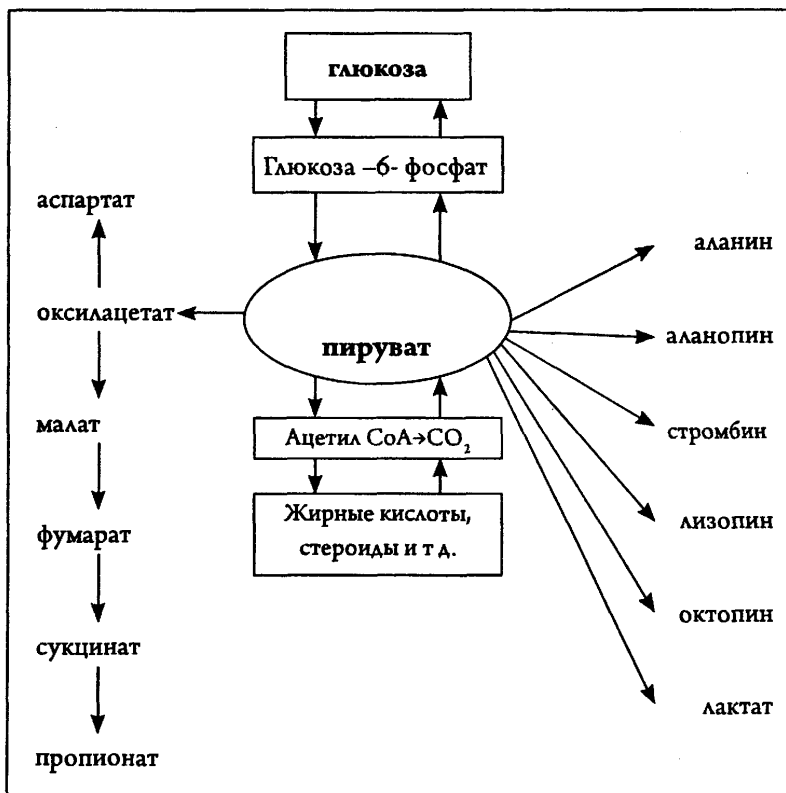


Рис. 87. Пример разветвленных метаболических цепей, так пируват может обеспечивать протекание реакций образования различных конечных продуктов.

Любой фактор, влияющий на скорость реакций, участвующий в процессах биосинтеза или распада компонента клетки, будет оказывать прямое или опосредованное влияние на реакции метаболизма.

Системы регуляции достаточно сложны. Относительно хорошо изученной является регуляция метаболизма по принципу обратной связи. Суть этого принципа в том, что избыток конечного продукта ингибирует (останавливает) дальнейшее его образование. Это один из ярких примеров саморегуляции. С системой регуляции мы познакомимся в разделе «принцип многоуровневой регуляции метаболизма».

Альтернатива – необходимость выбора одного из двух или нескольких возможных вариантов или решений.

Принцип альтернативных метаболических путей

Принцип альтернативных метаболических путей может быть представлен как «один продукт разными путями». Этот принцип в каком-то смысле дополняет принцип разветвленных метаболических путей.

Благодаря принципу альтернативных метаболических путей организм имеет возможность обеспечивать жизнеспособность в экстремальных ситуациях.

В качестве примера рассмотрим синтез предшественников нуклеиновых кислот – пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды могут синтезироваться двумя альтернативными путями: *de novo* из не нуклеотидных предшественников (глюкозы, аминокислот CO_2 и NH_3) (рис. 88); либо непосредственно из пуриновых и пиримидиновых оснований. Этот путь еще называют запасным. Пуриновые и пиримидиновые основания образуются при распаде нуклеиновых кислот или нуклеотидов.

Говоря о путях синтеза нуклеотидов необходимо отметить, что синтез пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов регулируется различными механизмами. Так как синтез дезоксирибонуклеозидтрифосфатов определяется скоростью лимитирующих стадий при синтезе ДНК, то содержание свободных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в клетке всегда находится в очень малой концентрации. Сбалансированный рост и размножение клеток может осуществляться только при условии синтеза или поступления в клетку сбалансированного отношения рибо- и дезоксирибонуклеотидов. Наличие альтернативных путей синтеза нуклеотидов позволяет обеспечивать регуляцию этого процесса в различных условиях среды.

Для синтеза нуклеотидов, как и других макромолекул, необходима энергия, роль которой выполняют молекулы АТФ. Скорость образования всех типов нуклеотидов зависит от доступности АТФ в клетке. В том случае, когда в клетке недостаточно АТФ, тогда повышено содержание АДФ, что ведет к ингибированию ключевого фермента синтеза нуклеотидов 5-фосфорибозил-

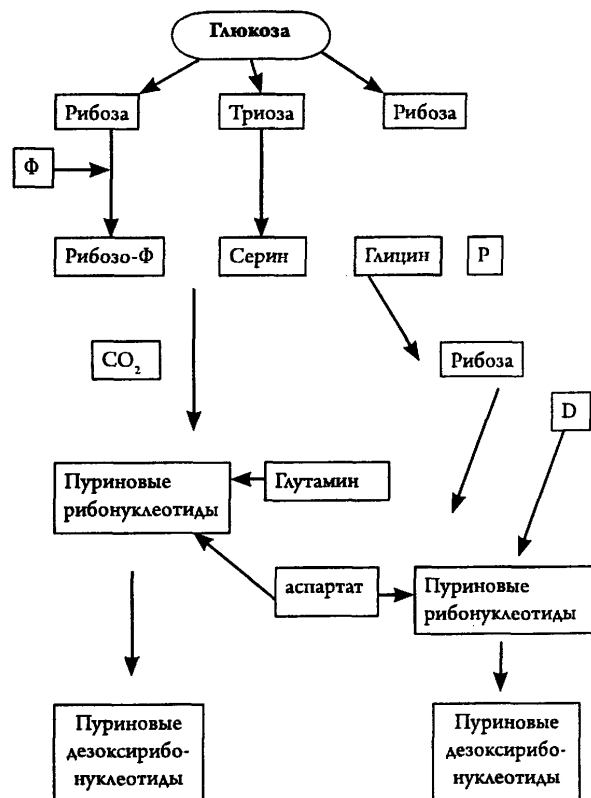


Рис. 88. Участие глюкозы в синтезе нуклеотидов.

1-пирофосфата. Одним словом, при отсутствии необходимого количества АТФ ингибируется и образование нуклеотидов. Это показывает согласованность регуляции метаболических циклов.

Эти примеры демонстрируют роль системы регуляции в функционировании биологических систем, которое осуществляется благодаря реализации комплекса взаимосвязанных продуктов.

Благодаря разветвленности метаболических цепей одна и та же молекула может включаться в различные превращения и обеспечивать синтез различных конечных продуктов. Так, аминокислота серин может различными путями изменяться. Приведем только несколько реакций, в которых может участвовать серин. Он может включаться в синтез белка и таким образом формировать белковые молекулы. Серин может расщепляться до глицина или превращаться в пируват, он может быть ацетилирован с помощью ацетил-КоА или перенесен на жирную кислоту с образованием фосфатидилсерина. Каждый из перечисленных продуктов может включаться в десятки других реакций. Если представить схематично некоторые метаболические пути, то они будут выглядеть как ажурная паутина с огромным количеством разветвлений.

Все эти многообразные пути конкурируют за одни и те же субстраты. Несмотря на такую сложность метаболическая система удивительно стабильна и высоко адаптивна. Это может достигаться благодаря принципу многоуровневости регуляции.

Принцип многоуровневости регуляции метаболизма

Ферментативная система регуляции

Одним из основополагающих принципов биологии является принцип гомеостаза – способности организма поддерживать постоянство внутренней среды независимо от условий существования. Нам хорошо известно, что величина рН крови человека всегда равна ($7,4 \pm 0,05$). Концентрация глюкозы в крови также величина постоянная (5 мМ). Хотя отклонения от этой величины происходят во время приема пищи, однако она достаточно быстро вновь достигает этой постоянной величины.

Поддержание физиологически важных показателей на стационарном уровне является одним из условий жизнеобеспечения биологических систем. Это возможно благодаря принципу многоуровневой регуляции, суть которого в том, что он обеспечивает саморегуляцию биохимических и физиологических процессов.

Регуляция в биологических системах столь сложна, что нам пока известны только некоторые особенности функционирования этих систем. Это неудивительно, так как только к концу 50-х годов XX века, когда были раскрыты основные метаболические пути, исследователи обратили свое внимание на механизмы регуляции метаболизма. Для биологических систем регуляции характерно: высокая специфичность, чувствительность, быстрота ответа и, пожалуй, самое главное, высокая способность к саморегуляции.

Гомеостаз – состояние динамического равновесия, направленное на сохранение внутренней среды организма в изменяющихся условиях среды. Гомеостаз применяется и по отношению к популяционным системам и в этом случае под гомеостазом понимают сохранение относительного постоянства систем.

Регулирование от лат. *regulo* – направляю, упорядочиваю.

С физической точки зрения закон регулирования основан на формировании регулирующего сигнала в случае отклонения регулируемой величины от заданного значения, или по сигналу ошибки. Для биологических систем, как уже отмечалось, существуют различные взаимосвязанные уровни регуляции. Так, различают химический уровень регулирования, молекулярный – активность ферментов, эндокринный, нейровегетативный. В процессе эволюции сформировалась сложная многоуровневая система регуляции.

Рассмотрим несколько примеров функционирования регуляторных систем в клетке, знания о которых используются в биотехнологии.

Концентрация многих молекул в клетке поддерживается на постоянном уровне благодаря регуляции по принципу обратной связи. Это достигается временным увеличением или уменьшением активности ключевых ферментов обеспечивающих синтез этих молекул.

Например, первый фермент в той или иной последовательности реакций ингибируется конечным продуктом этого метаболического пути (рис. 89). Когда концентрация конечного продукта накапливается больше некоего оптимального количества, его дальнейшее образование прекращается. После уменьшения его концентрации реакция его образования вновь восстанавливается, т. е. осуществляется саморегуляция.

Регуляция по принципу обратной связи может срабатывать почти мгновенно, и она может регулироваться не только ингибиторами, но и активаторами.

Другим уровнем регуляции метаболических реакций являются кооперативные изменения активности не одного, а многих ферментов одновременно. Примером таких крупномасштабных изменений может служить переход от процесса расщепления глюкозы к ее биосинтезу или глюконеогенезу. Фактором такого переключения может служить напряженная физическая тренировка. При физической работе необходима энергия и глюкоза расщепляется, в случае голодания глюкоза образуется из жирных кислот и аминокислот (вспомните принцип разветвленных метаболических путей).

Регуляция биосинтеза L-изолейцина в клетках бактерий

Изолейцин образуется из треонина (рис. 90).

В эксперименте было обнаружено, что присутствие L-изолейцина в ростовой среде тормозит внутриклеточный синтез L-изолейцина. Более того, оказалось, что внесение в среду L-изолейцина уменьшало содержание в клетке треонина, из которого он образуется. Это указывало на то, что изолейцин образовывался из треонина и на то, что L-изолейцин каким-то образом снижал активность фермента, катализирующего образование треонина в клетке.

Дальнейшие исследования привели к открытию ингибирующего эффекта L-изолейцина треониндезаминазы (Umbarger H. E. Scince. 123, 843, 1956). Эта работа внесла важный вклад

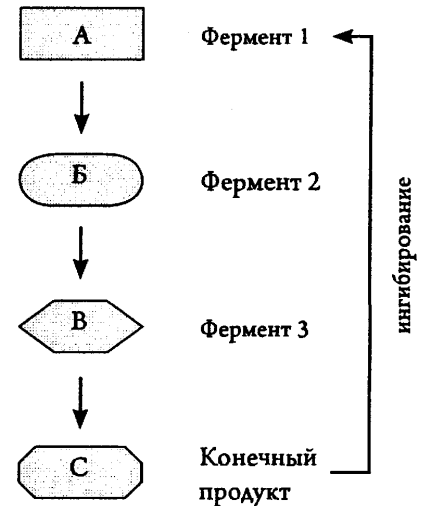


Рис. 89. Схема ингибирования по принципу обратной связи. Конечный продукт С является ингибитором фермента 1, обеспечивающего образование метаболитов Б, В продукта С.



Рис. 90. Схема образования L-изолейцина.

в представления о механизмах регуляции активности ферментов. Ингибирование треониндезаминазы L-изолейцином является конкурентным в том смысле, что в присутствии L-изолейцина концентрация L-треонина, необходимая для достижения полумаксимальной скорости, повышается.

Кинетика этого процесса регуляции достаточно сложна и имеет S-образную зависимость. Это позволяет обеспечивать более эффективную регуляцию образования L-изолейцина.

Исследуя особенности регуляции активности треониндезаминазы и других ферментов, Моно, Шанже и Жакоб в своей классической работе (Monod J., Changeax J. P., Yacob F. J. //Mol. Biol., 1963, 6, 306-329) ввели термин аллостерический эффектор для регуляторной молекулы (в нашем случае L-изолейцина). Суть концепции авторов сводится к тому, что аллостерический эффектор специфически и необратимо связывается с аллостерическим участком фермента. Образование такого комплекса не сопровождается никакой реакцией, в которой бы участвовал сам эффектор, но приводит к скачкообразному (кооперативному) обратимому изменению молекулярной структуры белка, т. е. к аллостерическому переходу, при котором изменяются свойства активного центра фермента: в результате активность фермента изменяется (принцип структурно-функциональной взаимосвязи, рис. 68).

Необходимо отметить, что отсутствие какого-либо «внутреннего» химического сходства или химического взаимодействия между субстратом и аллостерическим эффектором имеет функциональное значение в системе регуляции.

В настоящее время выделено большое количество ферментов, которые несут в своем составе регуляторные субъединицы, выступающие в роли аллостерических модификаторов.

В заключение необходимо отметить, что общие механизмы регуляции биосинтетических процессов в клетках бактерий сводятся к ингибированию фермента, который катализирует первую стадию метаболического пути конечным продуктом этого пути (принцип обратной связи).

В том случае, если бы такое ингибирование осуществлялось не на первой, а на последующих стадиях, то это приводило бы к значительному увеличению концентрации промежуточных продуктов в клетке, и создавало бы трудности в отношении регуляции метаболизма.

Регуляция транскрипции в клетках бактерий

Регуляция транскрипции обеспечивает синтез тех белков, которые необходимы для жизнеобеспечения клетки в данный момент времени. Следовательно, регуляция транскрипции обеспечивает экспрессию только тех генов, которые кодируют белки, обеспечивающие поддержание клеточных функций.

Когда в клетке возникает потребность в каком-то белке, то осуществляется инициация (включение) транскрипции

Аллостерический означает «связанный с другим местом или другим центром».

В отношении ферментов аллостерическими называют те ферменты, которые имеют дополнительный регуляторный центр связывания. Эффектор – это метаболит, который связывается с аллостерическим центром фермента и участвует в регуляции его активности. Если связывание эффектора с аллостерическим центром фермента ведет к ингибированию активности фермента, то его называют отрицательным эффектором. Многие регуляторные ферменты поливалентны, т. е. подчиняются действию более чем одного специфического эффектора.

соответствующего структурного гена или генов, а когда в клетке уже образовалось необходимое количество этих белков и потребность в них отпадает, транскрипция прекращается (экспрессия ингибируется).

Для знакомства с механизмом регуляции экспрессии оперона в клетках бактерий рассмотрим наиболее общие особенности такой регуляции.

У структурных генов *E. coli* имеются два сайта связывания РНК-полимеразы (фермента, обеспечивающего синтез РНК). Один сайт связывания представляет собой нуклеотидную последовательность:

Т А Т А А Т
 | | | | |
 А Т А Т Т А – его называют ТАТА-бокс или бокс Прибнова)

Другая последовательность:

Т Т G А С
 | | | | |
 А А С Т G,

она располагается за 10 нуклеотидов до сайта инициации транскрипции (рис. 91).

РНК-полимераза связывается с промотором и обеспечивает экспрессию структурных генов. В процессе эволюции сформировались различные системы регуляции экспрессии генов.

Так, если с оператором свяжется регуляторный белок, выполняющий функцию репрессора, то он остановит перемещения РНК-полимеразы по оперону и транскрипция будет заблокирована.

Однако в клетке существуют и другие регуляторные белки – эффекторы. Если молекула эффектора (как правило, это вещества с малой молекулярной массой) свяжется с репрессором, находящемся на молекуле ДНК, то его конформация изменится так, что репрессор освобождает оператор и транскрипция вновь возобновится.

Так как содержание эффектора находится под контролем клеточных ферментов, и они способны изменить его концентрацию, то снижение концентрации эффектора ведет к блокированию транскрипции. Необходимо отметить, что операторный участок специфичен для каждого оперона, а эффектор взаимодействует только с определенным репрессором.

Регуляцию транскрипции с помощью репрессора называют отрицательной регуляцией. Если система регуляции транскрипции направлена на повышение скорости транскрипции, то ее называют положительной. Так белок активатор, связываясь с участком между ТАТА-боксом и сайтом инициации транскрипции, не блокирует перемещение РНК-полимеразы по цепи ДНК, а, напротив, ускоряет скорость транскрипции.

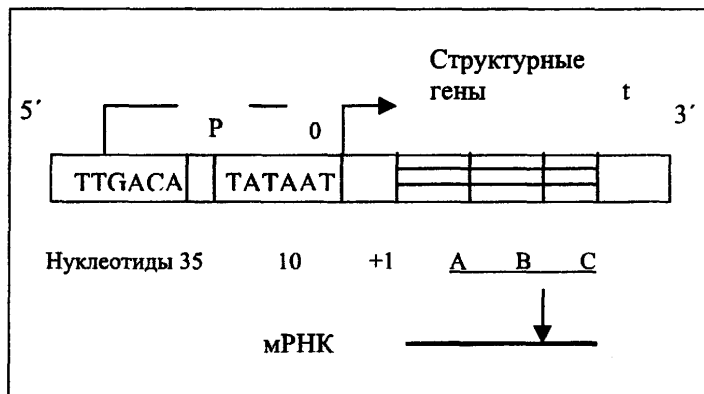


Рис. 91. Организация оперона бактерии. Структурные гены А, В, С находятся под транскрипционным контролем оператора (О) и промотора (Р): РНК-полимераза связывается с участком, находящимся на 10 и 35 пар оснований от сайта инициации транскрипции +1. t – стоп кодон, который останавливает движение РНК-пол и прекращает синтез мРНК. В результате транскрипции оперона образуется молекула матричной РНК.

Жакоб и Моно в 1961 г. предложили гипотезу, объясняющую связь структурных и регуляторных генов. Регуляторный ген-Р кодирует последовательность аминокислот специфического белка, выполняющего функцию репрессора (т. е. ингибитора) Белок-репрессор, связываясь с ДНК, препятствует транскрипции соответствующего структурного гена, того гена, который находится под контролем этого регуляторного гена.

РНК-полимераза (ДНК-зависимая) – фермент, который осуществляет синтез РНК на ДНК-последовательности. РНК-полимераза в отличие от ДНК-полимеразы не способна исправлять ошибки в результате транскрипции и образующаяся РНК имеет больше ошибок, чем ДНК.

Существуют и такие системы, при которых активатор связывается с эффектором и переводит его в неактивную форму и тогда скорость транскрипции уменьшается.

Итак, можно заключить, что существуют многообразные системы регуляции экспрессии структурных генов, которые обеспечивают включение, выключение или изменение скорости транскрипции.

Еще более сложной и многоуровневой является система регуляции транскрипции генов в клетках эукариот.

Регуляция экспрессии генов в клетках эукариот

Если в клетках прокариот синтез РНК обеспечивается одним ферментом, РНК-полимеразой, то в клетках эукариот синтез различных типов РНК осуществляется различными РНК-полимеразами. РНК-пол. I обеспечивает синтез высокомолекулярных предшественников рРНК, РНК-пол. III – низкомолекулярных РНК, в том числе тРНК и 5S рРНК, а РНК-пол. II синтезирует молекулы мРНК (рис. 92), которые транслируясь, определяют аминокислотные последовательности в молекулах белков. Или, другими словами, только мРНК несут информацию об аминокислотной последовательности в белках. Остальные типы РНК обеспечивают механизм трансляции, т. е. синтез белков.

В этом небольшом разделе мы рассмотрим только механизмы синтеза мРНК. В клетках эукариот содержится около 40 000 молекул РНК-пол. II, причем их количество изменяется в зависимости от функциональных свойств клетки.

Включение и выключение генов в клетках эукариот регулируется множеством разнообразных высокоспецифичных процессов. Многие из специфичных белков, регулирующих транскрипцию (факторы транскрипции), непосредственно связываются с нуклеотидной последовательностью ДНК (не более 10 пар нуклеотидов). В отличие от прокариот у эукариот гены не организованы в опероны в том смысле, что каждый структурный ген имеет свой собственный набор регуляторных элементов.

Гены эукариот имеют промоторные участки (ТАТА-боксы, или боксы Хогнесса) из 8 нуклеотидов. Эти элементы находятся на расстоянии 25, 75 и 90 н. п. от сайта инициации. Транскрипция гена начинается с того, что с ТАТА-боксом связывается фактор транскрипции – TFIID, который представлен комплексом по крайней мере 14 белков. После чего с TFIID и участками ДНК, примыкающими к ТАТА-боксу, связываются все другие факторы транскрипции и в завершении со всем этим образовавшимся комплексом связывается РНК-пол. II. Однако для начала транскрипции необходимы дополнительные факторы транскрипции.

Если структура ТАТА-блока изменена, то транскрипция соответствующего гена становится невозможной. Транскрипция будет

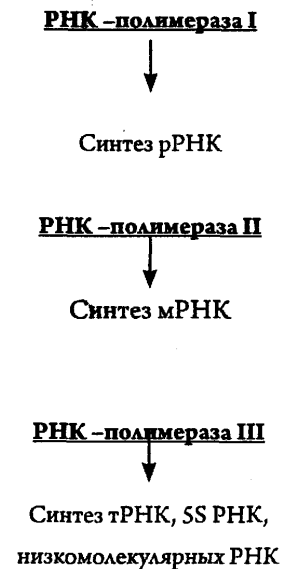


Рис. 92. Разные типы РНК в клетках эукариот синтезируются разными типами РНК-полимераз.

Транскрипция – синтез однопочечной копии РНК на матрице ДНК (матричный принцип) с помощью РНК-полимеразы. Новая цепь всегда синтезируется в направлении от 5' конца к 3' концу.

Факторы транскрипции – белковые молекулы и надмолекулярные комплексы с различными молекулярными массами, принимающие прямое участие в регуляции скорости транскрипции.

Энхансер – сигнальная последовательность нуклеотидов ДНК, усиливающая транскрипцию гена с данного промотора.

невозможна и в случае отсутствия или изменения хотя бы одного из многочисленных факторов транскрипции.

В клетках эукариот идентифицированы факторы транскрипции, которые специфически связываются с регуляторными последовательностями генов ССААТ и GC. Однако как белково-нуклеиновые взаимодействия в данном случае определяют регуляцию транскрипции неясно, так как эти регуляторные последовательности расположены на расстоянии более 75 п. н. от сайта инициации транскрипции.

Еще более загадочным является механизм регуляции транскрипции энхансерными последовательностями.

Энхансеры – это последовательности ДНК расположенные на расстоянии сотен и даже тысяч пар оснований от сайта инициации структурного гена и способные многократно повышать скорость транскрипции соответствующего структурного гена. Следовательно, регуляция транскрипции осуществляется не только на уровне запуска или остановки процесса, но и на уровне изменения скорости синтеза РНК.

Временной фактор регуляции, который мы еще рассмотрим в следующем разделе, является чрезвычайно важным для функционирования биологических систем. Для биологических систем важно не только сколько (количество) и где (пространственное расположение), но и когда (временное совпадения) осуществляются процессы.

Следующей особенностью регуляции, которую можно рассмотреть на примере регуляции транскрипции, является принцип каскадности (или иерархичности), т. е. гены активируются в результате каскада – последовательных событий. Так, например, изменение концентрации гормона в крови может привести к запуску синтеза специфических типов мРНК и, как следствие, соответствующих белков.

Гормон, поступив в кровоток, связывается со специфическим рецептором, который обеспечивает его проникновение в клетку. В клетке гормон связывается со специфическим белком, изменяет его конформацию, только в таком случае этот измененный белок способен проникнуть в ядро и связаться со специфическим регуляторным элементом транскрипции.

Познакомившись с некоторыми особенностями инициации транскрипции генов эукариот, можно заключить, что структурный ген имеет множество регуляторных элементов. Эти регуляторные элементы активируются множеством специфических факторов регуляции. Запуск регуляторного каскада транскрипции осуществляется разнообразными факторами.

Если в клетках бактерий синтезированная РНК сразу же используется в процессе трансляции, то в клетках эукариот процессы синтеза РНК и трансляция (синтез белка на ней) разделены в пространстве и во времени. Более того, вновь образованные молекулы РНК в клетках эукариот подвергаются посттранскрипционным мо-



Георгиев Георгий Павлович (род. 1933).

Основное направление научных исследований – изучение механизмов реализации генетической информации. Открыл новый тип рибонуклеиновой кислоты – ядерного предшественника мРНК (про-мРНК и новый класс внутриклеточных частиц – информосом (ядерные нуклеотиды, содержащие про-мРНК). Установил ряд основных принципов структуры генома у эукариотов. Сформулировал новые представления о структурной организации функциональных элементов хромосом у высших организмов. Предложил метод получения фрагментов ДНК, содержащих в определенной части кодирующей цепи структурные гены.

дификациям и «созреванию», которые сводятся к осуществлению процессинга.

Следовательно, в клетках эукариот от процесса синтеза РНК до процесса синтеза белка функционирует сложная многоуровневая каскадная система регуляции. Рассмотрим основные этапы этой многоуровневой регуляции процесса экспрессии генов.

Эукариотическая РНК-полимераза, как и полимеразы прокариот, начинает и завершает синтез молекулы РНК в строго определенных местах. Образующийся первичный транскрипт значительно превышает длину зрелой мРНК.

В процессе синтеза новообразованная РНК связывается со специфическими белками, что ведет к образованию рибонуклеопротеидных комплексов (РНП-частицы). В изучение этого этапа регуляции экспрессии генов внес вклад академик г. П. Георгиев.

Белки, связывающие РНК, обеспечивают специфическую упаковку и укладку молекул РНК.

Такая компактизация новообразованных РНК обеспечивает регуляцию процессинга первичных РНК-транскриптов и, вероятно, последующего транспорта РНК из ядра в цитоплазму.

Новообразованную РНК называют гетерогенной ядерной РНК (гяРНК). Гетерогенной эта РНК была названа из-за высокого разнообразия размера молекул.

ГяРНК, связанная со специфическими белками, подвергается серии ковалентных модификаций, которые обуславливают функциональную специализацию молекул мРНК. Созреванию подвергаются не только матричные, но и другие типы РНК (рис. 93).

Еще во время синтеза молекулы РНК осуществляется ее кэпирование. Кэпирование – это достраивание на 5'-конце остатка молекулы 7-метилгуанозина, он ковалентно связан 5'-концевым трифосфатом. Так как синтез молекулы РНК осуществляется в направлении $5' \rightarrow 3'$, то кэпирование осуществляется еще до завершения синтеза всей молекулы РНК.

«Кэп» обеспечивает процесс последующего связывания молекулы РНК с рибосомой, т. е. принимает участие в регуляции синтеза белка.

Рост молекулы РНК продолжается в направлении $5' \rightarrow 3'$ со скоростью 30 нуклеотидов в секунду до тех пор, пока РНК-полимераза не встретится с последовательностью ДНК, являющейся сигналом терминации.

Сразу после завершения транскрипции к 3'-концу молекулы мРНК присоединяется от 100 до 200 остатков адениловой кислоты [поли (А)]. Этот процесс называют полиаденилированием, он регулируется ферментом поли-(А)-полимеразой.

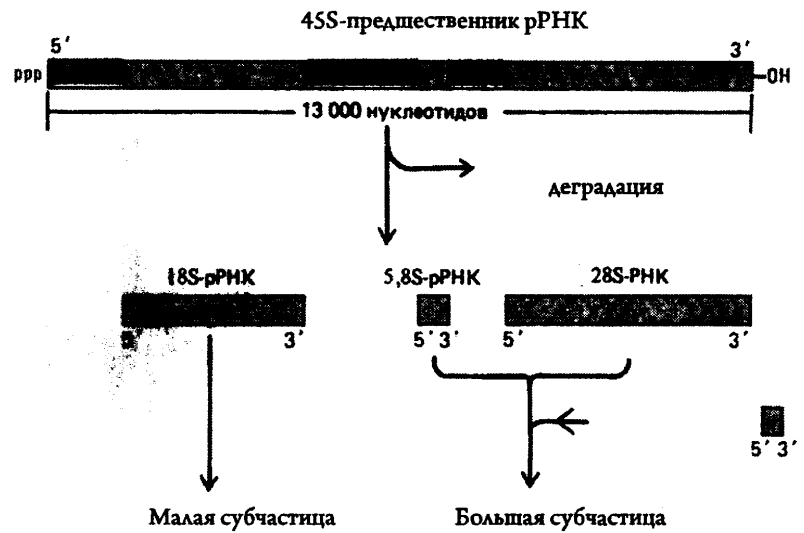


Рис. 93. Процессинг 45S рРНК. Более половины последовательности предшественника деградирует в процессе созревания.

Структура «кэпа» образована 7-метилгуанозином, который присоединяется к 5'-концу рибозы необычным способом через 5'-5'-трифосфатный мостик. Два последних остатка рибозы метилированы во втором положении. Второй остаток рибозы может метилироваться не всегда.

Функция поли-А-фрагмента окончательно не установлена, считается, что он обеспечивает дальнейший процессинг молекулы, транспорт зрелых молекул мРНК в цитоплазму и количество циклов трансляции.

Так как кэпирование 5'-конца и полиаденилирование 3'-конца осуществляется только в молекуле мРНК, т. е. молекулу, синтезируемых РНК-пол. II, то была высказана гипотеза, что ферменты, участвующие в этой модификации РНК, взаимодействуют с РНК-пол. II, но не с РНК-пол. I и III.

Необходимо отметить, что поли-А-фрагмент, который характерен только для молекул мРНК, используется для аналитического отделения молекул мРНК от рРНК и тРНК. Это разделение основано на использовании аффинной хроматографии.

Образование первичного транскрипта гяРНК регулируется большим количеством специфических факторов. На первом этапе формируется инициаторный комплекс, на втором этапе осуществляется элонгация – собственно синтез гяРНК и кэпирование 5'-конца молекулы РНК, на третьем этапе, сразу после завершения синтеза осуществляется полиаденилирование гяРНК.

Первичный транскрипт гяРНК нестабилен и подвергается дальнейшим превращениям – процессингу, который и обеспечивает формирование «зрелых» молекул мРНК.

Регуляция процессинга ядерной РНК

Важным этапом в развитии биохимии явилось использование радиоактивно меченых предшественников макромолекул в исследовании метаболизма. Этот подход позволил «наблюдать» за динамикой молекулярных процессов. Для исследования метаболизма нуклеиновых кислот чаще всего использовали [³H]-тимидин (для мечения ДНК) и [³H] или [¹⁴C] – уридин (для мечения РНК).

Исследование «судьбы» или метаболизма гяРНК с помощью радиоактивных соединений позволило показать, что: 1 – молекулы гя РНК, имеющие среднюю длину 6 000 нуклетидов, (отдельные молекулы могут содержать до 50 000 нуклетидов) достаточно быстро, в течение 15-30 мин уменьшаются в размерах в среднем до 1500 нуклетидов; 2 – в цитоплазме уже зрелые молекулы мРНК обнаруживаются спустя 15-30 мин после синтеза. В цитоплазме выявляется только небольшая часть синтезированной в виде гяРНК не более 1-5 %.

Обнаружение этих фактов показало принципиальное отличие функционирования генома клеток прокариот и эукариот.

Исследование процессов превращения гяРНК в зрелую мРНК привело к открытию в 1977 г. прерывистой или расщепленной структуры генов эукариот. Оказалось, что гяРНК, которая является копией гена, представлена двумя типами последовательностей: экзонами и интронами. Последовательности, которые определяют последовательность аминокислот в молекуле белка названы

Экзоны – нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности полипептидной цепи.

Интроны – нуклеотидные последовательности, не кодирующие последовательность аминокислот, в результате вырезания интронов и последующего сплайсинга экзонов из гетерогенной РНК образуется зрелая мРНК. В зрелой мРНК экзоны соединены концами так, что рамка считывания прочитывается рибосомами.

Сплайсинг – удаление интронов с последующим сшиванием экзонов.

Сплайсинг начинается после полиаденилирования транскрипта. Сплайсинг может осуществляться по-разному, т. е. имеет место альтернативный сплайсинг, что обеспечивает образование различных зрелых мРНК из одного и того же первичного транскрипта. Альтернативный сплайсинг достаточно часто встречается для основных регуляторных генов, а также в системе иммунного ответа.

экзонами. Они остаются в составе зрелых мРНК. Последовательности, которые не несут информацию для синтеза белка и удаляются (выщепляются и разрушаются в ядре) из гяРНК в процессе созревания мРНК называются интронами.

Исследование последовательности расположения интронов и экзонов в гяРНК показало, что экзоны и интроны «перемешаны» в молекуле гяРНК и для образования зрелых мРНК необходимо вырезать интроны, а после этого сплечь разорванную последовательность экзонов и сформировать зрелую молекулу мРНК (рис. 94).

Количество интронных участков различно в разных генах и может варьировать от 1 до 50. Следовательно, разные типы мРНК спlicingаются из различного количества фрагментов.

Механизмы регуляции процессинга изучены недостаточно. В настоящее время имеются данные, которые свидетельствуют о том, что в этом сложном многостадийном процессе принимают участие малые ядерные РНК (мяРНК).

Предполагают, что они служат сигналами для сплайсинга РНК, мяРНК образуют комплементарное связывание с пограничными участками интронов, а это в свою очередь ведет к формированию кольца интронов (рис. 94).

На РНК формируются комплексы с белками, которые называются мяРНК-частицами (малыми ядерными рибонуклеопротеиновыми частицами).

Хотя механизмы сплайсинга очень сложны и далеко не ясны, можно говорить о том, что формирование прерывистых генов в клетках эукариот имеет огромное преимущество перед генами прокариот.

Одной из наиболее важных является возможность альтернативного сплайсинга и образование из одной гяРНК нескольких типов мРНК, кодирующих различные белки. Одним словом, существование механизма сплайсинга обеспечивает дополнительную генетическую гибкость организму.

Альтернативный сплайсинг впервые был обнаружен у аденовирусов – вирусов, инфицирующих клетки животных. В результате альтернативного сплайсинга одного и того же транскрипта образуются молекулы различных типов мРНК, которые имеют одну и ту же 5'-концевую последовательность – кэп. Альтернативный сплайсинг имеет место и при формировании молекулы антител в лимфоцитах.

После завершения процессинга и формирования зрелых мРНК, они транспортируются в цитоплазму, где осуществляется синтез белка (трансляция).

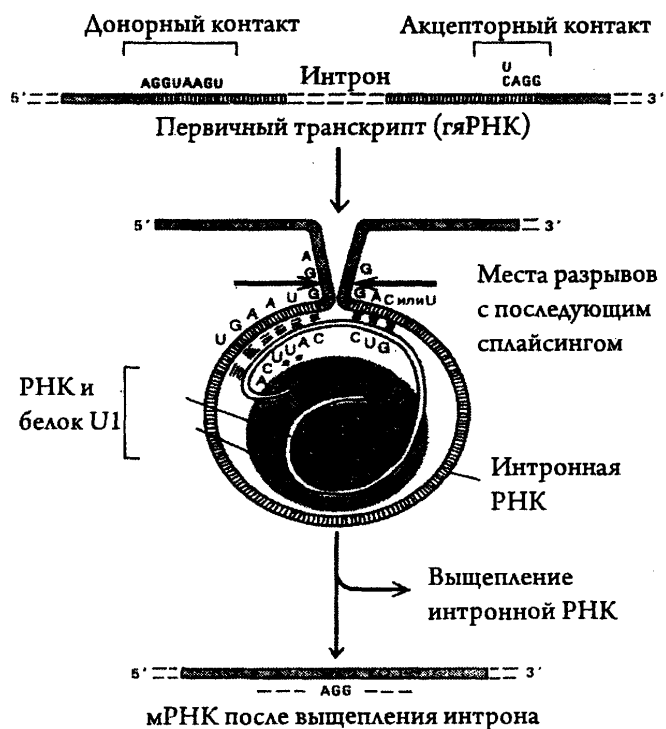


Рис. 94. Предполагаемая схема участия мяРНК (U1) в сплайсинге гяРНК.

Механизм регуляции транспорта РНК из ядра в цитоплазму

Экспериментальные данные показали, что только небольшая часть вновь образованной в ядре мРНК выявляется (транспортируется) в цитоплазме. Как правило, количество транспортируемой мРНК составляет не более 5 % от всей синтезируемой гРНК. Этот факт свидетельствует о том, что на уровне транспорта осуществляется контроль механизмов реализации генетической информации (рис. 95).

Установлено, что в случае удаления интронов из РНК-транскрипта, такая РНК остается в ядре и не транспортируется в цитоплазму. Это указывает на то, что в процессе сплайсинга обеспечивается формирование каких-то сигналов, вероятно, обеспечивающих дальнейший транспорт РНК в цитоплазму.

Ряд экспериментальных данных свидетельствует об участии мРНК и специфических белков клетки в механизме транспорта РНК из ядра в цитоплазму.

В нашей лаборатории было показано, что ингибирование синтеза РНК в ядрах клеток интактной печени ведет к прекращению транспорта РНК в цитоплазму, даже в том случае, если количество уже синтезированной РНК в ядре и «готовой» к транспорту достаточно велико. Напротив, если в активно пролиферирующих клетках остановлен дальнейший синтез РНК, то транспорт РНК в цитоплазму продолжается до почти полного «истощения» имеющихся там вновь синтезированных РНК.

Эти исследования указывают на активную роль компонентов цитоплазмы в механизме транспорта РНК из ядра.

Механизмы регуляции транспорта РНК из ядра в цитоплазму мало исследованы. Сегодня можно утверждать, что транспорт РНК из ядра в цитоплазму многостадийный, тонко регулируемый процесс, который принимает непосредственное участие в экспрессии генов в клетках эукариот.

В данном разделе мы остановились только на некоторых примерах, демонстрирующих многоуровневость системы регуляции метаболизма. Выбор этих примеров обусловлен значимостью этих процессов в биотехнологии. Мы не остановились на сложной и относительно хорошо изученной системе регуляции трансляции – завершающем звене экспрессии генов, так как он хорошо описан во всех учебных пособиях по молекулярной биологии.

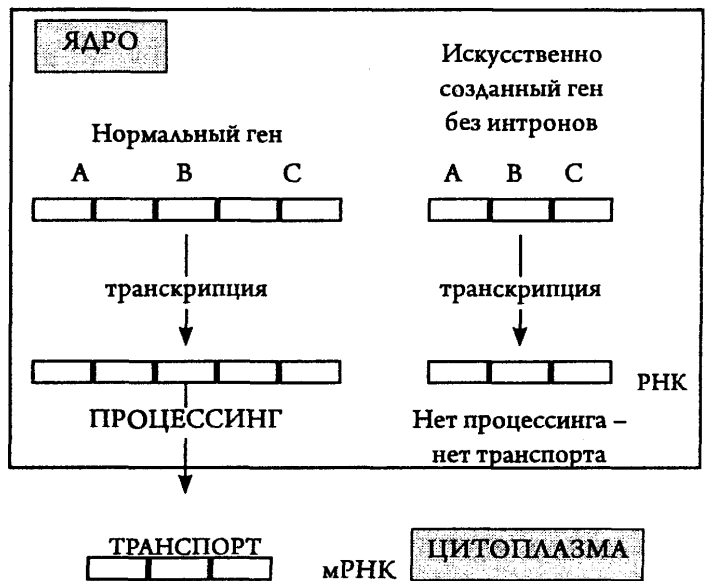


Рис. 95. Схема, демонстрирующая многоуровневость регуляции экспрессии генома в клетках эукариот (транскрипция, процессинг, транспорт).

Ингибировать – сдерживать, останавливать.
Ингибитор – вещество замедляющее или останавливающее ферментативные реакции. Ингибиторы – это природные (антибиотики и др.) или синтетические вещества.

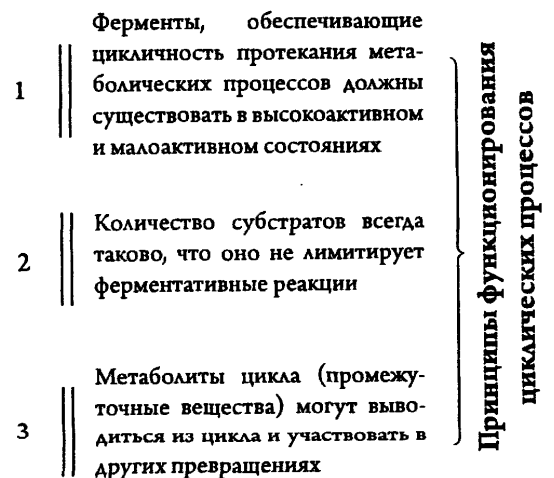


Рис. 96. Схема, отражающая принципы функционирования циклических процессов.

Для биологических систем характерен не только уникальный молекулярный состав, но и особая пространственно-временная молекулярная организация. Или другими словами, система регуляции обеспечивает концентрационные градиенты, пространственное размещение и временное совпадение необходимых молекул.

Исследовать временные системы регуляции очень сложно, так как для этого необходимо проводить анализ временной динамики в линейном режиме или с узким интервалом дискретизации. К сожалению, существующие методы биохимии не позволяют проводить подобные исследования. Сегодня мы можем говорить только о наличии циклических систем регуляции метаболизма (рис. 96).

Формирование метаболических циклов обеспечивает сопряженность (согласованность) различных метаболических систем и тем самым интеграцию их в единую систему. Пожалуй, одним из первых описанных метаболических циклов был цикл лимонной кислоты или цикл Кребса (цикл трикарбоновых кислот).

Основные этапы цикла были описаны в 1943 г. английским биохимиком Хансом Адольфом Кребсом. Цикл лимонной кислоты включает процесс конденсации уксусной кислоты — CH_3COOH со щавелево-уксусной кислотой $\text{HOOCCH}_2\text{COCOON}$, которая приводит к образованию лимонной кислоты (цитрата) трикарбоновой кислоты, молекула которой содержит 6 атомов углерода.

Однако позже было показано, что сама уксусная кислота не может входить в цикл трикарбоновых кислот, а образует ацетил-SКоА.

Важно, что ацетил-SКоА, вступающий в цикл лимонной кислоты может происходить из полисахаридов, жирных кислот или аминокислот (принцип разветвленных метаболических путей). Как мы знаем, цикл лимонной кислоты обеспечивает клетку не только метаболитами, но и энергией (синтезом АТФ).

Если рассмотреть этот цикл изолированно, то окажется, что ацетильные остатки распадаются в нем без какого-либо изменения количества промежуточных продуктов, следовательно, этот процесс носит циклический и каталитический характер, так как промежуточные вещества в нем не накапливаются и не расходуются.

На примере особенностей регуляции цикла Кребса, можно обобщить три фундаментальных положения циклической регуляции. Достаточно иметь один или несколько входящих в цикл ферментов, которые должны существовать в высокоактивном и малоактивном состояниях. Для цикла Кребса известны три таких фермента: цитратсинтаза, NAD^+ -изоцитратдегидрогеназа и 2-оксоглутаратдегидрогеназа.

Если в покое (мышцы) количество субстрата для любого из трех ферментов достигнет уровня насыщения, то поток веществ в цикле увеличивается в результате ускорения оборота.

Цикличность — круговой, совокупность процессов, которые формируют кругооборот в течение известного промежутка времени.

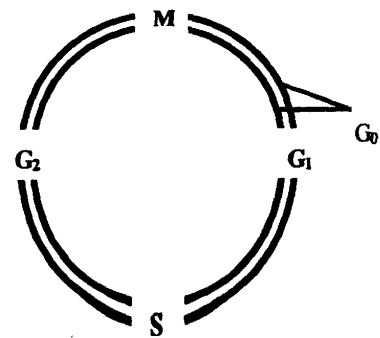


Рис. 97. В процессе жизнедеятельности клетки осуществляются многократно повторяющиеся изменения функции генетической системы. После митоза (М) осуществляется интенсивный синтез РНК и белков (G₁-период), затем синтезируются РНК, белки и ДНК (S), G₂-период характеризуется синтезом специфических РНК и белков, обеспечивающих прохождение митоза (М). Клетка может выйти из цикла, т. е. перейти в так называемый G₀ или R период.

Вторым фундаментальным свойством регуляции циклических процессов является то, что ферментативные реакции не лимитируются количеством субстрата. Необходимо отметить, что это правило не соблюдается в покоящихся мышцах. В них низкая концентрация оксалацетата ограничивает активность цитратсинтазы.

Третье фундаментальное положение циклической организации метаболизма состоит в том, что промежуточные вещества цикла по необходимости могут выводиться из цикла и использоваться в других превращениях.

Все метаболические превращения в клетке организованы в циклические системы: цикл синтеза белка, цикл синтеза ДНК, клеточный цикл (рис. 97) и т. д.

Так, формирование представлений о клеточном цикле началось тогда, когда было обнаружено, что синтез ДНК в клетке осуществляется только в определенный период жизни неактивной клетки (позже он был назван S-период, т. е. синтетический период). С синтезом ДНК сопряжен цикл хроматина. Этот цикл характеризуется последовательным изменением структуры хроматина и синтезом его компонентов (прежде всего белков), а это проявляется во временной последовательности экспрессии генов. Это означает, что синтез каждого белка ограничен во времени и приурочен к определенному моменту клеточного цикла.

В проявлении цикличности основную роль играют ферменты. С позиции временной организации все ферменты могут быть разделены на несколько групп: «непрерывные» ферменты – это те ферменты, количество которых постепенно и непрерывно возрастает в интерфазе клеточного цикла; «ступенчатые» ферменты – количество которых резко возрастает в определенные моменты цикла; «пиковые» ферменты – количество которых возрастает и также резко падает на протяжении короткого периода времени.

В заключение отметим, что циклическая организация метаболизма обеспечивает временную организацию функционирования биологических систем.

Под временной организацией следует понимать характеристику или особенности реализации тех или иных реакций во времени. В том смысле, что для образования метаболита и его превращения в другое соединение требуется какое-то время с одной стороны, и согласование реакции во времени – с другой.

Глава IV

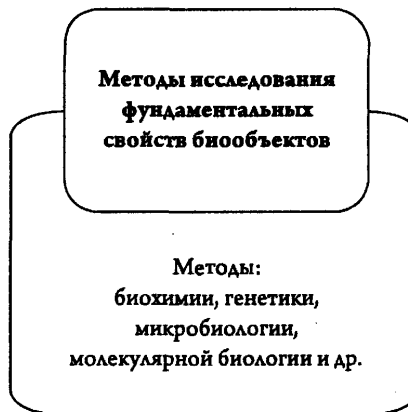
Методы биотехнологии

Классификация методов биотехнологии

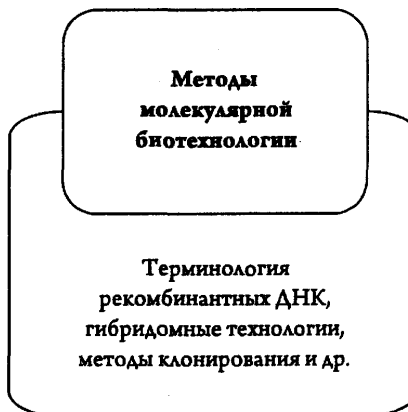
Биотехнология как интегральная область использует огромный арсенал методов. Для удобства весь набор методов, используемый в биотехнологии можно разбить на три группы методов (рис. 98):

Метод – совокупность приемов или операций, позволяющих решать конкретные задачи, или способствующих достижению цели.

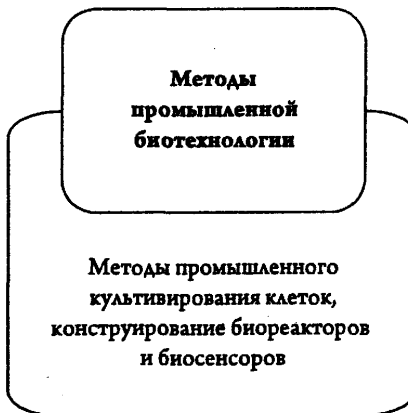
I. Методы, которые используются при исследовании фундаментальных механизмов функционирования биологических систем. Это современные методы биохимии, генетики, молекулярной биологии, иммунологии и других биологических наук. Используя арсенал этих методов, биотехнологи решают такие фундаментальные задачи как механизмы структурно-функциональной организации продуцентов.



II. Методы, которые позволяют осуществлять реконструкцию биологических объектов, используемых в биотехнологии (методы молекулярной биотехнологии). Эти методы, в свою очередь, можно разбить на две группы. К одной из них можно отнести конструирование векторов и рекомбинантных ДНК, т.е. молекулярные манипуляции, а ко второй группе – гибридизацию клеток, т.е. клеточный уровень. Методы получения векторов и рекомбинантных ДНК будут изложены в главе VIII, а методы клеточной гибридизации в главе V и VI.



III. Специфические методы крупномасштабного (промышленного) культивирования биообъектов, которые позволяют получать целевой продукт в промышленном объеме. Культивирование биообъектов может осуществляться в периодическом, полунепрерывном или непрерывном режимах. Это обеспечивается использованием специального оборудования – биореакторов или ферментеров. Еще одна особенность для методов биотехнологии связана с тем, что все процедуры осуществляются в асептических (стерильных) условиях (от греческого «asepticos» – не гнилостный), т.е. в условиях, исключающих возможность попадания в среду культивирования биообъектов болезнетворных (патогенных) и не болезнетворных (сапрофитных) микроорганизмов. Это связано с тем, что патогенные микроорганизмы представляют опасность для обслуживающего персонала, а сапрофитные виды микроорганизмов являются конкурентами за питательные вещества организмов-продуцентов.



В этой главе мы рассмотрим: способы стерилизации; закономерности кинетики роста культур в биореакторе; способы

Рис. 98. Группы методов, используемые в биотехнологии.

культивирования; особенности процессов макропереноса в биореакторах и типы биореакторов, т.е. методы, используемые в промышленной биотехнологии. С некоторыми методами будем знакомиться в отдельных главах.

Стерилизующие агенты и способы стерилизации

Что такое стерилизация?

Под термином «стерилизация» следует понимать полное разрушение всех жизнеспособных организмов. Стерилизация – это полная инактивация всех форм микробной жизни в отношении способности к размножению. Это понятие следует отличать от понятия «дезинфекция», которое означает лишь снижение количества контаминирующих микроорганизмов до «безопасного», не вызывающего инфицирования, но не обязательно их полного разрушения.

Бактерии и клетки грибов, характеризуются высокой скоростью роста по сравнению с клетками животных и растений. Если в культуре клеток млекопитающих или растений попадает даже небольшое количество клеток бактерий, то их количество очень быстро увеличивается и препятствует росту культур продуцента. Поэтому на всех этапах биотехнологического процесса должна быть исключена возможность контаминации (инфицированность микроорганизмами).

Исследование характера деструкции многих микроорганизмов под влиянием термообработки показало, что он следует логарифмическому закону, близкому к закону, описывающему механизмы реакции первого порядка, т.е. одномолекулярных реакций. Это означает, что чем большее количество микроорганизмов необходимо инактивировать, тем более «жесткие» условия стерилизации необходимо использовать для достижения этой цели.

Допустим, что при данных условиях стерилизации разрушается 99,99 % клеток микроорганизмов. Для того чтобы уничтожить 99,999 % микроорганизмов, т.е. увеличить эффективность стерилизации еще на порядок, необходимо усилить вдвое условия стерилизации, например, температуру, или дозу облучения, или же удвоить время обработки.

Действие всех стерилизующих агентов основано на инактивации процессов, обеспечивающих рост и репродукцию клеток. Это, прежде всего, денатурация ферментов и инактивация генома. Известно, что споры бактерий более устойчивы к действующим агентам, чем вегетативные клетки. Эти различия в устойчивости могут быть связаны с тем, что споры окружены плотной мембраной и в них понижено содержание воды.

Результаты показали, что практически все споры погибают при температуре 121 °С в течение 15 мин, хотя некоторые виды, например, *Clostridium botulinum*, могут выдерживать температуру до 170 °С.

Стерилизация – это полная инактивация всех форм микробной жизни в отношении способности к размножению.

Дезинфекция – это снижение количества контаминирующих микроорганизмов до «безопасного», не вызывающего инфицирования, но не обязательно их полного разрушения.

Пастеризация – способ уничтожения микробов в жидкостях и пищевых продуктах однократным нагреванием до температуры 60-70 °С с выдержкой 15-30 мин. Предложена Л. Пастером.

Требования к асептике в биотехнологических процессах

Асептика или стерилизация – это комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания в среду посторонних микроорганизмов (вирусов, микоплазм, бактерий, грибов). Необходимо учитывать, что любой материальный поток является потенциальным источником микроорганизмов.

Воздушная пыль или капельки влаги в воздухе содержат на своей поверхности слой адсорбированных микроорганизмов и их спор. Частицы пыли имеют различные размеры и их делят на три фракции: крупноядерную с диаметром частиц более 100 мкм; мелкоядерную – менее 100 мкм и фазу бактериальной пыли с диаметром частиц от 1 до 100 мкм. Частицы крупноядерной фракции при отсутствии потоков воздуха оседают на поверхности в течение нескольких секунд. Частицы, относящиеся к мелкоядерной фракции, могут находиться в воздухе достаточно долго и образуют устойчивую коллоидную систему.

Производственные помещения по степени загрязненности воздуха микроорганизмами и механическими частицами в расчете на 1 м³ классифицируют на 4 класса чистоты (рис. 99).

1-й класс чистоты с ламинарным потоком стерильного воздуха, в котором отсутствуют микроорганизмы, а механических частиц размером до 0,5 мкм не должно быть более 3500. В таких помещениях готовят стерильные лекарственные средства. 2-й класс чистоты – это помещения, в которых содержится не более 50 микробных клеток, а механических примесей размером 5 мкм не более 2500 частиц и частиц размером 0,5 мкм до 350 000 в 1 м³. 3-й класс чистоты до 100 микробных клеток (кроме этого разделяют 3А – до 200 и 3Б до 500 клеток), а механических частиц размером 5 мкм до 25 000 и размером 0,5 мкм до 3,5 млн. в 1 м³. Для 4-го класса чистоты достаточно выполнения условий по ГОСТ 12.1.000-86.

Сотрудники, работающие в чистых помещениях, должны надевать специальную технологическую одежду (согласно требованиям GLP). Так, в помещениях первого класса чистоты надевают стерильный костюм, головной убор, который полностью закрывает волосы, включая бороду, и заворачивается под ворот костюма, а на лицо надевается маска, на руки – стерильные перчатки, на ноги – бахилы. Такая одежда является одноразовой или же может быть использована только в течение одного дня. Двери в таких помещениях снабжены воздушными шлюзами, а в рабочие помещения стерильный воздух подается под положительным давлением и обменивается с 600-200 кратностью в час.

Агенты, обеспечивающие стерильность

Температура

Существует достаточно большое количество агентов, обеспечивающих инактивацию микроорганизмов. Их можно разделить на несколько групп: 1 – тепло, включая пар и горячий воздух; 2 – токсические химические соединения; 3 – физические факторы:

По степени загрязненности водоемы делят на 3 зоны сапрофитности (от латинского *saprotites* – гниль, гниение):

полисапробная – сильно загрязненная, содержащая несколько миллионов бактериальных клеток в 1 мл;

мегасапробная – умеренно загрязненная, содержащая до 100000 микробных клеток в 1 мл;

олигосапробная – зона чистой воды, в которой содержится не более 1000 микробных клеток в 1 мл.

1-й класс чистоты

Микробы отсутствуют.
Механических частиц до 0,5 мкм не более 3500 в м³.

2-й класс чистоты

Микробных клеток не более 50, механических примесей 5 мкм не более 2500, а частиц м 0,5 мкм до 350 тыс. в м³.

3-й класс чистоты

Микробных клеток не более 100, механических примесей 5 мкм не более 25000, частиц размером 0,5 мкм до 3,5 млн. в м³.

4-й класс чистоты

ГОСТ 12.1.000-86

Рис. 99. Классы чистоты производственных помещений.

ионизирующая радиация, главным образом γ -лучи. Широко применяющееся ультрафиолетовое излучение не всегда эффективно.

Тепло в виде насыщенного пара или горячего воздуха является наиболее универсальным средством стерилизации. Стерилизация паром наиболее эффективный метод термообработки. По мнению Rohn O., это объясняется тем, что под действием пара происходит коагуляция белков, а гибель клеток при действии сухого тепла является результатом окислительных процессов. При обработке клеток паром, вероятно, разрушаются внутримолекулярные дисульфидные связи с образованием свободных сульфгидрильных $-SH^+$ групп. Эти реакционноспособные группы вступают в случайное взаимодействие с другими белками и формируют неправильные вторичные и третичные структуры.

Необходимо отметить, что обработка паром обеспечивает снижение популяции клеток на величину, составляющую более 10^{15} , в то время как для большинства других методов стерилизации, например, при использовании этиленоксида, этот показатель будет не более 10^8 - 10^9 клеток.

В случае воздействия сухого тепла на клетки обнаружено, что по мере повышения температуры и дегидратации клетки степень воздействия на белковые молекулы различных полярных групп ($-OH$, $-SH$ и др.) снижается. Следовательно, для разрушения структуры белков требуется более высокая температура. Если при обработке паром при $121^\circ C$ уничтожается 10^{15} клеток, то для достижения такого же эффекта сухим теплом необходима температура 160 - $180^\circ C$ в течение 15 мин. Однако не все материалы или компоненты питательных сред могут без изменений выдерживать такие температуры и в таком случае необходимо использовать другие способы стерилизации.

Химические вещества

Большое количество химических веществ являются токсичными для микроорганизмов. Однако при стерилизации оборудования, предназначенного для культивирования клеток, наиболее эффективными являются этиленоксид и формальдегид. Эти соединения необратимо взаимодействуют с аминогруппами ($-NH_2$).

Этиленоксид $(C_2H_4)_2O$ – газообразное вещество, которое имеет точку кипения $10,8^\circ C$. Он легко алкилирует свободные аминогруппы белков и нуклеиновых кислот и инактивирует эти макромолекулы, что ведет к гибели микроорганизмов.

Формальдегид $(HCHO)$ высоко токсичен для всех клеток, включая и бактериальные споры. При температуре 50 - $60^\circ C$ и относительной влажности 80 - 90% его действие сравнимо с действием этиленоксида. Формальдегид обычно используют в виде 10% водного раствора. Большое распространение получили в качестве стерилизующих агентов хлорпроизводные соединения.

Ионизирующая радиация

Для стерилизации обычно применяют γ -лучи (или рентгеновские лучи), можно использовать и электроны высоких энергий, которые получают в линейных ускорителях. Ионизирующая

Температура – физическая величина, характеризующая состояние термодинамического равновесия системы. Более высокой температурой обладают те тела, у которых средняя кинетическая энергия атомов, молекул выше. Температура всех частей изолированной системы, находящейся в равновесии, одинакова. Если система не находится в равновесии, то между ее частями, имеющими разную температуру, происходит теплообмен. За единицу абсолютной температуры в системе СИ принят кельвин (К). Значение температуры по шкале Цельсия ($t, ^\circ C$) связано с абсолютной температурой соотношением: $t = T - 273,15 K$.

Этиленоксид и формальдегид токсичны не только по отношению к бактериальным клеткам, но и ко всему живому, включая человека.

радиация приводит к ингибированию ферментов, изменению структуры ДНК (в некоторых случаях даже к разрыву пуриновых и пиримидиновых колец и полипептидных цепей).

Облучение может приводить и к разрушению внутриклеточных структур, что может сопровождаться освобождением мембраносвязанных ферментов и потере их активности.

γ -лучи имеют повышенную проникающую способность, и они могут использоваться при стерилизации изделий из пластмасс – фильтры, шприцы и т. д. Было показано, что доза 2,5 Мрад (мегарад) достаточна для стерилизации многих медицинских материалов, она принята в качестве стандарта. Вместе с тем, выявлены и необычайно стойкие к облучению микроорганизмы. Так, *Micrococcus radiodurans* способен переносить дозу облучения до 6 Мрад. Однако он редко встречается в лабораторной практике.

Затруднения в применении γ -лучей связаны с высокой стоимостью источников излучения (кобальт-60, цезий-137) и затрат на защитное оборудование.

Методы стерилизации

Стерилизация паром под давлением

Наиболее эффективным и надежным средством стерилизации является насыщенный пар под давлением (автоклавы). Этот метод может рассматриваться в качестве универсального при условии, что: 1 – для этого имеется автоклав и 2 – объекты, которые подвергаются стерилизации, не повреждаются высокой температурой и влажностью.

Установлено, что насыщенный пар эффективно разрушает все микроорганизмы, включая термофильные бактерии и бактериальные споры. Эффективность такой обработки обусловлена высокой теплоемкостью пара. Так, при 100 °С теплоемкость пара в 7 раз больше, чем такое же количество воды при этой же температуре.

Скорость стерилизации паром зависит от температуры пара. Для того, чтобы повысить температуру пара используют давление. В таблице 8 представлена зависимость между температурой и временем обработки, необходимым для стерилизации насыщенным паром. Чаще всего используют условия 121 °С (1,05 кг/см²) в течение 20-30 мин. Необходимо отметить, что время стерилизации учитывают с момента, когда все предметы, подвергнутые стерилизации, достигнут температуры пара. Время стерилизации зависит от объема и состава материала, который стерилизуется, от размера камеры для стерилизации.

Стерилизацию паром проводят в автоклавах, которые имеют различное конструктивное решение. Основное препятствие в создании оптимальных условий для стерилизации паром связано с различиями физических свойств воздуха и пара. Когда пар подается в камеру, воздух, благодаря большой плотности и более низкой температуре по сравнению с паром, располагается у дна

Рентгеновские лучи – электромагнитное излучение с длиной волны от 10^{-5} до 10^2 нм. Возникают в результате торможения быстрых электронов в веществе или при переходе электронов с внешних оболочек на внутреннюю. Источниками являются некоторые радиоактивные элементы, ускорители и накопители электронов, рентгеновская трубка. Открыты в 1895 г. В.К.Рентгеном (немецкий физик). За открытие и исследование рентгеновских лучей стал первым лауреатом Нобелевской премии в 1901 г.

Поглощенная доза Ра_D (рад)

$$1 \text{ рад} = 100 \text{ эрг/г} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ Дж/кг} =$$

$$1 \cdot 10^{-2} \text{ Гр}$$

$$1 \text{ Гр} = 1 \text{ Дж/кг} = 10^4 \text{ эрг/г} = 100 \text{ рад}$$

Температура пара, °С	Время стерилизации, мин	Давление пара, кг/см ²
115	30	0,70
121	15	1,05
126	10	1,10
134	3	2,10

Табл. 8. Зависимость между температурой и временем, необходимым для стерилизации насыщенным паром под давлением.

камеры. А так как пар и воздух плохо смешиваются, то в камере образуется градиент температуры (внизу холоднее, чем сверху камеры), что приводит к разной стерилизации материала в камере. Эта проблема решается предварительным вытеснением воздуха из стерилизационной камеры и достигается двумя путями: вытеснением воздуха потоком пара из камеры – это используется в автоклавах старой конструкции и с помощью вакуума, который применяется в автоклавах современных конструкций, так называемых высоковакуумных автоклавах.

Автоклав – это сосуд, который выдерживает высокое давление в пределах безопасности функционирования от 1,4 до 2,1 кг/см². Устройство автоклава позволяет обеспечить контролируемые условия стерилизации (влажность, давление, температуры и время воздействия).

Стерилизация горячим воздухом

Горячий воздух эффективно может быть использован для стерилизации металлических и стеклянных предметов (хирургические инструменты), он используется при стерилизации фармацевтических препаратов (порошки, мази), которые не могут обрабатываться паром (неблагоприятное действие влаги).

Стерилизация сухим паром осуществляется в сушильных шкафах, которые обеспечивают регуляцию температуры и время обработки. Недостаток использования горячего воздуха в качестве стерилизующего агента связан с несовершенством конструкции аппаратов для получения нагретого воздуха. Так, при средней температуре в шкафу 180 °С в некоторых частях аппарата она достигает только 150 °С.

Практика показала, что для большинства микроорганизмов, в том числе *Bacillus anthracis* и различных видов *Clostridium* летальной является температура 170 °С на протяжении 60 мин. Увеличение температуры до 180 °С и времени обработки до 60 мин приводит к гибели практически всех видов микроорганизмов и даже теплоустойчивых спор почвенных бактерий.

Аэрозоли опасны для человека не только из-за микроорганизмов, адсорбированных на них, но и сами по себе вследствие их способности проникать в альвеолы дыхательной системы и угнетать их функцию. В альвеолы проникают частицы размером менее 3 мкм. Особую опасность для здоровья представляют аэрозольные частицы асбеста, алебаstra, абразивного порошка, графита, гипса, диоксида титана, извести, корунда, карбида кремния, оксида олова, стекловолосна.

Стерилизация химическими веществами

Оборудование, которое повреждается действием пара или горячего воздуха, стерилизуется этиленоксидом или другими химическими веществами. Стерилизация внутренней полости замкнутых контейнеров осуществляют 10 % этиленоксидом и выдерживают в течение ночи при температуре 20-25 °С. В том случае, если нельзя обрабатывать при таких больших экспозициях, используют более высокие концентрации газа (80 %) при температуре 50-60 °С.

Было обнаружено, что на эффект стерилизации оказывает влияние влажность воздуха. Наибольший эффект стерилизации выявляется при относительной влажности более 30 %. Для подбора оптимальных условий стерилизации химическими веществами проводят тестирование на стерильность.

Существенным недостатком применения этиленоксида для стерилизации является то, что он образует взрывоопасную смесь с воздухом и очень токсичен. Для устранения этих недостатков применяют смесь этиленоксида с фреонами и строго следят за утечкой

Токсичность – от слова ядовитость, способность некоторых химических веществ вызывать развитие патологий или гибель организма. Токсичностью обладают и ряд природных соединений (они образуются бактериями, водорослями, грибами и ядовитыми растениями и животными). Природа токсических веществ чрезвычайно разнообразна.

этиленоксида. Отходы этиленоксида после завершения стерилизации подвергают утилизации. Для этого используют орошаемые водой фильтры, и в результате реакции образуется этиленгликоль.

Стерилизация воздуха

Стерилизация воздуха ультрафиолетовым излучением

Отсутствие в воздухе жизнеспособных микроорганизмов является необходимым условием функционирования многих технологических процессов. Стерильный воздух используется для аэрации в процессах ферментации. Он необходим на участках так называемых стерильных зон, где осуществляют очистку готовой продукции. Очистка воздуха от вредных (патогенных для человека) микроорганизмов – необходимое условие защиты персонала и окружающей среды.

В атмосферном воздухе содержится достаточно большое количество мелкодисперсных частиц. Размер этих частиц от 0,5 до 2 мкм. В состав дисперсных частиц входят клетки и споры микроорганизмов.

Состав микроорганизмов обычного технологического воздуха представлен в таблице 9.

Так как стерильность трактуется как состояние, в котором полностью отсутствуют микроорганизмы, то задача получения стерильного воздуха практически недостижима. Более реальной является снижение микробной контаминации воздуха до уровня, не оказывающего влияния на контаминацию культур или окружающей среды. Реальное содержание микроорганизмов в воздухе можно уменьшить до уровня ниже порога чувствительности методов их обнаружения.

Исследования показывают, что современные системы очистки воздуха позволяют снизить содержание микроорганизмов в воздухе до 10^{-15} %.

Для очистки воздуха применяют несколько способов: различные виды излучения, тепловую обработку и фильтрацию воздуха.

Ультрафиолетовое излучение с длиной волны 2600 Å (260 нм) способно убивать бактерии и вирусы, содержащиеся в воздухе. Наибольшая скорость гибели аэрозолированных в воздухе вирусов происходит при использовании ультрафиолета с интенсивностью света не менее 0,3 Вт/мин на м² и временем воздействия 0,3-0,6 с.

Имеются сведения, что летальный эффект УФ-света зависит от температуры и относительной влажности воздуха. Ультрафиолетовое излучение не обеспечивает высокой степени стерильности воздуха и на этом основании этот метод может применяться только в комбинации с другими способами стерилизации.

Стерилизация воздуха тепловой обработкой

Стерилизация воздуха может быть успешно решена с помощью высокой температуры. Установлено, что для получения

Микро-организмы	Размеры клеток, мкм	Частота встречаемости, %
Актиномицеты	0,8-1,2	4,5
Кокки	0,47-1,7	33,5
Плесневые грибы	0,8-12,0	8,1
Палочки	0,77-0,98x 2,0-5,8	22,5
Споры бацилл (диаметр нитей)	0,55-1,2x 2,3-7,1	18,7

Табл. 9. Типы микроорганизмов и частота их обнаружения в воздухе.

Антимикробное действие УФ-света основано на том, что в этом диапазоне излучения интенсивно поглощают нуклеиновые кислоты и белки, что приводит к их структурно-функциональным изменениям, в частности инактивации ферментов и гибели клеток. Необходимо учитывать, что энергия УФ-лучей невелика, и они имеют низкую проникающую способность.

стерильности воздуха необходимо поддержание температуры 300 °С в течение 1,6 с. Однако современные фильтрационные материалы позволяют разработать фильтры, обеспечивающие высокую эффективность очистки воздуха, и эти системы дешевле по сравнению с тепловой обработкой.

Фильтрационная очистка воздуха

В качестве фильтрующих материалов применяют керамические материалы, спеченное стекло и разнообразные волокна. Для получения глубинных волокнистых фильтров используют шлаковату, хлопковую вату, хлопкоасбест, стекловату и др.

Благодаря современным разработкам созданы высокоэффективные фильтры – НЕРА (High-efficiency particulate air – высокоэффективное разделение воздуха).

Фильтрация с использованием фильтров НЕРА является наиболее предпочтительным методом в случае необходимости извлечения воздуха из сосудов, где культивируются клетки, создания безопасных зон и других.

Взвешенные в воздухе частицы задерживаются, проходя через волокнистый материал благодаря инерционному и диффузному механизмам осаждения.

В процессе фильтрации через волокнистые фильтры функционируют три механизма: инерция, перехват и диффузия частиц.

Механизм инерционного осаждения основан на том, что когда воздушный поток начинает обтекать нить волокна на своем пути, взвешенные в воздухе частицы, движутся по инерции, отклоняются от потока воздуха и осаждаются на волокне. Эффект инерционного осаждения высок для крупных частиц (более 5 мкм) и при более высоких скоростях прохождения воздуха через фильтры (рис. 100).

Механизм перехвата частиц реализуется для частиц с диаметром от 0,5 до 5 мкм. Они движутся вместе с током воздуха и удерживаются волокнами в результате контакта с ними (рис. 100).

Частицы диаметром менее 0,3 мкм передвигаются в токе воздуха по принципу броуновского движения, они могут диффундировать поперек тока линии и, в результате, увеличивается вероятность столкновения этих частиц с волокном (рис. 100).

Для хорошей очистки воздуха от механических частиц и бактерий необходимо применять фильтрующий материал различной структуры. Основные фильтры, иногда их называют головными, заполняют относительно грубыми волокнами. С помощью этих фильтров удаляется около 98 % микроорганизмов. На следующем этапе очистки используют супертонкие волокна или мембраны, что обеспечивает удаление еще до 2 % контаминантов.

Важной характеристикой фильтров, обеспечивающих очистку воздуха, является функционирование при малых перепадах давления, т. е. разность давления до и после фильтра должна быть минимальной.

Фильтрация – процеживание, пропускание жидкости или газов через фильтр с целью очистки, отделение нерастворимых веществ от жидкости, в которой они находились.

Ультрафильтрация – приставка ультра обозначает крайний, который находится за пределами, т. е. сверх.

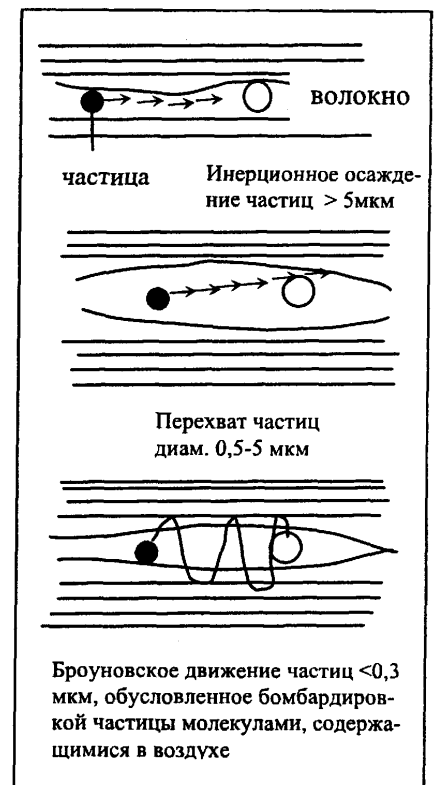


Рис. 100. Механизмы задержки частиц при фильтрации через волокнистые фильтры.

В фильтрах для тонкой очистки используют ткань Петрянова, которая состоит из ультратонких полимерных волокон, базальтовый картон и бумагу. Базальтовые суперволокна диаметром 1,0-1,5 мкм, выпускаются в виде матов толщиной 30-40 мм. Сейчас начинают применять фильтрующие материалы из фторопласта и металлокерамики, из которых изготавливают фильтрующие элементы патронного типа.

В некоторых случаях для очистки воздуха используют мембраны с диаметром пор 0,45 мкм. Основным производителем фильтрующих мембран – фирма «Миллипор» (США).

Очистка отработанного воздуха

В процессе ферментации образуется большое количество отработанного воздуха, содержащего различные вредные вещества: амины, кетоны, спирты, альдегиды, эфиры и т.д. Кроме того, в культуральной жидкости могут содержаться и клетки продуцентов. Все это требует разработки системы очистки отработанного воздуха.

В настоящее время существует несколько методов очистки отработанного воздуха: метод каталитического дожигания; жидкофазного окисления и применение сетчатых фильтров. Суть метода каталитического дожигания состоит в том, что отработанный воздух прокачивают через комбинированный катализатор, состоящий из слоя пиролюзита и слоя палладиевого катализатора, при температуре 320-350 °С. Этот метод является энергоемким и позволяет обезвреживать воздух на 87-98 %.

При использовании жидкофазного окисления в качестве окислителей используют перманганат калия или гипохлорид натрия. Растворы, которыми орошают отработанный воздух, обращаются в замкнутом цикле. Каждую неделю растворы заменяют, что создает проблему очистки сточных вод. Эффективность очистки воздуха этим методом составляет 90-95 %.

При использовании сетчатых фильтров удается очистить отработанный воздух до 99,6 %. Такие фильтры состоят из цилиндрического корпуса с крышкой и дном, фильтрующий элемент изготовлен из металлических сеток трикотажного плетения с диаметром волокна проволоки 0,28 мм из нержавеющей стали (рис. 101).

Стерилизация питательных сред

Особенности стерилизации питательных сред

Процесс приготовления питательных сред является важным этапом технологического процесса, так как от качества питательных сред зависит выход целевого продукта. Особенности приготовления питательных сред для культивирования продуцентов мы рассмотрим в главе, посвященной основным этапам биотехнологического процесса, а в этом разделе остановимся на способах стерилизации питательных сред.

Качество фильтрующего материала характеризуется коэффициентом осаждения h .

$$h = \frac{CN_0 - CN}{CN_0}$$

где CN_0 – начальная концентрация микробов в воздухе до фильтрации;

CN – конечная концентрация микроорганизмов в воздухе после фильтра.

Чем выше коэффициент осаждения, тем лучше качество фильтра.

В основных фильтрах для грубой очистки воздуха используют такие фильтрующие материалы как: 1 – базальтовое волокно с диаметром волокна 16 и 26 мкм, толщина слоя составляет – 1000 мкм. Эти волокна выдерживают нагревание до 1100 °С без потери механической прочности и высокой пылеемкости; 2 – нетканый фильтрующий материал или ткань Каминской с диаметром волокна 16,9 мкм, толщина слоя 20-23 мм и 3 – стеклосреды с диаметром волокна 6 мкм, толщина слоя 600 мм, термостойкость 300 °С.

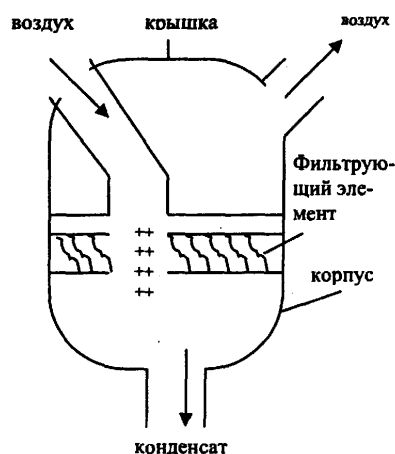


Рис. 101. Схема сетчатого фильтра для очистки отработанного воздуха биотехнологического производства.

Как уже отмечалось, наиболее эффективным методом деструкции микроорганизмов является использование горячего пара. Длительность экспозиции термической обработки или время выдержки – это время необходимое для гибели микроорганизмов. Для оценки стерильности используют «критерий стерильности» (N).

Тепловую стерилизацию питательных сред можно осуществлять двумя способами: периодическим и непрерывным. При периодическом способе стерилизации процессы: нагрева, выдержки при высокой температуре и охлаждения среды осуществляются в одном аппарате при последовательной смене режимов. Весь объем среды нагревается в аппарате, выдерживается определенное время при этой температуре и охлаждается водой, которая подается по змеевику, после чего стерильная среда откачивается насосом, при этом фильтруется и подается в биореактор (рис. 102).

Этот метод достаточно прост в исполнении, однако он имеет недостатки. Прежде всего, он требует большого расхода тепла. Кроме того, при использовании периодического способа стерилизации среды возникают трудности автоматизации процесса.

При непрерывном способе стерилизации питательных сред каждый процесс – нагрев, выдержка при высокой температуре и охлаждение осуществляются в специальных устройствах: нагревателе, термостате и охладителе. Этот способ позволяет обеспечить быстрый нагрев среды и, тем самым, уменьшить время экспозиции при высокой температуре.

Способ непрерывной стерилизации имеет ряд преимуществ перед периодической стерилизацией:

1 – благодаря быстрому разогреву и достижению высокой температуры стерилизации и уменьшению экспозиции можно избежать деструкции компонентов питательной среды; 2 – процесс легко контролировать и управлять им; 3 – возможна частичная регенерация тепла.

Несмотря на высокую эффективность стерилизации питательных сред термической обработкой, этот подход имеет серьезные ограничения, и это связано с тем, что высокая температура оказывает деструктивное действие не только на бактерии и их споры, но и на органические соединения, содержащиеся в среде, что приводит к ухудшению качества питательной среды. Так, высокая температура приводит к разрушению витаминов, к карамелизации сахаров (образованию ангидридов сахаров), образованию моносахаров, а они являются потенциальными ингибиторами процессов ферментации.

Стерилизация сред с использованием высокой температуры может найти применение только при стерилизации солевых сред, т.е. сред, содержащих термостабильные соединения. В том случае, если питательные среды содержат термолабильные соединения, их стерилизуют ультрафильтрацией.

Критерий стерильности N – это отношение числа операций, в результате которых выжили по одной термостойкой бактериальной споре к общему числу проведенных операций. При стерилизации сред принимают критерий стерильности равный $0,01 \pm 0,001$.

Примем такие условия: исходное количество спор в среде N_0 , то тогда N/N_0 – коэффициент выживаемости. Он означает, что для достижения заданного критерия стерильности (например, 0,01) среда должна выдерживаться такое время, которое обеспечит снижение количества спор до 10^{-16} от исходного значения.

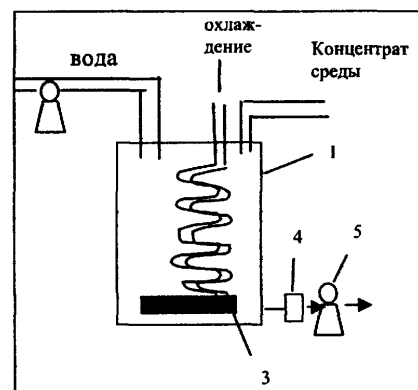


Рис. 102. Схема установки для периодической стерилизации питательной среды: 1 – емкость для приготовления и стерилизации среды; 2 – система охлаждения среды; 3 – система нагревания среды; 4 – система фильтрации среды от механических примесей; 5 – насос для перекачивания.

Использование ультрафильтрации для стерилизации питательных сред

Ультрафильтрация – это фильтрация через так называемые фильтры с диаметром пор 0,15-0,22 мкм. Таким образом, ультрафильтрация – это процесс, при котором молекулы, размеры которых больше определенной пороговой величины, задерживаются на фильтре, в то время как более мелкие проходят через него.

Мембранные фильтры в промышленных условиях готовят двумя методами: травлением мест бомбардировки ядрами элементов (эта технология разработана фирмой «Нуклеопор») и методом отмывки раствора, обеспечивающего образование тонкого слоя на движущейся ленте. Полученные таким способом мембраны имеют контролируемый размер (от 0,2 до 8,0 мкм)

Ультрафильтрация используется и для отделения полученных белков или клеток. В настоящее время при характеристике фильтров не указывают размеры пор, а используют термин «исключающий раствор» и «отсекаемый размер». Однако на практике не удается получить резкого теоретического «отсекания» молекул с определенными размерами. Разделение зависит от качества фильтра, характера раствора, который фильтруется и условий фильтрации. Обнаружено, что чем ниже исключаяющий размер, тем резче выражены отклоняющиеся характеристики. Например, мембрана с «отсекаемым» размером 10 кДа означает, что молекулы с молекулярной массой меньше 10 кДа должны свободно проходить через такой фильтр. На практике показано, что на этом фильтре задерживается более 60 % молекул с молекулярной массой до 5 кДа, содержащихся в растворе. Это связано с проблемой концентрационной поляризации, т. е. изложенные положения справедливы для очень разбавленных суспензий.

Контроль стерильности

Для обеспечения стерильности необходимо соблюдать целый ряд технологических условий.

Наиболее «чистые» условия для работы в пределах производственных линий или лаборатории могут быть обеспечены применением ламинарных боксов (которые обеспечивают ламинарный поток стерильного воздуха). Для обеспечения стерильности важнейшим условием является соблюдение дисциплины труда. В частности, применение стерилизационной спецодежды, удержание опасного материала в замкнутых объемах, правильное удаление использованного оборудования и соблюдение таких условий работы, при которых исключено промывание или разбрызгивание рабочих жидкостей.

Контроль стерильности осуществляют проведением микробиологических проб. Для этого испытуемую среду разбавляют, например в соотношении 1:100 и инкубируют в стандартных условиях (37 °С в течение 14 суток). Отсутствие роста бактерий

Питательные растворы, которые приготовлены с использованием неорганических солей (за исключением бикарбоната), можно стерилизовать в автоклаве при 121°С в течение 15 мин. Необходимо помнить, что соли кальция и магния автоклавируют отдельно от фосфатов, в противном случае они выпадают в осадок.

Проблема концентрационной поляризации относится ко всей системе ультрафильтрации. Суть ее сводится к тому, что в начале процесса ультрафильтрации после приложения давления через поры проходят молекулы с размером меньше отсекаемой величины. В процессе фильтрации крупные молекулы захватываются мембраной и через некоторое время на мембране образуется белковый слой и на нем начинают задерживаться мелкие молекулы. В конечном итоге мембрана полностью теряет способность пропускать раствор, что требует ее замены.

Для достижения стерильности необходимо обеспечить работу системы стерилизации и соблюдать такие условия:

1. До начала применения системы стерилизации необходимо проверить ее эффективность;
2. Работу осуществлять с соблюдением методов асептики;
3. Подтверждать стерильность получаемых продуктов посредством проверки стерильности рабочих мест;
4. Перед испытанием необходимо проверить точность и правильность показаний аппаратуры, контролирующей условия стерилизации (приборы для регистрации температуры, давления);
5. Для контрольной проверки эффективности стерилизации использовать тест-объекты (содержащие тест-споры).

свидетельствует о стерильности испытуемой пробы. В том случае, если необходимо проверить аналитическую мембрану на стерильность, ее помещают в условия, благоприятные для роста бактерий и наблюдают за ростом микроорганизмов. Если рост микроорганизмов не выявляется, то это свидетельствует о стерильности мембраны. Вместе с тем, стандартные среды культивирования, которые обеспечивают рост бактерий и грибов, не позволяют выявить в пробах микоплазм, их наличие определяют специальными методами.

Микоплазмы оказывают негативное влияние на культивирование клеток. Наиболее чувствительным методом выявления микоплазм является непосредственное культивирование. Для начальной инокуляции бульона, обеспечивающей высокое накопление микоплазм, необходимо использовать большие объемы среды (25 мл на 100 мл индикаторной среды). Наличие микоплазм идентифицируют микроскопически после субкультивирования среды на агаре или же с помощью флюорохромной техники после совместного культивирования бульона с монослоем клеток тест-культур.

Наличие вирусов в средах или сыворотке может быть выявлено специальным оборудованием и современными методами, например с помощью полимеразной цепной реакции.

Не реже одного раза в год необходимо проводить освидетельствование используемой аппаратуры, если она находится в постоянном использовании.

Для этого используют ДНК-диагностику, которая основана на полимеразной цепной реакции.

Общая характеристика кинетики роста клеточных культур в биореакторах

Под процессом роста клеточных культур понимают увеличение биомассы во времени. Рост биомассы в культуре может обеспечиваться двумя способами.

В первом случае рост биомассы может обеспечиваться увеличением деления и размера гиф мицелия (характерно для грибов) или увеличением размера клеток. При таком росте увеличиваются размеры организма и их концентрация, но не обязательно число организмов.

Во втором случае увеличение биомассы обеспечивается увеличением числа клеток, благодаря интенсивному делению клеток и в этом случае мы встречаемся с ростом популяции. Этот тип роста характерен для большинства объектов, используемых в биотехнологии.

Следовательно, логарифм концентрации клеток растет линейно во времени. Этот закон выполняется для многих биологических систем.

Если в культуральную среду добавляются вещества, влияющие на рост культуры, то это приводит к изменению характера роста.

В процессе клеточного роста непрерывно происходит поглощение клетками питательных веществ из культуральной среды и

Для того, чтобы предотвратить феномен концентрационной поляризации разработаны системы с использованием турбулентного движения. Благодаря такому интенсивному потоку, белки не задерживаются на поверхности мембраны, что позволяет решать проблему концентрационной поляризации.

Как известно, оптическая плотность пропорциональна концентрации поглощающих веществ в растворе: $D = kcl$ (закон Бэра), k – константа, c – концентрация клеток, l – толщина кюветы, в которой определяют оптическую плотность.

Для определения концентрации клеток чаще всего определяют зависимость оптической плотности во времени. Если начальная концентрация клеток N_0 , то за время t , когда совершится n делений клеток, концентрация будет равна $N = N_0 2^n$ (геометрическая прогрессия со знаменателем 2). В том случае, если θ – среднее время между делениями клеток, то $n = t/\theta$. В таком случае закон роста клеток в культуре можно записать так $N = N_0 2^{t/\theta}$ или в логарифмической

шкале $\lg N = \lg N_0 + \frac{t}{\theta} \lg 2$
или в виде $\lg N = A + Bt$, где A и B – постоянные коэффициенты для данной культуры.

выделение продуктов метаболизма клеток в среду. В процессе роста клеточной популяции скорость этих процессов (поглощение и выделение) изменяются в очень широких пределах и имеют нелинейный характер. Предсказать характер этих изменений в процессе роста культуры практически невозможно. Исследование этих процессов, которые могут быть отнесены к фундаментальным исследованиям в биотехнологии, позволят подойти к механизмам управления процессами культивирования.

Рассмотрим наиболее общие закономерности растущей популяции клеток. Культуру клеток следует рассматривать как систему, состоящую из двух взаимодействующих элементов или фаз: биологической фазы, которая состоит из популяции клеток и фазы, окружающей клетки, – среды (рис.103). Клетки поглощают питательные вещества и превращают разнообразные субстраты (поглощаемые из среды) в продукты метаболизма. Большая часть, образующихся метаболитов, используется на рост и размножение клеток, а часть выделяется в среду в виде экзометаболитов. В процессе метаболизма клетки генерируют теплоту, а температура среды влияет на температуру клеток и скорость метаболизма. Кроме того, среда оказывает и механическое воздействие на функцию клеток, изменяя гидродинамическое давление, а также вязкость среды. Изменение вязкости среды сопровождается изменением скорости массопереноса между клетками и компонентами среды.

Характеризуя динамику культуральной среды, необходимо отметить, что она всегда многокомпонентна и ее состав меняется в процессе роста культуры. Многокомпонентность обусловлена потребностью клеток в разнообразных питательных веществах, накоплением в ней экзометаболитов и химическими реакциями, которые могут протекать в среде. Часто компоненты в среде оказывают влияние на механизмы транспорта веществ в клетку.

В некоторых случаях культуральная среда представляет собой многофазную систему, состоящую из жидкой фазы и пузырьков газа. Так как в реакторах, благодаря высокой вязкости, могут создаваться различные условия в разных точках, увеличивается функциональная гетерогенность клеток.

Одним из наиболее общих свойств клеток (как и организмов) является их способность к адаптации, которая выражается в том, что в клетках может изменяться скорость, а в некоторых случаях даже тип химических реакций. При длительном культивировании могут накапливаться спонтанные мутации и изменяться генетическая природа штамма клеток.

Учитывая только перечисленные факторы (кроме этого существует большое количество неучтенных факторов), сегодня невозможно создать кинетическую модель, которая учитывала бы все параметры и факторы в процессе роста популяции. Поэтому приходится использовать упрощенную модель для описания кинетики роста популяции клеток в биореакторе.

В настоящее время используют различные принципы приближенного описания кинетики популяционного роста клеток

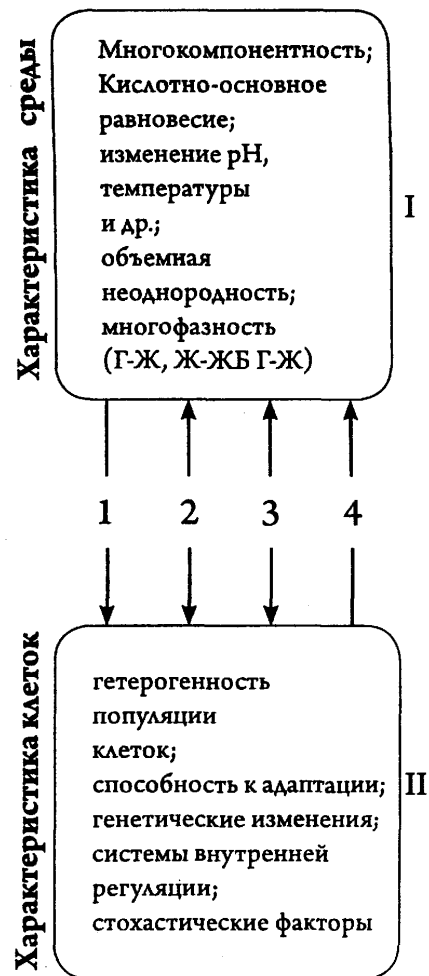


Рис. 103. Некоторые параметры культуральной среды и клеток, изменяющиеся в процессе культивирования и взаимодействия между ними: I – культуральная среда; II – популяция клеток.

1 – питательные вещества, субстрат; 2 – теплота; 3 – механические воздействия; 4 – продукты метаболизма, экзометаболиты.

в культуре. В зависимости от системы классификации числа компонентов, многокомпонентные модели клеток называют структурированными, а однокомпонентные – неструктурированными моделями. При описании популяции клеток с учетом их гетерогенности используют два подхода: сегрегированный подход, который учитывает гетерогенность популяций и несегрегированный, при котором описывают только усредненные свойства клеток.

Клетки представляют собой чрезвычайно мелкие системы и поэтому количество любого химического компонента в клетке крайне ограничено. Реакции и процессы массопередачи, в которых участвует ограниченное число молекул, можно рассматривать как случайные события клетки. Для описания таких случайных событий используют стохастические модели популяции клеток, которые мало отличаются от простых детерминистических моделей. Используя эти модели можно предсказать поведение популяции клеток. В общем случае разработка кинетической модели популяции клеток является сложной задачей, при решении которой необходимо: 1 – исходить из окончательной цели; 2 – правильно выбирать основные переменные и параметры, влияющие на метаболизм клетки; 3 – выбор математической модели должен обеспечивать гибкость и концептуальность.

Кинетика сбалансированного роста, уравнение Моно

Скорость роста клеток зависит от подачи питательных веществ в среду культивирования и их состава. Как известно, рост популяции клеток лимитируется каким-либо питательным веществом.

Все питательные среды могут быть условно разделены на синтетические питательные среды с известным составом и сложные питательные среды, которые имеют неопределенный химический состав. К примеру, точный химический состав дрожжевого экстракта, мясного бульона или сыворотки неизвестен. Основное требование, которое предъявляется к питательной среде, сводится к обеспечению высокой скорости роста клеток и (или) синтеза продуктов их жизнедеятельности. Однако из этого не следует, что все питательные вещества в среде должны присутствовать в избытке. Избыточная концентрация питательных веществ может ингибировать рост клеток, кроме того, необычно высокая скорость, которая обусловлена избытком питательных веществ, может сопровождаться интенсивным накоплением экзометаболитов в среде, а они могут изменять сам метаболизм клеток.

В том случае, если рост культуры лимитируется одним из компонентов среды, то скорость роста культуры выражается кривой типа гиперболы.

Математическое выражение, описывающее функциональную зависимость удельной скорости клеточного роста μ от концентрации независимого питательного вещества, было предложено Моно в 1942 г.

Жак Люсьен Моно – известный микробиолог и вирусолог, в 1965 г. вместе со А. Львовым и Ф. Жакобом получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие, связанное с генетической регуляцией синтеза белка у бактерий. Исследования Жакоба и Моно, проведенные ими в 60-х годах XX века оказали большое влияние на формирование молекулярной биологии и методологии современной биологии.

Уравнение Моно имеет ту же форму, что и уравнение изотермы адсорбции Ленгмюра.

Уравнение Моно упрощенно описывает кинетику роста популяции клеток. Однако в некоторых ситуациях оно вполне удовлетворительно описывает поведение культуры.

Несмотря на простоту уравнения Моно, при его использовании необходимо учитывать, что K_s может быть малой величиной и S – намного больше, чем K_s и соотношение $S / (K_s + S)$ можно рассматривать как адекватное выражение для расчета отклонений μ от μ_{\max} по мере снижения концентрации S .

Важным в биотехнологии является и такой параметр как экономический коэффициент Y_x/S . Как уже отмечалось, скорость роста культуры зависит от скорости потока питательных веществ ($D = F/V_n$). Если скорость потока очень медленная, то почти весь вводимый в реактор субстрат поглощается клетками, тогда концентрация клеточной массы x на выходе из реактора будет равна $Sf Y_x/S$. По мере повышения D возрастает и S (концентрация лимитирующего компонента): сначала пропорционально D , а затем, по мере приближения D к μ_{\max} , еще быстрее, так как поступления S превышает величину его использования клетками. При приближении D к μ_{\max} , она в какой-то момент становится равной нулю; это означает, что скорость разведения D превысила максимальные возможности скорости роста. Потеря всех клеток в стационарном состоянии, называемая выпиливанием, происходит, когда $D > D_{\max}$, которую определяют из уравнения:

$$D_{\max} = \frac{\mu_{\max} x' sf}{K_s + Sf}$$

При производстве биомассы необходимо учитывать зависимость концентрации субстрата и клеточной биомассы от скорости разведения D . Необходимо учитывать, что вблизи точки вымывания реакционная смесь становится очень чувствительной к колебаниям D ; даже небольшие изменения скорости разведения сопровождаются большими изменениями в накоплении биомассы. Максимальную скорость образования клеток можно рассчитать из уравнения:

$$\frac{d(Dx)}{dD} = 0$$

(Dx – скорость продуцирования клеток в единице объема реактора).

Для описания количества клеточной массы (x) как функции от D используют уравнение:

$$D_{\max \text{ произв.}} = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{K_s / (K_s + S1)} \right)$$

На практике часто $Sf \gg K_s$, то тогда $D_{\max \text{ произв.}}$ приближается к μ_{\max} и, следовательно, находится вблизи точки вымывания. В таком случае, чтобы избежать диапазона наибольшей чувствительности, целесообразно не добиваться максимальной скорости образования биомассы. Исходя из этого, на практике

Для описания детерминистического поведения популяции клеток предположим, что совокупность продолжительности клеточного цикла индивидуальных клеток в культуре описывается нормальным распределением:

$$P(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{(t-\bar{t})^2}{2\sigma^2}\right]$$

Примем $t=1$, а стандартное отклонение $\sigma = 0,5$. В таком случае, если коэффициент доверительности будет равен 0,95, то продолжительность клеточного цикла отдельной клетки составит:

$$t_{\text{клетки}} = t \pm 1,96 \sigma = 1,0 \pm 0,98$$

В суспензии содержится m клеток. Предположим, что каждая из m клеток делится независимо от других клеток, т. е. суспензия состоит из m независимых клеток. В таком случае доверительный предел времени удвоения (при 95 % уровне значимости) численности этой популяции клеток будет равен $2\bar{\sigma}$ популяции, где

$$\bar{\sigma} \text{ популяции} = \frac{0,98\sigma}{\sqrt{m}}$$

Из этого следует, что с увеличением m (количество клеток в популяции) неопределенность времени удвоения численности популяции быстро уменьшается. Если мы примем $\sigma=0,5$, а $t=1$, то в случае 95 %-ных доверительных пределов для \bar{t} в случае популяции, состоящей из m клеток, составляют:

m	95 % дов. предел для \bar{t}
1	$t = 1 \pm 0,98$
10^4	$t = 1 \pm 0,0098$
10^8	$t = 1 \pm 0,000098$

Этот расчет подтверждает известное положение, что любой случайный процесс, при большом числе событий может быть предсказан с достаточно большой точностью, даже если стандартные отклонения характеристик индивидуальных клеток велики. Это позволяет говорить о скорости синтеза ДНК в типичной клетке популяции, хотя в каждой индивидуальной клетке скорость синтеза ДНК может отличаться от другой индивидуальной клетки.

необходимо сочетать чувствительность, регулируемость и надежность. $Y_{X/S} = \frac{\text{масса образующихся клеток}}{\text{масса утилизируем. субстрата}}$

Модель Моно не согласуется с экспериментальными данными при очень низких и очень высоких диапазонах разведения.

Такая особенность модели Моно для хемостата объясняется так называемым эндогенным метаболизмом. Под эндогенным метаболизмом подразумеваются метаболические реакции, которые могут изменяться при изменении скорости разведения.

Для решения этого вопроса предлагается ввести слагаемое $-K_e X$ в уравнение Моно

$$r_x = \frac{\mu \max Sx}{S + K_s} - K_e X$$

$K_e X$ – можно интерпретировать и как скорость гибели клеток.

Такое модифицированное уравнение Моно согласуется с экспериментальными данными.

Другая причина отклонения кинетики роста от модели Моно может быть связана с использованием субстрата не только на клеточный рост, но и на другие энергетические потребности клетки, это состояние принято называть метаболизмом поддержания.

В том случае, если осуществляется разведение с высокими скоростями в проточном реакторе также может наблюдаться отклонение от поведения культуры, описываемого моделью Моно для хемостата.

Это объясняется относительно высокой концентрацией субстрата, при котором субстрат не ограничивает рост клеток (он в избытке) и рост клеток лимитируется каким-либо другим фактором.

Влияние некоторых физико-химических параметров среды на кинетику клеточного роста

В том случае, если культура клеток находится в состоянии сбалансированного роста, то для характеристики кинетики роста популяции достаточно такого параметра как удельная скорость роста (μ), или время удвоения численности популяции $t_d = \ln 2 / \mu$.

В подобных случаях при оценке влияния факторов среды достаточно опустить эти параметры.

Как известно, живые организмы могут существовать в широком температурном диапазоне, от -5 до 95 °C (клетки эукариот, напротив, функционируют в узком диапазоне температур от 30 до 37 °C).

Динамика роста клеток сильно зависит от температуры культивирования. Клетки прокариот классифицируют в зависимости от температурного диапазона их роста. При относительно высокой температуре клетки погибают (30 и более градусов). Температурная зависимость клеточного роста очень похожа на

Уравнение материального баланса по субстрату для стационарного состояния можно записать в таком виде:

$$D(s_f - s) = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu x = 0, \text{ где } D - \text{ скорость разведения и соответствует}$$

$$D = \frac{F}{V_R}, \text{ где } F - \text{объемная скорость потока питательных веществ и вытекающего потока, а } V_R - \text{общий объем культуры в биореакторе.}$$

Уравнение Моно, для роста клеточной популяции, при лимитированности среды по одному питательному компоненту

$$\mu = \frac{\mu \max^S}{K_s + S}, \text{ где } \mu - \text{удельная скорость роста, } \mu \max - \text{максимальная скорость роста, которая достигается при } S \gg K_s \text{ и постоянных концентрациях всех других компонентов питательной среды. } K_s - \text{такая концентрация лимитирующих компонентов, при которой удельная скорость роста в два раза ниже максимальной скорости роста } K_s - \text{составляет } 0,5 \cdot 10^4 \text{М глюкозы.}$$

зависимость активности фермента от температуры. И это позволяет выразить зависимость удельной скорости клеточного роста от температуры в виде уравнения (1) которое описывает поведение систем фермент-субстрат.

Бесспорно, что влияние температуры на метаболическую активность клеток обусловлено ее влиянием на активность ферментов. Высокая температура, которая приводит к денатурации белков, приводит и к гибели клеток.

Конформация белков, а, следовательно, и активность ферментов зависит не только от температуры, но и от величины рН.

Показано, что величина рН оказывает влияние на скорость транспорта ионов и ряда субстратов в клетку, а также скорость ферментативных реакций. Этим и объясняется влияние рН на скорость роста популяции клеток.

Различные виды бактерий растут при разных значениях рН. Так, оптимум для роста ацидофильных бактерий соответствует 2,0; дрожжей 4,0-5,0; а плесневых грибов 5,0-7,0.

Обычно отклонение рН на 1,5-2 единицы от оптимальной величины как в кислую, так и щелочную области сопровождается полным прекращением роста клеток в культуре.

На скорость роста клеток в среде влияет осмотическое и гидростатическое давление среды.

Скорость роста аэробных организмов зависит от концентрации растворенного кислорода, и поэтому система аэрации и перемешивания среды оказывают влияние на рост популяции клеток в культуре.

Основные фазы роста клеток в реакторах периодического действия

В процессе периодического культивирования число живых клеток изменяется во времени (рис. 17). Для удобства характеристики состояния культуры принято делить ее на 4 фазы. Сразу после пересадки клеток (инокулята) на свежую культуральную среду их численность в течение короткого времени остается постоянной. Эту фазу называют фазой задержки или латентной фазой, сокращенно лаг-фазой (рис. 17).

Наличие лаг-фазы объясняется несколькими причинами. Кратко рассмотрим основные причины, приводящие к такому поведению клеток. Перенос клеток в новую для них среду, которая отличается от старой среды по составу или концентрации одних и тех же веществ приводит к запуску механизмов адаптации, в частности индукции ферментов, необходимых для метаболизма в новых условиях. Для регуляции метаболизма клетке необходим набор витаминов и других кофакторов. Многие из этих регуляторов являются низкомолекулярными соединениями и после переноса клеток в свежую среду, часть этих низкомолекулярных соединений переходит из клеток в среду из-за так называемой обратной диффузии. В таком случае скорость деления клеток будет остановлена на

$$r_s = \frac{1}{Y_x/s} \mu x + m x \quad (1)$$

Где m - удельная скорость потребления субстрата, который расходуется в метаболизме поддержания.

Индукцибельные ферменты - ферменты, активность которых увеличивается различными индукторами, т. е. способные к индукции.

О жизнеспособности клеток можно судить по их дыханию, которое измеряют в течение инкубации через различные промежутки времени. С помощью электрода Кларка регистрируют потребление клетками кислорода, определяют сухую массу клеток и рассчитывают удельную скорость дыхания.

время, необходимое для восстановления уровня этих соединений в клетке.

На длительность лаг-фазы оказывает влияние состояние инокулята, возраст культуры в момент пересадки, объем инокулята по отношению к свежей среде и стадии роста культуры, из которой отобран инокулят. Так, если отбирать инокулят из культуры, находящийся в стадии экспоненциального роста, то продолжительность лаг-фазы будет сокращена.

В том случае, если питательная среда содержит несколько источников углерода, то в культуре микроорганизмов можно наблюдать несколько последовательных лаг-фаз. Это явление, которое называют диауксией или двухфазным ростом, объясняется изменением метаболизма клетки после утилизации глюкозы. В основе такого последовательного усвоения питательных веществ лежит явление катаболитной репрессии.

После адаптации или освоения клеток в новой среде они начинают быстро размножаться и клеточная масса (биомасса) быстро увеличивается. Эта фаза логарифмического роста, точнее экспоненциального роста, так как количество биомассы увеличивается по экспоненте.

Увеличение числа клеток в этот период описывается уравнением (2).

Совершенно очевидно, что для описания поведения популяции в ходе экспоненциального роста в процессе периодического культивирования необходим только один параметр μ или t_d . Можно считать, что в периоде экспоненциального роста периодическая культура сбалансирована.

Это важно, так как изучение роста культуры клеток в реакторе периодического действия дает возможность получать результаты о кинетике сбалансированного роста.

Когда концентрация питательных веществ снижается до уровня, не обеспечивающего максимальную скорость роста культуры или же количество экзопродуктов, оказывающих токсический эффект начинает сдерживать скорость деления клеток, то дальнейший рост концентрации клеток прекращается, и культура переходит в стационарную фазу, которая соответствует максимальному количеству клеток.

Необходимо помнить, что в стационарной фазе количество погибших клеток равно количеству клеток, появившихся в результате деления.

Уравнение, выражающее максимальную концентрацию биомассы в момент истощения питательного вещества, имеет вид (3).

В том случае, если культура переходит в стационарную фазу за счет накопления токсина, то такая система описывается уравнением (4).

Разведение такой среды или связывание токсина каким-либо веществом сопровождается возобновлением клеточного роста и, следовательно, увеличением максимальной концентрации x_s в стационарной фазе. Если же разведение средой, не содержащей

Еще одним тестом для оценки жизнеспособности клеток является окрашивание клеток, в частности флуоресцеиндиацетатом (ФДА). При наличии в клетках эстеразной активности ФДА деацетируется и флуоресцирует, что легко увидеть в микроскоп.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{или} \quad \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \mu \quad (2)$$

при этом $x=x_0$ при $t= t_{lag}$. Интегрируя уравнение (1), получим:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu(t - t_{lag}),$$

из которого следует, что время удвоения популяции клеток (t_d)

$$\text{составляет } t_d = \frac{\ln 2}{\mu},$$

где μ – удельная скорость роста популяции.

$$x_s = x_0 + \frac{\mu}{K_a} A_0 \quad (3),$$

где x_s – массовая концентрация популяции в тот момент, когда питательное вещество А истощено и популяция переходит в стационарную фазу, или другими словами, x_s – это максимальная концентрация биомассы в периодическом процессе, а x_0 – массовая концентрация живых клеток в момент начала экспоненциального роста.

$$\frac{dx}{dt} = kx[1 - f(c_t)] \quad (4)$$

где C_t – концентрация токсина.

питательных веществ, не сказывается на росте клеток в стационарной фазе, это означает, что переход культуры в стационарную фазу обусловлен истощением питательных веществ. Используя этот подход, легко выяснить по каким причинам популяция клеток перешла из экспоненциальной фазы роста в стационарную фазу.

В том случае, если в процессе роста культуры отсутствует выраженная фаза экспоненциального роста, то это означает, что в среде недостаток питательных веществ (рис. 104).

В какой-то момент времени культивирования в периодическом режиме наступает истощение питательных веществ и накапливается такое количество токсических веществ, что популяция не может поддерживать свое существование на прежнем уровне и наступает фаза отмирания.

Исследований, посвященных процессам отмирания клеток в периодической культуре, очень мало. Это объясняется тем, что большинство промышленных процессов связаны с контролем лаг-фазы и времени наступления стационарной фазы, на которой собирают урожай.

Считается, что гибель популяции подчиняется экспоненциальному закону.

При этом допускается, что в любое время погибает одна и та же доля живых клеток. Траектория характера экспоненциального уменьшения численности популяции в фазе отмирания сводится к тому, что в культуре клеток летальный исход является случайным событием, а, следовательно, гибель клеток есть вероятностное событие.

Вместе с тем, в указанных выше объяснениях не учитывается история популяции, и все рассуждения касаются неких усредненных параметров достаточно сложной гетерогенной системы. Гетерогенность клеточной популяции становится особенно выраженной в стационарной фазе и фазе отмирания. Так, в стационарной фазе существуют делящиеся (молодые) клетки и старые погибающие клетки. Кроме того, периодическая культура клеток является сложной системой, которая состоит из популяции клеток с различной функциональной активностью и жидкой средой переменного состава (рис.103). Исходя из этого, необходимо рассматривать свойства клеток в культуре во взаимодействии со средой и друг с другом.

Исследование этих вопросов является научной задачей биотехнологии. На характеристики роста клеточных культур большое влияние оказывают газообмен и массоперенос

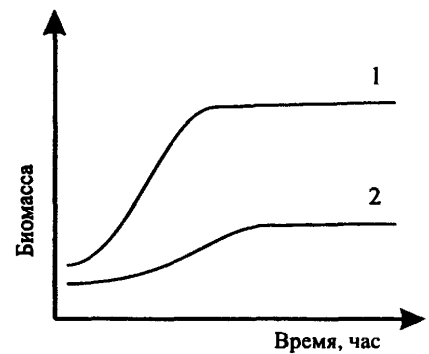


Рис. 104. Динамика накопления биомассы клеток в культуре при росте на оптимальной питательной среде (1); и на среде с низким содержанием питательных веществ (2).

На стадии отмирания культуры количество погибающих клеток превышает количество вновь появившихся в культуре в результате деления клеток. Процесс гибели клеток обусловлен различными причинами.

Методы оценки газообмена и массопереноса в биореакторах

Особенности массообмена между газовой и жидкой фазами

Биологическая продуктивность клеточных культур, используемых в биотехнологии, зависит не только от наличия питательных веществ и физико-химических характеристик среды культивирования, но и от доступности клеток к кислороду и питательным веществам, или, другими словами, от эффективности газообмена и массопереноса в системах. Это связано с тем, что биотехнологическая система гетерогенна как структурно, так и функционально.

В настоящее время проблеме газообмена и массопереноса уделяется большое внимание, так как во многих случаях эти процессы лимитируют продуктивность биотехнологических систем. Такая ситуация характерна для самых разных процессов, протекающих как в небольших лабораторных реакторах, так и в промышленных установках, предназначенных для производства пенициллина, лимонной кислоты, кантаина, или установок для обработки сточных вод с помощью активного ила. Исходя из этого, при разработке биореакторов необходимо уделять внимание факторам, влияющим на скорость газо- и массопереноса.

Массообмен кислорода играет важную роль и в природных процессах, автотрофизации озер, окислительных процессах пищевых продуктов. Важность газообмена в биотехнологических системах можно продемонстрировать примером по обмену диоксида углерода. Как известно, CO_2 образуется почти в любом биологическом процессе. Несмотря на высокую растворимость CO_2 , он легко переходит в различные формы – H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , которые сильно влияют на величину pH, а это, в свою очередь, оказывает влияние на активность ферментных систем клетки.

В этом разделе мы кратко остановимся на методах определения скорости переноса кислорода, определения коэффициентов массопередачи, характеристике теплообмена.

При подаче в реактор кислорода или других органически растворимых субстратов они должны преодолеть ряд препятствий, прежде чем они будут поглощены клеткой. Массообмен совершается за счет свободного подъема пузырьков газа или опускания жидкости и за счет движения жидкости под действием принудительной конвекции (перемешивания). В связи с этим, большое значение уделяется гидродинамике в биореакторах.

Скорость массообмена определяется целым рядом явлений и факторов: реологией жидкой фазы и дисперсией системы, характеристиками барботирующего устройства, потребляемой мощности биореактора и другими (табл. 10). Так как в настоящее время отсутствуют фундаментальные данные о скорости повторного диспергирования, о распределении газовых пузырьков по размерам и

1. Диффузия газа из газовой фазы в жидкость.
2. Диффузия вещества из перемешиваемой фазы жидкости к не перемешиваемому слою жидкости, который примыкает к клетке.
3. Перенос растворенного вещества через неоднородную жидкость, мало перемешиваемую фазу, окружающую клетку.
4. Перенос через оболочку клетки.

Табл. 10. Основные факторы, формирующие сопротивление массообмену.

времени их пребывания в реакторе, то расчет параметров массообмена осуществляют по усредненным величинам.

Как известно, растворимость кислорода при давлении 1 атм в воде зависит от температуры и концентрации химических веществ в среде (табл. 11).

Следовательно, \bar{N}_e^* (концентрация растворенного вещества в жидкой фазе, находящейся в равновесии с газовой средой $\mu\bar{N}_e^* = C_g$), зависит от температуры и от состава среды. Эта зависимость усложняется, если растворенный газ может реагировать с жидкой фазой (например, CO_2 , который образует H_2CO_3 , CO_3^{2-} , HCO_3^-).

Таким образом, в зависимости от условий может происходить химическая реакция или физический процесс [CO_2 (раствор) CO_2 (газ)].

В качестве примера рассмотрим популяцию дрожжевых клеток в периоде их активного дыхания. В это время они могут потреблять кислород со скоростью 0,3 г O_2 в час (в расчете на 1 г сухого вещества). Рассмотрим максимальную скорость утилизации кислорода при концентрации клеток 10^9 в мл, из которой 80 % составляет вода, тогда абсолютная потребность в кислороде составит: (уравнение 5)

$$\left(\frac{0,3 \text{ г } \text{O}_2}{(\text{г сухой биомассы}) \cdot \text{ч}} \right) (10^9 \text{ клеток / мл}) (10^{-10} \text{ мл}) \times \\ \times (1 \text{ г клеточной массы / см}^3) \left(0,2 \frac{\text{г сухой биомассы}}{\text{г клеточной массы}} \right) = \\ = 6 \cdot 10^{-3} \text{ г / (мл} \cdot \text{ч)} = 6 \text{ г } \text{O}_2 / (\text{л} \cdot \text{ч})$$

(уравнение 5)

Поскольку запасы растворенного кислорода незначительны, то активная популяция клеток при высокой плотности клеток может существовать только при условии непрерывного введения кислорода в жидкую фазу.

Скорость утилизации кислорода и клеточный метаболизм

Общая потребность клеток в кислороде складывается из затрат кислорода на поддержание жизнедеятельности клеток, окислительные реакции в процессе дыхания (рост и биосинтетические процессы) и окисление субстратов в соответствующие конечные продукты метаболизма. Скорость утилизации кислорода, расходуемого на клеточный рост, связана с количеством потребляемого субстрата, который является источником углерода.

Кислород может также играть роль реагента, участвующего в биотрансформациях. Растворимость кислорода в воде зависит от концентрации электролитов раствора (табл. 12).

Скорость переноса кислорода можно определить по изменению объема или давления газа во времени.

В различных реакторах и в естественных процессах локальная скорость переноса кислорода может меняться в зависимости от пространственного положения данной точки. В таком случае найденные усредненные значения непосредственно используют в операциях масштабного переноса.

Температура °С	Растворимость O_2 в воде, ммоль/л
0	2,18
10	1,70
15	1,54
20	1,38
25	1,26
30	1,16
35	1,09
40	1,03

Табл. 11. Растворимость кислорода, ммоль/л при разных температурах, если давление равно 1 атм.

Кон-ция электролита, моль	Раствор HCl	Раствор NaCl
0,0	1,26	1,26
0,5	1,21	1,07
1,0	1,16	0,89
2,0	1,12	0,71

Табл. 12. Растворимость кислорода, ммоль/л при 25 °С в зависимости от концентрации электролитов.

Изменение концентрации растворенного кислорода в жидкой фазе, суспензии микроорганизмов и т.д. определяют с помощью миниатюрных кислородных зондов, диаметр головки которых около 10 мкм.

Массообмен с участием свободно поднимающихся частиц

Скорость массообмена между разными зонами реактора определяется уравнениями, которые описывают сохранение массы всей системы, ее отдельных компонентов и баланс количества движения. В том случае, если эти уравнения выражают относительными величинами, отражающими изменения расстояний, скоростей и концентраций, а движущей силой является разность плотностей между двумя контактирующими фазами, то в конечных уравнениях появляются три безразмерных параметра (три критерия подобия, которые называют числами Грасгофа, Шервуда и Шмидта).

Можно ожидать, что в случае конвективного движения выражения для коэффициентов массопередачи будут включать только эти три критерия подобия.

Массообмен путем принудительной конвекции

Для обеспечения высокой скорости газо- и массообмена, обеспечивающих интенсивный рост биомассы, часто возникает необходимость в эффективном перемешивании дисперсной системы вода – воздух.

Основная цель механического перемешивания сводится к увеличению скорости смешения фаз по сравнению с естественной конвекцией, которая обусловлена движением частиц свободно поднимающихся или опускающихся диспергированных фаз.

Принудительная конвенция позволяет:

1 – обеспечивает более однородное диспергирование фаз, что особенно важно в тех случаях, когда культуральная среда содержит суспензию твердой или другой жидкой фазы, способствующей расслаиванию этих фаз;

2 – обеспечивает уменьшение диаметра газовых пузырьков и, тем самым, увеличивает газообмен, не изменяя газосодержания в реакторе;

3 – способствует снижению максимального размера частиц скопления клеток плесневых грибов, водорослей, что приводит к более однородному распределению микроорганизмов в жидкой фазе;

4 – в тех случаях, когда суспензия клеток в культуральной среде приводит к увеличению вязкости, механическое перемешивание позволяет добиться заметного диспергирования газа в жидкой среде.

Вместе с тем, известны случаи, когда высокая скорость перемешивания приводит к снижению выхода клеточных продуктов.

Число Грасгофа:

$$G_2 = \frac{D_2 \rho_l (\rho_l - \rho_g) g}{\mu^2 L}$$

Число Шервуда: $Sh = \frac{K_2 D}{D_{O_2}}$

Число Шмидта:

$$Sc = \frac{\mu L}{SLD_{O_2}}$$

где D – характерная размерность,
 μ_2 – вязкость непрерывной фазы,
 $D_{O_2} = 1,6 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$.

Необходимо помнить, что модельная система будет удовлетворять описанию биологических процессов в биореакторе только в том случае, если у них будут идентичными:

- 1 – вязкость и другие реологические характеристики;
- 2 – сопротивление массообмену на границе раздела газ-жидкость;
- 3 – коалесценция пузырьков;
- 4 – растворимость кислорода и его коэффициент диффузии.

Это связано с тем, что при интенсивном перемешивании могут нарушаться клеточные структуры. Учитывая это, необходимо подбирать параметры механического перемешивания для конкретных систем культивирования.

Основными параметрами перемешивающих систем являются форма и диаметр лопастей мешалки и ее скорость вращения.

Теплообмен в биореакторах

В процессе культивирования может возникнуть необходимость в отводе образующейся теплоты или, напротив, в обогреве культуральной жидкости. Такая ситуация может возникнуть по нескольким причинам:

1. В процессе переработки отходов в анаэробных условиях оптимальной температурой процесса является 55-60 °С и это требует подогрева реактора и поддержания температуры в указанном оптимальном режиме.

2. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы выделяют тепло, которое часто необходимо отводить.

3. После завершения процесса стерилизации также необходимо отводить тепло для быстрого охлаждения культуральной среды.

Теплообмен между культуральной жидкостью реактора и средой осуществляется с помощью внешних рубашек или спиральными теплообменниками (змеевиками), помещаемыми в культуральную жидкость, циркуляцией реакционной смеси через теплообменные аппараты (рис. 105).

Если принять, что скорости подачи и изменения других форм энергии пренебрежимо малы, то теплообмен в стационарном состоянии будет отражать связь между скоростью отвода и скоростью выделения тепла. Или, общая скорость выделения тепла = скорости отвода тепла. Коэффициент теплопередачи зависит от особенностей конвекции, так, например, при естественной и принудительной конвекции он различается (табл. 13).

В системах с наружной охлаждающей или обогревающей рубашкой площадь теплопередачи поверхности A пропорциональна квадрату диаметра реактора (или диаметра лопастной мешалки).

В то же время, если необходимо, чтобы скорость микробиологических процессов и потребляемая мощность на единицу объема оставались постоянными, то степень нагрева или охлаждения реактора должны быть пропорциональна Di^3 .

Поэтому для обеспечения в реакторах изотермических условий приходится использовать змеевики.

Использование системы внутренних трубопроводов изменяет картину перемешивания. Решение этого вопроса возможно только экспериментальным определением параметров для конкретного биореактора.

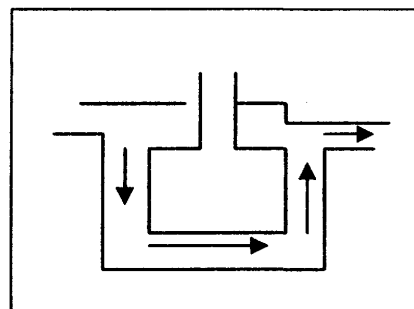


Рис. 105. Схема биореактора с водяной рубашкой, которая может обеспечить контроль температуры.

Естественная конвекция	
h ккал	($m^2 \cdot град$)
Газы	3-20
Жидкости	100-600
Кипящая вода	1000-20000
Принудительная конвекция	
Газы	10-100
Жидкости	50-500
Кипящая вода	500-10000

Табл. 13. Примерные величины коэффициентов теплопередачи h .

Типы биореакторов

Требования к биореакторам

Для культивирования биологических объектов (бактерии, грибы, культура растительных и животных клеток) используют биореакторы или ферментеры.

Биореактор – это емкость, в которой создаются условия, обеспечивающие жизнедеятельность биологических объектов. В настоящее время ведутся интенсивные разработки новых типов биореакторов, обеспечивающих оптимальные условия роста и продуктивности объектов, используемых в биотехнологии.

Условия культивирования должны обеспечивать клетки: 1 – необходимыми питательными веществами; 2 – кислородом, а точнее необходимым газовым составом O_2/CO_2 ; 3 – стабильным значением концентрации ионов водорода –рН среды; 4 – поддержанием осмотичности среды; 5 – однородностью состава среды, так как в процессе роста клеток образуются градиенты веществ и продукты жизнедеятельности; 6 – контролем температуры, так как в процессе роста микроорганизмы выделяют 10-14 кДж теплоты на 1 кг сухой массы; 7 – и в идеале удалять продукты жизнедеятельности клеток, т. е. обеспечивать постоянство параметров среды (рис. 106).

Биореактор должен быть изготовлен из инертных материалов, так как в процессе эксплуатации объектов образуются реакционно активные вещества, что способствует коррозии и биоповреждению. Наиболее удачным материалом, удовлетворяющим этим требованиям, является хромоникелевая нержавеющая сталь марки X18H10T, которая содержит 0,01% углерода, 18 % хрома, 10 % никеля и менее 10 % титана.

При изготовлении биореакторов применяют стекло, полиэтилен и другие полимерные материалы.

Наряду с этим, биореакторы должны удовлетворять следующим требованиям: полная герметизация, исключающая попадания посторонней микрофлоры; сохранение постоянного объема культуральной жидкости, удобство при чистке всех частей аппарата и внутренней поверхности, а также удобство стерилизации.

В зависимости от конструктивных решений, объемов и других характеристик биореакторы делят на группы. Приведем примеры таких классификаций: так на основе рабочего объема (рис. 107) биореакторы делятся на лабораторные (их емкость 0,5-100 л), пилотные (100 л-10м³) и промышленные (10-100 м³).

Все биореакторы могут быть разделены по используемому принципу культивирования на закрытые и открытые.

В закрытых биореакторах осуществляют периодическое культивирование, иногда его называют накопительным культивированием.

Систему называют закрытой в том случае, если после начала культивирования ни один из компонентов, участвующих в процессе, не вводится и не выводится из биореактора. В таком

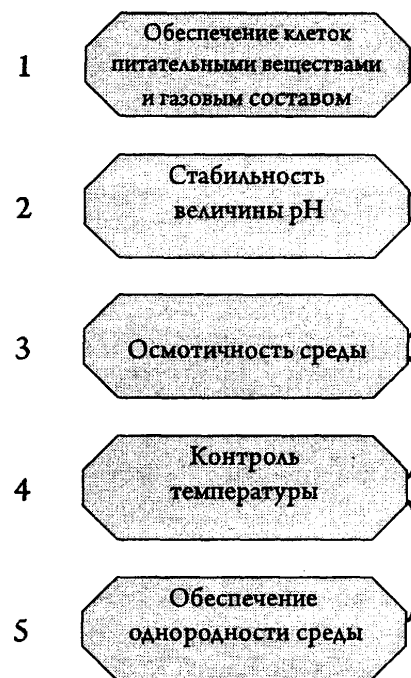


Рис. 106. Схема, демонстрирующая основные требования к биореакторам.

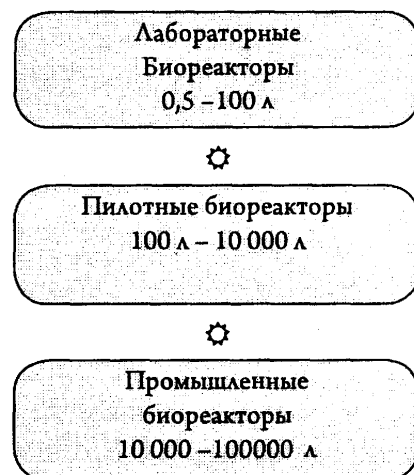


Рис. 107. Классификация биореакторов в зависимости от объемов.

периодическом процессе культура клеток растет по описанному экспоненциальному закону. Естественно, что в процессе роста все параметры непрерывно изменяются и после накопления конечного (целевого) продукта, реактор разгружается и осуществляется сбор урожая, и культивирование повторяется.

Так как в таких условиях истощение среды может происходить достаточно быстро, то возникла модификация этого типа культивирования, получившая название объемно-доливочной системы.

Суть ее в том, что в процессе культивирования основные компоненты среды добавляют дробно, это позволяет исключить субстратное ингибирование. В этой системе культивирования никакие компоненты среды не отводят из реактора.

В открытые системы постоянно и равномерно вводят компоненты питательной среды, которые уже использованы культурой, так что бы их концентрация (по лимитирующему компоненту) оставалась постоянной, при этом постоянным сохраняется и объем питательной среды. Регулируя концентрацию субстрата, можно поддерживать концентрацию биомассы на постоянном уровне. Такой тип реактора называют турбодистатом.

Обоснование выбора реактора может быть основано на знании механизмов регуляции обмена веществ культивируемых клеток.

По способу подвода энергии биореакторы делят на три группы: 1) барботажные с механическим перемешиванием; 2) эжекционные, с самовсасывающей турбинной мешалкой, с внешним циркуляционным потоком; 3) барботажные, форсуночные, колонные, барботажно-эрлифтные.

По способу подачи воздуха в биореактор их можно разбить на 2 типа: без подводки стерильного воздуха, в таких биореакторах культивируют анаэробные микроорганизмы; с подводкой стерильного воздуха (их используют для культивирования аэробов).

Аэрация жидкости в биореакторах может обеспечиваться механическими мешалками или потоком воздуха.

Биореакторы барботажные с механическим перемешиванием

В биореакторах этого типа осуществляется культивирование бактерий, дрожжей и грибов и они широко используются в мировой практике. Обычно эти промышленные биореакторы с объемом 100 м³ используются при культивировании микроорганизмов на газообразных углеводородах.

Биореактор с самовсасывающей системой аэрации

Такой реактор имеет самовсасывающую турбину, которая создает разрежение, что позволяет через полый вал сверху засасывать воздух. Одновременно аэратор перемешивает жидкость. По такому принципу работает ферментер системы Вольдгофа (рис. 108). Это цилиндрический сосуд с центральным полым валом-

Объемно-доливочный тип культивирования позволяет обеспечить постоянство объема среды и основных ее компонентов. Необходимо учитывать, что в процессе культивирования часть воды испаряется, при этом концентрация клеток и компонентов среды увеличивается, это может приводить к ингибированию роста культуры. Объемно-доливочный способ культивирования позволяет поддерживать концентрацию питательных веществ на относительно постоянном уровне.

воздуховодом, который заканчивается на нижнем конце воздухо-распределителем – сегнеровым колесом. Вал вращается вместе с сегнеровым колесом с частотой 320 об/мин, это обеспечивает равномерное распределение воздуха. Для улучшения циркуляции воздуха в нижней части аппарата установлен направляющий цилиндр (диффузор). При вращении колеса жидкость отбрасывается воздухом и поднимается по внешнему кольцу между стенками аппарата и диффузора, а затем опускается по внутренней полости цилиндра. Такая система обеспечивает оптимальные условия контакта воздуха с жидкостью и предупреждает повышение пенообразования. Образующаяся теплота отводится от биореактора при помощи холодной воды, которая пропускается через змеевик. Недостатком данного типа биореактора является низкий коэффициент заполнения (22-25 %). Удельный расход воздуха 50 м³ на 1 кг сухой биомассы.

В Германии были разработаны струйный ферментер, который используется для производства кормовых дрожжей. Он состоит из секций, расположенных одна над другой, которые соединены между собой шахтными переливами. Из нижней секции среда подается насосами в верхний шахтный перелив, при поступлении среды в нижнюю секцию подсасывается воздух из газовада. Отвод теплоты осуществляется с помощью теплообменников, расположенных на линиях циркуляционных контуров. Скорость насыщения субстрата кислородом в этом аппарате – 15 кг O₂/т в час.

Биореакторы с подводом энергии в газовую фазу

Барботажные ферментеры имеют небольшие объемы – они используются при производстве маточных культур и хлебопекарных дрожжей. Это вертикальные цилиндрические емкости, на дне которых располагаются барботеры различных конструкций. Внутри аппарата размещается теплообменник для отвода теплоты.

Главный недостаток барботажных биореакторов является неравномерность распределения концентрации культивируемых микроорганизмов. В таких аппаратах невысокие массообменные характеристики.

На заводах по производству кормовых дрожжей из растительного сырья работают ферментеры системы Лефрансуа-Мариё, которые имеют объем 250, 320 и 600 м³. В этих аппаратах нет мешалок и пеногашения. Перемешивание жидкости обеспечивается эрлифтными насосами. В нижней части аппарата установлен центральный стакан-диффузор. Воздух подается в воздуховод.

Недостатком этих аппаратов является большой расход воздуха 25-35 м³ на 1 кг дрожжей.

В настоящее время существует большое количество модификаций барботажных биореакторов (рис. 109).

Колонные ферментеры характеризуются большой высотой по сравнению с диаметром (отношение 10:1). Перемешивание в таких реакторах осуществляется потоком воздуха.

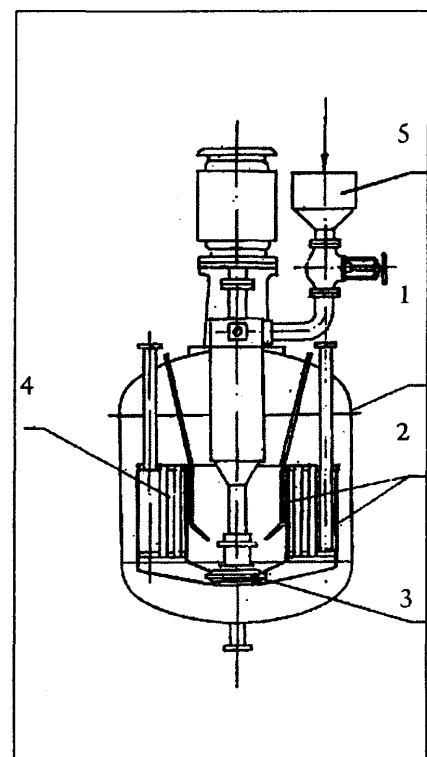


Рис. 108. Биореактор с самозасасывающей мешалкой непрерывного действия: 1 – корпус; 2 – диффузор; 3 – самозасасывающая мешалка; 4 – теплообменник; 5 – фильтр.

Биореактор со струящейся пленкой

Он состоит из цилиндрического сосуда, заполненного вертикальными трубками, которые обеспечивают круговорот жидкости и газа. Культуральная жидкость подается сверху и в виде тонкой пленки спускается по вертикальным каналам. За счет снижения скорости перпендикулярно направлению потока клетки вовлекаются в дополнительное вращательное движение, что обеспечивает хороший доступ питательных веществ.

Для культивирования растительных клеток разработаны специальные биореакторы. В последние годы широкое применение получили мембранные биореакторы. Американская фирма «Sigma» выпускает мембранные фильтры для использования в системе культивирования растительных клеток. Такие фильтры изготавливают из полипропилена с диаметром пор от 0,075 до 0,25 мкм. Мембраны устойчивы к действию кислот, щелочей и органических растворителей. Использование таких мембранных фильтров позволяет удалить из среды ингибиторы роста протопластов. В таких биореакторах протопласты могут поддерживаться длительное время без смены культуральной среды.

Биореакторы для культивирования клеток животных

Культура клеток животных используется для получения моноклональных антител, гормонов, факторов роста (глава VII). Клетки животных требуют многокомпонентных питательных сред, большинство клеток растет в монослое, т.е. прикрепившись к поверхности. Все это усложняет требования к условиям культивирования клеток животных.

Для решения этих задач был использован способ выращивания клеток на гранулированных микроносителях, на тонких нитях и пористых трубочках. Использование этого подхода позволило повысить плотность клеток на 1 см² поверхности в 10 раз.

Впервые культивирование клеток животных на микроносителях осуществил А. Ван-Везель (Голландия) в 1967 г. В качестве гранулированных микроносителей используют альгинат, декстран, синтетические полимеры. Клетки прикрепляются к поверхности гранул и таким образом формируется одновременно монослойная культура (при которой клетки животных хорошо растут) и суспензионная культура (что обеспечивает перемешивание компонентов).

В компании Monsanto (США) созданы проточные биореакторы для массового культивирования клеток млекопитающих. В таких реакторах используется комбинация выращивания культур с высокой плотностью клеток и последующего переноса этих клеток в реактор большего объема.

Американская фирма New Brunswick Scientific Co Inc. разработала биореактор Cell Gen. Этот биореактор многоцелевого назначения (обеспечивает суспензионное культивирование,

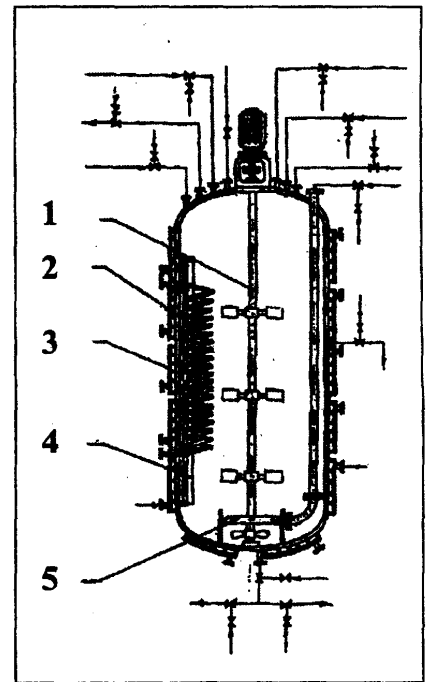


Рис. 109. Ферментер периодического действия.

- 1 – турбинная трехъярусная мешалка;
- 2 – охлаждающий змеевик;
- 3 – секционная рубашка;
- 4 – отражательная перегородка;
- 5 – барботер.

культивирование на микроносителях и проточное культивирование) и позволяет: 1) достичь эффективного массообмена O_2 при малых скоростях перемешивания; 2) надежно контролировать температурный режим; 3) обеспечивать контроль pH и содержание кислорода; 4) объем реакционного сосуда легко заменяется на 1,5, 2,5 и 5,0 литров; 5) он оснащен микропроцессором.

В таких биореакторах увеличивается выход клеток, а жизнеспособность клеток достигает 90 %.

Гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, культивируют в проточных биореакторах, которые оснащенных фильтрационным устройством с тангенциальным потоком жидкости. В таком реакторе культура поддерживается до 1,5 мес. и более при концентрации $1,8 \cdot 10^7$ клеток/мл с продуктивностью моноклональных антител 504 мг/день.

В настоящее время ведутся интенсивные разработки новых биореакторов, что позволяет надеяться на серьезный прогресс в этой области биотехнологии.

Необходимо учитывать, что при увеличении объемов биореакторов возникает ряд биохимико-инженерных проблем: 1) увеличение размеров реактора ведет к тому, что увеличивается критический коэффициент объемной абсорбции кислорода. Показано, что существует предел увеличения этого коэффициента, даже при интенсивной аэрации и перемешивании, т.е. масштабирование имеет свои пределы, выше которых культивирование становится малоэффективным; 2) интенсивное перемешивание (механическая мешалка – более 150 об/мин) тоже имеет свои ограничения, так как оно может приводить к повреждению культивируемых клеток; 3) для получения высокой продуктивности используют высококонцентрированные питательные среды, при использовании которых значительно увеличивается скорость потребления кислорода клетками микроорганизмов, что ведет к изменению температурного режима в реакторе.

Тангенциальный – направленный по касательной к данной кривой.

Глава V

Культура растительных клеток и тканей

Применение культивируемых растительных тканей и клеток

Выращивание растительных тканей или отдельных клеток на искусственных питательных средах имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение. Именно это и привело к интенсивному развитию этого направления в биотехнологии.

Культура клеток является относительно простой и удобной моделью для изучения механизмов экспрессии генома, биогенеза клеточных органелл, межклеточных контактов и других теоретических проблем биологии клетки. Используя соматическую гибридизацию протопластов, можно решать такие фундаментальные проблемы как биогенез клеточной стенки и ее роль в функционировании клетки, получать гибриды клеток и выращивать из них целые растения.

Следовательно, можно выделить несколько направлений практического использования культур клеток (рис. 110).

Первое, основанное на способности изолированных растительных тканей и клеток продуцировать в среду биологически ценные вещества, которые могут находить применение в медицине, парфюмерии, косметологии. Применение основано на том, что растущие в культуре клетки лекарственных растений сохраняют, а в некоторых случаях и увеличивают способность к биосинтезу биологически активных веществ: алкалоидов, стероидов, эфирных масел, гликозидов и др. На основе этих клеточных технологий уже получают такие медицинские препараты как диосгенин (культура клеток диоскорей), айлюмин (клетки раувольфии змеиной), тонизирующие вещества (клетки женьшеня) и другие.

Это направление позволяет получать практически неограниченное количество ценных биологических веществ, используя редкие растения, количество которых в природе ограничено, или же использовать в культуре уникальные тропические растения.

Второе направление практического использования культуры растительных тканей связано с получением безвирусного посадочного материала. В настоящее время очень широко распространены разнообразные вирусные инфекции овощных, декоративных, плодово-ягодных и технических культур. Это приводит не только к потере урожая, но в конечном итоге и к утрате высокопродуктивных сортов. Необходимо помнить, что посадочный материал, полученный от инфицированных вирусом растений, всегда заражен вирусами, и избавиться от них практически невозможно.

Сегодня одним из наиболее эффективных способов борьбы с вирусными инфекциями растений является использование культуры меристем и последующее микроклональное размножение.

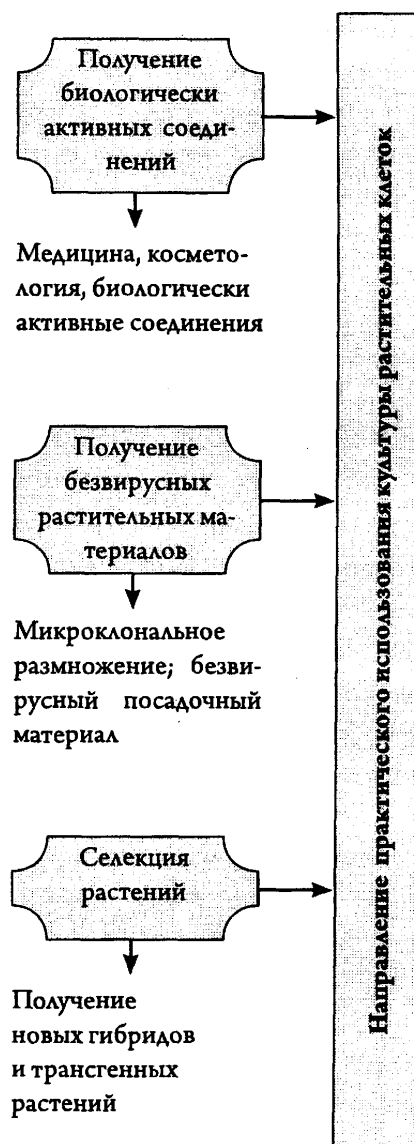


Рис. 110. Схема, демонстрирующая области практического использования культур растительных клеток

Одним из наиболее эффективных способов получения растений, не содержащих вирусы, является микроклональное размножение. Оно основано на использовании меристемы кончика стебля, которая не содержит вирусных частиц.

Это основано на том, что самые молодые части стебля и в особенности меристема кончика стебля, не содержат вирусных частиц, тогда как вся остальная часть растения может быть инфицирована. А это означает, что если от больного растения взять маленький кусочек стебля и получить из этих клеток новое растение, то такое растение будет свободным от вирусов и может использоваться в качестве посадочного материала.

Третье направление практического использования культур растительных клеток – это селекционные работы, т. е. работы, направленные на получение новых генетических форм. Оно основано прежде всего на соматической гибридизации, т. е. слиянии соматических клеток разных видов растений и таким образом можно получать и гибриды с новыми свойствами. Этот подход позволяет получить быстро растущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды (засуха, засоление, низкая и высокая температура).

В изолированные протопласты можно внести отдельные чужеродные для данного вида гены, т. е. обеспечить получение растений с новыми свойствами.

В настоящее время в селекционной работе используется и культивирование изолированных пыльников и семязпочек. Это дает возможность получать гаплоидные клетки и в дальнейшем их слияние с другим типом таких же гаплоидных клеток позволяет получать истинные гибриды.

Итак, культура тканей и клеток растений имеет несколько перспективных практических направлений, а успех их применения зависит от фундаментальных разработок по оптимизации управления физиологическими процессами. Это касается, прежде всего, размножения клеток в культуре, процесса дифференцировки и регенерации взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток, и в первую очередь злаковых растений. Однако прежде чем мы рассмотрим эти проблемы, остановимся на краткой истории метода культивирования изолированных растительных тканей и клеток.

Становление метода культивирования растительных клеток и тканей

Попытки культивирования растительных тканей начаты достаточно давно, остановимся на основных этапах становления метода культивирования растительных тканей.

1 этап можно определить как первые попытки культивирования растительных тканей (1892-1902 г. г.). Немецкие исследователи Фехтинг, Рехингер и Хаберландт попытались культивировать в растворе сахарозы различные фрагменты растительных тканей в культуре. Из сегментов стеблей одуванчика и тополя были получены первичные каллусы. На основании скромных экспериментальных результатов Хаберландт высказал гипотезу о тотипотентности любой растительной клетки, т. е. способности соматических клеток

Несмотря на то, что Х. Фехтинг, С. Рехингер и Дж. Хаберландт не получили в своих первых работах положительных результатов по культивированию клеток, они высказали идеи, которые опередили развитие науки того времени. Так, Фехтинг предположил, что поляриность присуща не только растениям, но и клеткам. Рехингер определил минимальный размер сегмента, который образует каллус, а Хаберландт четко сформулировал идею о возможности культивирования клеток растений и о том, что клетки растений тотипотентны.

обеспечивать развитие целого растения. Это фундаментальное свойство растительных клеток было доказано позже, хотя эта идея была высказана еще в начале XX века.

II этап развития метода был посвящен разработке сред для культивирования. Пожалуй, наиболее значимыми были результаты Роббинса и Котте, которые показали возможность культивирования меристемы кончиков томатов и кукурузы на твердых питательных средах. Однако время культивирования было непродолжительным и ткани погибали. Более интенсивно развитие этого метода началось с 1932 г., которое и можно выделить в следующий этап.

III этап (1932-1940 г. г.), в это время французский ученый Готре показал возможность длительного культивирования растительных тканей благодаря их периодическому пересаживанию на свежую питательную среду. Таким образом, была разработана основа периодического культивирования тканей растений. Естественно это способствовало развитию интереса к методу культивирования растительных тканей.

IV этап (1940-1960 г. г.). В 1955 г был открыт кинетин – новый класс фитогормонов – цитокининов. Кинетин стимулировал деление клеток в культуре ткани, которые лишены проводящих пучков и камбия. В это время начались работы по исследованию условий интенсивного культивирования каллусных тканей и стимуляции процессов морфогенеза.

V этап (1960-1975 г. г.) характеризовался разработкой метода ферментативного выделения протопластов из корней и плодов томата и их культивирование. В 1970 г. Пауэр с сотрудниками осуществили искусственное слияние полученных протопластов, что позволило получать соматические гибриды растительных клеток. Французский исследователь Ж. Морель и российский ученый Р.Бутенко разработали метод микроразмножения растений *in vitro* с целью оздоровления посадочного материала орхидей.

VI этап. Начиная с 1975 г. по настоящее время интенсивно развивается техника культивирования клеток и тканей растений. В это время были разработаны методы электрослияния протопластов, методы селекции, методы получения культур гаплоидных клеток, созданы векторы на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Разработаны методы переноса генов в клетки двудольных растений. Следовательно, метод культуры клеток и тканей растений прошел длительный период своего становления.

I – 1802-1902 гг.

В эти годы осуществлены первые попытки культивирования растительных клеток и тканей.

II – 1902-1930 гг.

Разработаны питательные среды для культивирования растительных клеток и способы их культивирования.

III – 1930- 1940 гг.

Разработан способ периодического культивирования тканей растений (существенный вклад внес Готре).

IV – 1940-1960 гг.

Использование растительных гормонов в разработке интенсивного культивирования каллусных тканей.

V – 1960-1975 гг.

Разработан метод выделения протопластов, соматической гибридизации и микрклонального размножения растений.

VI – 1975 по настоящее время

Генная и клеточная инженерия клеток растений.

Табл. 14. Этапы становления метода культивирования клеток.

Техника культивирования растительных клеток

Методы стерилизации растительных объектов

Одним из условий культивирования клеток или тканей является соблюдение строгой стерильности, так как в питательной среде очень быстро размножаются микроорганизмы, которые поражают эксплантаты. Поэтому необходимо стерилизовать как питательные растворы, так и сами эксплантаты и все манипуляции с тканями проводить в асептических условиях (ламинар-боксе) и стерильными инструментами.

Перед тем, как погрузить эксплантат в стерилизующий раствор необходимо его тщательно вымыть мыльным раствором со щеткой и интенсивно промыть дистиллированной водой, после этого погрузить его на несколько секунд в 70 % этиловый спирт. Если в работе используют семена, то их погружают в раствор 70 % спирта на 1-2 мин. Использование спирта важно не только потому, что он обладает стерилизующим эффектом, но и потому, что он повышает эффект других стерилизующих растворов.

Для стерилизации растительных эксплантатов и семян их выдерживают в течение 5-20 мин в стерилизующих растворах (диацид, сулема, гипохлориты или пероксид водорода).

Время стерилизации определяется особенностями эксплантата и активностью инактивации бактерий стерилизующим раствором (табл. 15). После извлечения объекта из стерилизующего раствора его тщательно промывают стерильной дистиллированной водой. Необходимо учесть, что описанный способ стерилизации обеспечивает только поверхностную стерилизацию. Питательные среды стерилизуются в автоклаве (0,75 – 1 атм) при температуре 120 °С в течение 20 мин. В том случае, если в питательных средах содержатся термолабильные соединения, то тогда их стерилизацию проводят с помощью бактериальных фильтров (диаметр пор таких фильтров 0,22-0,45 мкм).

Посуду стерилизуют сухим жаром при температуре 160° С в течение 2 часов.

Характеристика питательных сред

Культивирование тканей и клеток растений требует правильного подбора питательных сред. Все питательные среды состоят из следующих основных групп веществ (рис. 111):

- 1) минеральные соли (макроэлементы – азот, фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо и микроэлементы – бор, цинк, медь, молибден, марганец и др.);

Объект	Время стерилизации, мин			
	Диацид, 0,1 %	Сулема, 0,1 %	Гипохлориты (Na, Ca), 5-9 %	Пероксид водорода, 10-12 %
Семена сухие	15-20	10-15	15-20	12-15
Набухшие	6-10	6-8	10-15	6-8
Ткани мясистого корня, клубня	20-30	15-25	15-20	-
одревесневшего стебля	2-40	20-25	20-25	-
Листья	1-3	1-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	1-7	3-15	2-7

Табл. 15. Рекомендуемые режимы стерилизации исходного растительного материала.



Рис. 111. Основные компоненты питательных сред, использующиеся в культуре растительных клеток.

- 2) сахара (сахароза и глюкоза в концентрации 2-3 % от объема среды);
- 3) некоторые витамины группы В (тиамин 0,4 мг/л – 1; пиридоксин – 0,1-0,5; никотиновая кислота – 0,5-1; инозит – 20-80);
- 4) стимуляторы роста (типа ауксинов-β-индолилуксусная кислота 0,1-1 мг/л; α-нафтилуксусная кислота – 1-2; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота – 1-2 (2,4-Д) и цитокины, такие как кинетин или 6-бензиламинопуридин или аденин в концентрации 0,2-0,5 %).

Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, аминокислоты, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевую соль, которая улучшает доступность железа для клеток.

Изолированные клетки и ткани в большинстве случаев неспособны к автотрофному питанию, поэтому в питательные среды вводят углеводы, которые являются в этом случае необходимым компонентом питания.

Фитогормоны необходимы для дифференцировки клеток и для индукции пролиферации. Дифференцировка обеспечивается ауксинами, а цитокины индуцируют деление клеток. В том случае, когда необходимо индуцировать стеблевой морфогенез, содержание ауксинов в среде снижают.

Опухолевые клетки растений способны сами синтезировать гормоны, поэтому они способны расти без внесения гормонов в питательную среду.

В настоящее время имеется достаточно большое количество различных питательных сред. Однако наиболее часто для выращивания растительных тканей и клеток применяют среду Г. Мурасиге и Ф. Скуга, которая была предложена этими авторами в 1962 г. (табл. 16). Эта среда хорошо сбалансирована и отличается от других сред соотношением аммонийного и нитратного азота. Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар (полисахарид, который получают из морских водорослей).

Для удобства при работе с питательными растворами готовят так называемые маточные растворы, это, как правило, в 10 раз более концентрированные растворы по сравнению с рабочим. Они хранятся в холодильнике, а перед использованием их разводят дистиллированной водой.

Хотя сегодня используется достаточно большое количество питательных сред: среда Уайта и среда Эглера, среда Гамборга, среда Шенна-Хильдербранта, однако по-прежнему остается наиболее часто используемой среда Мурасиге и Скуга.

Условия культивирования клеток

Успешное культивирование растительных клеток и тканей требует соблюдения определенных условий культивирования (рис. 112).

Влажность воздуха в комнате, где осуществляется культивирование, должна составлять 60-70 %. В том случае, если воздух суше, то это будет приводить к интенсивному испарению питательных

Компонент среды	Концентрация, мг/л
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
KH_2PO_4	170
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8,6
H_3BO_4	6,2
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
$Na EDTA \cdot 2H_2O$	37,3
Мезоинозит	100
Тиамин-НCl	0,5
Пиридоксин-НCl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Сахароза	30 000

Табл. 16. Состав питательной среды Мурасиге и Скуга.

Маточный питательный раствор – это раствор, концентрация необходимых компонентов в котором, как правило, в 10 раз выше необходимого питательного раствора – рабочего раствора.

сред, на которых культивируются клетки и ткани, что в свою очередь будет приводить к изменению концентрации солей в питательных растворах и условий культивирования.

Оптимальной температурой для культивирования растительных тканей является 25-26 °С. В том случае, если осуществляют индукцию морфогенеза, то температуру понижают до 18-20 °С. Если осуществляют культивирование тропических растений, то температуру поддерживают на уровне 29-30 °С.

Еще одним фактором, оказывающим влияние на процессы культивирования растительных тканей, является освещенность.

Для культивирования изолированных меристем и их дальнейшего размножения необходима освещенность от 1 до 10 клк в зависимости от вида растения. Длительность фотопериода также устанавливается в зависимости от вида культивируемого растения.

Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как они питаются гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани (ткань мандрагоры).

Необходимо учитывать, что если каллусные ткани в дальнейшем будут использоваться для индукции морфогенеза, то их культивируют при непрерывном освещении в 1-4 клк.

Поддержание оптимального светового и температурного режима влажности обеспечивается с помощью климатических камер.

Культура клеточных суспензий

Клеточные культуры используются для получения вторичных метаболитов, большинство из которых являются лекарственными веществами. Кроме того, в культуре клеток образуются необычные соединения, такие как антиканцерогены (камптотецин, харингтонин), пептиды, обладающие ингибирующими свойствами по отношению к протеазам или фитовирусам.

Наряду с получением биологически активных соединений культуры растительных клеток используются в клеточной селекции. Так, получая потомство одной клетки, можно получить клон генетически однотипных, ценных растений. Это может быть обеспечено путем регенерации целого растения из отдельных клеток.

Еще одна область применения культур клеток – это получение соматических гибридов и дальнейшее их использование в селекции. Для этого клетки, растущие в культуре, используются для получения протопластов, а уже различные протопласты гибридизуются между собой с последующей регенерацией растений из полученных соматических гибридов (рис. 113).

Достаточно перспективной областью использования культур растительных клеток является получение трансформированных растительных клеток и использование их в качестве продуцентов белков животного происхождения. Так, например, после реконструкции генома растительные клетки способны продуцировать моноклональные антитела или целый ряд факторов роста (рис. 113). Факторы



Рис. 112. Основные физические факторы, которые контролируются при культивировании растительных клеток.

Антиканцерогены – это соединения, ингибирующие размножение опухолевых клеток.

роста – вещества, оказывающие регуляторное влияние на деление клеток.

Культура растительных клеток является перспективным объектом в научных исследованиях при решении таких вопросов как структурно-функциональная организация генома растительной клетки, межклеточное взаимодействие и другие вопросы.

В настоящее время культивирование растительных клеток в промышленных условиях позволяет получать достаточно большие массы клеток. Для этого чаще всего используют ферментеры большой емкости (от 20000 л и более), в которых осуществляют непрерывное культивирование. Может использоваться и глубинное культивирование клеточных суспензий в закрытых периодических системах.

Источники получения клеток для культивирования

Культура растительных клеток может быть получена из каллуса. Для этого каллус переносят в жидкую питательную среду и обрабатывают ферментом – пектиназой. Пектиназа разрушает пектат кальция, который обеспечивает контакт между растительными клетками. Исключение ионов кальция из культуральной среды способствует разделению каллуса на отдельные клетки.

Клеточная суспензия не должна содержать крупных агрегатов. Крупными считают агрегаты, в состав которых входит более 10 клеток. Для того чтобы избавиться от таких клеточных агрегатов полученную суспензию клеток фильтруют, используя нейлоновые фильтры, и контролируют качество суспензии клеток.

Для получения 100 мл клеточной суспензии ($5 \cdot 10^4$ клеток в мл) необходимо 2-3 г свежей каллусной ткани.

Необходимым условием культивирования клеточной суспензии является перемешивание или встряхивание. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то она вновь образует каллусную ткань.

Суспензия клеток для культивирования может быть получена непосредственно из тканей эксплантата – лист, стебель, корень. Однако клеточная суспензия легче получается из рыхлого каллуса, который получают на средах с (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой) химическим аналогом ауксина.

Особенности культивирования клеточных суспензий

В зависимости от способа и условий культивирования можно выделить несколько типов культур: каллусные культуры, суспензионные культуры (рис.114).

Как уже отмечалось, необходимым условием культивирования клеточных суспензий является интенсивное и постоянное перемешивание среды с клетками. Деление клеток в культуре

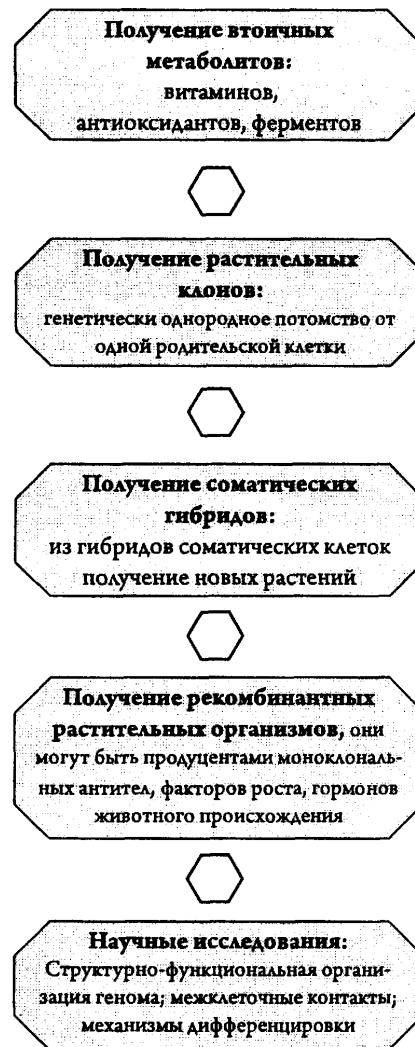


Рис. 113. Схема, демонстрирующая основные направления использования культуры растительных клеток.

обеспечивается наличием в культуральной среде ауксинов и цитокинов, т. е. фитогормонов. По своим характеристикам суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками. Для клеток используют те же солевые среды, которые используются и для культивирования каллуса.

Культивирование клеток может осуществляться как в накопительном режиме или в периодическом культивировании, так и проточном или непрерывном культивировании. В накопительном режиме культуральная среда не изменяется до окончания процесса культивирования. В случае непрерывного культивирования постоянно отбирается часть среды и добавляется свежая среда.

В процессе культивирования клеток постоянно осуществляется контроль состояния культуры, при этом оценивают такие характеристики как жизнеспособность клеток, плотность клеток в суспензии, степень агрегированности и скорость роста клеток.

О жизнеспособности клеток судят по их окрашиванию красителями. Так, чаще всего используют метиленовую синь или синь Эванса, трипановый синий. Живые клетки не окрашиваются этими красителями, так как их нативная мембрана непроницаема для этих красителей, а в клетки с нарушенной плазматической мембраной (мертвых) краситель легко проникает и прокрашивает их в синий цвет.

Плотность клеточной суспензии определяют под микроскопом в камере Фукс-Розенталя. Обычно плотность клеток при посадке составляет $5 \cdot 10^4$ кл./мл, а при выходе в стационарную фазу их количество составляет около $5 \cdot 10^6$ кл./мл. Как правило, стационарная фаза наступает на 15-18 день после посадки клеток на свежую среду.

О скорости деления клеток в культуре судят по увеличению количества клеток или клеточной массы за единицу времени.

Особенности культивирования одиночных клеток

При решении таких задач как получение генетически уникальных клонов, проведение соматической гибридизации, ведение клеточной селекции необходимо получение культур одиночных клеток.

Одиночную клетку можно выделить из суспензии клеток, из каллуса, из растительных тканей, например, меристемы или из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

Культивирование одиночных клеток сопряжено с большими трудностями. Это связано с тем, что одиночная клетка не делится в тех условиях, при которых осуществляют деление клеточной суспензии или каллусной ткани. Для преодоления этой трудности разработаны специальные методы культивирования. Первый метод, обеспечивающий деление одиночной клетки в культуре, был предложен Джонсом в 1960 г. (рис.115). Этот метод получил название метода «няньки». В данном случае «нянька» обеспечивает

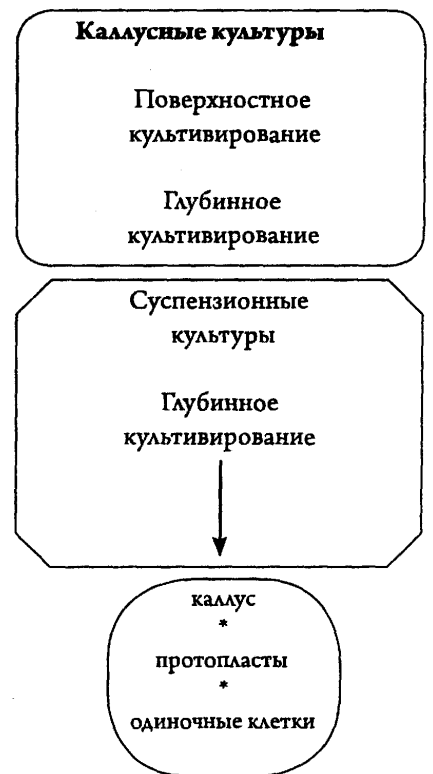


Рис. 114. Распределение культур по способу культивирования.

При оценке состояния культуры определяют плотность клеточной суспензии, скорость роста клеток, степень агрегированности, количество мертвых клеток, интенсивность метаболизма (по интенсивности дыхания).

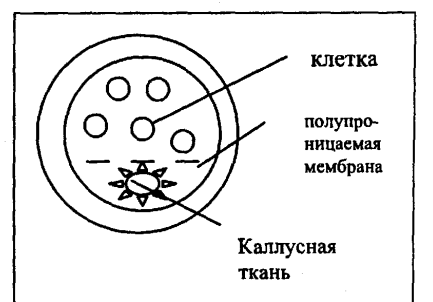


Рис. 115. Использование растительной ткани каллуса в качестве «няньки» при культивировании на агаризованной среде.

стимуляцию деления одиночной клетки. В качестве «няньки» используют кусочки каллусной ткани, которая отделена от одиночной клетки фильтром в случае суспензионной культуры. В присутствии «няньки» одиночная клетка делится и дает клон (генетически однородные клетки).

В том случае, если используют агаризованные (твердые) среды, то одиночную клетку помещают в центр чашки Петри, который отмечен кружочком на дне чашки. На расстоянии 0,5 см от отдельной клетки помещают кусочек (2-3 мм в диаметре) хорошо растущей ткани.

Ткань может быть того же вида, что и изолированная клетка, а может быть и близкого вида. Показано, что в процессе роста ткани в среду выделяются биологически активные вещества, которые стимулируют деление одиночных клеток.

Спустя 2-3 недели из одиночной клетки формируется масса ткани, ее переносят на свежую питательную среду (в жидкую или твердую) и продолжают культивирование.

Необходимо отметить, что полученная ткань представляет собой клон.

Другой метод культивирования одиночных клеток основан на использовании микрокапли питательной среды (20 мкл). Использование микрокапли в чашке Купрака обеспечивает малый объем и концентрированную питательную среду.

Индукцию клеточных делений одиночной клетки можно обеспечить с помощью так называемого «кормящего слоя» (аналогичен методу «няньки»). В качестве «кормящего слоя» используются активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка.

Основой использования всех перечисленных методов является увеличение концентрации факторов, выделяющихся клетками в процессе культивирования. Эти факторы могут быть получены после фильтрации и концентрирования культуральной среды, в которой росли клетки. Для этого используют фильтрацию клеточной суспензии, находящейся в экспоненциальной фазе роста, когда достигается наибольшая концентрация так называемых кондиционирующих факторов – метаболитов, выделяющихся в среду в процессе культивирования.

Если предварительно получить кондиционирующий фактор и внести его в среду с одиночной клеткой, то можно индуцировать ее деление.

Следовательно, для обеспечения деления одиночной клетки в культуре, необходимо добиться быстрого повышения концентрации кондиционирующего фактора одним из указанных способов (рис. 116).

Исследование природы кондиционирующего фактора показало, что это низкомолекулярные вещества (молекулярная масса около 700 Да), водорастворимые и термостабильные. Химическая природа этих факторов пока не ясна.

В основе всех методов культивирования одиночных клеток лежит обеспечение необходимого микроокружения за счет культуры других клеток.



Рис. 116. Методы, используемые для получения потомства одиночных клеток (клонов).

Культура каллусных тканей

Культивирование каллуса

Каллус (от лат. *callus* – мозоль) – ткань, образующаяся у растений в местах повреждений в виде наплыва, что способствует заживлению повреждений. Каллус образуется на изолированных кусочках ткани при культивировании его *in vitro* (такой кусочек называют эксплантатом). Каллусная ткань не имеет анатомической структуры, характерной для типичных дифференцированных растительных тканей. В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусная ткань может быть разной консистенции: 1 – рыхлой и легко распадающейся на отдельные клетки; 2 – средней плотности с выраженными меристематическими очагами; 3 – плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы (рис. 117).

Каллусная ткань – это активно пролиферирующая ткань, которая состоит из дедифференцированных (утративших дифференциацию) клеток. В процессе культивирования растительная ткань может формировать каллусную ткань.

Дифференцированные специализированные растительные клетки не способны к делению. Каждая клетка проходит три фазы своего развития: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. В результате дифференцировки в растительной клетке происходит утолщение клеточной стенки, после этого клетки теряют способность к делению. Для того, чтобы дифференцированные растительные клетки вновь приобрели способность к делению должна произойти их дедифференцировка, т.е. они должны приобрести свойства, характерные для меристематического состояния.

Для того чтобы ткань стала дедифференцированной и превратилась в каллусную необходимо присутствие в среде (или в самом растении) двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины способствуют подготовке клетки к делению, что проявляется в дедифференцировке (т.е. выхода их из дифференцированного состояния), а цитокинины обеспечивают деление клеток (пролиферацию). В том случае, если в питательную среду, не содержащую гормонов, поместить фрагмент растительной ткани, то клетки не будут делиться и каллус не образуется.

Следовательно, в процессе специализации (дифференцировки) клетки теряют способность к делению, индукция клеточного деления приводит к образованию каллусной ткани.

В некоторых случаях каллусная ткань может образовываться и с внесением в среду одного гормона, это может быть связано с наличием эндогенных гормонов, содержащихся в клетках эксплантата. Имеются сведения, что образование каллуса обусловлено не наличием ауксинов и цитокининов, а полисахаридами или другими индукторами клеточного деления, этот вопрос еще не решен.

Интенсивность образования каллусной ткани зависит не только от присутствия фитогормонов или других индукторов дедифференцировки, но и от физиологических особенностей эксплантатов

Каллусная культура

Плотные ткани

имеют зоны редуцирования камбия и сосудов



Ткани средней плотности

имеют очаги меристемы (органогенез)



Рыхлые ткани

Легко распадаются на отдельные клетки, из них легко получать суспензионные культуры

Рис. 117. Характеристика каллуса на основе межклеточных взаимодействий.

Дедифференцировка – способность дифференцированных клеток растений выполнять функции меристемы, т.е. недифференцированной ткани.

Из ауксинов чаще всего используют 2,4-Д, ИУК (индолил-3-уксусную кислоту), НУК (α -нафтолуксусную кислоту), однако наибольшей активностью обладает 2,4-Д. Из цитокинов чаще всего используют кинетин, 6-БАП (6-бензиламинопури, зеатин. Наибольшей активностью обладают 6-БАП и зеатин. Ауксины индуцируют синтез главной протеинкиназы клеточного деления.

Образование каллусной ткани лучше происходит у двудольных растений по сравнению с однодольными. Вероятно, это связано с их способностью изменять характер экспрессии генов.

и, прежде всего, степени ее дифференцировки. Так, формирование каллуса у двудольных растений осуществляется эффективнее, в то время как у однодольных этот процесс менее выражен. Это связано с тем, что переход клетки из дифференцированного состояния в недифференцированное обусловлено изменением активности генов (эпигенетическая изменчивость). Активация одних генов и ингибирование активности других приводит к изменению в составе белков клетки. В каллусных клетках появляются специфические белки, и уменьшается содержание белков, характерных для дифференцированных клеток. Показано, что в клетках двудольных растений активной осуществляется эпигенетическая изменчивость в культуре.

Процесс образования каллусной ткани начинается с разрушения некоторых клеточных органелл. Спустя 6-12 ч после начала культивирования изменяется клеточная оболочка, которая разбухает, изменяет свою плотность, значительно увеличивается число свободных рибосом, что отражает активацию белоксинтезирующего аппарата, и в частности увеличение синтеза внутриклеточных белков, увеличивается число ядрышек и их размеры. Спустя 48-72 ч после перевода ткани в культуру начинается деление клеток.

Каллусная ткань в культуре проходит те же этапы, которые характерны для развития других тканей: деление клеток, растяжение и дифференцировку в каллусную ткань. Каллусную дифференцировку не следует путать с морфогенезом, т.е. образованием растений.

Каллусная ткань при регулярном пассировании (переносе на свежую питательную среду) может поддерживаться в таком состоянии, по крайней мере, в течение десятка лет. Так, культура каллуса моркови была получена Р.Готре более 60 лет тому назад и в настоящее время она поддерживается в коллекции.

Кривая роста каллусной ткани не отличается от типичной S-образной кривой, характерной для клеточных культур (рис. 118). Каллусная ткань в культуре сохраняет основные характеристики и свойства нормальных клеток, они сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов. Для каллусных тканей характерно сохранение фотопериодической реакции. Вместе с тем, в каллусных тканях появляются и характерные для них особенности, в частности они отличаются от дифференцированных тканей (из которых они получены) составом белков, большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

Клеточный цикл клеток каллуса более длительный, чем у дифференцированных клеток. Как и у активно делящихся клеток, каллусная культура потребляет меньше кислорода, чем нормальные клетки. Это связано с изменением соотношения между дыханием и брожением, с увеличением доли брожения (бескислородное расщепление углеводов), т.е. снижением эффекта Пастера. О том, что в каллусных тканях превалирует процесс брожения над дыханием свидетельствует накопление этилового спирта в делящихся клетках. В пользу этого свидетельствует и слабое развитие системы митохондрий (количество митохондрий уменьшено и у них мало крист).



Рис. 118. Типичная кривая роста каллусной культуры.

Приблизительно к 30-м суткам культивирования она выходит на стационарную фазу роста.

Эффект Пастера — подавление процесса брожения в присутствии кислорода. Наиболее ярко выражено нарушение эффекта Пастера в опухолевых клетках животных. Это было обнаружено еще Варбургом. Усиление бескислородного расщепления углеводов (анаэробный гликолиз) в присутствии кислорода приводит к резкому увеличению (до 20 раз) потребления углеводов опухолевыми клетками.

В каллусных тканях увеличивается эффективность использования пентозофосфатного пути, что ведет к увеличению количества пентоз в клетке, что также необходимо делящимся клеткам.

Еще одной особенностью каллусных тканей является их генетическая гетерогенность (неоднородность). Она выражается в изменении плоидности клеток и увеличении хромосомных аберраций. Обнаружено, что чем дольше культивирование каллусной ткани, тем больше различие по плоидности у них выявляется. Так, спустя 4 года в каллусной культуре табака, все клетки становятся полиплоидными. Хромосомные и генные мутации, появляющиеся в культуре, ведут к изменению морфологических и физиолого-биохимических свойств клетки.

Причин, приводящих к генетической гетерогенности клеток в культуре, множество. Прежде всего, это генетическая неоднородность исходного материала. Ведь у многих растений дифференцированные ткани имеют различную плоидность, в то время как верхушечные меристемы, камбий всегда являются диплоидными. Само длительное культивирование ведет к появлению генетических изменений. Это может быть связано с тем, что многие компоненты культуральной среды мутагенны. Так, широко используемая 2,4-дихлорфенилуксусная кислота является сильным мутагеном, а цитокинины, в частности, кинетин увеличивает полиплоидность клеток.

Следовательно, каллус – специфическая дедифференцированная ткань, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с дифференцированными растительными клетками в качестве объектов биотехнологии.

Особенности каллусных культур

Каллус может быть получен из сегмента стебля, черешка листа, листовой пластинки, корня или завязи, плода, пыльника и пыльцы. Необходимо отметить, что кроме органа, содержащего разные ткани (меристему, паренхиму, сосудисто-волокнистые пучки) можно использовать отдельную ткань, меристему или паренхиму.

Существует еще один источник получения каллусной ткани – это семена. Для этого семена помещают на среду для роста каллуса и как только семена прорастут на первичном корешке, семядолях и почечке зародыша образуется каллусная ткань.

Пожалуй, наиболее удачным источником каллуса являются различные опухоли, которые образуются на растениях под влиянием бактерий и вирусов.

Независимо от источника весь материал, используемый для получения каллуса, необходимо простерилизовать, т.е. удалить микроорганизмы, которые находятся на образцах. Для этого выбранную ткань механически очищают, по возможности удаляют эпителий стерильным инструментом, и помещают на несколько минут (от 3 до 40 в зависимости от ткани) в стерилизующий раствор (например, 1-6 % гипохлорид натрия), и последовательно промывают ткань 4-5 раз стерильной водой. Для этого каждый раз образец погружают на 10 минут в стерильную воду (для получения стерильной воды ее автоклавируют при 0,8-1,0 атм, 112-115 °С, в течение 30 минут).

Анеуплоидия – изменение числа хромосом, не кратное основному набору хромосом. Уменьшение на одну хромосому (моносомия) реже на 2-е хромосомы (нуллисомия) или увеличение на несколько хромосом. Полиплоидия – кратное увеличение числа хромосом. Широко распространено у растительных объектов. Полиплоидные формы растений, как правило, имеют более крупные размеры. На основе полиплоидии методами селекции получен ряд полиплоидных высокопродуктивных сортов. Генетическая нестабильность каллусных тканей может использоваться в селекции, так как позволяет отбирать штаммы клеток с новыми измененными генотипами.

Стерилизацию образцов осуществляют в стерильном или ламинарном боксе.

Все работы с изолированными тканями необходимо проводить, соблюдая условия стерильности, принятые в микробиологической практике.

Подготовленный образец помещают на питательную среду: агаризованную (твердую) или жидкую. Для этого можно использовать различную посуду – чашки Петри, пробирки или колбы. Посуда с образцами закрывается ватными тампонами и помещается в термостат или комнату с постоянной температурой 25-26 °С (в ростовых помещениях не поддерживают стерильность). Каллус выращивают как в темноте, так и на слабом рассеянном свете. На свету ткани зеленеют и рост несколько угнетается.

Обычно за 25-30 дней хорошо растущая каллусная ткань увеличивается в массе в 100 раз от исходной.

Как правило, на 30-40 день культивирования культура переходит в стационарную фазу и ее рост прекращается. Прекращение роста объясняется истощением среды и старением самой ткани.

Если каллусная ткань выращивается в жидкой среде (суспензионная культура), необходимо обеспечить непрерывное и интенсивное перемешивание.

После выхода на стационарную фазу культуру переносят в стерильный бокс и стерильными инструментами разделяют ее на небольшие фрагменты, каждый из которых помещают на новую питательную среду (этот процесс называется пассированием). Рост каллуса вновь повторяется. Так за короткое время можно нарастить большие массы каллусной ткани.

Интенсивность роста каллуса зависит от многих причин: питательной среды, вида ткани, вида растений, условий культивирования, и для обеспечения роста приходится подбирать эти параметры индивидуально.

Индукция морфогенеза в каллусных тканях

Развитие каллусной ткани может осуществляться в трех различных направлениях. Первый путь – это стойкая дифференцировка. Клетки приобретают способность расти на среде без гормонов, т.е. становятся гормоннезависимыми культурами и превращаются в опухолевые, т.е. постоянно делящиеся клетки (рис. 119).

Второй путь – это развитие в стабильную каллусную ткань, которое заканчивается старением и отмиранием. По сути клетки как бы претерпевают вторичную дифференцировку и прекращают делиться после достижения стационарной фазы роста. Подобная дифференцировка не ведет к морфогенезу, а приводит к старению каллусной ткани.

Третий путь – это вторичная регенерация целого растения, т.е. морфогенез (возникновение организованных структур из неорганизованной клеточной массы). Морфогенез может проходить по типу органогенеза (образование отдельных органов, из которых формируется целое растение) и соматического эмбриогенеза (в этом случае сразу образуется зародыш (имеет меристему корня и меристему верхушечной почки), а из него развивается целое растение (рис. 120).

Каллусная ткань может питаться гетеротрофно, при этом интенсивность ее роста выше по сравнению с автотрофным питанием.



Рис. 119. Возможные пути развития каллуса.

Морфогенез каллусных тканей – возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Показано, что только одна из 400-800 клеток способна компетентно отвечать на индукторы морфогенеза и, следовательно, обеспечивать развитие растения.

Так как для агробиотехнологии (сельскохозяйственной биотехнологии) наибольший интерес представляет морфогенез, мы немного подробнее остановимся на его характеристике.

Любая соматическая клетка содержит полный набор генов и потенциально она может в определенных условиях давать все типы клеток, т.е. целое растение. Реализация этих потенциальных возможностей клетки и называют тотипотентностью. Идея о тотипотентности растительной клетки была выдвинута Г. Хаберландтом еще в 1902 г. Согласно определению, которое тогда давал Г. Хаберландт, любая клетка растения может дать начало новому организму, если этого не происходит, то только потому, что организм подавляет потенции клеток к развитию. Изоляция же клетки от растения способствует проявлению этих потенций. Позже экспериментально было показано, что действительно растительные клетки обладают тотипотентностью, что и лежит в основе морфогенеза каллуса.

В основе морфогенеза лежит цитодифференцировка. Дедифференцированные клетки каллусной ткани могут вторично дифференцироваться и тем самым приобретать функцию специализированных клеток. На процесс морфогенеза каллусной ткани оказывают влияние как внутренние, так и целый ряд внешних факторов.

Наиболее существенными внутренними факторами, влияющими на дифференцировку, являются: видовая принадлежность растения, из которого выделен эксплантат и, конечно, орган, из которого был получен эксплантат.

К внешним факторам, влияющим на морфогенез, необходимо отнести: состав питательной среды, температуру, световой режим. Наиболее сложным фактором морфогенеза является соотношение между цитокинами и ауксинами, которые входят в состав питательных сред. В том случае, если в питательной среде преобладают цитокины над ауксинами, чаще всего начинается стебельный органогенез, а в случае преобладания ауксинов над цитокинами – корневой органогенез.

Необходимо отметить, что существует такая закономерность – если в начале формируются корни, то, как правило, они не дают образования стебля и целого растения, в то время как образование стебля приводит к формированию корней и целого растения.

Следовательно, регуляторами дифференцировки являются цитокины и ауксины.

Если органогенез можно индуцировать с помощью фитогормонов, то соматический эмбриогенез фактически не зависит от фитогормонов в питательной среде. Эмбриогенные зоны в каллусной культуре возникают на той же среде, где культивируется каллус, а сигналом этому служит удаление из питательной среды дедифференцирующего фактора (2,4-Д). Особенности индукции соматического эмбриогенеза свидетельствуют о том, что выделение растительной клетки в культуру уже является стимулом к проявлению тотипотентности, т.е. переходу к морфогенезу. Процесс образования соматического эмбриогенеза усиливается манни-

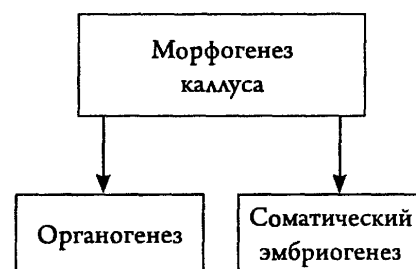


Рис. 120. Типы морфогенеза в каллусной культуре.

Наиболее простой тип каллусной дифференцировки – это образование отдельных дифференцированных клеток. Например, образование эпибластов – клеток запасющих вторичные метаболиты. Более сложный путь дифференцировки каллуса – это образование в каллусе различных тканей: волокон, трихом, ксилемы, флоэмы.

Органогенез – образование органов (стебли, корни) относится к самым сложным типам вторичной дифференцировки.

Соматический эмбриогенез – образование эмбрионов из соматических клеток.

том и сорбитом, ионами NO_3^- , нитратом аммония, некоторыми аминокислотами (пролин, тирозин).

Необходимо учесть, что не все клетки в каллусной культуре способны воспринимать сигналы к морфогенезу, а лишь одна из 400-800 клеток. Способность клетки воспринимать стимулы морфогенеза называют компетентностью клетки.

Компетентная клетка обособляется от окружающих ее каллусных клеток, образуя утолщенную клеточную стенку. При соматическом эмбриогенезе такая клетка дает начало зиготе, а при органогенезе она образует меристему. В компетентных клетках (инициальные клетки) содержатся большие количества запасных веществ: крахмала, липидов.

После стимуляции инициальные клетки некоторое время находятся в лаг-фазе. В это время у них изменяется метаболизм, в клетках появляются белки-антигены, осуществляется подготовка к делению.

Вслед за биохимическими изменениями происходят и структурные изменения клетки: возрастает число рибосом, митохондрий, изменяются другие структурные компоненты (вспомните принцип кооперативности и структурно-функциональной взаимосвязи). Все изменения, происходящие при морфогенезе, заканчиваются регенерацией из каллусной ткани растения, существует мнение, что признак морфогенеза полигенен и контролируется несколькими хромосомами, другая точка зрения, что только два гена определяют морфогенез.

Культура протопластов

Области применения протопластов

Изолированные протопласты являются перспективным объектом биотехнологии. Удаление клеточной стенки у растительной клетки позволяет исследовать свойства мембраны – плазмалеммы. Так, Е.Коккинг показал, что благодаря пиноцитозу протопласты способны «поглощать» из окружающей среды не только низкомолекулярные вещества, но и такие крупные образования как органеллы клеток и вирусные частицы. Этот подход используется при исследовании роли органелл в функционировании клеток растений.

Протопласты могут образовывать соматические гибриды между клетками различных видов растений. Для получения гибридных клеток используют различные способы индукции слияния. С ними мы познакомимся в другом разделе. Соматические гибриды используются для получения новых генетических форм растений. Это позволяет получать отдаленные гибриды, обладающие ценными хозяйственными свойствами. Еще одним направлением в использовании протопластов является получение трансгенных растений, т. е. растений несущих чужеродный генетический материал. Этот подход реализуется благодаря тому, что в протопласт относительно легко могут быть перенесены фрагменты генов и в дальнейшем из такой клетки путем регенерации получено новое растение с рекомбинантным геном (рис. 121).

Долгов Ю.Б. (1994) установил, что слабый постоянный электрический ток (2мкА) может быть индуктором эмбриогенеза.

Термин «изолированные протопласты» был предложен в 1880 г. А. Ганштейном. Дж. Кернер в 1892 г. выделил протопласты при изучении плазмолиза в клетках листа телореза (*Stratiotes aloides*) при механическом повреждении ткани.

Получение и культивирование протопластов

Впервые протопласты были выделены Клернером в 1892 г. Он изучал плазмолемму в клетках листа телореза. Так как он использовал механическое удаление клеточной стенки, то этот способ получил название механического получения протопластов.

Этот метод очень трудоемкий и не позволяет получить большое количество протопластов.

Другой способ получения протопластов основан на удалении клеточной стенки ферментами – ферментативный способ. Для разрушения клеточной стенки используют целлюлазу, гемицеллюлазу и пектиназу. Один из первых успешных выделений протопластов ферментативным способом был осуществлен Е. Коккингем в 1960 г. Этот метод по сравнению с механическим методом имеет ряд преимуществ. Прежде всего, он обеспечивает быстрое получение большого количества протопластов, относительно хорошего качества.

Выделять протопласты можно из клеток растительных тканей, каллусной культуры, суспензионной культуры растительных клеток. Для получения протопластов из разных растительных объектов требуются различные условия, т. е. необходима индивидуальная разработка условий выделения. Однако независимо от объектов источника общим является подбор стабилизатора, что обеспечивает получение жизнеспособных протопластов. В качестве стабилизаторов чаще всего используют различные сахара или ионные осмотики (растворы солей CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl). Концентрация осмотиков должна быть немного гипертонична, чтобы протопласты находились в состоянии слабого протеолиза. Такое состояние тормозит метаболизм и регенерацию клеточной стенки.

Полученные протопласты культивируют на тех же средах, что и растительные клетки и ткани.

Регенерация целых растений из протопластов сопряжена с рядом трудностей. В настоящее время удается относительно легко регенерировать растения моркови, табака, петунии и др.

Клональное микроразмножение растений

Семенные растения способны размножаться семенами (половой путь) и вегетативно (не половым путем). В основе вегетативного размножения растений лежит явление тотипотентности, т.е. способности любой соматической клетки реализовывать свой генетический потенциал и при определенных условиях формировать целое растение.

Если при размножении семенами каждое полученное растение имеет уникальный генотип, то в случае вегетативного размножения все получаемые растения имеют генотип материнского растения, т.е. мы получаем растительный клон. Кроме того, вегетативное размножение растений позволяет значительно сократить длительность ювенильного периода по сравнению с семенным размножением. В этом смысле использование вегетативного размножения

ПРОТОПЛАСТЫ

Получение соматических гибридов между различными типами клеток

Получение трансгенных растений

Исследование взаимоотношений ядерного генома и других клеточных органелл
*
биогенез клеточной стенки и др. вопросы

Рис. 121. Схема, демонстрирующая возможности применения протопластов.

Осмотики – вещества, которые обеспечивают необходимую осмотичность раствора, в котором культивируются протопласты. Кроме сохранения целостности протопласта они тормозят метаболизм клеток.

№	Некоторые растения не способны :
1)	к эффективному вегетативному размножению (дуб, сосна, ель и др.);
2)	к черенкованию, если древесные породы старше 15 лет;
3)	используя метод черенкования, не всегда удается получить не зараженный вирусами посадочный материал. Это связано с тем, что растительные вирусы системно поражают все растение;
4)	традиционный способ черенкования, особенно древесных растений не может быть использован на протяжении всего года (как правило, это всегда лето).

Табл. 17. Некоторые особенности вегетативного размножения растений.

растений позволяет сохранять и использовать высокопродуктивные сорта растений. Однако традиционный вегетативный способ размножения растений имеет ряд особенностей и ограничений (табл. 17).

Указанные недостатки вегетативного размножения легко преодолеваются с помощью клонального микроразмножения растений. Клональное микроразмножение основано на культивировании в условиях *in vitro* (в пробирке) растительных тканей с дальнейшей индукцией регенерации целого растения.

Первые достижения в области микроклонального размножения были получены французским ученым Ж. Морелем в конце 50-х годов XX столетия. Он получил орхидеи путем регенерации из культуры тканей. Для этого Ж. Морель удалил конус нарастания (верхушку) цимбидиума, который состоял из нескольких листовых зачатков, перевел их в культуру и получил каллус. Полученную таким способом ткань можно было делить на части и продолжать культивирование *in vitro* неопределенно долго, а из них относительно легко можно было получать целые растения. Следовательно, используя этот способ размножения, можно получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В настоящее время метод клонального микроразмножения растений интенсивно развивается и находит все более широкое применение в практике.

Как известно, культивирование тканей хвойных пород сопряжено с большими методическими трудностями. Они медленно растут, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений (фенолов, терпенов и др.). В культуре тканей фенольные соединения окисляются различными фенолазами, а продукты окисления фенолов являются ингибиторами клеточного деления и роста клеток. Это приводит к тому, что культуры хвойных быстро гибнут. В настоящее время разрабатываются методы стабилизации фенольных соединений в культуре, что дало бы возможность разработать способ клонального размножения хвойных. Сегодня можно использовать клональное микроразмножение более 200 видов древесных растений из 40 семейств (каштан, дуб, береза, клен, осина, сосна, ель, секвойя и др.).

Метод клонального микроразмножения имеет ряд преимуществ перед существующими способами размножения (табл. 18).

Первые положительные результаты по микроклональному размножению были получены в конце 50-х годов XX века, а через 50 лет стало возможным использовать этот метод для размножения более 200 видов древесных растений из 40 семейств.

№	Метод клонального микроразмножения имеет ряд преимуществ перед существующими способами размножения:
1	позволяет получить генетически однородный посадочный материал;
2	используя культуру меристемы можно получить посадочный материал, не содержащий вирусов, т.е. безвирусный посадочный материал;
3	позволяет сократить продолжительность селекционного периода;
4	имеет высокий коэффициент размножения, для травянистых (10^5 - 10^6), кустарниковых и древесных (10^4 - 10^5), а для хвойных - 10^4 ;
5	позволяет ускорить переход растения от ювенильной к репродуктивной фазе роста;
6	позволяет вести размножение круглый год, на малых площадях;
7	процесс размножения может быть автоматизирован.

Табл. 18. Преимущества клонального микроразмножения растений.

Методы клонального размножения растений

Основные этапы клонального микроразмножения растений

Клональное микроразмножение можно разделить на 4 основных этапа (рис. 122):

1. Получение стерильной культуры

Этот этап состоит из выбора растения-донора, изолирования из него эксплантата, перенос его в культуру и обеспечения роста эксплантата в культуре.

2. Получение микроклонов

На этом этапе осуществляется микроразмножение в культуре, что позволяет получить максимальное количество мериклонов (клонов меристемы).

3. Укоренение полученных побегов

Этот этап характеризуется укоренением полученных побегов, их адаптацией к почве, при необходимости часть полученных побегов сохраняют при пониженной температуре (2-10 °С).

4. Выращивание клонированных растений в теплице и посадка их в полевые условия

Это завершающий этап клонального размножения растений. В настоящее время существуют различные методы клонального размножения растений.

Метод активации развития уже существующих в растениях меристем

Методы клонального размножения основаны на разработке подходов управления процессами морфогенеза растений. В настоящее время выделяют несколько методов клонального размножения растений.

Как известно, меристема находится в апексе стебля, в пазушных и так называемых спящих почках стебля, у разных растений они развиты в разной степени.

В настоящее время этот метод используется достаточно часто. Для его реализации необходимо снять апикальное доминирование. Этого можно достичь двумя путями. В первом случае удаляют верхушечную меристему стебля, проводят микрочеренкование такого побега *in vitro* на среде, не содержащей гормоны, такие манипуляции приводят к стимулированию существующих меристем (рис.123). Во втором случае не удаляют верхушечную меристему, а культивируют *in vitro* побег на среде, содержащей цитокины, что ведет к усилению развития существующих пазушных побегов. В качестве цитокинов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин).

Полученные таким методом молодые побеги отделяют от материнского эксплантата и уже самостоятельно культивируют на

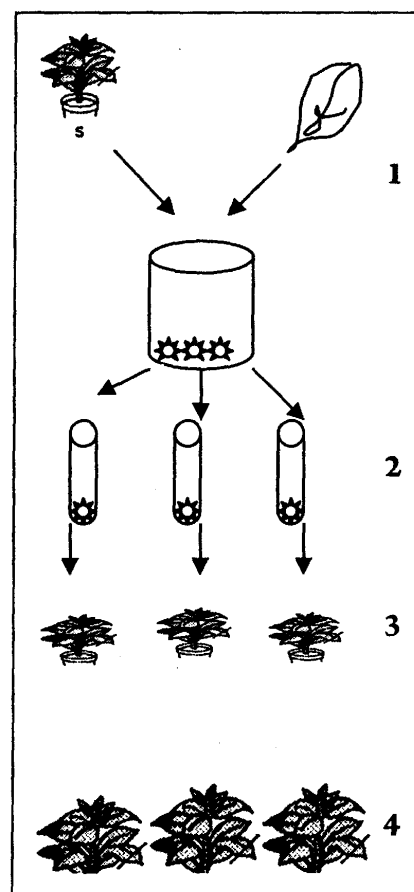


Рис. 122. Схема клонального микроразмножения растений.

1 – получение стерильной культуры; 2 – получение микроклонов; 3 – укоренение в теплице полученных клонов; 4 – посадка клонов в грунт.

свежей питательной среде. После достижения необходимых размеров полученные побеги высаживают в грунт.

Этот метод широко применяется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур: технических (сахарная свекла, табак, хмель), овощных (томаты, картофель, перец и др.), цветочных (гвоздика, роза, хризантема и др.) и древесных (яблоня, слива, груша и др.).

Для картофеля разработана технология промышленного производства, причем она позволяет получать в пробирке микроклубни, которые являются ценным посадочным безвирусным материалом. Этот метод позволяет получить от одного растения в течение года 100 000 генетически идентичных растений (клонов, сохраняющих свойства родительских растений).

Индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями эксплантата

Второй метод основан на индукции возникновения адвентивных почек непосредственно тканями эксплантата. Изолированные части растения способны восстанавливать недостающие органы, т.е. регенерировать целые растения. Если удастся получить растительные ткани независимо от происхождения (лист, стебель, семядоли, корни, зачатки соцветий), не содержащие вирусов, то в определенных условиях культивирования они могут образовывать адвентивные почки, которые, в свою очередь, способны образовывать побеги.

Для обеспечения этого процесса используют питательные среды, содержащие цитокины и ауксины в соотношении 10:1 или 100:1. В качестве ауксина часто используют β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или α -нафтилуксусную кислоту (НУК).

Этим методом размножают луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинты, гладиолусы, тюльпаны). Из эксплантатов листьев размножают цветную капусту, качанную, брюссельскую и др., из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев хорошо размножаются лук и чеснок.

На использовании этого метода основана технология клонового микроразмножения земляники. Меристематические верхушки изолируют из молодых растений (не содержащих вирусов) и выращивают на среде Мурасиге и Скуга, которая содержит БАП в концентрации 0,1-0,5 мг/л. Спустя 3-4 недели меристема дает начало проростку, у основания которого формируются адвентивные почки. Адвентивные почки быстро растут и дают начало новым почкам. В течение 6-8 недель образуется множество адвентивных почек. На следующих стадиях появляются листья, а в основаниях формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют и вновь пересаживают на новую питательную среду. Если отдельные почки пересаживают на среду без регуляторов роста, то через 4-6 недель формируются нормальные растения. Необходимо отметить, что полученный эксплантат сохраняет способность к морфогенезу на протяжении 3-4 лет.

I способ



Удаление верхушечной почки



Культивирование на среде без гормонов



Черенкование



Высадка в грунт

II способ



Удаление верхушечной почки



Культивирование на среде с гормонами



Черенкование



Высадка в грунт

Рис. 123. Способы клонового размножения растений.

Используя эту методику от одного растения можно получить несколько миллионов новых растений с сохранением свойств родительского материала.

Механизм образования адвентивных почек пока остается неясным.

Соматический эмбриогенез

Третий метод, использующийся при клональном микроразмножении называется соматическим эмбриогенезом.

Он основан на том, что из соматических клеток формируются структуры подобные зародышам и по внешнему виду они напоминают зиготические зародыши. Соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно развиваются апикальные меристемы стебля и корня. По существующим представлениям соматические зародыши проходят три стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную, и в конечном итоге развиваются в проросток. Впервые это явление было обнаружено в культуре клеток моркови в 50-х годах XX века.

В настоящее время соматический эмбриогенез используется для размножения злаковых, люцерны, редиса, винограда, ряда древесных пород (осины, эвкалипта, дуба, ели обыкновенной), растений из семейства *Orchidaceae* и *Putaceae*.

Формирование эмбриоидов в культуре обеспечивается особенностью культуральной среды. В этом смысле формирование зародыша можно разбить на два этапа. На первом этапе в среду культивирования клеток добавляют ауксин (как правило, его аналог 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту), это способствует превращению соматических клеток в эмбриональные.

На следующем этапе культивирования заменяют культуральную среду на среду, не содержащую ауксин, или содержащую ауксин в очень низких концентрациях. Это обеспечивает развитие из образовавшихся эмбриональных клеток эмбриоидов (рис. 124).

Соматический эмбриогенез может реализоваться как в культуре растительных клеток, так и в каллусной культуре.

Необходимо отметить, что, при использовании каллусных культур для клонального размножения на основе этого метода, образующиеся растения генетически нестабильны по отношению к растению-донору, кроме того, не всегда удается получить хорошие результаты. Вместе с тем, этот метод имеет и свои преимущества, которые связаны с тем, что при этом нет необходимости адаптировать полученные растения к укоренению.

Метод клонального микроразмножения на основе дифференциации адвентивных почек

Этот метод основан на дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани. Особенности этого

Эмбриогенез – процесс зародышевого развития организма. Соматический эмбриогенез – обеспечение условий эмбрионального развития из соматических клеток (клеток тела).

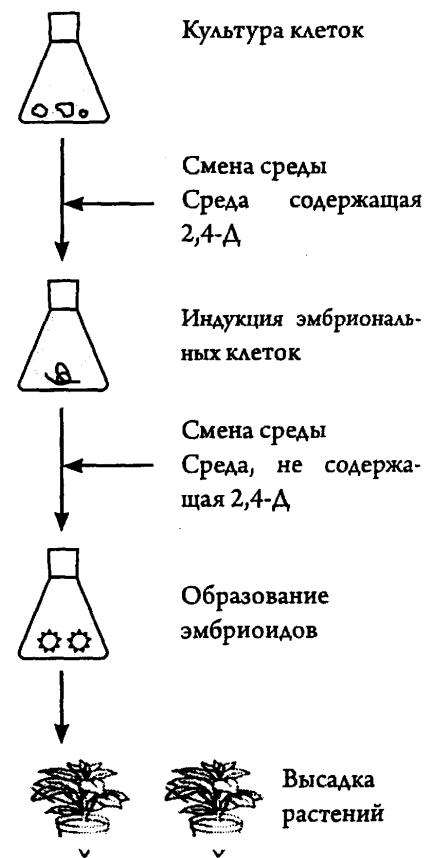


Рис. 124. Схема соматического эмбриогенеза.

метода в том, что при культивировании каллусной ткани ее частые пересадки на свежую среду приводят к изменению пloidности клеток, потере стабильности генома (генные и хромосомные мутации). Это, в свою очередь, ведет к изменению морфологических характеристик полученных растений. Однако эти особенности могут быть использованы в дальнейшей работе, в частности как исходный материал в селекции.

Этот метод основан на том, что при культивировании каллуса в определенных условиях формируются адвентивные почки, которые дают начало новому растению.

Техника культивирования при клональном микроразмножении

Управление морфогенезом в культуре обеспечивается контролем состава питательной среды и с учетом этого клональное микро-размножение может быть разбито на 4 этапа (рис.125).

I этап – получение стерильной культуры меристем

Это осуществляется стерилизацией растительных тканей, как правило, ртутьсодержащими растворами (0,1-0,2 % раствор диоксида или сулемы) или хлорсодержащими соединениями (хлорамин, 10-15 % раствор гипохлорида натрия или калия 5-10 %) в течение 10-20 мин для тканей, имеющих плотную оболочку. После этого растительный материал трижды промывают стерильной водой и переносят на стерильную питательную среду. Для улучшения эффекта стерилизации в питательную среду вносят антибиотики – тетрациклин, бензилпенициллин и др. в концентрации 100-200 мг/л.

На этом этапе культивирования используют солевую среду Мурасиге и Скуга, ауксины и цитокины вносят в различных концентрациях в зависимости от объекта. В некоторых случаях объекты (голосеменные) выделяют в среду токсичные вещества такие как фенолы, терпены и другие, в таком случае в среду культивирования вносят антиоксиданты (аскорбиновую кислоту – 12 мг/л; глутатион – 4,5 мг/л; дитиотриитол (1-3 мг/л); диэтилакарбомат (2-5 мг/л). Обоснованным является внесение в культуральную среду активированного древесного угля (0,5-1 %).

На первом этапе, который может продолжаться от 1 до 2-х месяцев начинается рост меристематических тканей и осуществляется формирование первичных побегов.

II этап – собственно микроразмножение.

На этом этапе так подбирают питательную среду и условия культивирования, чтобы получить максимально возможное количество микроклонов.

Основой питательной среды, используемой на этом этапе, является та же среда Мурасиге и Скуга, которая содержит цитокины и ауксины. Из цитокинов используется БАП (6-бензиламинопуридин) в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л. Так как высокие концентрации цитокинов способны подавлять пролиферацию

Под морфогенезом для каллусной ткани понимают возникновение морфологических структур из неорганизованной массы клеток. Каллусная ткань может проходить разные направления развития:

- 1 – вторичная дифференцировка;
- 2 – стойкая дифференцировка;
- 3 – собственный цикл развития, который завершается старением и отмиранием каллуса.

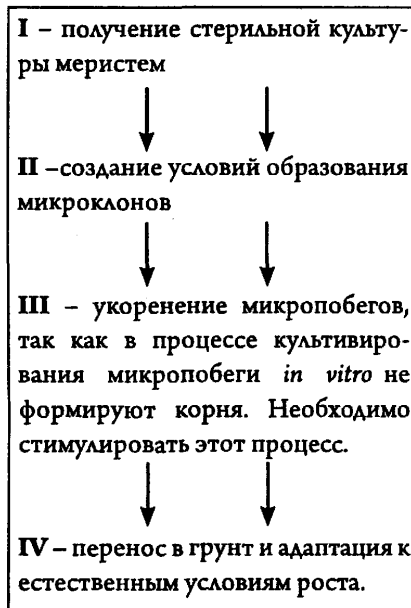


Рис. 125. Этапы клонального микроразмножения растений.

пазушных меристем, образование витрифицированных побегов и угнетать укоренение растений, то целесообразно использовать циклы культивирования на средах, содержащих низкие и высокие концентрации цитокинов.

III этап – укоренение микропобегов.

Для этого осуществляют смену культуральной среды на среду Уайта, содержащую меньшую концентрацию солей или разбавляют среду Мурасиге и Скуга в 2 раза. Содержание сахаров уменьшают до 0,5-1 %. Из среды исключают цитокины, оставляя только ауксины. Для стимуляции образования корней в среду вносят β-индолил-3-масляную кислоту, ИУК или НУК.

Укоренение микропобегов проводят двумя способами: 1) выдерживают микропобеги от 2 до 24-х часов в стерильном растворе ауксина (20-50 мг/л). После этого их культивируют на агаризованной среде, не содержащей гормонов, или переносят в стерильную почву;

2) культивирование микропобегов на питательной среде, содержащей ауксин (1-5 мг/л), в течение 3-4 недель.

В настоящее время для укоренения начали использовать гидропонный метод выращивания. Так, для картофеля, используя гидропонный метод, можно получать мини клубни как посадочный материал.

IV этап – перенос в грунт.

Растения, у которых сформировались 2-3 листа и корневая система, осторожно извлекают из колб или пробирок пинцетом или специальным крючком. Корни осторожно отмывают от остатков агара и высаживают в почву, которая предварительно простерилизована при 85-90 °С в течение часа. Почвенный субстрат готовят на основе торфа и песка (3:1), торфа, дерновой почвы, перлита (1:1:1). Для представителей семейства орхидных субстрат готовят из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба и сосновой коры (1:1:1). Горшок с растением переносят в теплицу с температурой 20-22 °С, освещенностью не более 5 клк и влажностью 80-90 %. В теплице создают условия искусственного тумана, если это невозможно, то каждое растение накрывают стеклянной банкой. Спустя 20-30 дней после пересадки, растения подкармливают раствором минеральных солей (Мурасиге и Скуга, Кнопа или другими).

По мере роста растений их пересаживают в большие горшки, а весной или летом в грунт.

Способ получения безвирусного посадочного материала

Растительные вирусы поражают растение системно, т.е. один вид вирусов способен поражать все ткани растений. Следствием этого является общая инфицированность всего растения. В 50-х годах XX века Ж. Морель и С. Мартин высказали предположение, что вирус распространяется по растению с некоторым отставанием, т.е.

Гидропонный метод – это метод выращивания растений без почвы на основе водных растворов необходимых питательных веществ. В некоторых случаях корни закрепляют в песке, гравии или мхе, или же в водной среде.

В состав раствора Кнопа входит:

Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	– 1г/л
KH ₂ PO ₄	– 0,25г/л
MgSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,25г/л
KCl	– 0,125г/л
FeCl ₂	– 0,0125г/л

побеги растут быстрее, чем «перемещение» вируса по растительным тканям. А если это так, то в молодых недифференцированных тканях (в меристеме) концентрация вируса должна быть очень низкой или вирус может отсутствовать вообще. Эта теоретическая концепция стимулировала разработку методов культивирования меристемы и получение безвирусных растений в системе *in vitro*.

Как правило, меристема состоит из конуса нарастания и одного или двух листовых зачатков (примордиев). Точка роста растений представляет собой апикальную меристему с диаметром до 200 мкм и высотой от 20 до 150 мкм (у разных растений они разные). Показано, что клональное микроразмножение зависит от размера меристематического эксплантата, чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче идет процесс морфогенеза, который завершается формированием целого растения в пробирке.

Использование современных методов обнаружения вирусов (иммуноферментный анализ, электронная микроскопия) показало, что в меристеме, выделенной из растений, пораженных вирусами, содержатся вирусы. Следовательно, применение апикальной меристемы в качестве метода получения безвирусных растений не очень эффективно. Было показано, что растения гвоздики, цимбидиума и другие, полученные из меристемы больных растений, также были инфицированы вирусами CarMV и CarVMV.

В настоящее время для получения безвирусной апикальной меристемы от больного растения используют предварительную обработку меристемы высокой температурой или химическими соединениями, угнетающими размножение вирусов.

Метод термотерапии может применяться как *in vivo*, так и *in vitro*, и основан на использовании сухого горячего воздуха. Растения после термообработки помещают в термокамеры и на протяжении недели повышают температуру от 25 до 37 °С, влажность воздуха в камере 90 %, освещенность 5 клк, а фотопериод – 14-16 часов в сутки. Продолжительность такой обработки разная для разных растений. Так, для гвоздики – это 10-12 недель, а для хризантемы – более 12 недель. После такой термотерапии из этих растений выделяют меристемы и культивируют их *in vitro*.

В ряде случаев для освобождения от вирусов меристему культивируют при высокой температуре.

Эффект действия температуры на вирус может быть основан на том, что при такой температуре скорость размножения вирусов отстает от скорости их деградации и при длительном культивировании вирусы погибают.

Используя термотерапию в сочетании с меристемной культурой можно избавиться от вирусов на 50-90 %.

Кроме термотерапии можно использовать и хемотерапию. Чаще всего для уничтожения вирусов используют 1β-D-рибофуранил-1,2,4-триазол-3-карбоксимид (коммерческое название виразол) в концентрации 20-50 мг/л. Для получения эффекта

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям наиболее трудоемкий и дорогой. Некоторые растения после пересадки в грунт останавливаются в росте, у них опадают листья и растения гибнут. Это связано в том, что у таких растений нарушена функция устьичного аппарата и они быстро теряют воду. Кроме этого у некоторых растений в условиях *in vitro* не образуются корневые волоски, это ведет к потере способностей поглощать воду и минеральные компоненты. Эту проблему решают с помощью искусственной микоризации растений. Для этого осуществляют заражение растений микоризообразующими грибами *in vitro* в стерильных условиях или *in vivo* в естественных условиях. Этот метод позволяет увеличить приживаемость растений в 2 раза. Улучшить адаптацию пробирочных растений можно, уменьшая на этапе адаптации обезвоживание, для этого на время периода адаптации растения опрыскивают 50% водным раствором глицерина. В институте физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской АН для улучшения адаптации винограда используют такой подход. Пробирки открывают и дают проросткам вырасти в пробирке на 2-3 листа в открытых условиях. После этого их переносят в грунт, не отмывая корни от агара, и побег заглубляют в почву так, чтобы над поверхностью оставался стебель с 2-мя развитыми листочками.

противовирусный препарат вносят в культуральную среду для меристем, при этом выход безвирусных растений увеличивается до 80-100 %.

Глава VI

Культура животных клеток

История развития метода культивирования клеток животных

История развития метода культивирования клеток животных может быть разбита на несколько этапов: 1 – доказательство возможности роста и воспроизводства клеток в культуре после их выделения из тканей животных. Эти работы были проведены в начале XX века; 2 – разработка методов культивирования клеток животных и размножение вирусов в культуре клеток; 3 – на этом этапе началось массовое получение вирусов в культуре клеток для вакцинации, получение моноклональных антител и клеток, несущих рекомбинантные ДНК.

Для того чтобы показать возможность выращивания и размножения клеток в культуре (*in vitro*) необходимо было разработать теоретическую концепцию структурно-функциональной организации клеток и решить ряд практических задач: 1 – разработать методику получения клеток из тканей, не содержащих экзогенных (чужеродных, сопутствующих) клеток бактерий и грибов; 2 – разработать питательные среды, в которых выделенные из организма клетки могли бы продолжать расти и размножаться, т.е. в средах должны содержаться все необходимые для клетки питательные вещества и поддерживаться необходимые физико-химические условия; 3 – разработать методики наблюдения за клетками и контроля их динамики развития; 4 – разработать методики длительного культивирования клеток в асептических условиях.

Важную роль в формировании теоретических основ культивирования клеток имело и формирование концепции гомеостаза Клода Бернара (1813-1878). Суть этой концепции сводится к тому, что живые организмы способны сохранять свою внутреннюю среду постоянной, несмотря на изменения в окружающей среде. Эта концепция разрабатывалась для организма как единого целого, однако она распространяется и на уровень клетки.

Клетка как функциональная единица организма может быть выделена из ткани, способна поддерживать свое внутриклеточное состояние, может в определенных условиях поддерживать свою жизнедеятельность.

Решение задач по культивированию клеток вне организма на начальных этапах имело не столько практическое, сколько теоретическое значение.

Способность кусочков ткани сохранять свою жизнеспособность вне организма была впервые показана У. Роуксом в 1885 г. Он продемонстрировал это на примере хорионаллантоисной оболочки куриного эмбриона. Несколько позже Лоеб (1897) показал, что клетки крови и соединительной ткани могут выживать в

I. 1885 – 1912 гг.

У. Роукс показал способность кусочков ткани сохранять свою жизнеспособность вне организма. Клетки крови выживают в растворе с сывороткой крови. Разработка метода висячей капли и др.

II. 1912 – 1961 гг.

Первые эксперименты по длительному культивированию клеток. Работы Карреля и др. Разработка питательных сред и методов культивирования.

III. 1961 – 1975 гг.

Старение клеток в культуре. Интенсивное развитие методов культивирования.

Разработка методов соматической гибридизации.

IV. 1975 – настоящее время.

Разработка гибридных технологий – промышленных методов культивирования, разработка бесывороточных сред для культивирования клеток.

Мальпиги (1674 г.) и Греур (1682 г.) обнаружили, что растительные клетки заполнены жидкостью и окружены оболочками, а Тревиранус (1806 г.) и Хьюго фон Мол (1830 г.) заметили, что клетки увеличиваются в объеме и делятся. В 1831 г. Браун описал наличие ядра в клетке, а Шлейден в 1838 г. сформулировал теорию клеточного строения растений. После встречи Шлейдена со Шванном и обсуждения результатов их исследований была сформулирована универсальность клеточного строения животных и растений.

пробирках с сывороткой и плазмой крови, а Льюнгрем (1898) подерживал эксплантаты кожи человека в жизнеспособном состоянии, и они сохраняли способность к реимплантации.

Важным этапом разработки методов культивирования клеток были работы Роукса по использованию метода «висячей капли», а Харрисон Р. наблюдал (в 1907 г.) рост нервных клеток в «висячей капле» и ему удалось определить скорость роста этих клеток, которая составляла 20 мкм за 25 мин.

Значительным этапом в развитии методов культивирования клеток явились работы Алексиса Карреля. Будучи хорошим хирургом, Каррель владел методами асептики, что и позволило ему добиться значительных результатов по культивированию клеток *in vitro*. Результаты своих исследований А.Каррель опубликовал под интригующим названием – культивирование «бессмертных» клеток. Культивирование клеток сердца курицы было начато 17 января 1912 г. и продолжалось 34 года. Процедура культивирования в лаборатории А.Карреля была очень сложной, и ее не смогли воспроизвести в других лабораториях. Для культивирования клеток использовалась модифицированная среда Рингера. Для выделения клеток был использован трипсин. Правда, трипсин начал широко использоваться только после того, когда Симмс и Стилман стали его использовать для пассирования клеток.

До 1961 на основании работ Карреля существовало мнение, что клетки, переведенные в культуру, имеют неограниченное время жизни. Но в 1961 г. Хейфлик и Мурхед выделили линию диплоидных фибробластов человека WJ-38, и показали, что для этих клеток характерен феномен старения. Время существования клеточной линии в культуре ограничено 50 пассажами (пересадками), что приблизительно соответствует 50 удвоениям популяции. В то же время было показано, что клетки, выделенные из раковых опухолей или трансформированные в ходе культивирования, являются «бессмертными» (иммортальными). «Бессмертность» клеток в культуре коррелирует с гетероплоидностью, тогда как для клеток, стареющих в культуре, характерно сохранение диплоидного набора хромосом.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования биологии клеток в культуре и, вероятно, будут открыты новые особенности поведения клеток в культуре.

Основные понятия и этапы культивирования клеток

После выделения клеток из тканей животных и перевода их в питательную среду их называют первичной культурой до тех пор, пока не проведут их субкультивирование.

Субкультивирование осуществляют после достижения полного монослоя первичными клетками или выходом количества клеток на стационарный уровень. При этом первичную культуру пересаживают в 2 или 4 флакона с использованием новой питательной

Трипсин – пищеварительный фермент, который расщепляет белки в кишечнике, синтезируется в виде предшественника – трипсиногена в клетках поджелудочной железы.

Пассирование – перенос клеток культивируемых *in vitro* в новый культуральный сосуд со средой.

Гетероплоидность – измененное число хромосом, не кратное гаплоидному набору.

Иммортальные клетки – клетки, как правило, трансформированные и способные к неограниченному делению в культуре (бессмертные).

Субкультивирование – перевод первичной культуры клеток в постоянную клеточную линию с последовательным пассированием, т. е. пересаживанием на свежую питательную среду.

среды. В дальнейшем пересадки осуществляют, как правило, каждую неделю. Если при этом клетки сохраняют диплоидность и свойства клетки не отличаются от исходного эксплантата, то их называют клеточной линией. В некоторых случаях клетки проявляют высокую генетическую нестабильность и их свойства сильно изменяются вплоть до трансформации, образования опухолевых клеток. Клетки в культуре могут быть представлены разными типами. Такие клетки могут быть использованы для клонирования, т. е. для получения клонов.

Клеточные штаммы обладают специфическими свойствами, которые могут сохраняться на протяжении длительного культивирования. Переход клеток к неопределенно длительному росту в культуре, как правило, связан с формированием анеуплоидного кариотипа. Другие штаммы клеток, например культура клеток HeLa, получены из опухолевых тканей, и их трансформация произошла *in vivo*.

Кроме того, первичные клетки культуры могут приобрести способность к быстрому росту не за счет трансформации, а за счет перекрестного заражения другими трансформированными клетками, которые могут вытеснить клетки первичной культуры. Такая способность «взаимозагрязнений» разными типами клеток требует соблюдения жестких условий асептики при ведении культур.

Необходимо учитывать, что питательная среда для культивирования является источником питательных веществ для клеток, и ее состав в процессе культивирования может достаточно быстро изменяться. Растущие в культуре клетки постоянно выделяют в среду продукты метаболизма, некоторые из которых являются необходимыми компонентами для регуляции роста клеток.

Метаболические процессы могут быть условно разделены на реакции первичного и вторичного обмена (первичные и вторичные метаболиты).

К реакциям первичного обмена относят синтез и расщепление нуклеиновых кислот, белков и их предшественников, а также большинства углеводов, липидов, некоторых карбоновых кислот. К реакциям вторичного обмена относят такие реакции, которые сопровождаются образованием алкалоидов, антибиотиков, трипировых кислот, гиббереллинов, пигментов. Не все типы клеток образуют вторичные метаболиты.

Необходимо отметить, что деление реакций на первичные и вторичные достаточно условно, так как трудно определить существенность или не существенность того или иного метаболита для клеток в данный момент.

В понятие интермедиаты или прометаболиты включают простые сахара, аминокислоты, азотистые основания и др. В 1939 г. В.Н.Шапошников сформулировал положение согласно которому каждый продуцент в своем развитии проходит две фазы, которые были названы Ж.Д.Бу' Локком (1961) трофофазой (от греческого *trofe* – питание) и идиофазой (от греческого *idios* – свой, специфический).

Первичная культура клеток – это популяция клеток, выделенная из той или иной ткани, органа или природной среды и переведенная в новые для нее условия роста.

Клоны – это потомство одной клетки или организма, имеющие полное генетическое сходство с родительской клеткой или организмом. Клоны могут быть получены только лишь при вегетативном размножении.

Анеуплоидия – гетероплоидия, явление, при котором клетки организма содержат измененное число хромосом, кратное гаплоидному набору.

Первичный обмен – метаболизм нуклеиновых кислот, белков, части липидов и углеводов, т. е. жизнеобеспечивающих компонентов.

Вторичный обмен, как правило, метаболизм запасящих веществ (углеводов, липидов, алкалоидов и др.), деление на первичный и вторичный обмен относительно.

В период трофофазы осуществляется интенсивный синтез первичных и некоторых вторичных метаболитов, в это время происходит интенсивный рост культуры и низкая скорость образования экзогенных вторичных метаболитов. В период идиофазы снижается скорость роста культуры и осуществляется интенсивное образование вторичных метаболитов.

Время прохождения трофофазы и наступления идиофазы различно для разных культур и его можно регулировать путем внесения в среду культивирования различных предшественников метаболита или антиметаболитов. Антиметаболиты имеют структурное сходство с метаболитами.

Биология клетки в культуре

Рост клеток в культуре

Биотехнология культур клеток основана: 1 – на способности выделенных из организма клеток расти и размножаться вне организма (*in vitro*); 2 – на возможности изменять функциональные свойства клеток в культуре благодаря изменению условий культивирования или их частичной генетической модификации. Однако разработка клеточных технологий, направленных на получение ценных продуктов – метаболитов клеток, сталкивается с рядом трудностей, обусловленных особенностями поведения клеток в культуре. Наиболее важные из них связаны с тем, что в культуре очень трудно сохранить специализированные свойства клеток, так как после перевода их в новые условия (*in vitro*) они быстро адаптируются и могут изменять свои свойства. Кроме того, в культуре клетки подвержены дегенерации (перерождению) и трансформации. Некоторые специалисты считают, что это связано со старением архитектуры клетки.

Основные свойства всех живых систем – способность размножаться, видоизменяться и реагировать на раздражение. Функционально клетка представляет собой набор органелл, обеспечивающих обмен веществом и энергией с внешней средой ограниченной плазматической мембраной.

Рост клетки – это увеличение ее биомассы. Рост биомассы может быть обеспечен за счет увеличения средней массы клеток (гипертрофия) или числа клеток (гиперплазия). Так как гипертрофия в норме находится под жестким контролем, то в понятие «рост» большей частью вкладывают увеличение числа клеток в культуре.

Пролиферация клеток является одним из фундаментальных свойств клетки. Процесс размножения клеток состоит из совокупности последовательных, связанных между собой событий. Последовательный ряд совокупности молекулярных событий между митотическими делениями клеток называют клеточным циклом. По различию синтетических процессов, происходящих в клеточном цикле, его делят на 4 основные фазы. Легче всего идентифицируются фаза митоза (M), во время которой осуществляется деление клетки и так называемая синтетическая фаза (S), во время

Возможное деление периода роста клетки на трофофазу и идиофазу, свидетельствует о взаимосвязи ряда метаболических реакций и, напротив, временной несовместимости других типов метаболических действий. Ярким примером тому является принцип временной организации метаболизма. Так, например для G1-периода характерен синтез специфических белков, которые не синтезируются в S-периоде клеточного цикла. Наряду с этим, в процессе жизнедеятельности может иметь место и синтез таких универсальных соединений, которые образуются на всех этапах жизненного цикла (синтез АТФ и др.).

Трофофаза – фаза питания или фаза роста культуры.

Идиофаза – фаза дифференцировки, т. е. специфического синтеза веществ.

Дегенерация – упрощение или редукция структуры органов и тканей в процессе онтогенеза организмов.

Пролиферация – разрастание ткани животного или растения путем новообразования (деления) клеток.

которой происходит удвоение ДНК. Между ними разделяют две фазы – (G_1) и (G_2), во время которых осуществляется подготовка к прохождению S-фазы (G_1) и митоза (G_2). Характеристика интенсивности синтеза ДНК, РНК и белков во время клеточного цикла представлена на рис. 126.

Существует точка зрения, согласно которой клетки осуществляют пролиферацию до тех пор, пока не будет получен сигнал, останавливающий рост (отсутствие питательных веществ, появление в среде специфических ингибиторов роста, ограничение пространства). Однако клетка может остановить движение по циклу только в G_1 -периоде, в том случае, если появление фактора, ингибирующего деление клетки, «застанет» клетку в S или G_2 , то такая клетка перейдет к митозу. Для удобства, то состояние, когда клетки, находясь в G_1 -фазе, перестают проходить по клеточному циклу, называют G_0 -фазой «покоя». Клетки из G_0 -фазы могут осуществлять движение по циклу при устранении фактора, ингибирующего деление. Для объяснения перехода клеток из G_0 в цикл было введено понятие о точке «переключения» (R) в G_1 -фазе. «Переключение» может осуществляться специфическими высоколабильными белками.

Существует гипотеза, согласно которой в трансформированных клетках отсутствует G_0 -период, что и обеспечивает им непрерывный рост.

Согласно альтернативной гипотезе (непрерывной модели) регуляция движения клеток по циклу осуществляется способностью клетки проходить S-период, т.е. синтезировать ДНК. Инициатор синтеза ДНК в клетке образуется непрерывно, однако он включает синтез только после достижения порогового уровня. Если синтез инициатора снижается и его концентрация остается ниже пороговой, то клетки не вступают в S-фазу (рис. 126).

Тот факт, что для размножения клетка должна пройти ряд последовательных молекулярных событий указывает на то, что она может находиться в различных функциональных состояниях и обладать разной чувствительностью к действию факторов среды (лекарственные препараты, факторы роста, и др.) Исходя из этого, становится ясным почему клетки столь гетерогенны и для получения однотипных по свойствам (гомогенных) клеток необходимо осуществлять их синхронизацию. В синхронной культуре все клетки одновременно проходят стадии клеточного цикла. Это особенно важно при использовании клеток в биотехнологических процессах, а также при оценке действия медицинских препаратов.

Механизмы, регулирующие пролиферацию клеток

Деление клеток обеспечивает поддержание постоянного отношения между массой или объемом цитоплазмы, а малые размеры клеток обеспечивают незначительную площадь поверхности по отношению к объему. Вероятно, само отношение объема к поверхности клетки выполняет регуляторную роль в делении клетки.

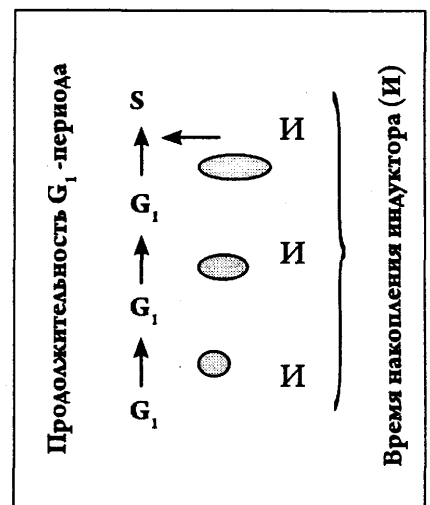


Рис. 126. Согласно одной из гипотез продолжительность G_1 -периода определяется временем накопления до определенной концентрации индуктор (И) синтеза ДНК, после достижения которой включается синтез ДНК, т.е. наступает S-период.

Клетки прокариот имеют в диаметре около 1 мкм, а средний диаметр эукариотической клетки составляет 25 мкм. По образному сравнению Де Дюва в одну клетку эукариот можно плотно упаковать до 10000 бактерий. В свою очередь, в одной клетке бактерии может уместиться тысяча вирусов.

Механизмы этого контроля пока остаются неясными. На пролиферацию клеток оказывает влияние и изменение конфигурации (формы) клеток. Так, особенность распластывания клеток на поверхности субстрата влияет на интенсивность их деления. Остановка размножения клеток после формирования монослоя получила название контактного торможения.

Вместе с тем контактное торможение как фактор регуляции пролиферации характерен не для всех типов клеток, в частности для клеток растущих в суспензии, для трансформированных клеток. Существует точка зрения, согласно которой при трансформации утрачивается чувствительность к контактному торможению и ограничению роста клеток.

Контроль регуляции пролиферации может быть представлен как серия последовательных событий, включающих: 1 – влияние различных внеклеточных агентов на рецепторы клеточной мембраны; 2 – перенос информации от поверхности мембраны с помощью различных цитоплазматических переносчиков и 3 – действие сигнальных молекул на клеточное ядро и инициацию репликации.

Вероятнее всего регуляция пролиферации является результатом интеграции многих факторов, влияющих на клетку. Однако закономерности интеграции этих факторов остаются малоисследованными.

Гораздо лучше изучена роль факторов роста в регуляции клеточного деления.

Использование дифференцированных клеток в культуре, направленное на получение специализированных продуктов сопряжено с тремя проблемами: 1 – генетической нестабильностью дифференцированных клеток в культуре; 2 – вариабельностью фенотипической экспрессии и 3 – старением клеток в культуре.

Остановившись кратко на этих особенностях клеток в культуре необходимо отметить, что специализация клеток (дифференцировка) приводит к формированию индивидуальных тканей с конкретными функциями. Специализированные клетки различаются набором активных (транскрибируемых) генов, что и приводит к формированию различных фенотипов. Перевод дифференцированных клеток в культуру довольно часто сопровождается увеличением хромосомной вариабельности (нестабильности), приводящей к увеличению генетической гетерогенности. Изменение генетической активности в процессе культивирования клеток приводит к проявлению новых свойств клеток, а это может привести к изменению специализированных свойств клеток.

Под термином «трансформация» понимают изменение ростовых свойств культивируемых клеток, что может являться одной из адаптивных особенностей клеток, переведенных в условия, неблагоприятные для культивирования. Трансформация – процесс необратимый и, вероятно, он включает изменение той части генома, которая контролирует неопластический фенотип. Трансформированные клетки введенные в организм животных могут образовывать опухоли.

Контактное торможение – остановка пролиферации в результате формирования монослоя, занимающего все пространство культурального сосуда.

Генетическая нестабильность, т.е. изменение нуклеотидной последовательности ДНК клетки в процессе культивирования, которое может быть вызвано изменением естественных условий жизнедеятельности этих клеток.

Трансформация – изменения генома, приводящие к неконтролируемому клеточному росту.

На этом основании часто трансформацию приравнивают к злокачественным изменениям, что неверно. Появление раковых клеток *in vivo* отличается от трансформации клеток *in vitro*.

Трансформация клеток в культуре связана, прежде всего, с изменением транспорта питательных веществ через плазматическую мембрану клетки, а это, в свою очередь, ведет к нечувствительности или независимости клеток от факторов роста и неспособности прикрепления к субстрату.

У трансформированных клеток преобладает целый ряд свойств, которые не характерны для дифференцированных клеток. Некоторые из этих свойств могут иметь значение для биотехнологических процессов.

И еще одно свойство клетки в культуре – это старение клетки. Примером старения клеток в культуре является линия диплоидных клеток человека (WJ38). Hayflick L. в 1965 г. показал, что для этих клеток характерен феномен старения, и эта культура имеет ограниченное время жизни. Эта работа стимулировала исследования старения на клеточном уровне, что, в конечном итоге, и привело к формированию нового направления – цитогеронтологии.

Механизмы клеточной гибели пока остаются не раскрытыми, а существующие гипотезы, с помощью которых пытаются объяснить это явление, могут быть объединены в две группы: стохастические и генетические. К генетическим относят механизмы, обеспечивающие реализацию программы гибели. Такой механизм назван апоптозом. К стохастическим механизмам гибели клетки относят механизмы, которые индуцированы случайными факторами и чаще всего проявляются через некроз.

Клетки с ограниченной продолжительностью жизни в культуре не являются идеальным объектом в производстве и в этом отношении трансформированные клетки, не имеющие ограничений в продолжительности жизни, характеризующиеся более высокими скоростями роста и способностью расти в суспензионной культуре, могут иметь преимущества в биотехнологии.

Однако в настоящее время существует запрет на использование трансформированных клеток для получения лекарственных препаратов.

Дальнейшее изучение биологии клетки в культуре и в частности требование к среде культивирования позволит реализовать огромный потенциал культур клеток в биотехнологии.

Характеристика сред для культивирования клеток животных

Сбалансированные солевые растворы

Среда для культивирования клеток должна обеспечить необходимые условия поддержания структуры и функциональной активности клеток. Учитывая то, что в процессе жизнедеятельности клетки непрерывно изменяют состав среды, она должна обладать

Цитогеронтология – наука, которая исследует механизм старения клеток в культуре и в составе организма.

Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.*, 37, 614-636.

Апоптоз – запрограммированная гибель клетки, которая индуцирована разрушением структуры ДНК.

Некроз – гибель в живом организме отдельных клеток или органов, их частей, которая обусловлена деградацией мембран клеток.

Бессывороточные среды – среды, не содержащие в своем составе сыворотку. В большинстве ростовых сред вносится до 10 % сыворотки, что обеспечивает среду факторами роста. Для обеспечения роста в бессывороточные среды вносят очищенные факторы роста.

достаточной буферной емкостью, чтобы устранить процесс ингибирования роста клеток. При составлении питательных сред необходимо решать две трудно совместимые задачи.

Во-первых, необходимо максимально воспроизвести состав природного окружения клетки, т.е. систему *in vivo*. Однако полный состав природных сред клеток еще до конца не расшифрован и он достаточно динамичен, а, следовательно, состав природных сред (тканевые экстракты) не может быть стандартизирован. Многие специалисты видят решение этого вопроса в разработке так называемых бессывороточных сред.

Во-вторых, для интенсивного роста клеток необходимо контролировать условия и состав компонентов среды, который постоянно меняется, т.е. он высокодинамичен. Моделировать эти процессы в полном соответствии с живой системой сегодня практически невозможно. Поэтому при решении этих задач выбирают компромиссные решения.

Питательные среды для выращивания клеток должны удовлетворять двум основным требованиям: 1 – поддерживать физико-химические условия существования клеток: осмолярность, концентрацию ионов водорода, необходимый ионный состав и буферную емкость; 2 – обеспечивать клетки питательными веществами, необходимыми для синтеза органических веществ (биомассы и продуктов жизнедеятельности).

В зависимости от меры удовлетворения этим требованиям питательные среды могут быть разделены на сбалансированные солевые среды и ростовые среды.

Практически все сбалансированные солевые растворы являются производными физиологического раствора, который был разработан Рингером в 1895 г. В состав раствора Рингера входят три катиона – кальций, натрий и калий в таких пропорциях, в каких они находятся в морской воде или крови высших животных. Первым сбалансированным солевым раствором, предназначенным для клеток млекопитающих, был раствор Тироде.

В настоящее время наиболее широко используются среды Эрла [Earle W., 1934], Хенкса [Hanks I., 1948] и Дульбекко и Фогта [Dulbecco R., Fogt M., 1964]. Солевой фосфатный буфер Дульбекко и Фогта используется для промывания клеток и как основа для раствора трипсина. Состав некоторых солевых растворов представлен в таблице 19. Поддержание значений pH в диапазоне 7,2-7,5 обеспечивается системой бикарбонат/CO₂. При концентрации CO₂ в воздухе до 5% обеспечивается величина pH среды до 7,4. При этом среда Эрла окрашивается в томатный цвет (что позволяет осуществлять визуальный контроль величины pH) благодаря присутствию в ней фенолфталеина. При подщелачивании среды ее цвет меняется на красный, а при подкислении – она становится желтой. Так как в процессе жизнедеятельности клетки вырабатывают кислоты, то среда может подкисляться. В настоящее время для обеспечения буферной емкости вместо бикарбоната используют буфер *Hepes*.

Tyrode	M.V.	Archs.	Int.
Pharmacodyn. Ther., 1910, 22, 205.			

Вещество	Раствор	
	Рингера	Эрла
Феноловый красный	-	0,02
NaCl	9,00	6,80
KCl	0,42	0,40
CaCl ₂ (безводный)	0,25	0,20
MnSO ₄ · 7H ₂ O	-	0,20
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	-	0,14
Глюкоза	-	1,00
NaHCO ₃	-	2,20

Табл. 19. Состав растворов Рингера и Эрла, которые используются в качестве сбалансированных солевых растворов (г/л).

В таком случае отпадает необходимость поддерживать 5 %-ную концентрацию CO_2 в газовой фазе культуры. Однако бикарбонат используют при клонировании клеток, в связи с чем используется смесь буфера *Нерес* и бикарбоната, а клетки растут при 2 % концентрации CO_2 в воздухе. Кроме буфера *Нерес*, в средах для клеточных культур используются и другие цвиттер-ионы.

Ростовые среды

Основной состав ростовых сред

В основе выбора питательных сред лежат такие особенности как: 1) потребность данного типа клеток в питательных веществах; 2) известный химический состав среды, что может обеспечить стабильность культивирования; 3) стоимость среды; 4) необходимость учета опыта культивирования клеток на выбранной среде.

Полная оптимизация состава питательных сред достаточно сложная задача и должна решаться отдельно для конкретного типа клеток. Это связано с тем, что потребность в компонентах питания для различных типов клеток различна. Так как использование клеток млекопитающих в промышленных технологиях возрастает, все большее значение придается фундаментальным исследованиям количественных аспектов культивирования клеток.

Для получения данных о количественных параметрах ростовых сред необходимо знать влияние концентрации питательных веществ на скорость роста клеток и их урожайность на единицу массы использованного питательного вещества. Показано, что скорость использования глюкозы варьирует с изменением величины рН и зависит от стадии роста клеток и типа клеток, точнее, их генотипа (табл. 20).

Как видно из данных, представленных в таблице 20, урожайность разных типов клеток может различаться в десятки раз, что отражает различия типов клеток и условий культивирования.

Культивируемые клетки требуют большое количество таких аминокислот как цистин и глутамин. Такая высокая потребность в глутамине обусловлена его низкой стабильностью в средах для культивирования. Он может распадаться до пирамидона, карбоновой кислоты и аммиака. На урожайность клеток влияют такие факторы как скорость роста, плотность клеток, концентрация сыворотки, содержание витаминов в среде и др.

Важную роль в урожайности (выходе биомассы) культур клеток играют неорганические ионы. Вероятно, для каждого типа клеток существуют пороговые значения концентрации ионов. Так, Бирг Дж. и Пирт С. (1971) показали, что для максимальной скорости роста клеток в культуре требуется 0,53 мМ калия, 0,2 мМ магния, 0,6-1,4 мкм железа, 0,6 мкмоль цинка и 30 нмоль селена.

На скорость использования различных компонентов среды влияет целый ряд факторов, которые в конечном счете и определяют урожайность культуры (рис. 127).

Традиционным источником углерода в средах является глюкоза, которую вносят в концентрациях 5-20 мМ. Необходимо

Нерес – это сокращенное название 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан-сульфоновой кислоты (м.м. 238,3)

$$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{N}-$$

$$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SO}_3$$

Тип клеток	Накопление биомассы, г
LS	0,76
HeLa	0,29
BHK21	0,28
Bri-8	0,16
VY-38	0,07
MRC-5	0,09

Табл. 20. Накопление биомассы разных типов клеток за единицу времени в расчете на 1 г используемой глюкозы.



Рис. 127. Факторы, влияющие на способность клеток в культуре усваивать питательные вещества и накапливать биомассу.

Стрелка → указывает на то, что этот фактор влияет на скорость накопления биомассы клеток, а ↔ означает, что этот фактор динамично изменяется в процессе культивирования.

учитывать, что применение глюкозы в больших концентрациях может ингибировать рост культуры. Это связано с тем, что быстрое превращение глюкозы в лактат может приводить к снижению рН среды (закисление), что сопровождается ингибированием роста культуры. Для устранения этого эффекта и поддержания рН на необходимом уровне автоматически контролируется величина рН и в случае необходимости добавляется щелочной раствор.

Другим основным источником энергии в большинстве сред является глутамин, который вносится в концентрациях 0,7-5 мМ. Так, например, в культуре диплоидных фибробластов человека при культивировании в обычной среде с сывороткой около 30 % потребности клеток в энергии обеспечивается глутамином.

Еще одним подходом в устранении избыточного накопления лактата в среде является использование фруктозы или галактозы вместо глюкозы. Кратко рассмотрим характеристики основных компонентов питательных сред.

Аминокислоты

Для культивируемых клеток животных незаменимыми считаются 13 аминокислот, которые включаются в состав ростовых сред. В некоторых случаях существует специфическая потребность в аминокислотах, например серине для лимфобластных линий клеток. Глутамин вносится в состав среды в 10 раз больше других аминокислот, это связано с тем, что он играет важную роль в энергетическом обмене и синтезе нуклеиновых кислот.

Витамины

Лучше всего изучено влияние на рост клеток в культуре водорастворимых витаминов группы В. Для многих клеток в культуре необходим биотин, фолиевая кислота, никотинамид, пантотеновая кислота, пиридоксин, рибофлавин и тиамин. Водорастворимые витамины выполняют функцию коферментов.

Потребность клеток в таких водорастворимых витаминах: аскорбиновой кислоте, р-аминобензойной кислоте, кобаламине изучена в меньшей степени.

В меньшей степени изучено и влияние жирорастворимых витаминов на культуру клеток. Пожалуй лучше других изучено влияние витамина А и Е (α -токоферола), которые входят в состав среды 199.

Основные неорганические ионы

Урожай клеток зависит от соотношения различных ионов (особенно ионов натрия и калия) в питательной среде. Кроме этих ионов для роста культуры необходимы: кальций, магний, фосфор, сера, бикарбонат и хлорид.

Микроэлементы

Считается, что для клеток животных жизненно необходимыми являются такие элементы как: Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn, Se, Cr, Ni, V, As, Si, Sn, которые обеспечивают регуляцию метаболизма клетки.

Предшественники нуклеиновых кислот

Хотя клетки в системе *in vitro* способны синтезировать пурины и пиримидины, внесение предшественников нуклеиновых кислот,

Незаменимые аминокислоты – это те аминокислоты, которые не способны синтезироваться в клетке и должны поступать в организм с пищей.

Некоторые незаменимые аминокислоты

Валин;
Лейцин;
Изолейцин;
Метионин;
Треонин;
Лизин;
Фенилаланин;
Триптофан.

Витамины группы В

B_1 – тиамин
 B_2 – рибофлавин
 B_3 – пантотеновая кислота
 B_6 – пиридоксин
 B_{12} – кобаламин.

таких как оротовая кислота, аланин, цитидин, тимидин и гипоксантин в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} М увеличивает урожайность клеточных культур.

Липиды

Источником липидов в ростовых средах является сыворотка, которая содержит неэстерифицированные жирные кислоты, холестерин, триацилглицериды и фосфолипиды. Такие комплексные среды как F12 и 199 содержат линолевую кислоту и холестерин соответственно. Существуют указания, что липиды являются группой низкомолекулярных соединений очень важных для роста клеток в культуре.

Кроме источника энергии, липиды являются компонентами клеточных мембран и предшественниками синтеза простагландинов. К незаменимым относятся такие жирные кислоты как олеиновая ($18:1n=9$), линолевая ($18:2n=6$) линоленовая ($18:3n=3$) и арахидоновая ($20:4n=6$), а также холестерин и фосфолипиды. В ростовые среды их вводят в виде липосом. В состав липосом включают такой антиоксидант как витамин У, что предотвращает окисление липидов. Клетки млекопитающих могут использовать этаноламин для синтеза фосфотидилэтаноламина. Для роста гибридных клеток этаноламин является обязательным компонентом среды.

Газовый состав ростовых сред

Наличие кислорода в среде культивирования является одним из факторов, обеспечивающих рост культуры. При культивировании клеток в малых объемах потребность клеток в кислороде может быть обеспечена за счет обдувания поверхности среды воздухом или же смесью 95 % воздуха и 5 % углекислого газа.

Проблема обеспечения клеток кислородом возникает при крупномасштабных объектах культивирования. Это связано с тем, что кислород очень плохо растворим в культуральных средах, а потребность клеток в нем и скорость его использования достаточно высокая. И в таких случаях кислород является лимитирующим фактором роста клеток в реакторе.

Решение проблемы обеспечения культур клеток кислородом осуществляется интенсивной аэрацией среды стерильным воздухом и непрерывным контролем концентрации кислорода в среде.

Важным компонентом газовой смеси является двуокись углерода, которая может служить источником бикарбоната и поддерживать величину рН. Для большинства клеток оптимальная концентрация CO_2 находится в пределах 0,5-2 %.

В процессе культивирования клетки могут инфицироваться различными микроорганизмами (контаминантами). Экономические убытки от контаминации столь значительны, что часто возникает необходимость включения антибиотиков в культуральные среды, что обеспечивает биологическую чистоту культуры. При этом необходимо учитывать, что антибиотики угнетают и рост самой культуры. Поэтому антибиотики подбирают так, чтобы обеспечить ингибирование роста контаминантов с минимальным ингибированием роста культур клеток.

Микроэлементы – химические элементы, содержащиеся в организмах в низких концентрациях и необходимые для нормальной жизнедеятельности.

Незаменимые липиды
Олеиновая кислота;
Линолевая кислота;
Арахидоновая кислота;
Холестерин;
Фосфолипиды.

Липосома – везикула, полученная в системе *in vitro* из фосфолипидов.

В качестве антибактериальных средств используют антибиотики: пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (50 мкг/мл), гентамицин (50 мкг/мл), а в качестве противогрибковых агентов используют амфотерицин В (25 мкг/мл) или нистатин (25 мкг/мл).

Контаминация – смешение, смешение нескольких культур, инфицированность основной культуры сопутствующими культурами.

Наиболее часто применяют такие антибиотики как пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) или гентамицин (50 мкг/мл), которые являются мощными антибактериальными агентами. В качестве противогрибковых агентов используют амфотерицин В (25 мкг/мл) или нистатин (25 мкг/мл).

«Неопределенные» биологически активные добавки к средам для культивирования клеток

Питательные среды не способны обеспечить интенсивный рост клеток в культуре. В таких средах (среда Игла, среда 199, среда Хепла F-10), клеточные культуры способны сохраняться в хорошем состоянии в течение нескольких недель и их свойства остаются неизменными. Такие среды называют поддерживающими средами. Внесение в поддерживающие среды сыворотки крови новорожденных телят или лошадей в концентрациях от 0,5 до 30 % по объему обеспечивает рост культуры клеток млекопитающих в системе *in vitro*. И в таком случае такие среды называют ростовыми. Необходимо отметить, что телячья эмбриональная сыворотка превосходит по ростовым свойствам другие виды сывороток. Установленным фактом является то, что в сыворотке высокое содержание биотина и других факторов роста.

Сыворотку получают либо от эмбрионов, либо от новорожденных телят. Получение сыворотки, ее обработка и стерилизация достаточно сложные задачи, решение которых требует специальной аппаратуры. При получении сыворотки необходимо устранить гемолиз эритроцитов, осуществить ее очистку от вирусов, микоплазм и бактерий. Для этого ее фильтруют через серию фильтров с диаметром пор до 0,1 мкм. Тестируют на отсутствие вирусов и способность обеспечивать рост клеток в культуре. Разные партии сыворотки крови могут существенно различаться по своим ростовым свойствам. Полученную сыворотку хранят при минус 20°С, ежемесячно проверяют ее свойства, она может храниться 6 и более месяцев, повторных циклов замораживания-оттаивания не допускается.

Сыворотка содержит более 1000 различных молекул, и пока еще не установлена связь между биохимическими и биофизическими свойствами сыворотки и ее способностью ускорять рост клеток *in vitro*. Однако целый ряд функций сыворотки в росте клеток уже установлен (табл. 21).

Использование сыворотки в питательных средах создает и целый ряд серьезных проблем (табл. 22). И эти проблемы, по мнению многих специалистов, могут быть решены только путем перехода на так называемые бессывороточные среды или среды с определенным составом.

Бессывороточные среды

Использование бессывороточных сред или сред с заменой наиболее важных для роста клеток компонентов сыворотки позволяет: улучшить воспроизводимость экспериментальных результатов и обеспечить стабильную продуктивность культур; значительно снизить вероятность заражения культуры вирусами или микоплазмами. Использование таких сред позволяет обеспечить относительно простую систему очистки продуктов метаболизма клеток.

Под «неопределенностью» состава, в частности сыворотки, понимают то, что полный состав неизвестен, и он может изменяться, так как состав сыворотки изменяется в зависимости от физиологических особенностей организма.

№	Действие сыворотки
1.	Связывает и нейтрализует токсины.
2.	Инактивирует протеазы среды.
3.	Поставляет гормоны и пептидные факторы роста.
4.	Обеспечивает клетку питательными веществами.
5.	Создает буферную емкость.
6.	Способствует прикреплению клеток к субстрату.
7.	Защищает клетки, растущие в суспензионной культуре.
8.	Является источником транспортных белков, которые переносят низкомолекулярные соединения.

Табл. 21. Роль сыворотки в культивировании клеток *in vitro*.

№	Содержание
1.	Вариабельность состава.
2.	Высокая стоимость.
3.	Источник контаминации (микоплазмами, бактериофагами, вирусами).
4.	Невозможность контроля состава среды.
5.	Затруднения, возникающие при очистке конечного продукта (например, иммуноглобулинов) и др.

Табл. 22. Недостатки, характерные для питательных сред, содержащих сыворотку крови.

Наряду с этими важными преимуществами, бессывороточные среды имеют и недостатки. Прежде всего, необходимо добавление в эти среды гормонов и факторов роста, что делает эти среды такими же дорогими, как и среды с сыворотками. Кроме того, бессывороточные среды могут использоваться лишь для отдельных типов клеток, т.е. пока не являются универсальными.

В настоящее время существуют различные типы бессывороточных сред (табл. 23) и ведутся интенсивные разработки в этом направлении.

Обычно в бессывороточные среды вносят очищенные белки или пептиды, такие как альбумин, трансферрин, инсулин, казеин, фибропектин. Известно, что альбумин (его включают в среды в концентрации до 5 г/л) является универсальной добавкой. Он связывает токсические вещества, избыточное содержание микроэлементов, жирные кислоты и перекись водорода.

Во многие бессывороточные среды II типа включают такие факторы роста как фактор роста фибробластов, фактор роста тромбоцитов. Бесспорно, исследование потребности клеток в факторах, обеспечивающих и регулирующих рост и размножение клеток, позволит не только разработать стандартные и, возможно, универсальные среды для культивирования, но и лучше понять биологию клетки в культуре.

тип	Степень определенности состава	Преимущества	Недостатки
I	Все компоненты полностью определены	Химически стандартна	Применима только для нескольких линий клеток
II	Содержит очищенные белки и гормоны	Для диплоидных линий клеток	Белки могут содержать следовые количества других соединений
III	Частичная определенность сывороток заменена другими неопределенного состава добавками	Низкая цена и можно автоматизировать	Нет точных данных о составе

Табл. 23. Некоторые характеристики типов бессывороточных сред.

Получение и культивирование первичных культур клеток

Культивирование клеток в виде монослоя

Штаммы и линии клеток могут быть получены от различных фирм – поставщиков, или из коллекции клеточных культур.

Маточные культуры хранятся и транспортируются в жидком азоте и в твердой углекислоте, при температуре сухого льда. Поскольку клетки при температуре сухого льда обладают низкой жизнеспособностью, то сразу после их получения необходимо начать их культивирование или перезаморозить их в жидком азоте. В таком виде их можно хранить сколько угодно долго. Транспортировать клетки можно и в виде монослоя. Сосуды при этом должны быть просто закупорены.

Наряду со стационарными линиями клеток (HeLa,) в культивировании используются и первичные культуры клеток.

Первичными клеточными культурами называют клетки, полученные от животного, и которые поддерживаются в культуре до начала субкультивирования.

В качестве примера рассмотрим способ получения фибробластов кожи.

Монослой клеток формируется в том случае, если клетки прикрепляются к подложке и для этих клеток характерно контактное торможение, т.е. остановка роста при контакте клеток со стенками культурального сосуда.

Выбрать участок кожи и обработать его стерилизующими агентами (70 % этанола). Вырезать стерильный участок 1 мм² и перенести его в стерильную чашку Петри. Добавить в чашку Петри несколько капель полной ростовой среды (например, минимальная среда Дульбекко) с 10 % эмбриональной сывороткой теленка и разрезать стерильным скальпелем кусочек на 5-10 маленьких кусочков.

Инкубировать кусочки при 37 °С в течение ночи. После этого осторожно, чтобы не сместить фрагменты, добавить в чашку 3 мл полной среды и продолжать инкубацию. Рост фибробластов из фрагментов кожи может происходить в течение недели.

Легко получают первичную культуру макрофагов мыши. Для этого стерилизуют кожу брюшной стенки 70 % этиловым спиртом. После этого удаляют кожу с брюшной стенки. Инъецируют в брюшную полость 2,5 мл ростовой среды с 10 % сывороткой теленка и 10-ю единицами гепарина. Затем массируют брюшную стенку для отделения макрофагов в суспензию.

Отсасывают брюшную жидкость стерильной иглой и переносят суспензию в стерильную чашку Петри, считают количество клеток и распределяют их по чашкам так, чтобы в чашке было 10⁶ клеток. В течение 30 мин макрофаги прикрепляются к чашке, а сопутствующие лимфоциты и фибробласты могут быть легко удалены сменой среды.

В настоящее время, кроме первичной культуры макрофагов получены и стационарные линии макрофагов.

Клетки способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и формировать монослой клеток. Такой тип культивирования называют монослоем. При достижении монослоем границ культурального сосуда рост клеток может прекращаться. Это явление получило название контактного торможения, так как при полном заполнении поверхности дальнейший рост клеток тормозится.

Культивирование клеток в виде монослоя имеет ряд преимуществ перед суспензионным культивированием, т.е. культивированием клеток в виде суспензии, которое обеспечивается непрерывным перемешиванием суспензии клеток.

Культивирование клеток в монослое позволяет: легко менять культуральную среду, так как клетки прикреплены к поверхности; получать высокий уровень экспрессии клеточных продуктов, так как у клеток прикрепленных к субстрату эффективнее экспрессируются клеточные продукты; обеспечить максимальную гибкость исследований, поскольку может использоваться для любого типа клеток.

Наряду с этим, монослойная культура имеет и недостатки по сравнению с суспензионными культурами: возникают трудности при увеличении масштаба культивирования; требуют больших пространств; трудно определять динамику роста клеток; трудно обеспечивать гомогенность клеток.

Механизм прикрепления клеток к поверхности (стекло или пластик) может обеспечиваться электростатическими взаимодействиями. Важным фактором в этом случае является суммарный

Макрофаги – клетки мезенхимного происхождения, встречающиеся у животных, способны к активному захвату (фагоцитоз) и перевариванию (разрушению) бактерий, остатков разрушенных клеток и других чужеродных веществ. К макрофагам относят моноциты, гистиоциты и др.

Моно – один, единый, единственный, монослой – один слой клеток, который растет на поверхности сосуда или специальной подложке.

отрицательный заряд. Для увеличения эффекта взаимодействия, в частности органических поверхностей, проводят химическую обработку (окисляющими агентами, кислотами) или физические воздействия (электрический разряд, облучение ультрафиолетом, бомбардировка электронами высоких энергий).

Поверхность культурального сосуда может быть покрыта веществом, которое облегчает прикрепление клеток. Чаще всего для этого используется коллаген и полиаминокислоты.

Клетки могут расти на мелких сферических носителях. В таком случае они могут рассматриваться как клеточные суспензии и для их выращивания могут применяться процессы и аппараты, разработанные для суспензионных культур. Такое культивирование используется в промышленности для получения вакцин и интерферона в ферментерах объемом до 1000 л. При этом культивировании используются первичные культуры клеток.

К сожалению, успешное выращивание клеток человека получается только в ферментерах лабораторного типа (объем реакторов до 20 л).

Хотя большое количество клеток животных вообще не выживают в суспензионных культурах, для сохранения жизнеспособности им необходимо образование межклеточных контактов (например, культуры клеток человека WJ-88, MRC-5), суспензионные культуры более технологичны и их используют для наращивания клеточной массы.

Суспензионные культуры

Клетки крови лучше растут в суспензионной культуре по сравнению с монослойными культурами. Для перевода клеток в суспензионную культуру используют различные способы адаптации к их росту в суспензии.

Одним из способов получения суспензионной культуры является селекция или система отбора. Способ основан на том, что в среде клеток, растущих в монослое, существуют клетки способные к росту в суспензии, их отбирают и в процессе длительной селекции получают клетки, способные расти в суспензии. Так были получены суспензионные культуры LS из L-929 и HeLa-S3 из HeLa.

Другим подходом к получению суспензионных культур является адаптация клеток к росту в суспензии. Для этого культуры интенсивно пересаживают и культивируют в суспензии, отбирают клетки, которые адаптированы к росту в суспензии. Однако всегда существует вероятность возврата клеток к росту в монослое.

Области применения культур клеток животных

Продукты, получаемые из клеток животных

Как объекты биотехнологии клетки бактерий обладают целым рядом преимуществ по сравнению с клетками эукариот:

Суспензионная культура – культура клеток, которая растет в виде суспензии. Для этого культуральная среда непрерывно перемешивается или аэрируется, что обеспечивает ровное распределение клеток в среде. Это необходимо для поддержания газо- и массообмена.

Продукт – от слова произведенный, вещественный или нематериальный (информационный) результат деятельности человека или биологических систем. Продукт можно рассматривать как следствие или результат превращений.

1 – культура бактериальных клеток имеет высокую производительность биомассы на единицу объема системы и на единицу объема капитальных затрат, их продуктивность в 40 раз выше клеток эукариот; 2 – культура бактериальных клеток менее требовательна к среде и условиям культивирования по сравнению с культурой клеток животных, и проще осуществлять контроль над процессами культивирования; 3 – с помощью культуры бактериальных клеток можно получать белки, синтезирующиеся и в клетках животных, используя технологию рекомбинантных ДНК.

Несмотря на эти преимущества, клетки бактерий не всегда могут быть использованы в качестве продуцентов белков животного происхождения. Это связано с тем, что:

1 – белки, синтезирующиеся в клетках бактерий не подвергаются необходимым для белков животных посттрансляционным модификациям и, следовательно, такие белки нуждаются в соответствующих посттрансляционных модификациях (гликозилировании, амидировании, карбоксилировании, фосфорилировании);

2 – как правило, белки, синтезирующиеся в клетках бактерий или дрожжей, не секретируются в окружающую среду и поэтому для выделения этих белков необходимо разрушать клетки, использовать сложные методы выделения этих белков и обеспечивать стерильность условий выделения;

3 – так как экспрессированные белки для клеток микроорганизмов являются «инородными», то они могут подвергаться протеазной атаке, а продукты гидролиза могут оказаться эндотоксинами.

Учитывая все эти особенности, целый ряд белковых продуктов целесообразно получать в культуре клеток животных.

Биомасса культур клеток богата различными биологически активными веществами, и она может быть использована для получения целевого получения продуктов. Наиболее часто получаемые продукты из клеток животных представлены в таблице 24.

Получение вирусных вакцин

Культура клеток может быть использована для размножения вирусов и получения вакцин. Первая вакцина, приготовленная на основе культур клеток, была получена в 1954 г. против полиомиелита Солка. Для этой цели использовались первичные культуры клеток почки обезьяны. Позже, когда была выделена линия клеток WJ-38 (диплоидные клетки человека) она начала использоваться для получения вакцин.

Необходимо отметить, что для обеспечения рентабельного производства вакцин с использованием культур клеток животных необходимо иметь высокоэффективные крупномасштабные системы культивирования клеток.

В настоящее время в культуре клеток получают различные вакцины для людей (табл. 25) и для сельскохозяйственных животных (табл. 26), и ведутся интенсивные разработки новых вакцин на основе использования технологии рекомбинантных ДНК.

Вирусные вакцины	Для людей и животных
Антитела	Моноклональные антитела
Интерфероны	Фибробластные и лимфобластоидные
Ферменты	Фибринолитические
Цельные клетки	Клетки и органеллы
Инсектициды	Вирусы насекомых
Иммунорегуляторы	Интерлейкины
Гормоны	Инсулин
Факторы роста	Выделенный из тромбоцитов фактор роста, эпидермальный фактор роста, нервный фактор роста

Табл. 24. Продукты, получаемые из культивируемых клеток животных.

Вакцинация – введение в организм антигена с тем, чтобы индуцировать в нем выработку антител к возможному инфекционному агенту.

Важнейшие вакцины	Вакцины ограниченного применения
Полиомиелита (Солк)	Против вируса герпес симплекс
Полиомиелита (Сабин)	Против цитомегаловируса
Противокоревая	Против вируса варицелла-зостер
Против свинки	Против респираторного синцитиального вируса
Против бешенства	Против аденовирусов
Против краснухи	Против клещевых энцефалитов
Против желтой лихорадки	
Противогриппозная	

Табл. 25. Вакцины для людей, которые получают в культуре клеток животных.

Получение антител в культуре клеток

Антитела представляют собой сложные белковые молекулы (иммуноглобулины), синтезирующиеся в клетках животных и их нельзя синтезировать химическим путем или в клетках бактерий. Их можно получать в больших количествах из сыворотки иммунизированных животных. Однако они содержат смеси молекул антител в соотношениях сильно варьирующих у разных животных. Так как реактивность таких гормональных антител представляет собой сумму реакций отдельных молекул, то практически нельзя добиться одинакового уровня специфичности между различными препаратами. Эта проблема решена на основе технологии получения моноклональных антител, которая была предложена Келером и Мильштейном.

В результате экспериментов, проведенных этими авторами, была получена клеточная линия, которая способна вырабатывать антитела одного молекулярного состава (моноклональные антитела), что имело основополагающее значение в развитии нового научного направления – иммунобиотехнологии.

Клетки, способные продуцировать моноклональные антитела, получают в результате слияния клеток миеломы и лимфоцита, который вырабатывает один и тот же тип антител. Для промышленного получения моноклональных антител культуры гибридных клеток культивируют в системе *in vitro* в сосудах для культивирования клеток. Технология получения моноклональных антител представлена в главе VII.

Получение инсектицидов в культуре клеток

Инсектициды можно получить из вирусов, которые летальны для насекомых. Вирусы специфически поражают отдельные виды насекомых, при этом не оказывают влияния на жизнедеятельность других видов насекомых. Использование вирусных инсектицидов имеет еще одно преимущество – они не загрязняют окружающую среду по сравнению с химическими веществами. Показано, что около 80 % всех используемых в сельском хозяйстве пестицидов могут быть заменены инсектицидами из бакуловирусов. При этом затраты на их производство почти на 50 % ниже стоимости пестицидов.

В настоящее время существуют два способа получения вирусов насекомых, используемых в качестве инсектицидов, один из них: *in vivo* – разведение насекомых и их инфицирование вирусом с последующей очисткой вирусных частиц. Второй – это производство вирусов в культуре клеток насекомых *in vitro*. Однако этот перспективный способ получения инсектицидов требует еще глубоких исследований, так как продукция вирусов в этих системах пока не очень высокая. Культивирование клеток насекомых было начато в конце 30-х годов XX столетия В.Трагером. В настоящее время получены различные клеточные линии насекомых,

Заболевание	Культура клеток
Ящур	ВНК, почки теленка и поросенка
Болезнь Ньюкасла	Почки поросенка, куриные эмбрионы
Болезнь Марека	Куриные эмбрионы
Чума крупного рогатого скота	Почки
Бешенство	СЕР ВНК
Чума собак	Почки собаки
Гепатит собак	Почки поросенка/хорька
Кошачья панлейкопения	Почки хорька
Кошачья ринопневмония	СЕС
Парагрипп 3	Почки быка
Однодневная бычья лихорадка	ВНК
Инфекционный бычий ринотрахеит	Почки
Вирусная диаррея КРС	Почки эмбриона
Дихорадка долины Рифт	
Тейлериоз	Бычьи лимфобласты
Африканская болезнь лошадей	Почки обезьян
Энцефалиты лошадей	СЕС
Классическая чума свиней	Почки
Ринопневмонии лошадей	Почки поросенка
Псевдобешенство (болезнь Ауэски)	Почки поросенка
Болезнь Тешена	СЕР
Синий язык	Почки овцы
Оспа овец	ВНК
Вертячка	Почки
Контагиозные пустулезные дерматиты	Почки кошки
Болезнь Вессельброна	Почки ягнят
Оспа птиц	СЕР
Инфекционный бурсит	СЕС
Чума уток	СЕР
Энтерит норки	Почки норки
Ларинготрахеиты	СЕС
Инфекционные гастроэнтериты	Почки собаки

Табл. 26. Вакцины для животных, которые получают в культуре клеток.

наилучшие результаты достигнуты на *Diptera* (мухи, комары) и *Lepidoptera* (бабочки).

Для культивирования клеток чаще всего используют среды Дж. Митсухасу и К. Марамороша (среда ММ), Шилда и Санга (среда МЗ) и другие.

Получение интерферонов в культуре клеток животных

Интерферон – это белок, синтезирующийся лейкоцитами в ответ на воздействие специфических чужеродных веществ. Он был открыт в 1957 г. в клетках цыпленка, которые были заражены вирусом гриппа. Однако дальнейшие исследования интерферонов показали, что они могут синтезироваться не только лейкоцитами, но и другими клетками млекопитающих, а в ответ на вирусную инфекцию синтезируется не один, а целое семейство интерферонов. Интерфероны ингибируют размножение вирусов в клетке. Интерфероны β и γ – являются гликопротеидами, а α – протеином.

Интерфероны – видоспецифичные белки, т.е. для каждого вида животного характерен свой интерферон. Однако они не вирусспецифичны, т.е. они подавляют размножение разных вирусов в клетке.

Индукторами интерферонов могут быть инактивированные температурой вирусы, двухнитевые молекулы РНК (например, реовирусная РНК), бактериальные эндотоксины, поликарбоновые кислоты, синтетические полирибонуклеотиды, в частности, поли-Ц, поли-У. Механизм индукции интерферонов до конца еще не изучен.

Интерферон α получают из лейкоцитов крови человека. Лейкоциты выделяют и переносят в культуральную среду и инфицируют их вирусом (Сендай, или вирус Нью-Каслской болезни), инкубируют в течение ночи, после этого лейкоциты осаждают центрифугированием, вирус инактивируют. В супернатанте содержится нативный интерферон. Его лиофильно высушивают и запаивают в стеклянные ампулы.

Интерферон β получают из фибробластов, которые выращивают в монослойной культуре. Индукцию интерферона обеспечивают введением в культуру клеток фрагментов РНК, синтезированных из последовательностей цитозина (поли-Ц) в присутствии циклогексимида и актиномицина Д. Необходимо отметить, что интерфероны продуцируются в малых количествах (около 1 мг на 10 л культуральной жидкости).

В настоящее время выпускаются генно-инженерные интерфероны, т.е. интерфероны, полученные на основе технологии рекомбинантных ДНК.

Получение ферментов из клеток животных

Клетки животных, как и бактериальные клетки, продуцируют несколько тысяч различных ферментов. Большинство из этих

«Лейкоциты» объединяют все белые клетки крови, которые представлены сегментоядерными лейкоцитами (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), макрофагами, лимфоцитами (Т и В) и моноцитами. Все эти клетки являются ядерными клетками крови и обеспечивают специфические и неспецифические иммунные реакции. Необходимо отметить, что сегментоядерные лейкоциты относятся к полинуклеарам, тогда как моноциты относятся к мононуклеарам. Моноциты, макрофаги и их предшественники объединены в систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

Фибробласты – от слов волокно и росток, клетки эпителиальных тканей животных, которые интенсивно делятся и способны продуцировать компоненты соединительной ткани.

Посттрансляционная модификация – это модификация белков, которая осуществляется после завершения синтеза соответствующего белка.

ферментов могут синтезироваться клетками бактерий, полученных на основе технологии рекомбинантных ДНК. Однако ферменты, которые требуют посттрансляционных модификаций предпочтительней производить в культуре клеток животных.

Необходимо отметить, что факторы системы свертывания крови человека, лучше всего получать в культуре клеток животных после генно-инженерных технологий. Это связано с тем, что в настоящее время в связи с проблемой приобретенного иммунодефицита пришлось отказаться от использования донорской крови в качестве сырья для выделения ферментов. Это привело к резкому увеличению числа работ по разработке методов культивирования клеток животных и получению из них ферментов.

Получение гормонов из клеток животных

В конце 70-х годов большое внимание начали уделять производству гормонов из генетически модифицированных клеток бактерий. Белковые гормоны животных достаточно разнообразны, от мелких молекул (20-30 аминокислот), которые могут быть получены химическим синтезом, до достаточно крупных (50-200 аминокислот), причем многие из них являются гликозилированными и их получение лучше осуществлять из клеток животных. К таким гормонам можно отнести эритропоэтин, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон и др. Такие гормоны могут продуцироваться культурами клеток из гипофиза или почки животных.

Другие области применения культур клеток животных

Еще одной интенсивно развивающейся областью использования клеток животных является использование клеток при испытании различных соединений на токсичность, скрининг биологически активных веществ, исследование механизмов действия ксенобиотиков.

В настоящее время для решения этих задач в большей части используют лабораторных животных. Развитие массового культивирования клеток животных позволит перейти на новые технологии решения этих важных задач.

Еще одна область практического использования культур клеток – это, так называемая, клеточная терапия или заместительная терапия. Для этого клетки заключаются в специальные камеры и имплантируются в организм, где они выполняют функцию искусственного органа или железы. Это перспективное направление интенсивно разрабатывается.

Стволовая клетка – это незрелая клетка, способная к самообновлению и развитию в специализированные клетки организма. Миллиарды клеток растущего организма (человека или животного) происходят всего-навсего из одной клетки (зиготы), которая

Гликозилирование – присоединение глюкозы к белковой молекуле.

Seeburg P.H., Shine J., Martial J.A., Ivaric R.D., Morris J., Ulliman J.A., Baxter J.D., and Goodman H.V. Synthesis of growth hormone by bacteria //Nature, 1978, (London) 276, 795-798.

Токсичность – ядовитость, способность некоторых химических веществ оказывать вредное воздействие на живые организмы.

образуется в результате слияния мужской и женской гамет. Эта единственная клетка содержит не только информацию об организме, но и схему ее последовательного развития. В ходе эмбриогенеза оплодотворенная яйцеклетка делится и дает начало клеткам, не имеющим других функций, кроме передачи генетического материала в следующие клеточные поколения. Это эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), геном которых находится в «нулевой точке»; механизмы, определяющие специализацию, еще не включены, из них потенциально могут развиваться любые клетки.

Глава VII

Лимфоидные гибридомы или технология получения моноклональных антител

Основные понятия

Иммунитет (лат. *immunis* свободный от) первоначально расфигурован как невосприимчивость к бактериальным инфекциям. С древних времен было известно, что никто не заболевает чумой дважды – однажды перенесенное заболевание формирует пожизненный иммунитет. В настоящее время иммунология – наука о специфических механизмах организма, обеспечивающих распознавание чужеродных для организма веществ и структур и защиту организма от них, а также элиминацию поврежденных и измененных клеток собственного организма.

Основным признаком иммунной реакции является антигенная специфичность и защита организма от инфекций.

Иммунизация – совокупность мероприятий, направленных на формирование иммунитета, для этого в организм вводят убитые или ослабленные возбудители. Так, с древних времен китайцы вдыхали высушенные и измельченные корочки оспенных больных – этот метод получил название вариоляция.

Первая успешная вакцинация человека против бешенства была проведена 6 июля 1887 г. Луи Пастером. К 1900 г. был создан научный фундамент иммунологии, т. е. был проведен ряд фундаментальных работ. И. И. Мечников открыл явление фагоцитоза и ввел понятие «клеточный иммунитет». Э. Беринг совместно с Ш. Китозато применил пассивную иммунизацию против дифтерии и столбняка. П. Эрлих предложил теорию «боковых цепей», объяснившую образование антител. В 1899 г. Ж. Борде открыл систему комплемента. Клеменс фон Пирке ввел понятие «аллергия». Тизелиус разработал метод электрофореза и в 1938 г. совместно с Кэботом показал, что антитела представляют собой γ -глобулины.

С 1960 г. началась вторая волна интенсивных исследований иммунной системы. Мак-Фарлейн Бернет и Нильс Ерне предложили клонально-селективную теорию образования антител, согласно которой способность индивидуума распознавать антиген связана с определенными иммунологически реактивными лимфоцитами или генетически идентичными линиями лимфоцитов – клонами. Клон – группа генетически идентичных клеток или организмов, которая образовалась путем бесполого размножения из одной клетки.

В 1962 г. Ж. Миллер доказал роль тимуса в иммунном ответе. И, наконец, наиболее важным открытием последних лет следует считать разработку метода получения моноклональных антител, который был предложен Кёлером и Миальштейном в 1975 г.



Мечников Илья Ильич, родился 15.05.1845 в Купянском уезде Харьковской губернии, умер 15.07.1916. В 1864 г. окончил Харьковский университет.

Мечников внес большой вклад в развитие сравнительной и эволюционной эмбриологии. Предложил оригинальную теорию происхождения многоклеточных животных. Разработал теорию фагоцитоза, а в дальнейшем – фагоцитарную теорию иммунитета (Нобелевская премия). Многочисленные работы Мечникова по бактериологии посвящены вопросам эпидемиологии холеры, брюшного тифа, туберкулеза и др. инфекционных заболеваний. Мечников совместно с Э. Ру впервое вызвал экспериментально сифилис у обезьян (1903). Значительное место в его трудах занимали вопросы старения. Он считал, что старость и смерть у человека наступают преждевременно в результате самоотравления организма микробными и иными ядами. Мечников создал первую школу микробиологов, иммунологов и патологов.

Иммунная система является уникальной по своей универсальности: она способна узнавать чужеродные биоорганические субстанции; вырабатывать против них реагенты абсолютной специфичности – антитела. Антитела, образуя комплексы с чужеродными соединениями (антигенами), обеспечивают их инактивацию с последующим выведением их из организма. Система узнавания (антиген-антитело) столь чувствительна, что различие двух белковых молекул в одном аминокислотном остатке будет узнаваться антителами как две разные молекулы. Чувствительность этой реакции обеспечивает выявление 10^{-12} г чужеродных веществ в одном литре биологической среды.

Основные этапы получения моноклональных антител

Характеристика этапов

Традиционная схема иммунизации, которая используется для получения антисыворотки с высоким содержанием антител (АТ) требует использовать для этого антиген (АГ) высокой степени чистоты и в достаточно больших количествах. Довольно часто получить чистый АГ трудно или просто невозможно, а при введении в организм гетерогенной смеси АГ образуются разнообразные АТ. Кроме того, сопутствующие примеси во вводимой смеси (которые всегда присутствуют) могут быть выше по иммуногенности, чем сам АГ, что приведет к тому, что необходимые антитела в полученной сыворотке будут составлять небольшую долю. Кроме того, необходимо учитывать, что АТ формируются не на всю молекулу биополимера (используемого в качестве АГ), а на определенный участок этой молекулы, который называется антигенным детерминантом. Так, у молекулы миоглобина пять детерминантов, у инсулина три и, следовательно, при иммунизации этими белками будут образовываться 5 или 3 АТ, соответственно на все детерминанты. Для того чтобы получить АТ только к необходимому детерминанту, необходимо предварительно выделить соответствующий детерминант и его использовать в качестве АГ, что сопряжено с методическими сложностями. Еще более сложная задача по получению однотипных антител возникает при введении в организм чужеродных клеток или смеси белков. По современным представлениям разнообразие АТ, способных образовываться в организме, оценивается цифрой 10^7 . Это означает, что в организме животного могут образовываться и секретироваться в кровотоке не менее 10 млн. разнообразных белковых молекул (АТ), способных взаимодействовать с соответствующим количеством антигенных детерминантов. Согласно клонально-селекционной теории каждый тип антител синтезируется и секретируется в кровотоке отдельным клоном В-лимфоцитов, т. е. в каждом В-лимфоците синтезируется только один тип антител (рис.128). Или другими словами, популяция лимфоидных клеток клонирована и, если организм способен

Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature, 1975, 256, p. 495 -497.

Иммунная система состоит из трех главных компонентов: клеточного, молекулярного и генетического. Клеточный компонент включает макрофаги, Т- и В-лимфоциты, молекулярный – 5 классов иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD и генетический – гены дифференциации клеточных антигенов и рецепторов.

Антисыворотка – сыворотка крови, содержащая антитела, образовавшиеся на появление антигена в организме.

Антигены – биополимеры различной природы и их комплексы (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты), которые при введении в организм индуцируют (запускают) реакции иммунитета.

Антитела – иммуноглобулины, специфически связывающие антигены.

Имуноглобулины – семейство белков сыворотки крови, которые характеризуются специфическим, сходным строением и способны связывать антигены. Различают 5 классов иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

Макрофаги – крупные, фагоцитирующие клетки, обнаруживаются в разных органах. Принимают участие в регуляции гуморального и клеточного иммунитета.

синтезировать 10^7 типов АТ, то соответственно существуют 10^7 типов клонов В-лимфоцитов.

Следовательно, гетерогенность антител в сыворотке определяется гетерогенным составом клонов В-лимфоцитов, вступающих в реакцию с соответствующим антигенным детерминантом. Исходя из этого следует, что если выделить В-лимфоцит, перевести его в культуру и получить клон, то полученный клон клеток будет продуцировать однотипные моноклональные антитела. Однако проблема в том, что выделенные лимфоциты в культуре не делятся. Заслуга Кёлера и Мильштейна состоит в том, что они разработали технологию, которая позволила осуществлять получение клонов В-лимфоцитов в культуре и продуцировать моноклональные антитела. Авторам удалось достичь этого, используя метод гибридизации соматических клеток, а партнерами этой гибридизации стали В-лимфоциты и клетки миеломы, т. е. трансформированные клетки, а, следовательно, способные к бесконечно длительной пролиферации в культуре, т. е. иммортальные клетки.

Гибридная клетка между специализированной В-клеткой и опухолевой миеломной клеткой, получившая название гибридомы, в условиях культуры способна к пролиферации и продукции моноклональных антител. Это технологическое направление получило название гибридомной технологии и способствовало интенсивному развитию иммунобиотехнологии. Гибридомная технология осуществляется в несколько этапов или стадий:

- 1) иммунизация, направленная на генерацию активированных В-лимфоцитов, использующихся для слияния с миеломными клетками;
- 2) слияние клеточных партнеров В-лимфоцитов и миеломных клеток;
- 3) культивирование гибридомных клеток;
- 4) скрининг клонов, продуцирующих моноклональные антитела;
- 5) продуцирование моноклональных антител гибридомными клонами.

Иммунизация животных

Цель иммунизации – это генерация активированных иммунных В-лимфоцитов, использующихся в слиянии с клетками миеломы. Иммунизация должна быть направлена на генерацию активно делящихся В-лимфоцитов, а не на дифференциацию клеток.

Количество образующихся гибридов между В-лимфоцитами и миеломными клетками зависит от числа свежестимулированных лимфоцитов в селезенке.

Установлено, что на последующую гибридизацию клеток оказывают влияние такие факторы как природа антигена, доза и способ введения антигена. Если антиген представлен мономерными формами, то он обладает слабыми иммуногенными свойствами, в то время как многомерные формы этих же белков являются

В 1959 г. М.Вунет предложил клонально-селективную теорию иммунитета.

Суть этой теории заключается в том, что В-лимфоцит дает начало клону однотипных В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела.

С этого момента иммунология начинает рассматриваться не как раздел инфекционной патологии, а как самостоятельная медико-биологическая дисциплина.

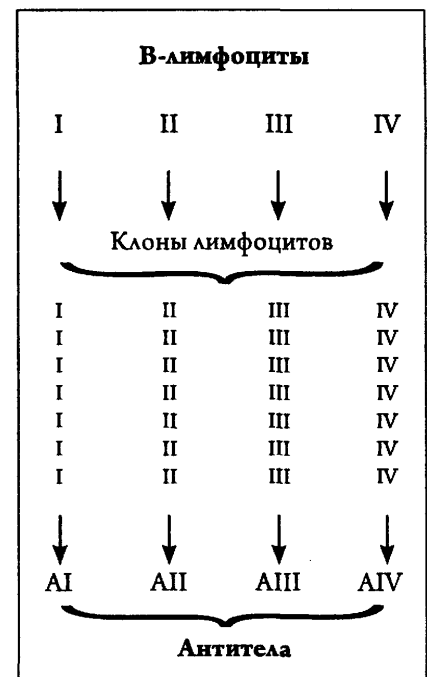


Рис. 128. Схема, демонстрирующая клонально-селективную теорию. Размножение каждого лимфоцита приводит к образованию клона лимфоцитов, продуцирующего моноклональные антитела (AI, AII, AIII, AIV).

Лимфоциты – клетки, которые содержатся в иммунокомпетентных органах: центральных (костный мозг и тимус) и периферических (селезенка, лимфоузлы), а также в крови и лимфе. Они обуславливают реализацию антигензависимых реакций иммунитета.

В-лимфоциты – это та группа лимфоцитов, которая образуется в фабрициевой сумке у птиц или аналогичных у млекопитающих.

высокоиммунными компонентами. Большое значение для успешной иммунизации имеет выбор экспериментальных животных. Наиболее успешно для этой цели используются мыши линии Balb/c или крысы линии LOU. Перед началом иммунизации необходимо контролировать наличие у экспериментальных животных сывороточных антител против данного антигена, что необходимо для оценки иммунного ответа у этих животных.

Способы введения антигена могут быть различными. Наиболее высокие титры антител удается получить при внутривенной инъекции, так как в таком случае в иммунный ответ включается селезенка, содержащая большое количество антителообразующих клеток. При подкожном или внутримышечном введении антигена происходит медленное всасывание, что способствует длительному сохранению антигена в организме и более продолжительной стимуляции лимфоидной ткани. Исходя из этого, часто при иммунизации комбинируют внутривенные и подкожные, или внутримышечные и внутривенные инъекции.

Существуют различные схемы иммунизации, предполагающие инъекции постепенно увеличивающихся доз или повторные циклы иммунизации с соблюдением временных интервалов, продолжительность которых определяется величиной предыдущей дозы.

Слияние клеточных партнеров (гибридизация клеток)

После завершения цикла иммунизации эти животные используются для выделения В-лимфоцитов, которые выделяются из селезенки животных.

Полученные клетки гибридизуют с клетками миеломной опухоли мыши. В результате такой клеточной гибридизации могут образовываться бессмертные лимфобластоидные клетки, секретирующие иммуноглобулины. Так как в культуре клеток могут оставаться не гибридизовавшиеся клетки миеломной опухоли, то гибридная технология предусматривает применение системы метаболической селекции для уничтожения негибридных опухолевых клеток. Метаболическая селекция гибридов основана на том, что нормальные соматические клетки (В-лимфоциты) могут использовать два метаболических пути синтеза нуклеотидов (пуринов и пиримидинов): основной путь и резервный путь. В случае основного пути синтеза *de novo* нуклеотидов они образуются из аминокислот и углеводных предшественников. При резервном пути синтез нуклеотидов осуществляется из гипоксантина (пурины) или из дезокситимидина (пиримидины). Если по каким-либо причинам основной метаболический путь синтеза нуклеотидов блокируется (например, антагонистом фолиевой кислоты аминоптерином), то в нормальных клетках используется резервный путь синтеза нуклеотидов. В таком случае включается в работу фермент гипоксантингуанидинфосфорибозилтрансфераза (Г/ГФРТ) и тимидинкиназа (ТК), что обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути.

Миелома – опухоль костного мозга, состоящая из пролиферирующих плазматических клеток.

Иммунизацию мышей осуществляют введением эмульсии под кожу хвоста (40-50 мкл) или в подушечки задних лап (25 мкл). Спустя 1-4 недели после иммунизации мышей забивают путем цервикальной дислокации, погружают их в 70 % этанол и иссекают лимфатические узлы. Лимфатические узлы помещают в стерильную чашку Петри, содержащую охлажденный физиологический раствор и сбалансированный солевой раствор, и выделяют суспензию клеток.

Другим способом иммунизации является внутривенное введение антигена, которое может осуществляться разными способами. Так, в одном случае кроликам вводят суспензию, содержащую антиген в объеме 0,25 мл ежедневно на протяжении недели, вторую неделю вводят по 0,5 мл суспензии, а на 3-ю неделю – по 1 мл. На 4-й неделе выделяют антителообразующие клетки. Могут использоваться и другие схемы введения антигенов.

Приготовление суспензии клеток селезенки.

Иммунизированных мышей забивают и извлекают селезенку с соблюдением асептических условий и переносят в чашку Петри с 10 мл солевого раствора Эрла (СРЭ). Клетки выдавливают из капсулы шпателем. Клетки суспендируют многократно, набирают и выдавливают их пипеткой. Суспензию переносят в чистую пробирку и оставляют на 5 мин. Суспензию переносят в чистую пробирку и центрифугируют при 170 g 15 мин при 4 °С. Осадок клеток ресуспендируют в чистой среде СРЭ и вновь центрифугируют, после чего осадок ресуспендируют в полной культуральной среде так, чтобы концентрация клеток составляла $2 \cdot 10^8$ в мл.

Клетки миеломы, используемые для гибридизации с В-лимфоцитами, генетически маркированы, у них не синтезируется фермент Г/ГФРТ. Такие клетки способны синтезировать нуклеотиды только по основному метаболическому пути. Если в среду для культивирования внести вещества, блокирующие основной путь синтеза нуклеотидов в клетке, такие как аминоптерин, то на данной среде миеломные клетки, у которых отсутствует фермент (Г/ГФРТ), не способны обеспечить синтез нуклеиновых кислот и будут погибать.

Итак, после гибридизации клеток миеломы и В-лимфоцитов в среде могут присутствовать В-лимфоциты, не образовавшие гибридных клеток, миеломные и клетки гибрида между В-лимфоцитами и миеломными клетками (рис. 129). Задача селекции сводится к отделению гибридом от миеломных клеток. Известно, что так как В-лимфоциты не адаптированы к росту *in vitro*, они достаточно быстро разрушаются, что облегчает процесс селекции. Для решения этой задачи используют селективную среду ГАТ (культуральная среда, содержащая гипоксантин – аминоптерин – тимидин). В такой среде, содержащей аминоптерин, блокируется основной путь синтеза нуклеотидов, а наличие гипоксантина и тимидина обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути. В таких условиях миеломные клетки погибают и остаются функционально активными только гибридомы.

Для селекции гибридных клеток можно использовать и другие методы, в частности воспитание устойчивости, необратимое биохимическое ингибирование, обзор этих методов селекции представлен в работе [Clements G.B.]. Важной характеристикой клеточных линий миеломы является стабильность образующихся гибридом, которая зависит от выбора клеточных линий. В настоящее время для получения гибридом применяют три линии миеломных клеток: миеломы мышей, крыс и человека. Миелома должна быть того же вида, что и подвергаемые иммунизации животные, так как это обеспечивает развитие опухолей у животных во время генерации гибридом в системе *in vivo*.

Большинство моноклональных антител, синтезирующихся гибридомами, относятся к подклассам Ig G и Ig M. Описаны случаи образования антител, относящихся и к Ig A и Ig E.

Спонтанное слияние эукариотических клеток происходит при развитии мыши [Foster C.S.].

В системе *in vitro* слияние соматических клеток может быть индуцировано вирусами, например вирусом Сендай, химическими веществами, в частности полиэтиленгликолем (ПЭГ) или электрическими воздействиями – электрослиянием. Чаще всего для слияния соматических клеток и в частности, при получении лимфоидных гибридом используют ПЭГ. Механизмы индукции слияния клеток ПЭГ окончательно не установлены. Предполагается, что он осуществляет изменение в водной среде, прилегающей к поверхности клеточной мембраны. Для эффективного слияния клеток имеет значение молекулярная масса ПЭГ, концентрация и время обработки. Оптимальной является 50 % концентрация ПЭГ

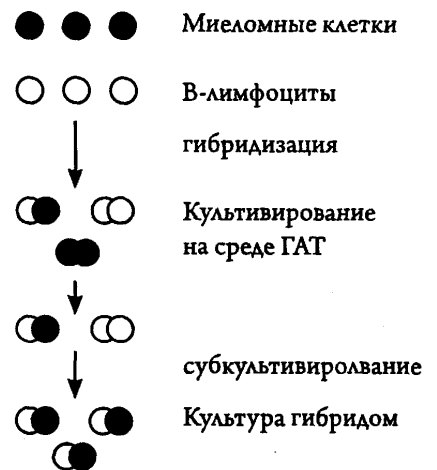


Рис. 129. Схема получения гибридных клеток (гибридом) между миеломными клетками и В-лимфоцитами.

Clements G.B. (1975) Selection of biochemical variant in some cases mutant, mammalian cells in culture //Adv. Cancer Res. Vol. 21.- P. 273-390.

Foster C.S. Lymphocyte hybridomas //Cancer Treat (1982) Vol. 9.-P. 59-84].

Спонтанный – самопроизвольный, процесс который вызван внутренними, чаще всего неизвестными нам причинами.

(масса/объем). Для предоставления необходимых процедур и операций, которые осуществляют при гибридизации клеток приведен пример одной из методик слияния.

1. Иммунизированную мышь убить в атмосфере CO_2 .
2. В стерильных условиях удалить селезенку.
3. Клетки селезенки суспендировать в 10 мл реактива А.
4. Удалить остатки тканей центрифугированием при 500 g 20 сек.
5. Надосадочную жидкость, содержащую клетки наложить на 20 % раствор ЭТС и центрифугировать 10 мин при 400 об/мин.
6. Надосадочную жидкость удалить, а клетки находящиеся в осадке суспендировать в 1 мл растворе NH_4Cl при комнатной температуре.
7. Через 1 мин добавить 9 мл среды В и эту суспензию пропустить через слой 1,5 мл раствора ЭТС центрифугированием 10 мин при 400 об/мин при комнатной температуре.
8. Полученные клетки суспендировать в 10 мл среды А, содержащей $2,5 \times 10^7$ клеток миеломы.
9. Трехкратно промыть суспензию клеток средой А и осадок клеток освободить от реактива А.
10. Осторожно встряхивая пробирку, разрушить конгломераты клеток.
11. Добавить к клеткам в течение 1 мин 1 мл ПЭГ 4000 и ДМСО и легко встряхнуть суспензию.
12. Добавить 1 мл среды А и легко перемешать, встряхивая пробирки.
13. 2 мин держать пробирку в руке при легком перемешивании.
14. Добавить 2 мл среды А при легком перемешивании.
15. Выдержать пробирку в руке 3 мин при легком перемешивании.
16. Добавить 5 мл среды А при легком перемешивании.
17. Выдержать пробирку в руке 2 мин при легком перемешивании.
18. Добавить 5 мл среды В и перемешать содержимое пробирки, переворачивая ее вверх дном и обратно.
19. Отцентрифугировать смесь 8 мин при 400 об/мин.
20. Осадок клеток суспендировать в 200 мл среды В, в которой необходимо суспендировать 2×10^8 свежеприготовленных крысиных тимоцитов.
21. Полученную суспензию распределить на 192 клонирующих чашек Грейнера.
22. Проинкубировать клетки 24 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 10 % CO_2 .
23. В каждую чашку добавить равный объем среды С.
24. Инкубировать чашки 48 ч.
25. Заменить среду культивирования на среду С.
26. Культивировать клетки 2 недели, меняя среду каждые 4 сут. до тех пор, пока не станут визуально выявляться клоны, состоящие примерно из 100 клеток.
27. Провести скрининг надосадочной культуральной жидкости на наличие необходимых антител.
28. Перенести необходимые (положительные) клоны в сосуды для культивирования.
29. Часть положительных клонов заморозить для длительного хранения.

Электрослияние применяется при слиянии различных типов клеток, в т. ч. и лимфоцитов. При этом клетки обрабатываются переменным электрическим полем низкой интенсивности и подвергаются «диэлектрофорезу». В таком случае в клетках генерируются диполи и силы притяжения между ними ориентируют клетки. Такие ориентированные клетки подвергаются короткому воздействию электрического импульса высокого напряжения, которое приводит к образованию «разрывов» (пор) в плазматической

Тимоциты – в данном случае выполняют роль так называемых питающих клеток или клеток «нянек». Они экскретируют в среду разнообразные факторы роста, что способствует адаптации и делению клеток в культуре.

Замораживание и оттаивание гибридомных клеток

1. Суспендировать 10^5 - 10^6 клеток в 1 мл среды В, содержащей 7,5 % ДМСО при 0°C в ампуле, в которой будет осуществляться замораживание.
2. Выдержать клетки 20 мин при 0°C .
3. Поместить ампулу в программирующее замораживающее устройство и охладить образцы до 70°C .
4. Погрузить ампулы в жидкий азот в сосуде Дьюара.
5. Для оттаивания поместить ампулы в водяную баню с температурой 37°C . Когда образцы оттаят, перенести клетки в пробирки емкостью 10 мл, находящиеся на ледяной бане.
6. Добавить по каплям в течение 3 минут при осторожном перемешивании 10 мл охлажденной на льду среды В.
7. Клетки осаждают центрифугированием 10 мин при 400 об/мин при 4°C и ресуспендируют их в свежей среде В.

мембране клетки. В результате таких изменений мембран соседние клетки сливаются.

По сравнению с другими методами слияния электрические воздействия высокоэффективны (до 100 % сливающихся клеток), с высоким процентом жизнеспособных клеток.

В 1980 г. была предложена методика слияния клеток на основе биологического эффекта слияния клеток [Bankert R.B., Des Soge D., Powers L.]. С клетками миеломы связывается антиген к полисахаридам и такие клетки инкубируются с клетками селезенки предварительно иммунизированных мышей. Такая способность селективно присоединять клетки миеломы к антигенреактивным лимфоцитам обеспечивается размещением антигена между двумя клетками в качестве связывающего лиганда.

Культивирование гибридных клеток

Для получения клона из одной гибридной клетки используют метод ограничивающих разведений. Клетки сразу после слияния переносятся в чашки для клонирования в жидкой среде. Так как одиночная клетка в культуре практически не растет, то для усиления ее деления используют два подхода: 1 – концентрированные питательные среды и 2 – так называемые питательные клетки. Предполагается, что питающие клетки оказывают неспецифическое и ростстимулирующее влияние на гибридомы. В качестве питающих клеток чаще всего используют мышинные или крысинные тимоциты, перитонеальные макрофаги или не слившиеся клетки селезенки. Наличие макрофагов в культуральной среде может обеспечивать поддержание стерильных культур, так как макрофаги инактивируют микроорганизмы.

Одной из главных проблем при культивировании гибридов является контаминация культур микоплазмами, так как они селективно потребляют предшественники нуклеиновых кислот и хорошо растут на средах для культивирования гибридов. Если установлено, что гибридная культура контаминирована, то необходимо срочно ее ликвидировать.

Существуют различные методы выявления микоплазм в культуре клеток, которые сводятся к 1) прямому культивированию; 2) ферментным пробам; 3) морфологическим исследованиям; 4) цитологическому и флюоресцирующему прокрашиванию.

Сразу после слияния клеток их культивируют на среде ГАТ. Для наращивания клеток гибридом используют различные питательные среды, такие как среда Дульбекко, модифицированная среда Игла (ДМЕМ), которая имеет повышенное содержание глюкозы (4,5 г/л) среды RPMI 1640 и NCTC 109. С целью ускорения роста клеток в культуры вносят дополнительные компоненты. В среду для начального культивирования вносят инактивированную (30 мин при 56 °C) очищенную сыворотку плода телянка.

Клетки культивируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5-10 % CO₂.

Bankert R. B., Des Soge D., Powers L. Antigen-promoted cell fusion: Antigen-coated myeloma cells fuse with antigen-reactive spleen cells (1980) Transplant. Proc., 12, 443-446.

Среда ГАТ – это питательная среда, в которую входят гипоксантин, аминоптерин (инактивирует синтез нуклеотидов по основному пути синтеза из аминокислот и углеводов), тимидин (обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути синтеза нуклеотидов).

Радиоиммунологические методы – методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело с радиоактивной меткой.

Скрининг клонов, продуцирующих моноклональные антитела

Отбор позитивных клонов (клоны, продуцирующие необходимые моноклональные антитела) желательно осуществлять на самых ранних этапах культивирования. Методы скрининга должны отвечать следующим требованиям: быть быстрыми, чувствительными и надежными. Клоны, продуцирующие моноклональные антитела, на начальных этапах гибридомной технологии обнаруживают, используя препарат антимишного Ig или белка А. Этот белок селективно связывается со всеми мышинными IgG.

Надосадочную жидкость, полученную из отдельных клонов, используют для выявления специфических антител. Методики выявления могут быть различными, классические тесты, такие как иммунопреципитация в геле или агглютинация, не всегда могут быть использованы, так как моноклональные антитела реагируют лишь с одной антигенной детерминантой. Часто для решения указанной задачи используют энзимосвязанные иммуносорбенты и радиоиммунологические методы.

Продуцирование моноклональных антител гибридными клонами

После того как позитивные клоны подвергнуты субклонированию, по меньшей мере, дважды заморожены в жидком азоте и стабилизированы, их можно наращивать в больших количествах. Наращивание клеточных культур можно осуществлять: 1 – в клеточных культурах (система *in vitro*), или 2 – путем инокуляции гибридом в брюшную полость размножающихся мышей (система *in vivo*).

Однако, если в системе *in vivo* в асцитной жидкости брюшной полости обнаруживается несколько миллиграммов антител на мл, то в суспензионной культуре гибридом образуется около 0,1 мг/мл.

Кроме того, антитела, получаемые в культуре клеток, не содержат посторонних глобулинов, которые могут присутствовать в случае получения в системе *in vivo*.

Для получения моноклональных антител в системе *in vivo* требуется иммунодепрессантная обработка животных. Для этого животных за 24 ч до трансплантации опухоли облучают X-лучами (500 рад) или же вводят им циклофосфамид (0,5 мг на мышшь) или противотимоцитный глобулин.

Асцитную жидкость из брюшка животного можно собирать в течение 1-3 недель.

До убоя животных можно осуществлять несколько последовательных пункций.

Клетки, содержащиеся в асцитной жидкости, удаляют центрифугированием, в надосадочной жидкости содержатся моноклональные антитела. Антитела осаждают сульфатом аммония с последующим диализом.

Иммунодепрессанты – вещества или факторы (облучение), подавляющие иммунный ответ организма на чужеродные соединения и, как следствие, устраняющие иммунное отторжение.

Ферментер – аппарат для ферментации, т.е. обеспечения протекания ферментативных реакций или выращивания клеток бактерий, растений или животных.

Моноклональные антитела – антитела, полученные (синтезированные) одним клоном В-лимфоцитов и однотипные по структуре.

При крупномасштабном производстве моноклональных антител используют системы ферментеров. Использование бесывороточных и даже безбелковых сред культивирования позволяет получать моноклональные антитела в терапевтических и диагностических целях. Одним из существенных недостатков обычных антисывороток (поликлональных антител) является их нестандартность. От одного животного нельзя получить такое количество антисыворотки, которое можно было бы длительно использовать. Приходится использовать для этого большое количество животных. Разные же животные в силу индивидуальных различий вырабатывают к одному и тому же антигену различные по специфичности и гетерогенности антитела, что делает невозможным получение стабильных результатов при использовании моноклональных антител. Гибридомы продуцируют неограниченное количество моноклональных антител с абсолютно стандартными свойствами, так как их свойства не изменяются в процессе культивирования. Моноклональные антитела являются высокочувствительными реагентами, способными узнавать специфические антигены. Примером может служить определение содержания инсулина в растворе. Свиной и бычий инсулины различаются между собой тем, что у инсулина быка в восьмом положении находится аланин, а у инсулина свиньи – треонин. Эти различия могут быть установлены только после определения аминокислотных последовательностей этих инсулинов. Для проведения такого анализа необходимо наличие инсулинов в достаточных количествах с высокой степенью чистоты. Используя же моноклональные антитела к инсулину свиньи или быка можно идентифицировать эти вещества и определить их количество в концентрации до 10^{-12} г/л, и такой анализ занимает несколько часов. Причем для этого нет необходимости очищать инсулин, он может находиться в составе многокомпонентной смеси, например, в сыворотке крови. Как высокочувствительные реагенты моноклональные антитела находят широкое применение в диагностике, научных исследованиях, профилактике и даже лечении болезней. Большая потребность в моноклональных антителах привела к формированию и интенсивному развитию новой отрасли биотехнологии – иммунобиотехнологии.

Профилактика – совокупность мероприятий, которые направлены на охрану здоровья, предупреждение возникновения и распространения болезней человека.

Области применения моноклональных антител

Использование в диагностике

Диагностика патологий является определяющим этапом в борьбе с болезнями.

В настоящее время можно выделить несколько направлений использования моноклональных антител в диагностике (рис. 130).

Известно, что поверхность клетки может быть представлена как мозаика, составленная из десятков и сотен антигенных структур. Для раковых клеток выявлены специфические, т. е. характерные

Использование моноклональных антител в диагностике

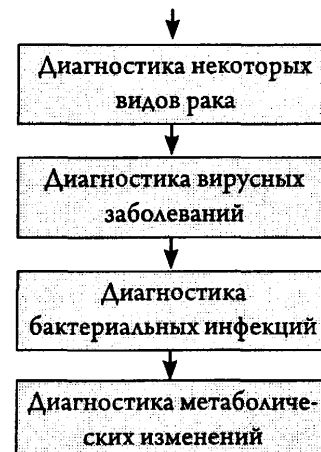


Рис. 130. Схема использования моноклональных антител в диагностике.

только для них антигены. Одним из таких антигенов трансформированных клеток оказался полисахарид ганглиозид, содержащий лакто-N-фукопентозу. Более того, при аденокарциноме у больных этот антиген появляется в сыворотке крови. Используя моноклональные антитела к этому антигену и определяя его в сыворотке крови, можно диагностировать эту патологию. Так, в сыворотке 163 из 255 обследованных больных аденокарциномой прямой кишки выявили этот антиген. У 45 из 49 больных аденокарциномой поджелудочной железы в сыворотке крови выявлен этот антиген с помощью моноклональных антител. Моноклональные антитела могут использоваться в диагностике вирусных заболеваний. Так, вирус гриппа, содержащий одноцепочечную РНК, содержит 7 структурных белков, а в инфицированной клетке продуцируются еще 2 неструктурных вирусных белка. При инфицировании этим вирусом в организме образуется гетерогенная и полиспецифическая иммунная сыворотка, исследовать которую достаточно трудно. В этом отношении использование моноклональных антител к антигенам вируса является ценным инструментом не только в диагностике, но и при исследовании фундаментальных задач вирусологии. Вирус бешенства инфицирует всех теплокровных животных, в том числе и человека. Это строго нейротропный вирус и он никогда не определяется в крови инфицированных животных. В группу вирусов бешенства собак входят 3 группы рабовирусов. Антигенные взаимоотношения между вирусами бешенства и родственными им вирусами остаются неясными. Используя моноклональные антитела, удается отличить вирусы бешенства от родственных им вирусов. Используя антитела к нуклеокапсидам, удается идентифицировать вирусы, вызывающие бешенство у человека и животных. Несмотря на успехи, достигнутые за последние годы в интенсивной терапии детей раннего возраста и введения в практику антимикробных средств широкого спектра действия, генерализованные бактериальные инфекции остаются самыми частыми причинами заболеваемости и смертности в период новорожденности. Среди инфицированных новорожденных 1/3-1/2 умирает, у 1/3 развивается менингит [Antony, Okada, 1977], а у половины детей с инфекционными заболеваниями центральной нервной системы позднее развиваются неврологические нарушения. Первое место среди патогенных микроорганизмов, выявляемых у инфицированных детей раннего возраста, занимают стрептококки группы В. Наиболее перспективным в этом отношении является использование диагностических тестов на основе моноклональных антител. Получение моноклональных антител человека позволит их использовать не только в диагностике, которую проводят *in vitro*, но возможно и в терапевтических целях.

Использование моноклональных антител в медицине

Как известно, антигенные свойства плазматических мембран изменяются в процессе опухолевого роста (табл. 27). В настоящее время получены моноклональные антитела к специфическим

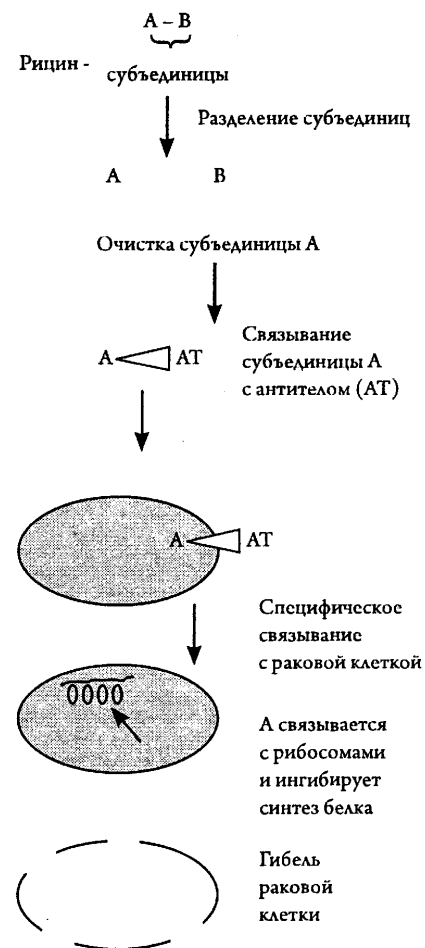


Рис. 131. Схема, демонстрирующая как моноклональные антитела специфически доставляют ингибитор синтеза белка А в раковые клетки и приводят их к гибели, не оказывая влияния на нормальные клетки.

антигенам раковых клеток, что позволяет не только выявить локализацию таких клеток, но и осуществлять лечение, особенно метастазирующих опухолей, в форме иммунотоксинов. Иммунотоксинами называют комплексы моноклональных антител с ядами белковой природы такие как дифтерийный токсин, рицин, абрин. В настоящее время чаще всего используется рицин – белок, выделенный из семян клещевины. Этот белок состоит из двух субъединиц А и В, соединенных дисульфидной связью. Субъединица В способна специфически взаимодействовать с гликопротеидами плазматической мембраны клетки. При таком взаимодействии субъединица А попадает в клетку, отщепляясь от субъединицы В и взаимодействует с 60S-субчастицей рибосомы, что приводит к необратимому ингибированию синтеза белка. Субъединицу А отделяют от субъединицы В в системе *in vitro* и соединяют ее со специфическими к раковым клеткам моноклональными антителами. Такой комплекс специфически узнают рецепторы раковых клеток и связываются с ним, при этом субъединица А рицина проникает в раковую клетку и необратимо ингибирует в ней синтез белка, что сопровождается гибелью раковой клетки. Следовательно, моноклональные антитела выполняют функцию направленного транспорта токсинов в раковые клетки (рис. 131).

Использование моноклональных антител в научных исследованиях

Использование моноклональных антител (моноАТ) в научных исследованиях безгранично. Приведем небольшое количество примеров. Гибридома, являющаяся результатом слияния В-лимфоцита и раковой клетки является уникальным объектом в исследовании биологии клеток в культуре и процессов их дифференцировки. Дело в том, что гибридизация этих двух типов клеток сопровождается остановкой дальнейшей дифференцировки В-лимфоцита на той стадии, на которой клетка находилась перед гибридизацией. Это позволяет, проводя гибридизацию лимфоцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки, расчленить процесс дифференцировки клеток на отдельные этапы. Эффект остановки дифференцировки присущ, по-видимому, не только гибриdomам лимфоидного происхождения, но и любым гибриdomам между опухолевыми клетками, адаптированными к росту в культуре, и нормальными клетками того же тканевого происхождения, например, между опухолевыми и нормальными клетками печени и т. д. Разгадка самого явления остановки дифференцировки является уникальной моделью в изучении процессов регуляции этого общебиологического явления. Моноклональные антитела являются уникальной моделью в изучении биологии рецепции. Исследование природы рецепторов с помощью антител не является новым, и такие работы проводились и до создания моноАТ. Однако достаточно часто исследователи сталкивались с тем, что о природе рецептора нет никаких сведений. В таких случаях можно получить моноАТ

1. Мутация или заражение онкогенным вирусом.
2. Изменение временной схемы реализации генетической информации (экспрессия фетальных антигенов на поверхности клеток взрослой особи).
3. Модификация структурных компонентов плазматической мембраны в результате гликозилирования, действия протеаз или межмолекулярных взаимодействий.

Табл. 27. Причины, вызывающие изменения специфических антигенов на плазматической мембране раковых клеток.

Поликлональные антитела – смесь антител, образующихся (синтезируемых) различными клонами В-лимфоцитов и способные узнавать и взаимодействовать с различными антигенами или разными детерминантами одного антигена.

Детерминантная группа – участок в молекуле антигена, который может распознаваться одним типом антител, одна большая молекула полимера может состоять из нескольких детерминантных групп и, следовательно, может связываться с разными антителами.

к неизвестному рецептору. Обходной путь в решении этого сводится к следующему. На первом этапе получают моноАТ к лиганду, который способен связываться с искомым рецептором. На втором этапе получают моноАТ (вторые моноАТ) к антигенсвязывающей области первых моноАТ. Эти вторые моноАТ и будут антителами к неизвестному рецептору. По такой же схеме были получены антитела к β -адренергическому рецептору. С помощью моноАТ можно изучать и функцию рецепторов. В ряде случаев моноАТ обладают «мимикрирующим» действием, т. е. они способны запускать те же реакции в клетке, что и лиганд, связывающейся с рецептором. Так, моноАТ к инсулиновому рецептору стимулируют в клетках реакцию окисления ^{14}C -глюкозы до CO_2 . Вместе с тем, существуют и такие моноАТ, которые, связываясь с рецептором, не изменяют его функции. Сравнительное изучение таких моноАТ позволяет изучить механизмы регуляции функциональной активности рецепторов.

Глава VIII

Технологии рекомбинантных ДНК бактериальных клеток

Основные понятия

Генетическую инженерию можно определить как конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур или рекомбинантных ДНК. Создание искусственных генетических программ в настоящее время сводится к получению рекомбинантных ДНК и это научное направление корректно называть, по мнению А.Сассона, технологией рекомбинантных ДНК, а не генетической инженерией.

Рекомбинантные ДНК – это ДНК, образованные в результате объединения нескольких фрагментов ДНК *in vitro*, выделенных из разных источников с последующим их введением в клетку. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и могут обеспечить ему проявление новых свойств.

Основным объектом манипуляции в технологии рекомбинантных ДНК являются гены или фрагменты ДНК, кодирующие определенные белки. Гены получают одним из трех способов: непосредственно из природной ДНК, путем копирования мРНК, или химическим синтезом.

Инструментом в технологии рекомбинантных ДНК являются ферменты и, прежде всего, рестриктирующие эндонуклеазы, лигазы, ДНК-полимераза, РНК-зависимая ДНК-полимераза. Используемые в технологии рекомбинантных ДНК ферменты не обладают видовой специфичностью и позволяют конструировать фрагменты ДНК любого происхождения и тем самым преодолевать видовые генетические барьеры и осуществлять неограниченные межвидовые генетические переносы. Однако при репликации и транскрипции рекомбинантных ДНК *in vivo* возникают некоторые ограничения, которые могут быть преодолены за счет свойств и особенностей используемых векторных молекул ДНК. Ген, используемый для переноса в реципиентную клетку, в большинстве случаев не имеет сигнальных последовательностей, управляющих его действием в клетке. Наиболее удобной системой для переноса гена и контроля его активности в клетке является включение его в состав вектора.

Чаще всего в качестве вектора используют циклическую молекулу ДНК, содержащую сигнальные последовательности репликации и транскрипции. Векторные молекулы ДНК способны самостоятельно существовать в клетке. Они содержат селективные генетические признаки, чаще всего определяют устойчивость к антибиотикам и относительно легко могут быть введены в реципиентную клетку.

Ген – последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, определяющая аминокислотную последовательность полипептидной цепи цепи или молекулы РНК. В состав гена наряду с кодирующими последовательностями (экзонами) могут входить и не кодирующие последовательности (интроны).

Вектор – кольцевая молекула ДНК, которая сконструирована с целью переноса фрагментов ДНК в реципиентную клетку. Вектор способен к саморепликации.

Репликация – самовоспроизведение молекулы ДНК.

Транскрипция – процесс синтеза РНК ферментом РНК-полимеразой на молекуле ДНК, которая выполняет функцию матрицы.

С момента введения рекомбинантных ДНК в клетку (трансформация) начинается молекулярное клонирование, т. е. получение потомков рекомбинантной ДНК. Трансформированные клетки культивируются в селективных условиях, что позволяет получить генетически однотипные клетки – гомогенный штамм. Из этого штамма в зависимости от целей можно выделить клонированный ген или его продукт – белок, синтезированный на этом гене.

Одиночные клетки, несущие рекомбинантные ДНК, называют трансформированными клетками, а многоклеточные организмы (растительные и животные) – трансгенными организмами. Трансформированные клетки и трансгенные организмы могут быть использованы в исследованиях фундаментальных механизмов функционирования генетических систем и в практике для получения организмов с полезными для человека свойствами. В частности для синтеза белков, гормонов и ферментов, используемых в медицинской практике, синтеза микроорганизмами пищевого или кормового белка, утилизации микроорганизмами токсичных для окружающей среды веществ и др.

С развитием технологии рекомбинантных ДНК, начали говорить об очередной биологической революции. Как отмечал академик А. А. Баев, технологическая реконструкция ДНК является лишь уточненной технологией манипуляции генами и не содержит нового взгляда на процессы наследственности, а потому причисление ее к событиям революционного ранга вызывает раздумье. Технология рекомбинантных ДНК, или генная инженерия не только не потребовала проведения ревизии установленных представлений молекулярной генетики, но, наоборот, полностью подтвердила установленные положения. Однако интенсивное развитие технологии рекомбинантных ДНК позволило открыть ряд новых явлений. К таким открытиям следует отнести мозаичное (интрон-экзонное) строение эукариотических генов и особенности их функционирования.

Технология рекомбинантных ДНК позволила глубже понять природу подвижных элементов генома: транспозонов бактерий и мобильных диспергированных генов у эукариот. Обнаруженное явление непостоянства генома, вероятно, имеет прямое отношение к молекулярным механизмам развития и эволюции. Необходимо отметить, что проблемы развития, морфогенеза, старения и эволюции остаются центральными и наиболее неясными проблемами биологии.

Следовательно, технология рекомбинантных ДНК основана на общепринятых положениях молекулярной генетики, однако это направление открыло новые подходы к исследованию механизмов наследования, которые могут привести к новым представлениям о наследственности.

Как только возникло это научное направление, сразу начались активные обсуждения потенциальной опасности работ с рекомбинантными ДНК. Это имело свои последствия, которые выразились в принятии специальных правил работы с ДНК в лабораторных условиях.

Трансгенный организм – организм, в который с помощью методов генной инженерии внесен чужеродный генетический материал.

Транспозоны – подвижные фрагменты ДНК, которые перемещаются с участием комплекса белков благодаря активности ферментов, способности точно вырезать элементы из хромосом для того, чтобы затем встроить их в какое-то другое место генома хозяина.

Однако 30-летний опыт привел к потере остроты вопроса о потенциальной опасности исследований в этой области. Многие специалисты считают, что случайное превращение рекомбинантных ДНК в патологическую форму объектов, несущих эти молекулы, невозможно. В настоящее время в большинстве развитых стран разрабатываются новые подходы в технологии рекомбинантных ДНК, издаются десятки специализированных научных журналов, регулярно проводятся симпозиумы и научные конгрессы, посвященные этой интенсивно развивающейся области молекулярной биологии и биотехнологии. И действительно, заключение сделанное на X Международном симпозиуме фирмы «Майле» в 1977 г. о том, что молекулярная биология находится на пути к превращению в технологию полностью подтвердилось.

Хотя методические подходы в технологии рекомбинантных ДНК постоянно расширяются и их многообразие увеличивается, получение рекомбинантных ДНК можно представить из следующих этапов (рис. 132): 1 – получение индивидуальных генов или фрагментов ДНК; 2 – конструирование вектора или встраивание выделенного гена в состав вектора; 3 – перенос вектора в реципиентную клетку; 4 – клонирование, т. е. получение клонов клеток или молекулярное клонирование, т. е. умножение генов; 5 – регуляция экспрессии трансгена. В дальнейшем рассмотрим каждый из этих этапов.

Этапы становления технологии рекомбинантных ДНК

Невозможно установить ту первую, единственную работу, с которой можно начать отсчет технологии рекомбинантных ДНК. Это определяется тем, что методология этого научного подхода была создана в 40-50-е годы XX века, благодаря интенсивным исследованиям в области генетики, биохимии, микробиологии и других биологических наук. И, тем не менее, можно выделить ряд работ, имевших самое прямое отношение к формированию технологии рекомбинантных ДНК.

Модель репликации и понятие репликаона, предложенные Жакобом, Бреннером и Куэно позволили объяснить, почему перенесенные в клетку при трансформации или трансдукции фрагменты ДНК неспособны самостоятельно реплицироваться, если они не включены в хромосому и не попадают под ее контроль. Клонирование выделенных генов может быть осуществлено только в том случае, если они включены или входят в состав молекул, имеющих аппарат репликации и транскрипции. Такие молекулы были названы векторами.

В 1953 г. Bertani G., Weigle J.J. открыли эффект рестрикции и модификации, а Arber W., Linn S. – объяснили эффект рестрикции. Эти работы обосновали методический подход выделения генов или фрагментов ДНК из генома, используя ферменты рестрикции.

В 1969 г. [Schapiro Y., Machattic L., Eron L. et al.] опубликована работа по выделению лактозных генов *E.coli*.

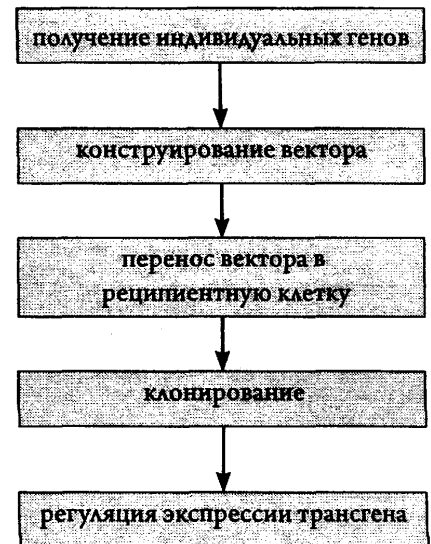


Рис. 132. Основные этапы получения рекомбинантных ДНК.

Репликаон – единица репликации. Эукариотическая ДНК имеет полирепликационную организацию.

Не останавливаясь на большом количестве работ, повлиявших на формирование технологии рекомбинантных ДНК, отметим, что получение таких молекул можно условно разбить на три этапа.

На первом этапе была доказана возможность получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Были получены гибриды между разными плазмидами; плазмидами и фагами, т. е. обоснован принцип конструирования векторов:

- 1 – показана возможность создания рекомбинантных молекул с использованием исходных молекул ДНК из различных видов и штаммов бактерий;
- 2 – их жизнеспособность;
- 3 – стабильность и функциональная активность таких молекул.

На втором этапе показана возможность получения рекомбинантных ДНК между генами прокариот и плазмидами.

Третий этап связан с началом работ по включению в векторные молекулы ДНК генов эукариот и, прежде всего, животных.

Первые эксперименты по созданию технологии рекомбинантных ДНК, давшие положительные результаты, были выполнены в Стенфордском университете исследователями Р. Берг, С.Н. Коэн, Н.В. Бойер с сотрудниками. В 1973 г. была опубликована работа [Cohen S.N. et al.], в которой авторы описали конструирование биологически активных гибридных плазмид, полученных обработкой плазмид рSC 101 и рSC 102 рестриктазой *EcoRI* с последующей сшивкой и получением новой плазмиды рSC 106. Эта группа исследователей получила и гибридную плазмиду на основе плазмид рSC 101 из *E.coli* и рJ 258 из *Staphylococcus aureus*. Гибридные плазмиды рSC 112 и рSC 113 реплицировались в клетках *E. coli* и экспрессировали генетическую информацию обеих родительских плазмид.

Проведенные работы показали: во-первых, что гибридные плазмиды, полученные *in vitro* между молекулами ДНК разных видов способны реплицироваться и экспрессироваться в клетке реципиента, во-вторых, плазмидные репликаны, формирующие устойчивость к антибиотикам бактериальных клеток, могут использоваться в качестве векторов и, в-третьих, была предложена методическая схема конструирования векторов.

В это же время в лаборатории Р.Берг была выполнена работа по созданию вектора на основе вируса SV40. Обезьяний вирус SV40 содержит кольцевую ДНК, которая встраивается в геном различных животных клеток и стабильно наследуется. Цель работы сводилась к встраиванию в молекулу ДНК вируса фрагментов ДНК фага лямбда и галактозного оперона *E.coli*. Однако гибридные молекулы ДНК были неактивны.

В 1975 г. была опубликована работа, выполненная в лаборатории ВНИИ генетики по получению гибридных плазмид между Col E1 и плазмидой R6K [Алиханян С.И. и др.].

Важным этапом в становлении новой технологии рекомбинантных ДНК были исследования, направленные на получение

Bertani G., Weigle J.J. Host controlled variation in bacterial viruses // J. Bacteriol., 1953, 65, 113-121.

Arber W., Linn S. DNA modification and restriction // Annu. Rev. Biochem. 1969.- 38.-p. 467-500.

Schapiro Y., Machattic L., Eron L. et al. Isolation of pure lac operon DNA // Nature.-1969.-224.-p.768-774.

Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B. Construction of biological functional bacterial plasmids *in vitro* // PNAS.-1973, 70, p. 3240-3244.

Jackson D.A., Symons R.H., Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *E.coli* // PNAS.-1972.-69.-p. 2904-2909.

Плазмида – кольцевая молекула ДНК бактериальной клетки, способная к автономной репликации.

Оперон – функциональная единица генома. Она состоит из гена-регулятора (дающего команду структурным генам), гена-оператора (воспринимает команду регулятора и передает структуру генам, которые кодируют синтез полипептидной цепи.

необходимых фрагментов ДНК. В 1975 г. две группы исследователей [Cameron J.R., Panasenko S.M., Lehman J.R., Davis P.W. и Clarke L., Carbon J.] разделяли смесь полученных рестриктаз ДНК электрофоретически, а потом проводили трансформацию с каждым из выделенных фрагментов. Возможность выделения из генома необходимых генов зависит от специфичности используемых рестриктаз.

Конечно, решающим этапом в становлении технологии рекомбинантных ДНК был третий этап, связанный с переходом к клонированию генов животных в бактериальных клетках. И в этом отношении классической работой является работа по клонированию гена соматостатина, выполненная в 1977 г. [Hakura K., Hirose T., Crea R., et al.] в лаборатории Бойера.

Соматостатин – белок, состоящий из 14 аминокислот и синтезирующийся в организме человека. Для клонирования были использованы химически синтезированный ген соматостатина и плаزمида pBR322. К плазмиде был присоединен контролирующий фрагмент *lac*-оперона *E. coli*, за ним следовал структурный ген бета-галактозидазы и ген соматостатина. Клоны *E. coli*, несущие эту гибридную плазмиду, синтезировали соматостатин. Хотя, выход соматостатина в *E. coli* был низким, в 10 раз меньше ожидаемого, можно считать, что эта работа стала примером удачного решения вопроса синтеза белка животного происхождения в бактериальной клетке.

Становление технологии рекомбинантных ДНК есть результат, достигнутый в исследовании фундаментальных генетических процессов биологии клетки и энзимологии, и в формировании новых методов манипуляции генетическими молекулами.

Основой этих работ стали методы выделения индивидуальных генов или фрагментов ДНК. В настоящее время для получения необходимых генов используют различные подходы: химико-ферментативный синтез гена; вырезание необходимого гена непосредственно из природных ДНК; синтез гена на соответствующих матричных ДНК.

Выделение индивидуальных генов или фрагментов ДНК

Химико-ферментативный синтез генов

Этот метод включает химический синтез коротких (8-16 нуклеотидов) одноцепочечных фрагментов ДНК – олигонуклеотидов. Это осуществляется поэтапным образованием фосфодиэфирных связей между нуклеотидами.

Полученные олигонуклеотиды сшиваются между собой с помощью фермента ДНК-лигазы. Из одноцепочечных олигонуклеотидов формируют двухцепочечную цепь ДНК.

Впервые химико-ферментативный синтез гена был осуществлен в конце 60-х – начале 70-х годов XX века индийским ученым Г.

Алиханян С.И., Хлебалина О.И., Степанов А.И. и др. Получение функционирующих рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК *in vitro* (эксперименты по генной инженерии) // Генетика. - 1975. - II. - с. 34-35.

Cameron J.R., Panasenko S.M., Lehman J.R., Davis R.W. *In vitro* construction of bacteriophage lambda carrying segments of the *Escherichia coli* chromosome: selection on of hybrids, containing the gene for DNA-ligase // PNAS USA. - 1975. - 72. - p. 3416-3420.

Clarke L., Carbon J. Biochemical construction and selection of hybrid plasmids, containing specific segments of the *Escherichia coli* genome // PNAS USA. - 1975. - 72. - p. 4361-4365.

Hakura K., Hirose T., Crea R., et al. Expression in *E. coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin // Science. - 1977. - 198. - p. 1056-1063.

Реввертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий реакцию синтеза молекулы ДНК на молекуле РНК, которая в данном случае используется в качестве матрицы. Реввертаза функционирует неточно с совершенством ошибок в нуклеотидной последовательности ДНК.

ДНК-лигаза – фермент, осуществляющий восстановление фосфодиэфирной связи между фрагментами ДНК, а точнее образующей связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК, а также образующей связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

Корана, работавшим в США, который был удостоен Нобелевской премии вместе с З.Холли и М.Ниренбергом за расшифровку генетического кода и его функции в синтезе белков в 1968 г. Г. Корана вместе со своими сотрудниками синтезировал ген одной тРНК, состоящей из 150 нуклеотидных пар. Для решения этой задачи он использовал блочный способ синтеза длинных полинуклеотидных последовательностей. Каждый блок синтезируется так, чтобы его левая половина была комплементарна одному нуклеотиду, а правая – другому. После сборки всего гена он сшивается ДНК-лигазой.

Для того чтобы связать фосфатную группу одного нуклеотида с гидроксильной группой другого так, чтобы каждый раз (каждый шаг) образовывалась 3'-5'-фосфодиэфирная связь, необходимо выполнить ряд условий. Сам по себе остаток фосфорной кислоты с гидроксилом дезоксирибозы реагировать не будет, и поэтому необходима дополнительная активация остатка фосфорной кислоты. Для этого необходимо к ней присоединить активирующую группировку. После этого необходимо обеспечить реакцию с нужной ОН-группой дезоксирибозы. Эту задачу можно решить, используя «защиту» остальных группировок от возможной реакции с остатком фосфорной кислоты. Это обеспечивается связыванием этих групп дополнительными соединениями. К концу синтеза олигонуклеотида необходимо освободить от всех защитных группировок. В настоящее время синтез олигонуклеотидов автоматизирован. В реактор синтезатора помещается первый нуклеотид, иммобилизованный (сшитый с инертным носителем) с носителем, у которого активирована фосфатная группа и защищено азотистое основание, т. е. этот нуклеотид готов к образованию 3'-5'-фосфодиэфирной связи со следующим нуклеотидом. По сигналу компьютера в реактор подается раствор второго нуклеотида со всеми необходимыми реагентами. В память компьютера заложена необходимая последовательность нуклеотидов. После образования фосфодиэфирной связи между двумя нуклеотидами уже ненужные реагенты отмываются, и в реактор вводится следующий нуклеотид до полного завершения синтеза олигонуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать необходимую последовательность нуклеотидов, кроме того, в процессе синтеза можно ввести различные регуляторные последовательности или участки узнавания различных рестриктаз и т. д. Этим методом получены гены соматостатина, А- и В- цепи инсулина, проинсулин и другие гены.

Выделение генов из природных ДНК

Характеристика рестриктаз

В 1962 г. W. Arber описал существование в клетках бактерий ферментов, способных разрезать двухцепочечную ДНК на фрагменты. Позже D. Nathans и H. Smith выделили ферменты рестрикции из бактериальных клеток.

В настоящее время список рестриктаз включает более 1000 ферментов, которые узнают около 120 нуклеотидных

Рестриктирующие эндонуклеазы – это высокоспецифичные бактериальные ферменты, которые узнают определенные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК и разрезают обе цепи. Первая рестриктирующая нуклеаза была выделена из бактерии *Escherichia coli*.

последовательностей в молекуле ДНК. Показано, что некоторые ферменты узнают одну и ту же нуклеотидную последовательность. Рестриктазы являются незаменимым инструментом в технологии рекомбинантных ДНК.

D. Nathans и H. Smith предложили номенклатуру рестриктаз, в соответствии с которой первая буква в ее обозначении соответствует названию рода и две следующие буквы – виду бактерий (например, фермент, выделенный из *Escherichia coli* – Eco или *Haemophilus influenzae* – Hin). Принадлежность штамма бактерии, из которого выделяется фермент тоже может вноситься в название (EcoB или Hind). Кроме того, принадлежность фермента модификации ДНК к рестриктазам обозначается как R, следовательно, название рестриктаз такие: R Hind III, Eco RI.

Так как чужеродная ДНК одного вида бактерий способна проникнуть в «чужую» бактериальную клетку и осуществлять изменение ее генома, в процессе эволюции бактериальные клетки выработали защиту от такой «чужой» ДНК. Одним из таких инструментов защиты стали рестриктазы. Эти рестриктирующие нуклеазы способны узнавать специфические нуклеотидные последовательности, как правило, короткие – 4-6 нуклеотидов, связаться с ними и разрезать молекулу ДНК в этих участках (рис. 133). Последовательности, узнающиеся рестриктазами, часто являются «полиндромными», т. е. они читаются одинаково в обоих направлениях (AAGCTT- и TCGAA). Последовательность собственной ДНК клетки, которые узнаются ее рестриктазой, защищены от действия собственных нуклеаз метилированием аденина и цитозина в этих участках. Индивидуальная рестриктаза способна разрезать ДНК с образованием серии фрагментов, которые называют рестрикционными фрагментами. Сравнительный анализ рестрикционных фрагментов, которые получены после обработки ДНК набором различных рестриктаз позволяет построить так называемую рестрикционную карту. Такая карта демонстрирует локализацию рестрикции (разреза) относительно соседних участков разрезания. Так как рестрикционные карты отражают расположение определенных последовательностей (узнающихся рестриктазой) нуклеотидов в геноме, то сравнение карт ДНК разных видов позволяет, хотя и приближенно, однако дать оценку гомологии структуры ДНК между сравниваемыми видами.

Рестриктирующие нуклеазы связываясь с определенными нуклеотидными последовательностями, способны разрезать спираль ДНК (разрушать фосфоэфирную связь) по-разному. В одном случае, как, например, рестриктаза Hpa I образуются «тупые» концы. В других случаях две цепи ДНК разрезаются не прямо друг против друга, а со смещением на несколько нуклеотидов в рамках узнающей полиндромной нуклеотидной последовательности, как в случае EcoR I или Hind III (рис. 133).

В последнем случае образуются короткие одноцепочечные участки с «тупыми» концами. Эти одноцепочечные участки (так как они комплементарны) способны образовывать комплементарные пары с

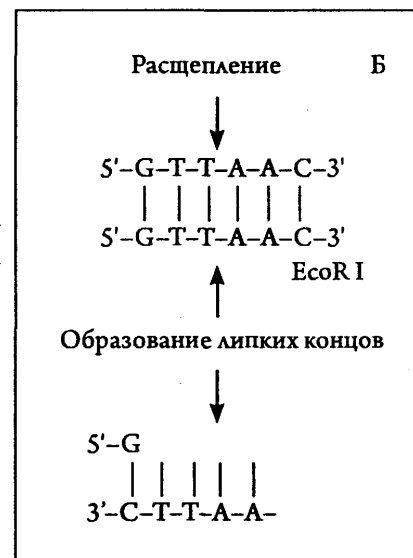
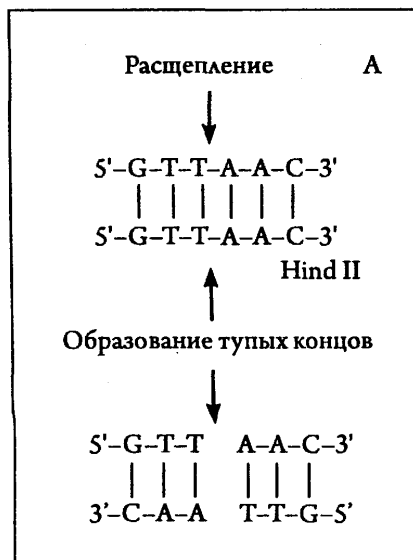


Рис. 133. Схема, демонстрирующая особенности разрезания ДНК разными рестриктазами с образованием «тупых» (А) и «липких» (Б) концов. Стрелка показывает место расщепления цепи ДНК рестриктазой.

любыми другими фрагментами, имеющими такие фрагменты. Такие одноцепочечные участки ДНК были названы липкими концами, т. е. способными образовывать комплементарные пары. Если обработать кольцевую молекулу ДНК (плазмидную ДНК) рестриктазой с образованием липких концов, то эта молекула вновь будет стремиться к восстановлению своей исходной структуры (в том случае, если она будет разрезана в одном сайте). Это свойство используется в технологии рекомбинантных ДНК. В том случае, если рестрикционными нуклеазами обрабатываются линейные молекулы, то этим способом можно получить фрагменты ДНК, содержащие отдельные гены.

Обработка ДНК ферментами рестрикции

За единицу активности рестриктазы принимают активность, при которой 1 мкг ДНК фага λ разрезается за 1 ч при 37 °С. На активность фермента влияют температура инкубации, ионный состав буфера, степень очистки ДНК и ее естественный уровень метилирования. Для каждого фермента оптимальный состав буфера свой, обычно используют три типа буфера (табл. 28). Обработку ДНК рестриктазами проводят в 20-40 мкл. Раствор ДНК, десятикратный буфер и фермент доводят до необходимого объема стерильной дистиллированной водой. Смесь перемешивают и инкубируют при 37 °С от 60 мин до 18 часов. Полученные фрагменты ДНК характеризуют, используя метод фракционирования ДНК электрофорезом в агарозном геле. Скорость миграции ДНК в агарозном геле определяется размером фрагментов, их конформацией и концентрацией агарозы. Это позволяет разделить фрагменты ДНК разной длины, определить их размеры, сравнивая скорость их миграции в геле с маркерными ДНК известного размера.

Используя этот метод получения генов трудно подобрать рестриктазы, которые точно вырезают необходимый экспериментатору ген. В результате обработки ДНК рестриктазой образуется большое количество фрагментов (ДНК клеток млекопитающих может давать 10^5 – 10^7 фрагментов). Клонировав эти фрагменты в клетках бактерий, можно получить миллионы различных колоний бактериальных клеток. После чего необходимо отобрать те колонии, которые содержат интересующий нас фрагмент ДНК. Отбор необходимой колонии представляет собой достаточно трудную и большую работу.

Этот метод выделения генов сравнивают с принципом действия «дробовика», так как в этом случае весь геном разрезают на множество случайных фрагментов.

Синтез индивидуальных генов на соответствующих мРНК

Характеристика обратной транскриптазы

Этот принцип получения генов основан на том, что мРНК является копией гена и, используя фермент РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу), на мРНК можно воспроизвести последовательность ДНК, которую в таком случае называют комплементарной ДНК (кДНК, рис. 134).

Десятикратный с высокой ионной силой

100 мМ трис-НСl pH 7.5
100 мМ MgCl₂
100 мМ NaCl

Десятикратный со средней ионной силой

100 мМ трис-НСl pH 7.5
100 мМ MgCl₂
500 мМ NaCl
10 мМ ДТТ

Десятикратный со средней ионной силой

100 мМ трис-НСl pH 7.5
100 мМ MgCl₂
10 мМ ДТТ

(ДТТ – дитиотреитол)

Табл. 28. Состав буферных растворов, использующихся в рестрикции ДНК.

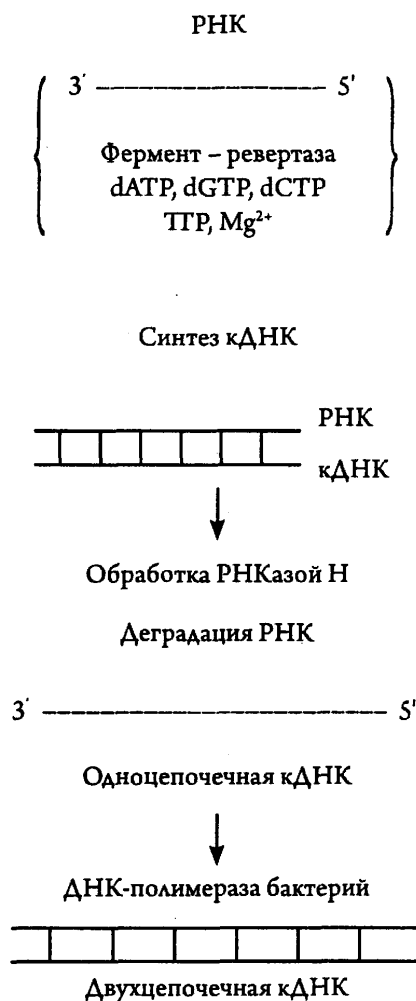


Рис. 134. Схема, демонстрирующая синтез *in vitro* двухцепочечной кДНК из молекулы РНК с помощью фермента ревертазы.

РНК-зависимая ДНК-полимераза вируса птичьего миелобластома состоит из затравки двух полипептидных цепей, имеющих 5'-3'-полимеразную, 5'-рибоэксонуклеазную и 3'-рибонуклеазную активности. При синтезе ДНК на мРНК в качестве затравки используют очень короткие одонитевые фрагменты РНК или ДНК. Схема действия фермента представлена на рис. 134. Разберем основные стадии получения кДНК, используя мРНК.

Выделение тотальной мРНК

В стратегии получения генов на основе мРНК можно использовать два подхода: 1 – использование суммарной мРНК для синтеза кДНК, клонирование ДНК и отбор клонов, несущих нужный ген; 2 – выделение индивидуальных мРНК, синтез на них соответствующих кДНК и получение желаемых клонов, несущих необходимые гены. Начальным этапом при использовании первого подхода является выделение тотальных мРНК. При выделении тотальных РНК необходимо обеспечить ингибирование рибонуклеазной активности внесением в раствор ингибиторов и удалением микроорганизмов ультрафильтрацией. В настоящее время существуют различные методы выделения РНК: фенольная экстракция, метод с использованием гуанидинтиоцианата, солей лития и мочевины.

В качестве примера в таблице представлены основные этапы выделения РНК из печени методом фенольной экстракции (табл. 29).

Полученную тотальную РНК используют для выделения мРНК. Чаще всего для этого используют хроматографию на poly (U)-сефарозе или oligo (T)-целлюлозе.

Однако необходимо помнить, что присутствие poly (A)⁺-последовательностей в мРНК придает ей ряд новых свойств, которые можно использовать для их отделения от других типов РНК. Так, если проводить фенольную экстракцию при нейтральном pH, poly (A)⁺ мРНК переходит в фенольную фазу, а при повторной экстракции при pH 9,0 их можно перевести в водную фазу. [Brauwerman G., Mendesi J., Lees, 1973]. Кроме этого poly (A)⁺ мРНК связываются с фильтрами типа Millipore3, сделанными из эфиров целлюлозы в 0,35 М KCl [Gorski J., Morrison M., 1974]. Связанная с фильтром poly (A)⁺ мРНК может быть отмита 0,05 % ДСН (додецилсульфат натрия) при низкой ионной силе. Однако ни один из этих методов не обладает такой высокой специфичностью как афинная хроматография на oligo (T)-целлюлозе или poly (U)-сефарозе.

Выделенную тотальную мРНК используют в реакции с обратной транскриптазой и получают кДНК, которую применяют для встраивания в вектор и трансформации бактериальных клеток.

Как известно, не все типы мРНК содержат poly (A)⁺-фрагмент. Выделение таких мРНК (poly (A)⁻) представляет более сложную задачу. Для решения подобной задачи выделяют мРНК-частицы в градиенте сульфата цезия, содержащего 15 % ДМСО. Из выделенных мРНК-частиц извлекают мРНК и разделяют ее на две популяции – содержащую poly (A)⁺ мРНК и не содержащую (poly (A)⁻) мРНК афинной хроматографией на oligo (T)-целлюлозе или poly (A)⁺-сефарозе.

Полицидромные последовательности, которые узнаются рестриктазами, называют сайтами узнавания.

1. Ткань гомогенизируют в 15 объемах холодного (4°C) буфера (0,35 М сахара, 50 мМ KCl, 10 мМ ацетата магния, 1,3 % -ный тритон X-100, 0,2 М трис-ацетат, pH 8,5
2. Клеточные ядра осаждают центрифугированием 5 мин при 2000 g.
3. К супернатанту добавляют ДСН до 1 % и ЭДТА до 2 мМ, встряхивают супернатант 10 мин с 2 объемами смеси фенол-хлороформ (1:1) по объему, предварительно смесь насыщают буфером.
4. Центрифугируют 10 мин при 10 000g при 20 °С.
5. Верхнюю (водную) фазу собирают и переносят в холодильник.
6. Добавляют к водной фазе ацетат калия до 0,2 М, pH 5,5 и 2,5 объема холодного (-20 °С) этанола. Перемешивают и оставляют при -20 °С на 16 ч.
7. Осадок РНК собирают центрифугированием при 2000 g 10 мин при 0 °С.
8. Осадок необходимо подсушить слабым током чистого азота.
9. РНК растворяют в буфере и хранят при -70 °С.

Табл. 29. Выделение РНК методом фенольной экстракции.

Выделение индивидуальных мРНК

Для получения фракции индивидуальных мРНК необходимо выделить полисомы, содержащие этот тип мРНК. Как известно, чем длиннее мРНК, тем крупнее полисомы и, наоборот. Однако различные типы мРНК могут совпадать по размерам и разделение полисомы по размерам позволяет только частично обогатить полученную фракцию мРНК индивидуальным типом мРНК.

Для фракционирования полисом по размерам (следовательно содержащих разные типы мРНК) чаще всего используют центрифугирование в линейных градиентах концентрации сахарозы 10-40 % или 20-50 % в буфере, содержащем к примеру 0,1 М КСl, 3мМ ацетата магния и 20 мМ трис-НСl, рН 7,6. Подбор условий фракционирования осуществляется экспериментально. Выделить полисомы, несущие индивидуальную мРНК, можно используя иммунопреципитацию полисом. Экспериментальные подходы могут быть основаны как на прямой, так и непрямой иммунопреципитации. В первом случае полисомы связываются со специфическими антигенами, полученные преципитаты очищают, используя градиенты сахарозы. Во втором случае (непрямая преципитация) используются вторичные антитела к комплексу полисом с первичными антителами, что приводит к образованию нерастворимых комплексов. Комплексы полисом с первичными антителами могут быть адсорбированы из аффинной колонки, к носителю которой ковалентно пришит нерастворимый антиген. Эти методы позволяют получить индивидуальные мРНК, которые составляют не более 1 % от всей популяции мРНК клетки (табл. 30).

Проверка чистоты полученных мРНК основана на эффективности их трансляции *in vitro* в бесклеточной системе с дальнейшим анализом полученных белков электрофорезом в полиакриламидном геле.

Схема выделения матричных РНК хроматографией на poly (U)-сефарозе.

1. Poly (U)-сефарозу суспендируют в стерильном буфере для элюции (10 мМ ЭДТА; 0,2 % саркозила; 90 % формамид; 10 мМ фосфат калия, рН 7,5
2. Суспензию переносят в стерильную колонку (0,5x2,0 см).
3. Промывают колонку 3 мл буфера для элюции, после чего промывают колонку 3 мл стерильного буфера для нанесения РНК (0,5 NaCl; 10 мМ ЭДТА; 25 % формамида; 50 мМ трис-НСl рН 7,5).
4. РНК, хранившуюся при -20 °С, растворяют в буфере для нанесения и наносят на колонку 1 мл этого раствора.
5. Элюируют несвязанную РНК (т. е. РНК не содержащую поли (α) фрагменты) тремя порциями буфера для нанесения по 1 мл.
6. Элюируют связавшуюся poly (A)⁺- РНК шестью порциями буфера для элюции по 0,25 мл.
7. Осаждают РНК этанолом.

1. Готовят сахарозные градиенты -10-40 % или 20-50 % (выбор градиента определяется происхождением фракционируемых полисом. Если предполагается фракционировать полисомы, содержащиеся в постмитохондриальной фракции, т. е. не очищенные полисомы, то их лучше разделять в градиенте 20-50 %, чтобы удалить сопутствующие белки. Если же полисомы предварительно были очищены, то их лучше фракционировать в 10-40 % сахарозе. Градиент сахарозы должен содержать 0,1 М КСl, 3 мМ ацетат аммония, 20 мМ трис-НСl, рН 7,6.
2. Наслаивают обработанный детергентом (тритон X-100) постмитохондриальный супернатант или ресуспендированные полисомы на градиент. Обычно на градиент сахарозы объемом 10 мл наслаивают 100-400 мкг полисом (по РНК). Центрифугируют 1 ч при 105 000 g, 4 °С.
3. Градиенты фракционируют, пропуская их через проточный денситометр с регистрацией материала при 260 нм со скоростью 1-5 мл/мин. Собирают отдельные фракции полисом. Из каждой выделяют РНК, и отделяют поли (A)⁺ РНК, т. е. мРНК на поли (U)-сефарозе.

Табл. 30. Фракционирование полисом по размеру

Получение фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции

Более быстрым и экономичным сегодня методом получения генов или фрагментов ДНК является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР – это способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Их амплификация (умножение в миллион раз) осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса.

ПЦР сводится к многократному повторению этих трех реакций. Все реакции проводят в пробирках, помещенных в термостат. Регуляция этих реакций осуществляется автоматической сменой температурных режимов.

Для осуществления ПЦР необходимо: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (длина которых около 20 нуклеотидов); 2) мишень длиной от 100 до 35 000 пар нуклеотидов (п.н.); 3) термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет своей активности при температуре не менее 95 °С, обычно используют ДНК-полимеразу, выделенную из бактерии *Thermus aquaticus* (ДНК-полимераза *Taq*); 4) четыре дезоксирибонуклеотида.

Этот метод получил широкое распространение. Он используется для идентификации патогенных микроорганизмов, выделения ДНК из образцов, содержащих ничтожное количество ДНК, выявления спонтанных мутаций, сборки полномерных генов из синтетических олигонуклеотидов, секвенирования ДНК.

С помощью ПЦР можно получить кДНК, отвечающие 3' или 5'-концевым участкам специфических мРНК. Этот метод назван *rapid amplification of cDNA ends* [RACE] – быстрая амплификация концов кДНК. Так как можно амплифицировать 3' и 5'-концы мРНК, то говорят о 3'RACE и 5'RACE. Для использования этого метода необходимо знать нуклеотидную последовательность кодирующей области мРНК-мишени, чтобы синтезировать специфический праймер (CSP). В случае 3'RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК служит *oligo* (dT) с присоединением к нему вторым праймером Р. *Oligo* (dT) спаривается с *poly* (A)-хвостом мРНК, а обратная транскриптаза (ревертаза) синтезирует цепь комплементарной мРНК.

Вторая цепь кДНК синтезируется на первой цепи при участии GSP, комплементарного кодирующей области данной мРНК, с использованием полимеразы *Taq*. После нескольких раундов ПЦР добавляют вторую пару праймеров, которые связываются по соседству с двумя первыми. Без второй пары праймеров нельзя амплифицировать полную молекулу. Синтез генов длиной 1000 п.н. можно осуществить в течение одного дня.

Векторы, принципы конструирования и характеристика

Центральным этапом в технологии рекомбинантных ДНК является перенос индивидуального гена в реципиентную клетку и

Праймер – короткий олигонуклеотид, который гибридизуется с матрицей и служит затравкой (обеспечивает начало синтеза цепи) при ее копировании.

ДНК-полимераза *Taq* – термостабильная ДНК-полимераза бактерий *Thermus aquaticus* (сохраняет свою активность при 95 °С), используется в полимеразной цепной реакции.

Емкость вектора – максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в данном векторе.

обеспечение его стабильной экспрессии. Решение этой задачи достигается с помощью векторных молекул или векторов.

Использование векторных молекул обусловлено тем, что при обычном введении фрагментов ДНК (отдельных сайтов) в бактериальные клетки, эта ДНК разрушается до отдельных нуклеотидов в результате действия гидролитических ферментов (ДНК-аз) клетки. В некоторых, достаточно редких случаях, если введенная в бактериальную клетку ДНК не будет разрушена, она не наследуется, а теряется в процессе деления клетки, так как она не входит в состав генетической системы клетки.

Для того чтобы введенная в клетку ДНК стала составной частью генетической системы клетки, ДНК должна быть либо встроенной в геном клетки (интегрироваться в хромосому), либо автономно (от генома) реплицироваться в клетке. Эти свойства перенесенной ДНК могут обеспечивать природные плазмиды, вирусы животных, бактериофаги. Следовательно, под векторными молекулами понимают кольцевые молекулы ДНК, в которые встроены чужеродные ДНК с целью молекулярного клонирования или переноса ее в реципиентную ДНК.

Векторные молекулы должны удовлетворять таким основным требованиям:

- 1) иметь область, чувствительную к действию определенного класса эндонуклеаз рестрикции (зоны рестрикции – разрезания). Это обеспечивает разрезание кольцевой молекулы и перевод ее в линейную форму. К образовавшейся линейной молекуле ДНК «пришивают» индивидуальный ген или группу генов и вновь формируют кольцевую ДНК;
- 2) векторная молекула должна быть способной реплицироваться в определенных типах бактериальных клеток;
- 3) в векторной ДНК должен содержаться так называемый маркерный ген, который может придавать клетке новые свойства, т.е. формировать ее фенотип. В качестве таких маркерных генов чаще всего используют гены устойчивости к антибиотикам. Гены устойчивости к антибиотикам синтезируют ферменты, модифицирующие молекулу антибиотика и приводящие к инактивации антибиотика. Для примера можно привести ген β -лактамазы. В том случае, если в клетке бактерии синтезируется β -лактамаза, то клетка приобретает устойчивость к пенициллину. Эта устойчивость проявляется в том, что, если культивировать клетки бактерий на среде, содержащей пенициллин, то все клетки погибнут, кроме тех, в состав которых входит вектор с геном β -лактамазы.

Первые векторные молекулы были сконструированы на основе природных бактериальных плазмид.

Плазмида – это внехромосомная автономно реплицирующаяся двухцепочечная кольцевая молекула ДНК. Плазмиды встречаются во всех бактериальных клетках. Плазмиды выполняют различные функции. Так, некоторые из них содержат гены, обеспечивающие их собственный перенос из одной клетки в другую (их называют F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам

Интегрирующий вектор – вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки хозяина.

Маркерный (или индикаторный) ген – это ген, который встраивается в вектор с целью проведения селекции клеток на наличие трансгена.

(R-плазмиды или гены, обеспечивающие деградацию метаболитов (плазмиды деградации). Различаются плазмиды и по размерам, которые определяют по количеству пар оснований и могут варьировать от 1 до 5 т. пар нуклеотидов.

Автономная репликация плазмид приводит тому, что в одной клетке может находиться от 10 до 100 копий плазмид, это так называемые высококопийные плазмиды. Низкокопийные плазмиды присутствуют в клетке в количестве 1-4 копий.

В одной бактериальной клетке могут встречаться плазмиды с разными функциями и сосуществовать независимо.

Плазмиды удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к векторам. Однако для увеличения эффективности использования плазмид в качестве векторов для переноса клонированной ДНК осуществляют их модификацию или генетическое конструирование.

Рассмотрим конструирование вектора на основе плазмиды pBR322 (рис. 135). Плазмидный вектор на основе pBR322 может быть отнесен к универсальным векторам, и он много лет остается самым популярным. При обозначении вектора используют строчную букву p (plasmid) и буквы, имеющие отношение к описанию вектора или истории его создания. Для вектора pBR322, это означает, Боливар и Родригес – авторы конструкции, а 322 – число, взятое авторами из протоколов эксперимента.

Плаزمида pBR322 имеет 436 пар нуклеотидов и несет два гена устойчивости к антибиотикам. Эта плазмида реплицируется благодаря уникальности последовательностей, образующих точку начала репликации, только в клетках *E. coli*.

Принцип конструирования векторов на основе вектора pBR322 сводится к тому, что его обрабатывают рестриктазой, которая разрезает плазмиду в единственном сайте. Это приводит к образованию линейной молекулы с «липкими» концами (рис. 133). Такую линейную молекулу смешивают с фрагментом ДНК, содержащим нужный ген (донорная ДНК). Однако для того, чтобы была возможность встраивания этого гена в вектор, донорную ДНК предварительно обрабатывают той же рестриктазой, что обеспечивает образование таких же «липких» концов, как и в векторе. Так как липкие концы этих фрагментов ДНК (векторной и донорной) комплементарны, они образуют гибридную молекулу, формируя двухцепочечную ДНК, – «восстанавливая» водородные связи. После этого конструкцию обрабатывают ДНК-липазой фага Т4 в присутствии молекул АТФ. Так как в результате этих манипуляций образуются разные комбинации фрагментов, в частности могут объединяться фрагменты донорной ДНК или только сходные плазмидные ДНК, то для уменьшения нежелательных фрагментов, в частности объединенных плазмидных ДНК, смесь молекул обрабатывают щелочной фосфатазой, которая отщепляет от линейаризованных молекул ДНК 5'-фосфатные группы и ДНК-лигаза не может сшивать концы дефосфорилированной линейной молекулы плазмидной ДНК.

Так как плазмида pBR322 содержит лишь несколько сайтов рестрикции, а отбор трансформированных клеток занимает много

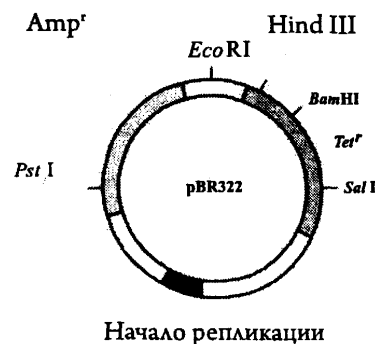


Рис. 135. Генетическая карта плазмидного вектора pBR322. Гены устойчивости к двум антибиотикам – тетрациклину (Tet^r) и ампициллину (Amp^r) содержат уникальные сайты узнавания для Hind III, Sal I, Bam HI и Pst I. EcoRI – сайт расположен вне этих генов. Длина вектора 4361 п.н.

Сайт – участок нуклеотидной последовательности РНК или белка, или участок белковой молекулы.

Линейаризация – перевод кольцевой молекулы, в частности ДНК в линейную молекулу обработкой рестриктазами.

Бактериофаги или фаги бактерий – вирусы, которые поражают бактерии.

времени, возникает необходимость разработки других векторов. Так, плазмида pUC19 длиной 2686 п.н. содержит ген устойчивости к ампициллину; регулируемый сегмент гена β -галактозидазы, лактозного оперона *E. coli*; ген *lacI*, кодирующий репрессор, который контролирует экспрессию гена *lac Z*; полимер с множеством сайтов узнавания для большого количества рестриктаз (*EcoR I*, *Sac I*, *Kpn I*, *Xma I*, *Sma I*, *BamH I*, *Xba I*, *Hind III*, *Sph I*, *Sal I*, *Hinc II*, *Acc I*, *BspM I*, *Pst I*) и точку начала репликации плазмиды pBR322. Такая конструкция обеспечивает более широкие возможности в селекции и конструировании рекомбинантных ДНК.

Кроме этих плазмид сегодня разрабатываются различные генетические конструкции, и у исследователей имеется огромный выбор при решении генно-инженерных задач.

Векторы клонирования крупных фрагментов ДНК

На основе плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК не более 10 т.п.н. При клонировании более крупных фрагментов ДНК используют бактериофаг λ *E. coli*.

Размер ДНК бактериофага λ составляет примерно 50 т.п.н., а около 20 т.п.н. из них не существенны для функционирования бактериофага, т.е. удаляя или заменяя их на нужной нам фрагмент, можно обеспечить клонирование достаточно больших фрагментов ДНК.

Вспомним, что после проникновения бактериофага в клетку *E.coli* события могут развиваться по двум сценариям. В случае литического пути, бактериофаг интенсивно размножается и через 20-30 мин наступает лизис бактериальной клетки и освобождение вирусных частиц, которых может быть не менее 100.

В случае включения ДНК фага в геном бактерии он реплицируется вместе с ДНК *E. coli*. Однако при недостатке питания или других неблагоприятных условиях интегрированная фаговая ДНК освобождается, и запускается литический цикл развития, т.е. фаговая частица разрушает клетки.

В том случае, если возникает необходимость клонировать фрагменты ДНК размером более 20 т.п.н, то можно использовать в качестве вектора космиды. Космиды как бы объединяют в себе свойства плазмидных векторов и векторов на основе фага λ . Космиды pLFR-5 активно амплифицируются в клетках *E.coli* как плазмиды. При этом они имеют два *cos*-сайта фага λ , которые разделены сайтом рестрикции для *Sca I*. Имеют ген устойчивости к тетрациклину и сайты рестрикции *Hind III*, *Pst I*, *Sal I*, *Bam HI*, *Sma I*, *Eco RI*.

Оказавшись в бактериальной клетке, линейная молекула космиды pLFR-5, благодаря спариванию *cos*-сайтов, замыкается в кольцо. В такой стабильной конфигурации она может долгое время существовать в клетке и реплицироваться как гибридная плазмида, а на среде с соответствующим антибиотиком бактериальные клетки, не несущие вектора, погибают.

Космидные векторы – это плазмиды, несущие <i>cos</i> -последовательности, которые распознаются системой узнавания фага λ .
--

Перенос вектора в реципиентную клетку

Трансформация клеток бактерий с использованием солей кальция

Процесс введения чужеродной ДНК в реципиентную клетку называют трансформацией. Эффективность трансформации определяют как число трансформантов на 1 мкг вносимой в суспензию клеток ДНК. Эффективность трансформации никогда не бывает стопроцентной, чаще всего она составляет 10^{-7} - 10^{-8} . В связи с этим большую роль играет система отбора или селекции трансформированных клеток.

Такая низкая эффективность трансформации объясняется тем, что не все клетки способны включать в свой состав чужеродную ДНК. Клетки, которые способны поглощать чужеродную ДНК, называют компетентными. Большинство существующих методов трансформации сводится к увеличению компетентности реципиентных клеток. Долю компетентных клеток можно повысить, используя специальные среды или условия культивирования.

Одним из самых простых методов трансформации является так называемый кальциевый метод.

Реципиентные клетки обрабатывают ледяным раствором CaCl_2 , после чего выдерживают клетки при 42°C в течение 1,5 мин. Такая обработка локально разрушает клеточную стенку клеток бактерий. Этот метод достаточно эффективен, он дает около 10-3 трансформантов, это означает, что на каждую 1000 клеток одна будет трансформирована.

Трансформация клеток с помощью полиэтиленгликоля

В некоторых случаях трансформация клеток бактерий может быть осуществлена с использованием полиэтиленгликоля, так же как и для клеток животных и растений.

В том случае, если клетки бактерий устойчивы к химическим индукторам трансформации и их использование не повышает их компетентность, то тогда применяют такие системы доставки ДНК как электропорация или конъюгация.

Трансформация клеток бактерий электропорацией

Суть метода электропорации сводится к обработке суспензии клеток бактерий электрическим током. Для разных видов бактерий условия электрообработки различны и подбираются они эмпирически. Механизмы проникновения ДНК в клетку в процессе электропорации известны недостаточно. Вероятно, и в этом случае в результате электрического импульса в клеточной стенке образуются временные поры.

При использовании *E.coli* векторную ДНК вносят в суспензию клеток и подают единичный импульс тока длительностью 4,5 мс, 2,5 кВ. Экспериментальные работы показали, что для коротких плазмид

Реципиент (от лат. – принимающий), организм, которому пересаживают какой-либо орган, ткань или клетки другого организма.

Трансформация – преобразование, превращение, перенесение в реципиентную клетку изолированных фрагментов ДНК, что может приводить к появлению у клеток-трансформанта признаков, свойственных организму, из которого получена эта ДНК.

Электропорация – сложное слово, составленное из электро- и поро – формирование пор под влиянием электричества, в данном случае подразумеваются мелкие поры в наружной мембране клетки.

(примерно 3000 п.н.) эффективность переноса 10^9 , а для длинных (примерно 135 000 п.н.) она значительно выше и составляет 10^6 .

Трансформация клеток бактерий методом тройного скрещивания

В природе некоторые плазмиды способны создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. Образование контактов между донорной и реципиентной клетками обеспечивается конъюгационными свойствами плазмид, а сам перенос ДНК – мобилизационными плазмидами. Большинство плазмид, которое используется для получения рекомбинантных ДНК не обладает конъюгативными функциями, и, следовательно, не может переходить в реципиентные клетки в результате обычной конъюгации. В этом случае используют подход, основанный на том, что при наличии в клетке плазмиды, обладающей конъюгативными свойствами, плазмидный вектор может переходить в реципиентную клетку.

Следовательно, введение в клетку плазмиды с конъюгативными функциями может обеспечить ее трансформацию плазмидным вектором, т.е. используется тройная конъюгация.

Селекция клонов, несущих трансген

Скрининг методом гибридизации нуклеиновых кислот

После создания библиотеки ДНК проводят скрининг, т.е. отбор клонов, несущих желаемую последовательность ДНК. При решении этой задачи используют три подхода: гибридизацию с радиоактивно меченым ДНК-зондом; иммунологический скрининг и скрининг по активности белка, который кодируется трансгеном.

Процедура ДНК-гибридизации состоит в следующем. Выделяют ДНК-мишень из анализируемого клона клеток, эту ДНК денатурируют, т.е. переводят в одноцепочечные молекулы и «пришивают» (связывают) к твердой подложке. В качестве такой подложки используют нитроцеллюлозные или нейлоновые фильтры. После этого к фильтру с ДНК-мишенью добавляют одноцепочечный ДНК-зонд, который помечен радиоактивной или другой меткой. Его инкубируют и обеспечивают комплементарное спаривание нуклеотидов зонда и мишени. Наличие гибридных молекул определяют по наличию радиоактивной метки на фильтре. Если комплементарность между зондом и ДНК-мишенью отсутствует и, следовательно, гибридизация не произошла, то метка на фильтре отсутствует, т.е. результат отрицательный.

Для гибридизации, т.е. образования стабильного комплекса ДНК, необходимо, чтобы на участке длиной в 50 нуклеотидов совпадало не менее 80 % этих последовательностей.

Для получения ДНК-зондов используют различные методы.

Приведем схему скрининга библиотеки геномной ДНК. После трансформации клетки высевают на чашки с питательной средой и

Донор – от слова дарить, жертвовать, человек или организм, который отдает свои ткани, клетки для пересадки в другой организм или клетку (реципиенту).

Скрининг – означает «просеивание». В медицине означает проведение простых и безопасных исследований большим группам населения с целью выделения групп риска развития той или иной патологии.

ДНК-зонд – фрагмент ДНК, в который включена специфическая метка (это может быть радиоактивный элемент, флуоресцентная или другая метка, которая может легко регистрироваться. Это позволяет наблюдать за локализацией зонда и его «судьбой».

Библиотека генов, или банк генов – набор фрагментов ДНК, в котором представлены все гены (или определенная часть генов) организма. Банк генов представляет культуру микроорганизмов (бактерии, дрожжи), в каждую клетку которых введен вектор, несущий один из фрагментов этого набора.

обеспечивают их рост. Проводят лизис клеток, депротенинизацию и денатурацию ДНК. Выделенную ДНК фиксируют на фильтре. На фильтр наносят заранее подготовленный ДНК-зонд, проводят отжиг и определяют наличие радиоактивности.

Клетки, содержащие гибридизующуюся с зондом ДНК (трансен), выделяют и переводят на новую культуральную среду для размножения.

Иммунологический скрининг

Трансен в трансформированной клетке можно определить по наличию белков, синтезирующихся на этом гене. Определить эти белки можно, используя иммунологический метод анализа. Для этого трансформированные клетки лизируют (разрушают), что приводит к освобождению белков в среду. Освободившиеся таким образом белки фиксируют на фильтре. После этого на фильтр наносят первые антитела, которые специфически связываются с этими белками (антигенами). Фильтр промывают и таким образом удаляют не связавшиеся антитела. Фильтр помещают в раствор вторых антител, которые специфичны в отношении первых антител. Вторые антитела связаны с различными ферментами. Если вторые антитела связываются с первыми, то под действием ферментов происходит гидролиз субстрата с образованием окрашенных продуктов, по которым судят о реакции антиген-антитело. В случае положительной реакции делают заключение о наличии в трансформированных клетках трансгена.

Лизис – от слова растворение, разрушение клеточных структур или тканей.

Скрининг по активности белков

В том случае, если трансген обеспечивает синтез фермента, то определение его активности в трансформированных клетках позволяет судить о наличии и экспрессии трансгена.

Определение фермента осуществляют обычными специфическими гистохимическими методами. Для этого трансформированные клетки лизируют, к лизату добавляют необходимые субстраты и определяют активность ферментов по уменьшению субстрата или по увеличению ферментативной реакции.

Экспрессия – выразительность, в данном случае синтез РНК на молекуле ДНК.

Регуляция экспрессии трансгена

Основной целью технологии рекомбинантных ДНК является подбор условий обеспечивающих эффективную экспрессию необходимого нам гена в реципиентной клетке. Сам факт встраивания гена в геном реципиента не означает, что он будет экспресироваться.

К сожалению, сегодня отсутствует единая стратегия регуляции клонированных генов. Известно, что большинство генов имеют уникальные молекулярные свойства и для каждого из них приходится экспериментально подбирать условия экспрессии. Сегодня мы знаем, что наиболее важными молекулярно-биологическими свойствами регуляции экспрессии трансгенов являются: 1 – тип промотора и терминатора транскрипции; 2 – прочность связывания

Оперон – группа генов, которая определяет синтез функционально связанных ферментов, например лактозный оперон и др.

мРНК с рибосомой; 3 – локализация трансгена в геноме реципиента; 4 – эффективность трансляции мРНК трансгена в реципиентной клетке; 5 – стабильность синтезируемого трансгенного белка в реципиентной клетке.

Для эффективной экспрессии трансгена необходимо наличие сильного регуляторного промотора, расположенного перед геном. С таким промотором РНК-полимераза эффективно связывается и трансген транскрибируется. Для обеспечения экспрессии в вектор с трансгеном встраивают известные промоторы, в частности, промотор *Lac* (лактозного оперона *E. coli*).

Трансген может быть встроен в плазмиду так, чтобы он находился под контролем постоянно функционирующего промотора. В таком случае трансген будет непрерывно экспрессироваться. Однако и такая система имеет свои недостатки. Такая непрерывная экспрессия чужеродного белка может приводить к гибели клетки-реципиента. Оптимальным является возможность регуляции экспрессии трансгена. Для этого осуществляют конструирование так называемых экспрессирующихся векторов.

Чаще всего используют такие сильные промоторы как *Lac* и *trp*-опероны *E. coli*. Был сконструирован *tac*-промотор, который включает 10-область *Lac*-промотора и – 35-область *trp*-промотора (так обозначают участки, которые находятся на расстоянии 10 и 35 п.н. до сайта инициации транскрипции); левый, или p^L , промотор бактериофага λ ; промотор гена 10 бактериофага T7, с каждым из них связываются соответствующие рецепторы, они обеспечивают включение и выключение транскрипции генов.

Если в среде культивирования реципиентных клеток отсутствует лактоза, то *Lac*-промотор *E. coli* находится в репрессированном состоянии, т.е. не транскрибируется, так как выключен белком-репрессором. Если в среду внести лактозу или изопропил- β D-тиогалактопиранозид, то они предотвращают связывание *Lac*-репрессора с оператором и транскрипция возобновляется.

Промотор *trp* выключается под действием комплекса триптофан-*trp*-репрессор, который связывается с *trp*-оператором и прекращает транскрипцию *trp*-оперона. Активация транскрипции (включение) *trp*-промотора происходит либо при удалении из среды культивирования триптофана, либо при добавлении в среду культивирования 3-индолакриловой кислоты.

Необходимо отметить, что эффективность инактивации белка-репрессора и, как следствие, активация транскрипции генов, находящихся под контролем соответствующих операторов, зависит от соотношения между числом молекул репрессора и числом копий промотора. Если концентрация репрессора слишком велика, то транскрипция не начинается, и наоборот, если молекул репрессора очень мало, то транскрипция может осуществляться и в отсутствие индукции.

В настоящее время разрабатываются различные стратегии регуляции генов и можно утверждать, что эти работы важны не только для получения необходимых белков, но и для понимания механизмов регуляции генной экспрессии.

Репрессор – ограничивающий, сдерживающий – регуляторный белок, который останавливает синтез мРНК с определенного гена.

Глава IX

Технология рекомбинантных ДНК растительных клеток и трансгенные растения

Задачи технологии рекомбинантных ДНК растений

Формальной датой рождения технологии рекомбинантных ДНК принято считать 1972 г, когда группа П.Берга в США сконструировала в системе *in vitro* рекомбинантную ДНК, в состав которой был включен генетический материал из трех разных источников – геном вируса SV40 (онкогенный вирус обезьян), часть генома бактериофага λ и гены лактозного оперона *E. coli*.

Этапы технологии рекомбинантных ДНК остаются неизменными и включают те же стадии, что и в случае трансформации бактериальных клеток: 1) выделение или синтез индивидуального гена; 2) встраивание выделенного гена в векторную молекулу и образование гибридной структуры; 3) введение, или перенос гибридной ДНК в реципиентную клетку; 4) отбор клонов трансформированных клеток на селективных средах; 5) контроль экспрессии чужеродных генов.

Основные задачи технологии рекомбинантных ДНК растений совпадают с традиционными задачами селекции растений; конструирование растений с более ценными свойствами в отношении накопления биомассы или состава веществ, получение устойчивых к вредителям и неблагоприятным факторам среды. Однако в отличие от традиционных методов селекции, технология рекомбинантных ДНК оперирует отдельными генами, что позволяет снизить количество случайных генетических комбинаций. Это обеспечивает целенаправленное введение в растение гена соответствующего программе селекции, и тем самым значительно сокращает сроки создания новых генотипов. Кроме того, использование технологии рекомбинантных ДНК не зависит от таксономического родства используемых организмов, в то время как классическая селекция использует скрещивание в пределах вида (рис. 136).

Необходимо помнить, что растения имеют очень важное преимущество перед животными, так как их клетки тотипотентны и из недифференцированных соматических клеток можно регенерировать зрелые фертильные растения. Развитие методов клеточной инженерии стимулировало развитие технологии рекомбинантных ДНК растений, так как открыло возможность введения ДНК в соматическую растительную клетку с последующей регенерацией трансгенного растения.

Основным препятствием для введения ДНК в растительные клетки является наличие у них клеточной стенки. Это препятствие удалось обойти, используя растительные протопласты, удаляя клеточные стенки обработкой целлюлолитическими ферментами. Протопласты сохраняют жизнеспособность и при определенных

Трансформированная клетка – это клетка, которая несет чужеродный ген.

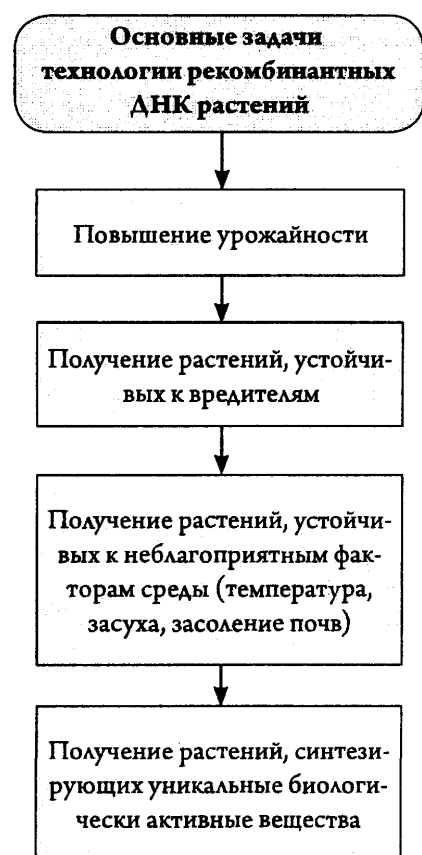


Рис. 136. Схема, демонстрирующая задачи, которые решаются с помощью рекомбинантных ДНК в растениеводстве.

условиях культивирования восстанавливают клеточные стенки. Из протопластов можно регенерировать целые растения. Значительный прогресс в методологии клеточной инженерии был достигнут благодаря разработке метода слияния протопластов [Melchers G., 1977]. Слияние клеток с различными признаками, используя гибридизацию соматических клеток, позволяет получать новые сочетания ядерных и цитоплазматических геномов. Таким методом гибридизации можно осуществлять «скрещивание» таких видов растений, которые в обычных условиях не могут скрещиваться и давать потомство. Хотя использование этого методологического подхода и имеет свои ограничения, так как не всегда удается получать клетки, способные к пролиферации в культуре, многие специалисты считают, что слияние протопластов является эффективным методом селекции растений.

Следовательно, используя методологию рекомбинантных ДНК, можно преодолевать межвидовые барьеры и получать сочетания генов любого происхождения. В качестве иллюстрации приведем пример получения пищевого белка растительного происхождения.

Как известно, организм человека нуждается в получении с пищей 11 незаменимых аминокислот. Необходимо учесть, что аминокислоты в пище должны быть представлены в определенных соотношениях. Если все незаменимые аминокислоты присутствуют в пище в необходимых соотношениях, то организм взрослого человека нуждается примерно в 30 г белка в день [Kemp J.D., 1983], в этом случае не будет белкового голодания.

Если в качестве белка использовать пшеницу, то в составе ее белков выявляется очень низкое содержание лизина и 30 г ее белков эквивалентно не более 12 г высококачественного белка. Использование любых программ классической селекции не позволяет получить сорт пшеницы с полноценным белковым составом, так как низкое содержание лизина выявляется у всех видов пшеницы.

Аминокислотный дефицит имеется у всех видов растений, но по разным аминокислотам. Так, например, белок бобов имеет низкое содержание метионина и цистеина, и поэтому 30 г белка бобов имеют всего 14 г белка эффективной утилизации. Традиционно человек решает эту проблему, включая в рацион белки различного происхождения.

Запасные белки подсолнечника (*Helianthus annuus*) аналогичны запасным белкам пшеницы (*Triticum spp.*) и также имеют низкое содержание лизина. Перенос генов, кодирующих запасные белки бобов, в геном подсолнечника позволит получать полноценный пищевой растительный белок.

Некоторые проблемы технологии рекомбинантных ДНК растений

Конечной целью генноинженерных манипуляций с растениями наряду с решением фундаментальных исследований функционирования генома является конструирование растений с новыми признаками. Наиболее сложной проблемой при получении трансгенных растений является выбор и выделение генов, способных

Melchers G. Recombinant molecules: impact in science and society, N.Y. Raven.- 1977.-P. 209-227.

Kemp J.D. Experimental manipulation of gene expression.-N.Y. Acad. Press Inc., 1983, P. 119-135.

Доминировать – господствовать, преобладать над другим, над рецессивным.

направленно изменить свойства растений и подбор эффективной системы переноса генов в реципиентные клетки.

Если признак детерминирован одним геном – это относительно простая задача. Однако структура генома растений более сложна и менее изучена по сравнению с бактериальными геномами, кроме того, многие признаки кодируются множественными генами. Сам процесс выделения генов растений достаточно трудная задача.

Серьезной проблемой еще остается осуществление стабильной интеграции чужеродной информации и экспрессия перенесенных генов на требуемой стадии развития растения, для чего необходима более детальная информация о растительных промоторах и механизмах регуляции растительных генов. Комплекс этих вопросов и составляет суть второй проблемы технологии рекомбинантных ДНК растений – механизм переноса новых генов и регуляция их экспрессии в новом окружении.

Еще недавно считалось, что перенос генетического материала между филогенетически отдаленными организмами в природе не имеют места в силу возникших в процессе эволюции межвидовых барьеров и возможны только в результате манипуляции *in vitro*. Исследования этих явлений, проведенные за последние годы показали, что плазмидо-хромосомные взаимодействия могут осуществляться и между таксономически отдаленными группами микроорганизмов и даже между растениями. Примером таких генетических переносов является перенос фрагментов ДНК вирулентных агробактерий – Ti-плазмид (Т-ДНК) в растительный геном, где Т-ДНК интегрируется в геном растения и становится наследственным аппаратом трансформированной (опухолевой) растительной клетки. Образование корончатых галлов у растений является примером миграции ДНК прокариот в эукариотическую клетку.

Дальнейшие исследования механизмов взаимодействия геномов бактерий с геномами растений являются важным этапом развития технологии рекомбинантных ДНК и получения трансгенных растений. В этом отношении удобной экспериментальной моделью является процесс опухолеобразования в результате заражения растений агробактериями. В настоящее время этот процесс исследуется не только фитопатологами, но и генетиками, и молекулярными биологами. Опухолеобразование у растений позволяет исследовать механизм тотипотентности растительных клеток и механизмы дифференцировки тканей, молекулярные основы развития.

Ti-плазида используется как природный инструмент для переноса новых генов в растения. Дальнейшие исследования этого уникального явления будут способствовать развитию технологии рекомбинантных ДНК и пониманию эволюционных процессов.

Общая схема переноса генов в клетки растений

Схемы переноса генов в растительных объектах мало отличаются от переноса генов в бактериальные клетки, однако в случае растительных клеток могут быть использованы два подхода (рис. 137). При выделении генов используют те же методические подходы, что

Понимание механизмов возможного переноса генов из клеток прокариот в эукариоты демонстрирует наличие еще одного пути эволюционной лабильности геномов. Нельзя исключать того, что этот механизм может играть важную роль в эволюционном процессе.

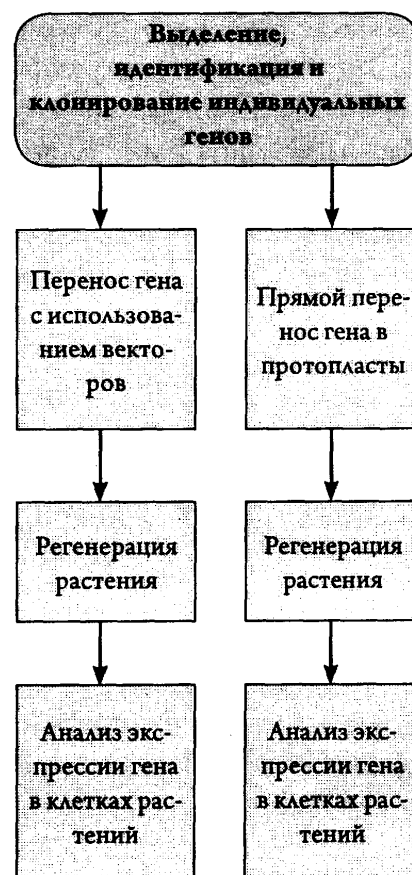


Рис. 137. Схема, демонстрирующая два подхода получения трансгенных растений

и при выделении генов из клеток бактерий или животных клеток. Основная проблема при выделении ДНК из клеток растений связана с разрушением клеточных стенок и отделением высокополимерных ДНК от полисахаридов и пигментов.

Для того чтобы чужеродный ген экспрессировался в клетках растений необходимо, чтобы промотор «химерных» генов был растительного происхождения, в противном случае РНК-полимераза растительных клеток не будет его транскрибировать.

Первые неудачи по переносу генов были связаны с тем, что чужеродные гены не содержали регуляторные последовательности характерные для растительных клеток.

Долгие годы считали, что природа установила непреодолимые препятствия во взаимодействии генов прокариот и эукариот. Открытие переноса Ti-плазмид бактерий в клетки растений, осуществленное в 1977 г. [Chilton M.D., et al., 1977.] стало первым примером того, как преодолеваются естественные барьеры обмена генома между прокариотами – бактериями и эукариотами – высшими растениями. Оказалось, что плазмидные гены бактерий переносятся и экспрессируются в растительных клетках и это сопровождается развитием опухоли (канцерогенезом) у растений. По существу, это явление является природной формой генетической инженерии растений.

В результате бактериального заражения происходит злокачественная трансформация нормальных клеток растений, выражающаяся в образовании на разных частях растений корончатых галлов, которые являются типичными злокачественными опухолями, характеризующимися анаплазией, перевиваемостью, гормоннезависимым ростом *in vitro*, способностью к метастазированию.

Опухоли индуцируются теми штаммами агробактерий, которые содержат опухолеобразные плазмиды Ti- (от tumor inducing – опухолеродный), кольцевые двунитевые ДНК, имеющие размеры 95-156 Мда, размеры которых зависят от штамма бактерий. Эти плазмиды не только придают онкогенные свойства вирулентным штаммам бактерий, вызывающим корончатые галлы, но и детерминируют опухолевый фенотип. В клетках галлов осуществляется синтез нового класса веществ (встречаются только в галлах) названные «опинами» [Tempe J., et al., 1982.]. В группу «опины» объединены вещества различной химической природы, характеризующиеся тем, что все они синтезируются в клетках корончатых галлов и являются специфическими ростовыми веществами агробактерий.

Интеграция ДНК Ti-плазмиды (Т-ДНК) с ДНК растительной клетки приводит к трансформации обычной клетки в раковую. В результате прекращается дифференцированный рост, начинается не контролируемое деление клеток растений, и в результате дедифференцированного роста образуются корончатые галлы, в клетках которых синтезируются опины.

Опины – производные аминокислот, кетокислот и сахаров.

Болезнь «бородатый корень», вызываемая плазмидами *Agrobacterium rhizogenes* также характеризуется синтезом своих специфических производных аминокислот в трансформированных

Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J. et al. //Cell.- 1977.- 11.- 263-271.

Корончатый галл – опухоль растений, образование которой вызывают бактерии рода *Agrobacterium*.

Tempe J., Goldman A. Molecular biology of plant tumor / G.Kahe, J. Schell, N 4: Acad Press.1982. P.427-449.

опухолевых клетках. Синтез опинов начинается через 5-7 дней после индукции опухоли. Необходимо отметить, что синтез опинов является причиной опухолеобразования у растений: вероятно, опины обеспечивают вирулентность бактерий и тем самым способствуют онкогенным бактериям занимать определенную экологическую нишу. Опины играют важную роль в индукции конъюгационного процесса, перенося опухолеродные плазмиды.

Специалисты трактуют это явление как генетическую колонизацию. Бактериальный фитопатоген влияет на метаболизм хозяина, заставляя его синтезировать питательные вещества, утилизировать которые может только сам патоген, благодаря тому, что он обладает необходимыми генами катаболизма (катаболитные плазмиды).

Естественная система развития корончатых галлов является примером трансплантации генетического материала, заключающаяся в обмене ДНК между прокариотическими и эукариотическими клетками. Феномен корончатых галлов иллюстрирует наличие в природе способа паразитизма и симбиоза, при котором один из партнеров не только приспособливается генетически к свойствам партнера-хозяина, но и специфически изменяет некоторые свойства хозяина путем встройки генов в геном хозяина.

Возможно, в процессе индукции клубеньков у бобовых растений штаммами *Rhizobium* также имеет место перенос бактериальных генов в растительные клетки на стадии бактериоидов (больших спитых агрегатов бактерий). Не исключено, что природный обмен генами происходит и между животными и бактериями.

Организация и экспрессия генов растений

Структурная организация генов растений

В то время, когда велись интенсивные фундаментальные молекулярно-генетические исследования прокариот, а несколько позже начались интенсивные исследования и генома животных, растительные объекты оставались в поле зрения только физиологов и агрономов. Объясняется это достаточно просто. Глубокие знания генетики *E.coli* и дрожофилы вывели их в разряд излюбленных объектов для молекулярной биологии. Значительный интерес представляют работы по молекулярной генетике животных, так как такие исследования прямо связаны с проблемой рака и наследственными болезнями человека. Вместе с тем, растительные клетки имеют уникальное преимущество перед животными как объекты исследования, это способность соматических клеток дифференцироваться *in vitro* в фертильное растение. Эта особенность растений позволяет исследовать экспрессию генов, введенных в организм.

Проведенные на растительных объектах исследования позволили установить целый ряд их преимуществ по сравнению с животными клетками (рис. 138).

Итак, благодаря интенсивному развитию методов исследования трансформации растений, как считают специалисты, назревает новая «молекулярно-генетическая революция».

Генетическая колонизация – способность фитопатогенов так влиять на метаболизм клетки-хозяина, что она начинает синтезировать такие вещества, которые могут утилизироваться только клеткой фитопатогена, т. е. фитопатоген заставляет клетку хозяина работать на себя.

Бактериоиды – ассоциаты, которые образуются между растениями.

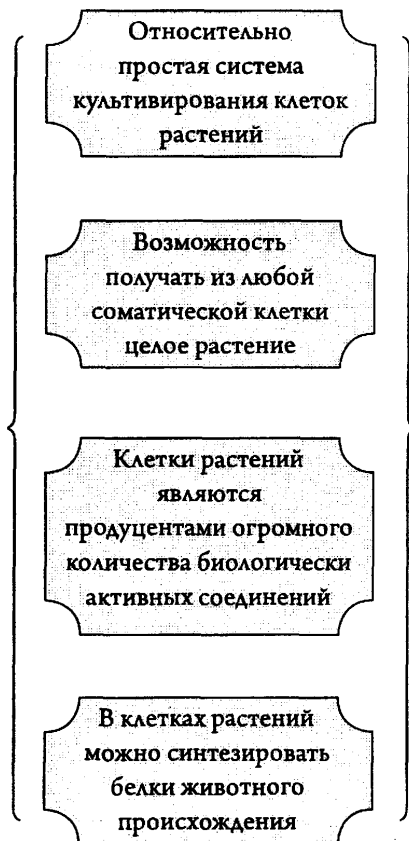


Рис. 138. Некоторые преимущества клеток растений по сравнению с клетками животных как объектов биотехнологии

Однако основой этих технологий являются фундаментальные знания организации и экспрессии генома растительных клеток.

Геном высших эукариот имеет сложную организацию. Это связано с существованием системы перестроек генома: таких как амплификации, делеции, транслокации и мутации не только в пределах хромосомы, но и между хромосомами. Важным инструментом исследования структурной организации генома стала методология молекулярного клонирования и секвенирования ДНК.

Характерной особенностью генома растений является многокопийность и наличие большого числа повторяющихся последовательностей ДНК, которые могут составлять до 75 % тотальной ДНК. Большое количество мультигенных семейств генов позволяет предполагать высокую нестабильность генома. Большая вариация в содержании ДНК у растений обусловлена преимущественно повторяющимися последовательностями. По характеру локализации повторяющиеся последовательности делят на три группы: 1 – тандемы близкородственных повторяющихся генов; 2 – семейства диспергированных повторов и 3 – мультигенные семейства.

Примерами мультигенных семейств генов являются гены, кодирующие запасные белки растений, гены рибосомальных РНК, актин цитоплазмы клеток. Цитоплазматический актин является компонентом цитоскелета клетки и обеспечивает движение цитоплазмы, внутриклеточный транспорт веществ, играет важную роль в клеточном делении.

Гены растений, которые интенсивно начали исследоваться в последние годы, имеют большое сходство с генами животных. Подобно другим эукариотическим генам, многие, но не все, содержат интроны, чаще всего 2-3 интрона на ген. Необходимо отметить, что в том случае, когда гены имеют интроны, все эти гены идентичны по двум основаниям интронов GT и AG. Наличие одинаковых динуклеотидов на стыке интрон/экзон у всех эукариотических генов может свидетельствовать о едином механизме сплайсинга РНК.

Гены растений как и все эукариотические гены содержат консенсусные сигналы транскрипции и процессинга. Для гена, кодирующего глутаминсинтетазу люцерны показано наличие ТАТА-блока (ТАТААТА) на расстоянии 25 нуклеотидных пар (н.п.) от стартового сайта транскрипции, потенциальный сигнал полиаденилирования (ААТААТАА) на расстоянии 20 н.п. от сайта полиаденилирования и терминальные динуклеотиды интронов (5'-GT...AG-3').

Консенсусы, характерные для генов животных найдены у многих изученных растительных генов. Так, последовательность ТАТА (ТАТА (А/Т) А (Т/А) присутствует в 5'-фланкирующей области многих растительных генов. Транскрипция генов обычно начинается в позиции примерно 30 н.п. левее ТАТА-блока. Дистанция от ТАТА-блока до кэп-сайта оценивается в 29-33 нуклеотида, что характерно для эукариот. Имеется в растительном геноме и другая консенсусная последовательность GC (С/Т) СААТСТ или СААТ-блок, которая участвует в регуляции транскрипции и располагается на расстоянии

Секвенирование ДНК – определение последовательности нуклеотидов в ДНК. Секвенирование основано на использовании методов, обеспечивающих разделение олиго- и полинуклеотидов, различающихся по длине всего на 1 нуклеотида, для этого можно использовать так называемый секвенирующий гель (полиакриламидный).

Актин – фибриллярный белок, который образует с миозином основу сократительного аппарата.

Интрон – транскрибируемый участок гена, не несущий информации для последовательности аминокислот в белке и который вырезается в результате сплайсинга.
Экзон – транскрибируемый участок гена, который несет информацию о первичной последовательности белка и входит в состав зрелых мРНК.

Сплайсинг – вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

Консенсусные – от слова согласие, единодушие, в данном случае – это согласованные, т.е. одинаковые для всех генов последовательности, являющиеся сигналами транскрипции и процессинга РНК.

80-100 нуклеотидов до кэп-сайта. Делеции в этом сайте сильно влияют на уровень транскрипции соответствующего гена.

Экспрессия генов и процессинг мРНК

Регуляция экспрессии генов направлена на поддержание концентрации соответствующих мРНК в цитоплазме и может осуществляться на всех уровнях от синтеза РНК до ее транспорта в цитоплазму.

Наличие регуляторных последовательностей ДНК определяет, где начнется транскрипция, и с какой частотой она будет осуществляться. В этих событиях принимают участие специфические регуляторные белки.

Синтезированная гетерогенная РНК подвергается сплайсингу, т. е. удалению интронов. Последовательности интронов вырезаются, и концы мРНК соединяются в строго определенных точках, окруженных последовательностями GU с 5'-конца и AG с 3'-конца.

Следующими этапами биогенеза мРНК является полиаденилирование, присоединение к 3'-концу цепочки поли (А), в которую может входить до 250 остатков (А). Наряду с полиаденилированием, мРНК подвергается кэпированию, т. е. образованию кэпа, состоящего из остатка 7-метилгуанозина, присоединенного к 5'-концу молекулы РНК 5'-5'-трифосфатной связью ($-CH_3-7mG$). Кэп блокирует 5'-конец мРНК.

Растительная мРНК подвергается метилированию, которое осуществляется образованием 5-метилцитозина.

Растительные метилазы узнают последовательности 5'-СХG-3', где Х может быть любым из четырех оснований.

Образовавшаяся в ядре мРНК транспортируется в цитоплазму.

Важным является то, что количество конечного продукта экспрессии (мРНК) может регулироваться в отличие от прокариот на всех уровнях биогенеза РНК.

Хотя этапы образования мРНК уже известны, задачи дальнейших исследований механизма экспрессии должны быть направлены на исследование детальных механизмов узнавания и функционирования промоторов, терминации и антитерминации, селективного метилирования, транспорта РНК и его контроля, механизма селективной дегградации мРНК.

Многие из этих фундаментальных вопросов функционирования механизмов экспрессии генома могут быть решены на основе использования современных методов рекомбинантных ДНК, культивирования и соматической гибридизации клеток.

Векторы на основе Ti-плазмид

Обнаружение естественной системы переноса генов в клетки растений с помощью Ti-плазмид привело к мысли о возможности их использования в качестве векторов. Исследование этого явления показало, что Ti-плазмиды переносятся и интегрируются в геном растительной клетки, они стабильно реплицируются в клетках

Промотор – участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза и это сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. Обычно промотор находится перед 5'-концом регуляторного гена.

Ti-плазмиды вызывают образование опухолей у растений (корончатые галлы). ДНК такой плазмиды встраивается в ДНК клетки-хозяина и стабильно наследуется ею.

высших растений, их транскрипционная активность и генетическая стабильность достаточно высоки, в них можно встраивать большие фрагменты ДНК и это не изменяет их способности интегрироваться в хромосомную ДНК. Учитывая то, что Ti-плазмиды имеют широкий спектр хозяев, они могут быть использованы как универсальные векторы при переносе чужеродных ДНК в клетки растений.

Ti-плазмиды обнаружены во всех вирулентных штаммах *Agrobacterium tumefaciens*, имеют размеры около 200-250 тыс. пар нуклеотидов. Ti-плазмиды имеют 4 области гомологии. Две области T-ДНК (transferred) и vir-область (virulence) связаны с опухолеобразованием, а две другие – обеспечивают конъюгационный процесс и репликацию плазмид в клетках агробактерий. Место встраивания T-ДНК в клеточную ДНК растений осуществляется случайно. Различные повторы T-ДНК могут быть разбросаны по геному растительной клетки.

Транскрипция T-ДНК в клетках растений осуществляется с образованием полиаденилированных мРНК. T-ДНК не содержит интронов. Она содержит гены, продукты которых препятствуют нормальной регуляции метаболических процессов, вовлеченных в синтез фитогормонов, что и приводит к онкогенному фенотипу.

Рассматривая требования к идеальной векторной системе, необходимо отметить, что она должна: 1) обеспечивать стабильную интеграцию передаваемых генов; 2) содержать маркеры, обеспечивающие трансформирование клеток; 3) не влиять на дифференцировку клеток и регенерацию растения; 4) иметь надежные способы введения Ti-плазмидных последовательностей с чужеродными генами в геном растительной клетки (рис. 139).

Исследование Ti-плазмид показало, что значительная часть интегрируемой T-области несущественна для индукции опухоли. Следовательно, утрата участков или встройка чужих генов, которые необходимо перенести в реципиентную клетку растения, не мешает процессу опухолеобразования, а удаление контролирующих опухолеобразование генов не влияет на механизм переноса и интеграции T-ДНК.

При модификации Ti-плазмид, направленной на конструирование вектора, необходимо предусмотреть наличие сайтов рестрикции, в которые будет производиться клонирование чужеродных фрагментов ДНК. Это осуществляется в результате встраивания в Ti-конструкции полилинкеров содержащих сайты узнавания рестриктазами *EcoR I*, *Hind III*, *BamHI* и др.

При конструировании векторов на основе Ti-плазмид необходимо включить в конструкцию промотор, который будет экспрессироваться в растительных клетках.

Для обнаружения экспрессии гена (генов), включенного в T-ДНК вектор, необходимо ввести селективный маркер, позволяющий различать трансформированные и не трансформированные растительные клетки.

Следовательно, Ti-плазмиды растений могут быть использованы как основа векторов растительных клеток.

Вирулентный – от слова ядовитый, болезнетворный, чаще всего это понятие используется по отношению к микроорганизмам способным вызвать заболевания.

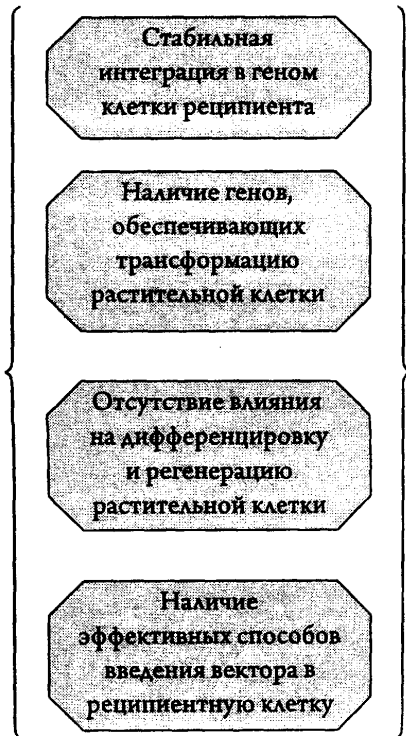


Рис. 139. Требования, которые необходимо соблюдать при выборе векторной системы.

Векторы на основе Ri-плазмиды

Agrobacterium rhizogenes

Бактерии *Agrobacterium rhizogenes* индуцируют заболевания косматого корня, подобно трансформирующему действию *A.tumefaciens*.

Плазмиды этих бактерий изучены в меньшей степени, чем Ti-плазмиды, и векторы на основе Ri-плазмид использовались в тех случаях, когда трудно регенерировать целое растение из отдельных клеток. Растения некоторых видов могут быть регенерированы из культуры корней, инфицированных *A. rhizogenes*, путем соматического эмбриогенеза или органогенеза. Регенерированные из косматых корней растения, часто морфологически измененные, имеют складчатые листья, низкорослы, а корневая система плагиотропна. Тепфер с сотрудниками [Тepfer D., 1984., Trulson A.J. et al., 1986], индуцировали косматые корни у томата и огурца с помощью штамма *A. rhizogenes*. Они провели скрининг растений с нормальным фенотипом среди регенерантов. Были получены растения, сохранившие бинарный вектор. Если бы эту технологию можно было распространить на большее число культурных растений, то в таком случае *A. rhizogenes* стал бы весьма перспективным в качестве вектора, однако Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* находят более широкое применение в качестве вектора.

Механизмы переноса T-ДНК

Поврежденные агробактерией ткани растений выделяют химические соединения, которые индуцируют транскрипцию *vir*-области (ответственную за вирулентность) Ti-плазмиды.

Одно из химических веществ, индуцирующих *vir*-область было идентифицировано как ацетосирингон [Stachels E., Nestcr E.W., Zambryski P.C., 1986]. Существует мнение, что действие эксудата поврежденной растительной клетки способствует тому, что продукт гена *vir A* узнает и взаимодействует с ацетосирингоном и этот сигнал передается внутрь клетки, где он активирует ген *vir G*. Белок, образующийся на гене *vir G*, активирует остальные гены вирулентности (*vir B, C, D и E*), все это повышает и уровень транскрипции *vir G*.

Индукция генов *vir* приводит к образованию одонитевых разрывов пограничных последовательностей длиной 25 п.п. фланкирующих T-ДНК. T-ДНК переносится в клетку растения (механизм не ясен), возможно, он аналогичен бактериальной конъюгации.

Цис-векторы Ti-плазмид

Любую клонированную ДНК можно перенести в геном клетки двудольного растения, используя Ti-плазмиды. Чужеродная ДНК, которую хотят перенести в клетку, должна быть фланкирована

Тepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium tumefaciens*:sexual transmission of the transformed geno-type and phenotype //Cell, 1984, 37, 959.

Trulson A.J., Simpson R.R., Shahin E.E. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. Appl.Genet. 1986, 73, 11-15.

Бинарный вектор – это двухплазмидная система *Agrobacterium*, которая предназначена для переноса участка T-ДНК, несущего клонированные гены в растительные клетки. Гены вирулентности локализованы на одной плазмиде, а встроенный участок T-ДНК – на другой.

концевыми последовательностями T-ДНК и стабильно поддерживаться в штамме агробактерий в цис- или трансположении (т. е. локализоваться на отдельной плазмиде, или «хелперной» плазмиде).

Цис-векторы представляют собой производные Ti-плазмид дикого типа, у которых удалены онкогены и заменены на фрагменты ДНК, имеющие области гомологии с клонирующим вектором, способным реплицироваться только в клетках *E. coli*. Этот подход основан на том, что в клетках *A. tumefaciens* происходит коинтеграция между гомологичными областями модифицированной Ti-плазмиды (*vir*-хелпер) и небольшим клонирующим (промежуточным) вектором *E. coli*, содержащим селективный маркерный ген, который предназначен для функционирования в растительных клетках. Для реализации этой стратегии сконструированный промежуточный вектор вводят в *A. tumefaciens* путем конъюгации. На следующем этапе, используя метод селекции, отбирают трансконъюгаты, у которых в результате гомологичной рекомбинации чужеродная ДНК стабилизировалась в составе T-ДНК. Обе границы T-ДНК могут находиться как на модифицированной T-ДНК, например у коинтегративного pGV3850, так и в промежуточном векторе. Может быть и третий вариант расположения границ, так как правая граница может находиться на промежуточном векторе, а левая граница T-ДНК на *vir*-плазмиде. Однако независимо от исходных положений границ конечный результат коинтеграции заключается в инсерции (*insertion sequences* – вставка последовательностей) последовательностей чужеродной ДНК между концевыми повторами T-ДНК в составе модифицированной Ti-плазмиды. Следовательно, в штаммах *A. tumefaciens*, содержащих такие генетические конструкции, во время трансформации T-ДНК переносится в геном растения в результате действия *vir*-области в положении цис.

Транс-векторы Ti-плазмид

Транс, или бинарные векторы конструируются на основе плазмид, содержащих последовательности границ T-ДНК и способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях. Эти векторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы последовательности границ фланкировали множественные сайты для клонирования, позволяющие осуществить инсерцию чужеродной ДНК, и маркеры, обеспечивающие прямую селекцию трансформированных растительных клеток. Это позволяет манипулировать с плазмидами в *E. coli* (на них отработана технология), а затем эти плазмиды можно переносить в штаммы агробактерий, которые содержат Ti-плазмиду. Последующая инсерция растения штаммом *A. rhizogenes*, который несет бинарный вектор, приведет к переносу в геном растения не только T-ДНК *A. rhizogenes*, но также и T-ДНК бинарного вектора.

Примером широко используемого бинарного вектора является вектор pBin19, полученный на основе репликона pR12252 с широким кругом хозяев.

Гомологичный – происходящий из **ОДНОГО ИСТОЧНИКА**, или имеющий сходную структуру или эволюционное происхождение.

Бинарная векторная система – двух-плазмидная система *Agrobacterium*, предназначенная для переноса участка T-ДНК, несущего клонированные гены в растительные клетки. Гены вирулентности локализованы на одной плазмиде, а встроенный участок T-ДНК – на другой.

Агробактерии – род граммотрицательных аэробных бактерий: 4 вида; обитают в почве, главным образом в ризосфере. Способны вызывать образование галлов (опухолей) у многих растений. Патогенность агробактерий обусловлена наличием в их клетках плазмид. На основе этих плазмид создают векторы, которые используются в генетической инженерии для введения чужеродных генов в клетки растений.

Выбор векторной системы для эксперимента по трансформации зависит от многих факторов и в частности от цели эксперимента и вида используемых растений. Ни одна из векторных систем не является универсальной и не может использоваться во всех случаях.

При выборе векторов необходимо учитывать следующие особенности:

1. Бинарные векторы легче переносятся из *E.coli* в агробактерии, чем коинтегративные векторы (цис-тип). Часто в агробактериях обнаруживается несколько копий бинарных векторов, тогда как векторы цис-типа обычно присутствуют в одной копии.

2. Известно, что штаммы агробактерий дикого типа обладают различной вирулентностью к разным видам двудольных растений, что необходимо учитывать при трансформации.

3. Недавно была описана супервирулентность Ti-плазмид (pTiB) у штамма *A. tumefaciens* [Komari T. et al., 1986]. Этот штамм индуцировал быстро развивающиеся опухоли у более широкого круга хозяев, что может позволить увеличить эффективность трансформации и расширить круг объектов для трансформации.

Поиск оптимальных схем трансформаций пока определяют эмпирически.

Komari T., Halperin W., Nester E.W. Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing plasmid pTi Bo542 // J. Bact., 1986, 166, 88-94.

Эмпирически – т.е. опытным путем, знания полученные в результате опыта, чувственных восприятий.

Трансформация клеток двудольных растений с помощью Ti-плазмид

Agrobacterium tumefaciens и Ri-плазмид *A. rhizogenes*

Первые векторы на основе Ti- и Ri-плазмид были сконструированы в 1962 г. для сравнительно небольшого числа растений. Большинство модельных экспериментов проведено на *Nicotiana tabacum*. Это объясняется тем, что в культуре клеток табака эффективность трансформации достаточно высока, и относительно легко можно осуществить регенерацию трансформированных растений. Для большинства двудольных растений не решена проблема селекции тканей, трансформированных неонкогенными T-ДНК, и еще сложнее получить трансформированные побеги из этих клеток.

Необходимо отметить, что, несмотря на то, что опухоли корончатых галлов способны расти на питательной среде, не содержащей фитогормонов, и, следовательно, обогнать в росте нетрансформированные клетки, что является хорошим селективным маркером трансформированных клеток, онкогенные клетки корончатых галлов не способны регенерировать в целое трансформированное растение. Это, несомненно, ограничивает применение данного метода.

Еще одним недостатком в использовании системы агробактерий при трансформации является неспособность трансформировать злаковые. Причина подобного ограничения круга хозяев в настоящее время непонятна. Возможно, это связано с отсутствием участков узнавания для бактерий на поверхности

клетки, или неспособностью *vir*-генов функционировать в клетках однодольных.

Вместе с тем, система агробактерий эффективно используется при трансформации клеток табака, льна и моркови.

Индукция трансформации векторами на основе агробактерий

Индукция корончатого галла и косматого корня агробактериями происходит в местах механического повреждения растительной ткани. Именно в участках повреждения появляются компетентные для трансформации клетки. Клетки являются компетентными короткое время. Это время S-периода клеточного цикла, в это время происходит удвоение ДНК. Повреждение растительных тканей сопровождается следующими событиями: 1 – обеспечивается доступ бактерий к участкам узнавания на поверхности растительных клеток; 2 – индуцируется клеточное деление; 3 – стимулируется образование в раневой поверхности ряда веществ, например ацетосирингона, которые активируют *vir*-гены, что необходимо для переноса Т-ДНК (рис. 140).

Следовательно, для обеспечения трансформации клетки растения должны находиться в S-фазе и быть компетентными для вирулентных агробактерий.

Селекция трансформированных клеток

Селекция опухолей корончатых галлов или косматого корня достаточно простая операция, так как злокачественные клетки образуют наросты на поверхности эксплантата. Исследования этого явления показали, что трансформированные клетки происходят из одной или нескольких исходно трансформированных клеток в области раневой поверхности, т. е. они имеют клональное происхождение.

В современных векторных системах, сконструированных на основе Ti-плазмид, таких как pBin 19/p AL4404 и p GV 3850::1103, опс-гены замещены на гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам. Такие векторы являются неонкогенными, иногда их называют «разоруженные». В таком случае селекция трансформантов такими векторами основана на селективных средах, содержащих соответствующие антибиотики или гербициды. Трансформированные клетки (и, следовательно, содержащие гены устойчивости к антибиотикам) способны расти на питательных средах, содержащих соответствующие антибиотики, а нетрансформированные клетки погибают (рис. 141).

Из резистентных к антибиотикам клеток можно регенерировать целые растения, используя стандартные методы культуры растительных тканей. Однако это сопряжено с некоторыми методическими трудностями. В отличие от индукции корончатого галла или косматого корня, которые нетребовательны к питательной среде,

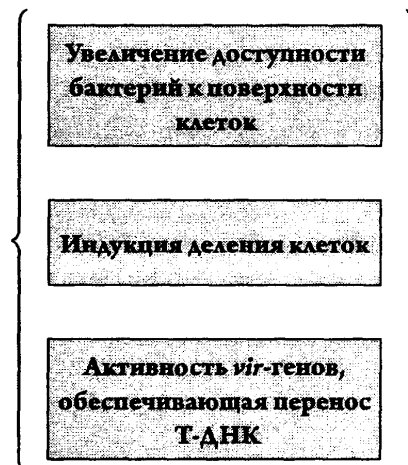


Рис. 140. Некоторые события, которые происходят в поврежденных клетках растений.

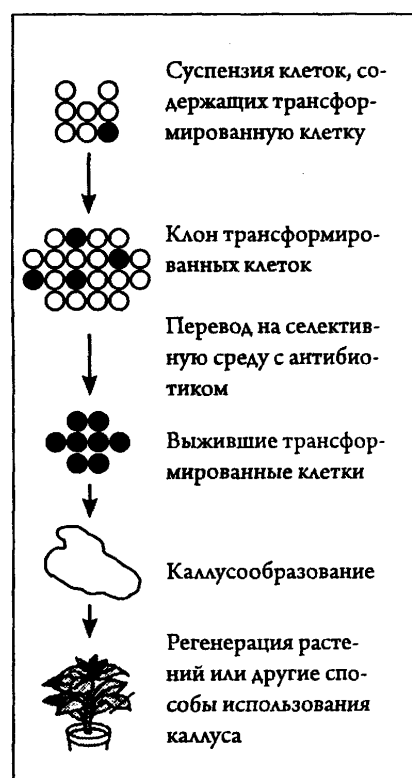


Рис. 141. Схема селекции трансформированных растительных клеток.

неонкогенные трансформированные клетки растут только в ростовых средах определенного состава, содержащих фитогормоны. Такие среды подбирают эмпирически для каждого вида растений, так чтобы в них поддерживалось образование каллуса.

Прямая регенерация трансформированных растений на примере табака

Регенерировать побеги легче из эксплантатов, чем из тканей, полученных из протопластов или длительно культивируемых (адаптированных) каллусов. Приведенная методика трансформации основана на использовании листовых дисков *Nicotiana tabacum*. Срезы листовых пластинок табака не содержат покоящихся почек или преформированных зачатков органов, а, следовательно, большинство побегов, формирующихся с края среза, формируется из дедифференцированных клеток, которые чувствительны к трансформации агробактериями. Многие другие типы эксплантатов содержат покоящиеся меристемы или почки и могут преимущественно продуцировать зачатки побегов из меристемы камбия или других глубоких слоев клеток эксплантата, которые не чувствительны к агробактериям. В таком случае используют другой подход к регенерации трансформированных побегов.

Необходимо отметить, что метод листовых пластинок применим не ко всем видам растений, так как его воспроизводимость зависит от способности эффективно регенерировать побеги из дедифференцированных побегов.

При культивировании на соответствующих срезах листовые диски быстро переходят к формированию каллуса в области срезанных краев эксплантата. Если такие эксплантаты поместить в среду для регенерации побегов, то в течение 10-15 дней появляются побеги вместе с сопутствующим каллусом. Срезы, которые стимулируют регенерацию из листовых дисков, имеют высокие отношения цитокининов к ауксинам.

Укоренение трансформированных побегов

В качестве селективных сред используют содержащие антибиотики среды, ген устойчивости которых был встроен в вектор. Как правило, дифференцированные структуры (побеги) менее чувствительны к селективным агентам (канамицину или другим антибиотикам) чем протопласты или каллус, что затрудняет процесс селекции. Однако показано, что корни обладают большей чувствительностью к антибиотикам, по сравнению со стеблями, эта особенность и используется при селекции, т.е. способность побега укореняться на среде с антибиотиком является серьезным аргументом в пользу трансформированной природы этого побега. Этапы получения трансформированных побегов описаны в таблице (табл. 31).

1. Молодые листья (только распуштившиеся) табака помещают в стерильный сосуд и заливают стерилизующим раствором (Domestos -10 %, он содержит 1 % активного хлора и эквивалентен 1 % раствору гипохлорида калия или натрия), удаляют пузырьки воздуха стерильным шпателем. Инкубируют 15 мин.

2. Листовую пластинку ополаскивают 4-5 раз в 400 мл стерильной водопроводной воды.

3. В стерильных условиях удаляют поврежденные (белые) участки листьев и среднюю жилку и нарезают лист на квадраты (0,5-1 см²). На каждую чашку Петри со средой MSD4x2 помещают 10 кусочков листа и чашку герметизируют липкой лентой.

4. Чашки инкубируют 2 суток при 24-26 °С при низкой освещенности (2 клк) с фотопериодом 16 ч.

5. Кусочки листа переносят в чашки со штаммами агробактерий (суспензию штамма агробактерий разводят 1:50), стряхивают избыток жидкости и помещают кусочки листа на исходную чашку с MSD4x2. Вновь обматывают края чашки липкой лентой и инкубируют еще 2-4 дня при 24-26 °С при слабом освещении (0,2-4 клк).

6. Спустя 2-4 дня инкубации с агробактериями переносят на новые среды (MSD4x2 + C_x + K_m и MSD4x2 + C_x):

7. Инкубируют чашки при 24-26 °С и низкой освещенности и наблюдают за развитием побегов и каллуса.

Следующим этапом процедуры трансформации является перенос появившихся побегов на селективную среду для укоренения и выявления трансформированных побегов.

Табл. 31. Этапы получения трансформированных побегов.

Селективная среда – такая среда, использование которой обеспечивает не только рост культуры, но и селекцию, т.е. рост только отбираемых экспериментатором клеток.

Размножение трансформированных побегов

Полученные побеги можно выращивать в компосте, выращивать их фототрофно и размножать, используя полный цикл развития, т. е. через семена.

Однако может получиться так, что после длительной и трудоемкой работы удастся получить всего несколько растений. Это связано с тем, что многие полученные таким способом побеги (гетеротрофные побеги) не способны к интенсивному фотосинтезу, а их рост определяется наличием питательных веществ, находящихся в культуральной среде. Экспериментально показано, что эти растения очень восприимчивы к поражению грибами.

В связи с этим, чаще прибегают к вегетативному размножению (табл. 32) такого материала – размножение с помощью пазушных почек. В качестве еще одного примера рассмотрим такие этапы работы:

1. Укоренившиеся побеги удаляют из среды и помещают на стерильную поверхность.
2. Разрезают стебель на несколько частей так, чтобы каждый из них содержал пазушную почку. Листья срезают, оставляя короткие отрезки – 2-3 мл.
3. Погружают полученные срезы в среду так, чтобы пазуха находилась на уровне поверхности среды. MSK (это типичная среда для размножения, содержащая небольшое количество цитокинина – никотина, который стимулирует развитие пазушных побегов. Без цитокининов развивается только апикально доминирующий побег. Полученные таким способом побеги не являются адвентивными, а представляют собой генетические клоны трансформированного побега. В среду размножения необходимо включить антибиотики, что позволит удалить оставшиеся агробактерии.
4. Срезы инкубируют при 24-26 °C и умеренной освещенности (3-4 клк). Спустя 2-3 недели из пазухи развивается один или несколько побегов. Пазушные побеги можно размножать этим способом и дальше их укоренять.

Для ускорения побегов в компост используют побеги 3-5 см. Для этого смывают с корней агар и переносят растения в горшок с компостом, удаляют несколько нижних листьев и присыпают стебель компостом на 1-2 см, что позволяет сохранить прямостоячий кончик.

Чтобы не допустить пересыхания растения его как можно быстрее переносят в теплицу или влажное помещение. Эти растения выращивают при освещенности 15 клк, пока они не адаптируются, после этого их переносят в обычную теплицу. Появившиеся цветы трансгенных растений закрывают мешочками, чтобы избежать перекрестного опыления и попадания трансформированной пыльцы в окружающую среду.

Генетическая трансформация растений на стадии каллуса

Методы генетической трансформации растений чаще всего сводятся к подбору эксплантатов, способных эффективно

1. Срезают побеги, достигшие не менее 0,5 см, и удаляют каллус.
2. Подрезают нижнюю часть побега так, чтобы осталась верхушечная почка и 2-3 листа с пазушными почками, и переносят их на среду для укоренения (не допускать подсыхания побегов!).
3. Побеги помещают в агар со срезами MSO + C_x и MSO + C_x + K_m и инкубируют при 24-26 °C и средней освещенности (4 клк).
4. Для подтверждения положительных результатов селекции на трансгенность, параллельно проводят побеги, которые не подвергались трансформации.
5. В дальнейшем наблюдают за процессом укоренения. Если побеги успешно укоренятся на срезе с канамицином (или другим антибиотиком, ген которого был использован при конструировании вектора), то это указывает с большой вероятностью, что они трансформированы.

Табл. 32. Пример методики по укоренению побегов, полученных из каллуса.

регенерировать побеги. Для этого подбирают эксплантат и комбинацию сред, способных обеспечить регенерацию растений путем органо- или эмбриогенеза. К сожалению, пока невозможно предсказать условия необходимые для эффективной регенерации побегов у разных видов. Не существует единых правил оптимизации питательных сред для регенерации и состав среды устанавливается только эмпирическим путем.

Установлено, что в большинстве случаев побеги возникают путем формирования зародышей в глубоких клеточных слоях ткани исходного эксплантата. А так как эти клетки (глубоко погруженные в эксплантат) не доступны для агробактерий, то они не чувствительны к трансформации. Такая особенность затрудняет получение генетически трансформированных растений.

Достаточно часто на эксплантатах образуется каллус, в котором могут развиваться зачатки побегов.

Такой каллус, формирующийся в местах повреждения эксплантата может быть трансформирован агробактериями, и после удаления из ткани первоначального эксплантата и переноса на свежую среду регенерировать в селективных условиях.

В качестве примера приведем методику трансформации растений льна на основе получения каллуса. Основные этапы работы следующие: 1 – определяют способность различных эксплантатов регенерировать побеги; 2 – подобранные эксплантаты инокулируют агробактериями; 3 – отбирают трансформированные каллусы; 4 – регенерируют побеги из трансформированных каллусов (рис. 142).

На первом этапе выращивают стерильные проростки льна. Стерильные проростки являются удобным источником растительного материала для экспериментов по трансплантации, так как не требуют сложных сред для размножения. Проростки содержат гетерогенную систему легко эксплантируемых ювенильных тканей, образование каллуса и регенерация побегов из проростков достаточно эффективна для многих видов растений.

1. Семена стерилизуют в 10 % растворе Domestos или подобном коммерческом отбеливателе, встряхивая семена, чтобы они не прилипали друг к другу или к посуде.
2. Семена тщательно ополаскивают 6 раз стерильной водопроводной водой. Стерильным шпателем переносят семена в сосуд с вермикулятом, смоченный раствором Хогланда, закрывают крышкой и инкубируют при 24-26 °С при освещенности 4 клк с фотопериодом 16 ч.
3. Спустя два дня после прорастания проростки переносят в чашки Петри. Нарезают эксплантаты гипокотыля длиной 1-2 мм и помещают по 15-20 таких эксплантатов на среду MSD4x2. Инкубируют на свету 4 клк при 24-26 °С.
4. Наблюдают за образованием каллуса. Образование каллуса можно индуцировать по краям среза гипокотыля льна, а бактериостатический агент цефатаксим не влияет на нормальное развитие каллуса и эти клетки представляют источник компетентных клеток для трансформации агробактериями.

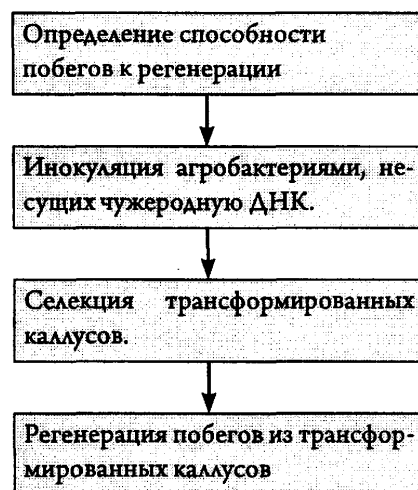


Рис. 142. Этапы получения трансгенных растений из трансформированного каллуса.

Состав среды MSO, которая используется для укоренения побегов, получения проростков, культивирования опухолей и соматического эмбриогенеза моркови.

Компоненты	Концентрация мг/л
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KI	0,830
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
MgSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600
FeSO ₄	27,850
NaЭДТА	37250
Глицин	2,000
Инозитол	100
Никотиновая к-та	0,5
Пиридоксин HCl	0,5
Тиамин HCL	0,1
Сахароза	30000

5. Для трансформации готовят две чашки Петри: одну, содержащую 20 мл разведенной в 50 раз культуры агробактерий C58C1 (pGV3858::1103) в среде MSD4x2, другую – контрольную, содержащую 20 мл MSD4x2, и в каждую переносят по 40 сегментов гипокотилей.
6. Чашки оставляют на 2 ч в ламинарном боксе.
7. Переносят стерильным пинцетом инокулированные и неинокулированные сегменты на чашки с агаризованной средой MSD4x2 и обматывают края чашек липкой лентой.
8. Инкубируют чашки при 24-26 °C с фотопериодом 16 ч и освещенностью 3-4 как до 2-х суток. После чего до появления колоний агробактерий переносят на среду, содержащую антибиотик.
9. Переносят стерильным шпателем сегменты на чашки со средой MSD4x2 + C_x (контрольный вариант), а сегменты с другой чашки на среду MSD4x2 + C_x + K_m (селективная среда с канамицином). Обматывают края чашек липкой лентой и инкубируют, как описано в п.8. Наблюдают за развитием побегов и каллуса.
10. Осторожно срезают каллус с инокулированных эксплантатов, переносят на свежую селективную среду (MSD4x2 + C_x + K_m) и инкубируют при 24-26 °C и 3-4 как в течение 2-6 недель с 16-часовым фотопериодом.
11. Отмечают регенерацию побегов на селективной среде с канамицином (K_m) и контрольные каллусы. Необходимо учитывать, что большинство каллусов, формирующихся на селективной среде, может лишь частично состоять из трансформированных, резистентных к антибиотику клеток. Для окончательного решения вопроса об эффективности трансформации необходимо определить наличие Т-ДНК или маркерных ферментов, доказывающих наличие трансгена.

Генетическая трансформация протопластов и гомогенных эксплантатов

В экспериментах по трансформации векторами можно использовать не только побеги и каллус, но и отдельные клетки (протопласты) или малые гомогенные эксплантаты. Этот подход иногда называют методом совместного культивирования агробактерий с многочисленными популяциями дедифференцированных растительных клеток.

Для малых гомогенных эксплантатов характерно:

1. Популяции протопластов или клеточные агрегаты обычно гомогенны по типу клеток.
2. Большинство клеток в культуре доступно для контакта с агробактериями и могут эффективно трансформироваться.
3. Легче осуществлять селекцию таких трансформированных клеток, их можно культивировать в жидкой среде, высевать на агаризованные среды или заплывать их в агар.
4. Для ускорения роста отдельных клеток можно использовать фидерный слой (слой пеньки), что позволяет обеспечить им

А. Контроль регенерации клеточной стенки с помощью тинопала

1. Готовят насыщенный раствор *tinopal* в дистиллированной воде, хранят в темноте при 4 °C.
2. Добавляют 0,1 мл насыщенного раствора *tinopal* к 20 мл CPW9M и перемешивают [CPW9M -соли (в мг/л: KH₂PO₄ – 27,2; KNO₃ – 101,0; MgSO₄ · 5H₂O – 246,0; KI – 0,160; CuSO₄ · 5H₂O – 0,025; CaCl₂ · 2H₂O – 1480) с добавлением 9 % (все на объем маннитола). Этот раствор стерилизуют фильтрованием и хранят в холодильнике несколько месяцев.
3. Смешивают одну каплю полученного раствора 2 с каплей суспензии и протопластов на предметном стекле и накрывают покровным стеклом, инкубируют 5 мин при комнатной температуре.
4. Препарат просматривают под микроскопом с флуоресцентной приставкой, возбуждая флуоресценцию при 330-380 нм. См. продолжение на следующей странице.

эффективный рост и увеличить вероятность эффективной селекции трансформированных колоний.

5. Колонии клеток, полученные из протопластов, клонально чистые и полученные из этих клеток побеги не будут химерными.

Вместе с тем, этот подход также сопряжен с некоторыми методическими трудностями, так как пока не разработаны системы надежного и эффективного выращивания протопластов. Продолжительное культивирование растительных клеток *in vitro* в недифференцированном состоянии может приводить к необратимым изменениям генотипа. Получение мезофильных протопластов табака и суспензионная культура клеток моркови являются модельными экспериментами. Для многих видов сельскохозяйственных растений этот подход пока не разработан.

Трансформация протопластов агробактериями

Как уже отмечалось, растительный протопласт – клетка с удаленной клеточной стенкой. Культивируемые протопласты являются популяцией однотипных клеток, которые могут быть трансформированы. Термин «трансформация» означает введение чужеродной ДНК в клетку и это необязательно приводит к опухолевому фенотипу.

Трансформация протопластов может быть осуществлена различными способами. В этом разделе мы рассмотрим возможности их трансформации с помощью агробактерий. Использование растительных протопластов в качестве клеток-мишеней позволяет использовать методологию трансформации, разработанную для бактериальных клеток, клеток дрожжей или клеток млекопитающих. В таком случае миллионы клеток растений подвергаются одновременному действию трансформирующих бактерий. При использовании определенных сред протопласты регенерируют клеточные стенки, образуют клеточные скопления и способны регенерировать целые растения, как и в случае с каллусом (табл. 33).

Для успешной работы по трансформации протопластов необходимо контролировать ключевые стадии развития протопластов. Это позволит, во-первых, определить осуществляется ли нормальное развитие протопластов и, во-вторых, определить момент компетентности клеток к агробактериям, т. е. определить момент внесения в культуру агробактерий. Увеличение размеров протопластов, миграцию хлоропластов, первое и второе деление легко проследить, используя фазово-контрастный микроскоп. За процессом регенерации клеточной стенки, делением клеток наблюдают под флуоресцентным микроскопом, используя для этого соответствующие красители, избирательно окрашивающие клеточные стенки или нуклеиновые кислоты. Такой анализ позволяет определить стадию компетентности.

Стадия компетентности совпадает с первым клеточным делением в ответ на механическое повреждение. Раневой ответ можно имитировать в культуре клеток, если индуцировать регенерацию клеточной

Б. Визуализация ядер протопластов акридиновым оранжевым

1. Готовят раствор акридинового оранжевого. Для этого 10 мг красителя растворяют в 4 мл 50 мМ глицин-NaOH-буфера pH 8,5 и смешивают с 6 мл CPW13M (солевой раствор с добавлением 134 % маннитола) хранят в темноте при 4 °С.

2. Добавляют одну каплю р-ра акридинового оранжевого, к 3 мл суспензии протопластов и инкубируют 15 мин в темноте при комнатной температуре.

3. Для изменения фона протопласты отмывают центрифугированием (400 g в течение 5 мин) и ресуспендируют осадок в среде CPW9M.

4. Просматривают протопласты в УФ-микроскоп, как описано в варианте А.

Табл. 33. Метод контроля развития растительных протопластов флуоресцентного окрашивания.

Флуоресценция – свечение, которое обусловлено спонтанным квантовым переходом молекул или атомов. Флуоресценция определяется временем жизни на возбужденном уровне.

стенки у протопластов. Клетки являются компетентными для трансформации тогда, когда в них начинается синтез ДНК. Показано, что репликация ДНК в растительных протопластах начинается одновременно с регенерацией клеточной стенки во время первого деления. Однако клетки в это время еще недостаточно адаптированы и целесообразно проводить инокуляцию агробактериями, когда клетки вступят во второй период синтеза ДНК. Для мезофильных протопластов табака эта стадия наступает через 6-8 дней от начала культивирования.

Технология трансформации протопластов сводится к совместному культивированию протопластов и агробактерий в соответствующей жидкой питательной среде. Варьируя условия культивирования, концентрацию протопластов и процедуру селекции (как правило, эти параметры для каждого вида устанавливаются эмпирически), можно получить трансформированные клетки клонального происхождения.

Основные этапы методики проведения трансформации приведены в таблице:

1. Ежедневно просматривают культуру протопластов в инвертированном микроскопе, при этом оценивают формирование клеточной стенки и первое деление. Чтобы увидеть формирование клеточных пластинок протопласты окрашивают тинопапом. Когда 20-30 % клеток завершат первое клеточное деление, культуру готовят к инокуляции агробактериями.
2. Стерильной пастеровской пипеткой к культуре протопластов добавляют две капли культуры штамма *Agrobacterium* LB4404 (pBin19) в соотношении около 100 бактерий на протопласт.
3. Чашку Петри накрывают и края обматывают клейкой лентой и инкубируют 36-48 ч при 24-26 °С в темноте. Обязательно ставят контроль – неинокулированную культуру. Во время совместного культивирования растительных и бактериальных клеток может образоваться пленка растительных клеток, связанных с бактериями. Эти агрегаты необходимо разрушить, чтобы отобрать полученные трансформанты и удалить агробактерии.
4. Разрушают агрегаты растительных клеток осторожным пипетированием. Клетки переносят в центрифужные пробирки и осаждают их центрифугированием при 500 об/мин в течение 5 мин.
5. Осадок клеток ресуспендируют в 5 мл среды MSP1 7М, содержащей 1 мг/мл карбенициллина (или другого антибиотика) в зависимости от используемого штамма агробактерий и вновь центрифугируют.
6. Ресуспендируют осадок в 5 мл жидкой MSP1 7М, содержащей антибиотик, клетки высевают на чашку с 5 мл агаризованной (0,8 % агара) среды MSP1 7М с антибиотиком.
7. Спустя 7-10 дней культивирования (24-26 °С) клетки переносят на среду MSP1 3М с антибиотиком и культивируют до начала селекции, как правило, – это 6-8 дней.

Селекция трансформированных агробактериями клеток может осуществляться двумя способами. Это определяется особенностями используемых векторов. Так, если вектор содержит онкогены

Клональное происхождение
имеют клетки, которые произошли от одного клона.

Среда MSP1 7М

Аналогична среде MSO, но содержит еще:

Нафтиауксусную кислоту – 2мг/л (НУК);

G-бензиламинопурин – 0,5 мг/л (6-БАП).

Готовят ее так: НУК – растворяют 500 мг НУК в 20 мл 50 % этанола и добавляют 80 мкл к 1N среде MSO.

6-БАП: Растворяют 126 мг 6-БАП в 1,0 мл 1M HCl, добавляют 99 мл дистиллированной воды и стерилизуют ультрафильтрацией. Добавляют 400 мкл этого раствора к 1 л MSO.

Среды MSP1 9М, 7М, 3М используют для культивирования протопластов *N.tabacum*. К MSP1 добавляют маннитол соответственно до 9 %, 7 % или 3 % (масса на объем).

(опс+-вектор), то клетки переносят на среду, не содержащую гормоны, и в этих условиях сохраняются только трансформированные клетки. В том же случае, если в вектор (опс-) включены доминантные селективные маркерные гены устойчивости к антибиотикам, то клетки выращивают на среде с добавлением соответствующих антибиотиков. В таких селективных средах остаются только трансформированные растительные клетки.

На этапе селекции необходимо учитывать то, что собственная устойчивость колоний растительных клеток к антибиотикам зависит от размера (возраста) колоний, как правило, она выше с увеличением возраста. Этапы проведения этой работы описаны в таблице 34.

Ограничения методов трансформации с помощью агробактерий

Использование векторов на основе плазмид агробактерий при трансформации растительных клеток уже позволили получить интересные практические и важные теоретические результаты. Векторы на основе агробактерий продолжают совершенствоваться что, вероятно, позволит расширить области их применения. Вместе с тем, этот подход при получении трансгенных растений имеет и серьезные ограничения (рис. 143).

Прежде всего, это связано с относительно узким кругом хозяев для агробактерий. Агробактерии не способны трансформировать клетки однодольных растений, а, как известно, к ним относятся злаковые, это большая часть культурных растений, используемых в пищу. Причина такой избирательности агробактерий еще не ясна. Это может быть связано или с отсутствием мест узнавания для агробактерий на поверхности клетки или же с тем, что *vir*-гены или их продукты не могут функционировать в клетках однодольных. Более того, некоторые виды культурных двудольных растений также не трансформируются агробактериями.

Еще одно ограничение этого подхода связано с проблемами регенерации растений из клеток, культивируемых *in vitro*. Необходимо отметить, что не все растительные клетки легко регенерируют целые растения. Для получения трансгенных растений необходимо трансформировать агробактериями клетки или ткани, способные к регенерации, но часто они не доступны для агробактерий, например, клетки семязачки.

Нельзя не остановиться и на методических трудностях трансформации растительных клеток векторами на основе T1-плазмид. Для получения полноценного трансформирующегося вектора необходимо провести сложный комплекс экспериментов *in vitro*. В зависимости от того, становятся ли гены частью коинтегративной или бинарной векторной челночной плазмиды (коинтегративная система) либо плазмиды с широким кругом хозяев (бинарная система).

После этого полученную векторную систему вводят в *E.coli*, где она клонируется, и потом переносят в агробактерии, используя конъюгацию, которую называют трехродительским скрещиванием.

1. Микроколонии переносят в стерильные центрифужные пробирки стерильной пастеровской пипеткой и осаждают их центрифугированием при 5000 об/мин 13 мин.
2. Отмывают клетки стерильной культуральной средой MSP1 и ресуспендируют их в 10 мл этой среды.
3. Подсчитывают клетки в суспензии под микроскопом и переносят их на агаризованную среду для селекции трансформантов. Для этого распределяют микроколонии в капельках на необходимое число чашек. Быстро добавляют 7 мл селективной среды (например, MSP1 + канамицин, 40 °C) и чашку покачивают на поверхности стекла ламинарного бокса, чтобы колонии равномерно распределились, пока среда не застынет.
4. Края чашки обматывают клейкой лентой и инкубируют на свету (4-5 клк) при 24-26 °C, в течение 3-6 недель, наблюдают за ростом резистентных к канамицину колоний и оценивают частоту трансформации.
5. Когда трансформированные колонии достигнут в диаметре 1 см, каждый каллус переносят на среду для регенерации (например, MSD4x2+Km) в стандартные чашки Петри.
6. Инкубируют при 24-26 °C и освещенности 4-5 клк 2-4 недели. Регенерированные побеги размножают, укореняют и выращивают до созревания.

Табл. 34. Этапы селекции трансформированных растений.

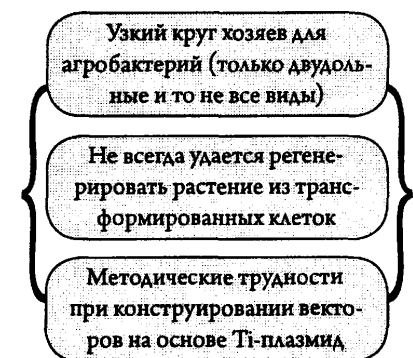


Рис. 143. Некоторые ограничения трансформации клеток растений агробактериями.

Векторы с широким кругом хозяев, как правило, относительно нестабильны, а это требует поддержания их под селективным давлением.

И, наконец, трехродительское скрещивание мало эффективно и требует использования сложных методов селекции трансконъюгантов (в частности, блоттинг-гибридизацию по Саузерну), чтобы подтвердить, что коинтергация осуществилась успешно.

Для устранения этих методических трудностей разрабатываются альтернативные методы трансформации растительных клеток, которые можно назвать «прямой перенос генов в растительные клетки» (табл. 35).

Методы прямого переноса генов в растительные клетки

Трансформация протопластов с использованием полиэтиленгликолей

Для оценки эффективности захвата реципиентности клетками они используют метод дот-блот-гибридизации: (табл. 36).

При непосредственном переносе ДНК (в форме вектора) в клетку необходимо решить две основные задачи: обеспечить защиту вектора от эндонуклеаз и захват вектора клеткой.

Культивируемые протопласты экскретируют (выделяют в среду) нуклеазы, которые влияют на сохранение структуры вектора и эффективность его проникновения в клетки. Поэтому эти эксперименты проводят с использованием $ZnCl_2$ или высоких значений рН (около 10), которые ингибируют растительные протеазы. Еще одной формой защиты ДНК от действия нуклеаз является заключение (инкапсуляция) ДНК в липосомы.

Обеспечение захвата ДНК клетками достигается использованием соединений, стимулирующих эндоцитоз или проникновение ДНК по другому механизму. Наибольшее распространение при этом получил полиэтиленгликоль (ПЭГ). Высокомолекулярный полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000) при добавлении его к протопластам в концентрациях 25-30 % является стимулятором эндоцитоза протопластов и приводит к агрегации протопластов. Механизм действия ПЭГ на эти процессы окончательно не выявлен.

Как известно, мембрана клеток имеет отрицательный заряд, нуклеиновые кислоты (благодаря фосфатным группам) также несут отрицательный заряд, что приводит к взаимному отталкиванию ДНК и протопластов. Полиэтиленгликоль

1. Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000) (химически стимулированный эндоцитоз).
2. Трансформация протопластов с помощью электропорации.
3. Трансформация растительных клеток методом микроинъекций ДНК.
4. Введение ДНК в протопласты с помощью липосом.
5. Трансформация методом биологической баллистики.

Табл. 35. Методы прямого переноса ДНК в растительные клетки.

Оценка количества векторов, захваченных клеткой методом дот-блот-гибридизации

1. Для выделения ДНК аликвоты суспензии клеток (1-3 мин) переносят в пробирку Эппендорфа и осаждают центрифугированием.
2. Протопласты лизируют быстрым пипетированием в 250 мкл 3х СТАВ буфера для экстракции (СТАВ от англ. Cetel triethylammonium bromide). Однократный СТАВ буфер имеет состав: 50 мл трис-НCl, рН 8,0; 0,7 М NaCl; 10 мМ ЭДТА; 1 % СТАВ (масса/объем), 20 мМ 2 меркаптоэтанол. Инкубируют при 46 °С 10 мин.
3. После остывания добавляют 500 мкл смеси хлороформ:октанола (24:1) и перемешивают.
4. Образец центрифугируют (5 мин, 10000 об/мин). Верхний слой (водная фаза) отбирают и переносят в чистую пробирку Эппендорфа.
5. К водной фазе добавляют 60 мкл 10-ного СТАВ-буфера, перемешивают и повторяют экстракцию смесью хлороформ: октанола (24:1). Центрифугируют и собирают водную фазу. К водной фазе добавляют еще 600 мкл СТАВ-буфера и оставляют при комнатной температуре на 20 мин для осаждения.
6. Осадок нуклеиновых кислот собирают центрифугированием.
7. Осадок растворяют в 400 мкл 1М NaCl (нагревают до 56 °С. Добавляют два объема 100 % этанола (800 мкл) и осаждают при - 70 °С в течение 20-30 мин.
8. Осадок нуклеиновых кислот собирают центрифугированием, дважды промывают его 65 % этанолом и один раз 85 %.
9. Высушивают под вакуумом и приступают к процедуре дот-блот-гибридизации.

Табл. 36. Выделение ДНК вектора для анализа дот-блот-гибридизации.

имеет выраженные гидрофильные свойства и, следовательно, способен к связыванию всех молекул воды, находящихся в растворе. При очень высоких концентрациях (до 30 %, при большей концентрации клетки погибают), вероятно, минимизируется взаимное электростатическое отталкивание и ДНК может войти в контакт с клетками. Кроме того, усиление полиэтиленгликолем эндоцитоза стимулирует проникновение вектора в протопласт.

В качестве агентов, стимулирующих захват культивируемыми клетками векторов, использовали и другие гидрофильные полимеры с длинной цепью (поливиниловый спирт, поли- α -лизин, поли- α -орнитин и полианион-декстран-сульфат). Однако они более токсичны для клетки, чем ПЭГ.

Показано, что ПЭГ 6000 в концентрации 15-25 % и 5 мкг плазмидной ДНК на 10^6 протопластов могут обеспечить поглощение протопластом до 1000 копий плазмид [Freeman J.P. et al, 1984].

Установлено, что максимальное количество ДНК, которое можно добавлять в культуру протопластов (при больших количествах ДНК происходит повреждение клеток), составляет 50-200 мкг ДНК на 10^6 протопластов.

После завершения эндоцитоза ДНК, адсорбированная на наружной поверхности мембраны клетки, удаляется обработкой ДНКазой. Для контроля эффективности переноса вектора в протопласт из части полученных клеток выделяют общую ДНК и оценивают количество встроенного вектора, используя блоттинг-гибридизацию по Саузерну (табл. 37).

Методика трансформации с помощью ПЭГ включает следующие этапы:

1. Переносят в центрифужные пробирки по 2×10^6 протопластов в 1 мл ростовой среды (MSP1 9M) и осаждают клетки центрифугированием при 400 об/мин, 7 мин (все в стерильных условиях).
2. Супернатант удаляют стерильной пипеткой и к осадку клеток добавляют 20 мкл раствора плазмид. Осторожно ресуспендируют осадок пастеровской пипеткой и оставляют их при комнатной температуре на 1 мин (не более 3 мин).
3. После чего в пробирки добавляют ПЭГ разной концентрации: 1,0; 2-5; 3-10; 4-20 % ПЭГ. Содержимое пробирок ресуспендируют, вращая пробирки между ладонями. После получения тонкой суспензии клеток их инкубируют при 28 °C, 30 минут.
4. Разводят инкубационную смесь, для этого медленно добавляют 10 мл (по 2 мл каждые 3 мин) раствора MSP1 9M и осаждают протопласты центрифугированием (400 об/мин, 10 мин).
5. Протопласты ресуспендируют в 1 мл MSP1 9M и добавляют по 10 мкл раствора ДНКазы (для удаления не проникшей в клетку ДНК). Инкубируют при комнатной температуре 30 минут.
6. Добавляют по 10 мл раствора CPW 9M, перемешивают и осаждают клетки (400 об/мин, 10 мин). Осадок еще раз отмывают этим же раствором
7. Считают количество клеток и в части клеток определяют наличие экзогенных ДНК (используют дот-блот-гибридизацию, табл. 37).

Freeman J.P., Draper J., Davey M.R.
A comparison methods for plasmid delivery into plant protoplasts // Plant Cell Physiol., 1984, 25, 1353-1365].

Блоттинг – перенос разделенных молекул (методом электрофореза) на твердый носитель (бумага, нитроцеллюлозный фильтр).

Гибридизация – от двух полипептидных цепей, часто из разных источников с образованием ДНК-РНК или ДНК-ДНК-гибридов, стабилизируемых водородными связями.

1. ДНК растворяют в 4 мл раствора для денатурации (1M NaCl; 0,1 MпОН, 10 mM ЭДТА).
2. Прогревают 5 мин при 100 °C.
3. Берут фильтр Hybond-N (8x3см) и карандашом отмечают 8 пятен.
4. Образцы наносят на фильтр Hybond-N микропипеткой, образец на одну точку. На точку в другом ряду наносят по 4 мкл образцов ДНК для экспериментов по реконструкции.
5. Подсушивают фильтр 3-4 мин, ополаскивают его в 3xSSC 2 мин. Помещают его между листами фильтровальной бумаги whatman – 3 мм, а после этого прогревают в термостате 30 мин при 80 °C. ДНК фиксируют на фильтре облучением ультрафиолетом.
6. Проводят гибридизацию ДНК, добавляя радиоактивно меченые фрагменты ДНК векторной плазмиды.
7. Количество ДНК-вектора включенного в плазмиду оценивают по интенсивности сигнала гибридизации.

Табл. 37. Оценка количества вектора захваченного протопластами методом дот-блот-гибридизации.

Трансформация протопластов методом электропорации

Использование электрических импульсов при трансформации клеток началось с 1985 г., когда Нейман и соавторы [Neuman H., Yamada Y., 1985] показали, что электрические импульсы увеличивают частоту трансформации клеток мыши экзогенной ДНК. Этот метод был назван электропорацией. А позже этот метод начал использоваться и при трансформации протопластов.

Показано, что электропорация вызывает кратковременное образование пор в плазматической мембране, через которые экзогенные ДНК перемещаются внутрь клетки. Диаметр таких пор около 30 нм и они существуют в течение нескольких минут после электрического импульса, после чего мембрана восстанавливается [Okada K. et al., 1986]. Действие электрического поля на плазматическую мембрану определяется напряженностью поля (градиент напряжения) и длительностью импульса (или время спада). Экспериментально обнаружено, что напряженность поля, необходимая для индукции электропорации, связана с диаметром клеток. Так, например, при расстоянии между электродами 1 см для успешной электропорации протопластов табака, имеющих диаметр 40-44 мкм, необходима напряженность поля 1,5 кВ/см².

Постоянная спада – это время, необходимое для снижения напряжения до 5 % от исходной величины. В современных электропораторах, таких как электропоратор Krüss можно получать импульсы с мгновенным спадом, т. е. прямоугольные.

Экзогенную ДНК можно успешно вводить в клетку, используя либо высоковольтный импульс малой длительности (1,5 кВ -10 мкс), либо низковольтный импульс 350В в течение 54 мс.

Поиск оптимальных режимов электропорации осуществляется в двух направлениях – временная экспрессия векторной ДНК и стабильная трансформация.

При оценке временной экспрессии определяют условия, при которых наблюдается максимальная экспрессия легко определяемого продукта индикаторного гена. Оптимизация режимов электропорации необходима потому, что часть клеток после электропорации гибнет. При количественной оценке временной экспрессии Конч с соавторами использовал бактериальную люциферазу, количество которой легко оценивать по световому излучению. Так как условия, благоприятные для временной экспрессии не всегда обеспечивают стабильную трансформацию, ведется поиск режимов, обеспечивающих стабильную трансформацию.

Методом электропорации получены стабильные трансформанты табака, моркови и кукурузы. В настоящее время метод электропорации, обеспечивает получение до 2 % трансформированных колоний, что более эффективно, чем использование ПЭГ.

Процедура трансформации и дальнейшая селекция трансформантов осуществляется так же, как и в случае использования ПЭГ.

В последние годы действие электрических полей на биологические объекты начинает использоваться и в других областях

Neuman H., Yamada Y. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localisation of injected materials //Plant Cell Physiol., 1985, 26, 229-236.

Okada K., Nogata T., Takebe J. (1986) Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation //Plant Cell Physiol., 1986, 27, 619-626.

Люцифераза – фермент, который катализирует переход окисленной (возбужденной) формы люциферина в основное состояние, сопровождающееся испусканием света (люминесценцией) у светящихся организмов.

биотехнологии. Так, электрический ток 1-2 мкА стимулирует дифференцировку побега из каллуса табака более чем в 5 раз. Электрический ток стимулировал образование корней у пшеницы. Следовательно, электропорация может стать эффективным методом введения чужеродного гена в реципиентные клетки с одинаковой эффективностью как для двудольных, так и для однодольных растений.

Трансформация методом микроинъекций

Техника микроинъекций ДНК в клетку была разработана в 1970 г. независимо А. Грассианом и Е.Г. Дьякумакосом. На первых этапах разработки метода были использованы клетки, имеющие большие размеры (ооциты). Метод основан на использовании стеклянных капилляров с диаметром кончика 0,5-10 мкм, с помощью которого осуществляют прямой перенос молекул или органелл в цитоплазму или ядро реципиентной клетки. Для этого реципиентную клетку иммобилизуют (связывают) с подложкой.

На животных клетках было показано, что инъекция ДНК непосредственно в ядро увеличивает эффективность трансформации, и метод оказался очень эффективным (15-60 %). Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами трансформации:

- высокую эффективность трансформации (15-60 %), а это очень важно, если экспериментатор работает с малым количеством клеток;
- позволяет вводить ДНК непосредственно в клеточные ядра;
- количество вводимой ДНК легко поддается контролю (обычно вводят 0,1-1,0 мкА);
- для микроинъекций можно не удалять клеточную стенку и, следовательно, можно использовать этот метод в тех случаях, когда не удается регенерировать растения из колоний, полученных на основе протопластов;
- возможность микроинъекции ДНК в клетки, способные к эмбриогенезу, клетки пыльцы, зародыши.

Для осуществления микроинъекций протопласты фиксируют. Известны три способа фиксации. Прикрепление протопластов к покровному стеклу, покрытому поли-1-лизином. Этот способ не нашел широкого применения, так как было обнаружено, что поли-1-лизин оказывает токсическое действие на протопласты.

Позже был разработан метод фиксации протопластов в агарозе. При этом протопласты заправляют в очень тонкий слой легкоплавкой агарозы. Этот метод позволяет локализовать ядра и ориентировать протопласты таким образом, чтобы чужеродная ДНК могла быть введена непосредственно в ядро. В таком фиксированном состоянии протопласты могут культивироваться до проведения селекции на селективных средах.

Третий способ иммобилизации протопластов при микроинъекции ДНК основан на их удержании специальной пипеткой. Пипетка соединена со шприцом и в ней создается отрицательное

Микроинъекция – введение в изолированную эукариотическую клетку ДНК или других молекул с помощью тонкой иглы.

давление, при этом протопласт притягивается к пипетке и удерживается. Для визуализации ядра используют инвертированный микроскоп, снабженный дифференциальной интерференционной оптикой. Можно использовать и ДНК-специфичные флуоресцентные красители, не влияющие на жизнеспособность клетки (Hoechst 33258) и наблюдать за ядром с помощью микроскопа, снабженного эпифлуоресцентной оптикой. Основные этапы микроинъекций ДНК представлены в таблице 38.

Микроинъецированные протопласты культивируют в микрокаплях или используют фидерные культуры. Методика культивирования протопластов с использованием фидерных культур сводится к следующему. В центр чашки Петри помещают нейлоновое сетчатое кольцо диаметром 8 мм (размер ячеек 15-20 мкм). Его фиксируют, заливая в чашку питательную среду, содержащую 0,8 % агар, и распределяют как внутри, так и снаружи кольца. После того как агар застынет на его поверхность наносят 2 мл среды для культивирования протопластов. Микроинъецированные протопласты помещают в центр кольца, а фидерные клетки (контрольные протопласты) помещают вне его в жидкой среде.

Введение ДНК в протопласты с помощью ЛИПОСОМ

Этот подход основан на том, что ДНК заключаются в липосомы (способы получения липосом описаны ранее), а на следующем этапе обеспечивается слияние липосом с протопластами или захват протопластами путем эндоцитоза липосом, несущих ДНК. В дальнейшем осуществляется культивирование и селекция протопластов, несущих чужеродную ДНК, используя те же методические подходы, которые используются и при других способах трансформации.

Слияние липосом с протопластами зависит от многих факторов. Липосомы могут иметь различный заряд в зависимости от типов фосфолипидов, входящих в состав липосом, что играет важную роль во взаимодействии липосом с клетками. На эффективность использования липосом влияет и концентрация ПЭГ, концентрация ионов металла в культуральной среде и pH среды. Deshayes инкапсулировал плазмиды pLGV23 neo, несущие ген резистентности к канамицину, в отрицательно заряженные липосомы. Липосомы обрабатывались ПЭГ и сливались с мезофильными протопластами табака. В этом эксперименте частота получения трансформированных клонов составила $4 \cdot 10^{-5}$.

Процесс поглощения липосом клеткой может быть условно разбит на 3 этапа: ассоциация липосом с протопластами, эндоцитоз липосом и внутренний процессинг липосом и их содержимого.

К преимуществам липосомальной системы можно отнести:

- 1) низкую токсичность по отношению к клеткам-реципиентам;
- 2) широкий круг клеток-реципиентов;
- 3) обеспечение нативности

1. Локализуют клетку, используя объектив $\times 10$ инвертированного микроскопа, локализованную одним из описанных способов.
2. Убеждаются, что ядро находится в таком положении, чтобы при микроинъекции не была повреждена вакуоль (при ее повреждении клетка погибает сразу).
3. Используя микроманипулятор заполняют микрокапилляр раствором ДНК (0,1-1,0 мкл) и располагают вблизи реципиентной клетки. Находят ядро, используя объектив $\times 40$, и вводят микрокапилляр в ядро.
4. Медленно вводят раствор вектора в ядро, используя устройство для микроинъекций, после чего выводят микрокапилляр из клетки.

Табл. 38. Методика микроинъекций ДНК в растительной клетке.

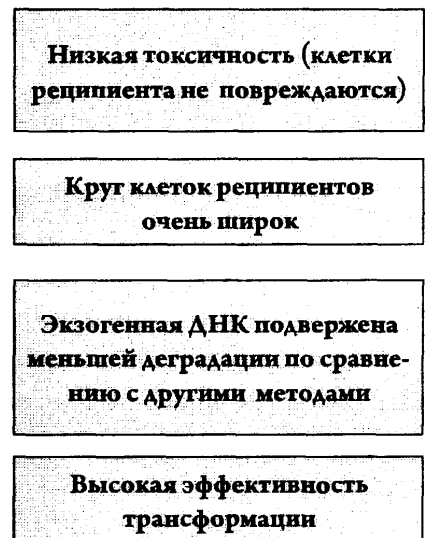


Рис. 144. Некоторые преимущества трансформации клеток с использованием липосом.

нуклеиновых кислот от деградаций нуклеазами, присутствующими в культуральной среде; 4) достаточно высокую эффективность введения нуклеиновых кислот в растительные протопласты (рис. 144).

Трансформация методом биологической баллистики

Метод биологической баллистики является довольно эффективным. Суть метода сводится к тому, что на частицы вольфрама (диаметр 0,6-1,2 мкм) напыляются ДНК векторы. Такая частица с иммобилизованной ДНК наносится на целлофановую подложку и помещается внутрь так называемой баллистической пушки. Суспензия клеток-реципиентов наносится на чашку Петри с агаризованной средой и помещается на 10-15 см от пушки. В пушке создается давление до 0,1 атм. После сбрасывания давления вольфрамовые частицы вылетают с большой скоростью и попадают в цитоплазму и ядро клеток. Чаще всего клетки, располагающиеся в центре чашки, гибнут из-за разрушения, а часть клеток в зоне 0,5-1,0 см от центра может быть трансформирована.

Клетки переносят на питательную среду и культивируют их с дальнейшей селекцией.

Этим методом трансформированы клетки таких однодольных растений как пшеница, рис, ячмень и другие.

В заключение необходимо отметить, что способы прямых переносов ДНК в клетки интенсивно совершенствуются и направлены на повышение эффективности переноса генов в реципиентные клетки. Так, эффективность прямого переноса в протопласты повысилась со временем первых сообщений более чем в 1000 раз. Это было достигнуто использованием электропорации, оптимизации концентрации ПЭГ, применением теплового шока (45 °С) и липосомной технологии.

Перспективы, проблемы и направления исследований технологии рекомбинантных ДНК растительных клеток

Универсальность генетического кода позволяет осуществить перенос генов из одних организмов в другие независимо от эволюционной иерархичности. Такой направленный перенос генов позволяет получать формы с новыми свойствами в сжатые сроки и преодолевать эволюционные барьеры в отличие от классических методов гибридизации.

Используя технологию рекомбинантных ДНК, получены растения, устойчивые к насекомым. Из генома бактерии *Bacillus thuringiensis* выделен ген *bt2*, который синтезирует токсин. Этот токсин синтезируется в виде белка-протоксина и только в кишечнике насекомых он превращается в активный токсин под действием протеаз и приводит к гибели вредителей. Этот ген (*bt2*) был

Баллистика – наука о движении (артиллерийских снарядов, пуль, ракет и др.).

Результаты научных исследований последних лет свидетельствуют о том, что ДНК-технологии существенно изменяют агропромышленные технологии. Можно ожидать изменения в производстве и хранении сельскохозяйственной продукции, в снижении антропогенного воздействия на окружающую среду, в создании генетически модифицированных растений для производства возобновляемых источников энергии и лекарственных препаратов, устойчивых к болезням и стресс-факторам. Как следствие это приведет к изменению не только характера производства, но и мировоззрения.

встроен в вектор под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты. Этот ген был интегрирован в геном табака с помощью Ti-векторной системы. Полученные растения были устойчивы к насекомым. Ген эндотоксина был встроен и в геном томатов, которые приобрели устойчивость к насекомым.

Многолетние исследования механизма взаимоотношений патогена с растениями показали, что в ответ на действие патогена растения используют защитную систему (иммунитет растений). Защита может обеспечиваться использованием двух механизмов. Во-первых, в клетках растений начинают синтезироваться соединения токсичные для патогенов, что приводит к их гибели. Во-вторых, в ответ на действия патогенов начинается интенсивный синтез структурных компонентов клеток, предотвращающих проникновение фитопатогенов в клетку. Это достигается лигнификацией клеточных стенок растений или синтезом гликопротеидов, богатых гидроксипролином и других соединений, получивших название экстензинов, что в конечном итоге предотвращает проникновение фитопатогена в клетку.

Обнаружено, что при инфицировании растений вирусами, бактериями и грибами в клетках начинают синтезироваться белки – pathogen related proteins, среди которых хитиназа и β -1,3-глюканаза. Эти ферменты ингибируют рост грибов и бактерий. Гены, обеспечивающие иммунную защиту растений, использованы для получения трансгенных растений, устойчивых к фитопатогенам.

Были получены трансгенные растения табака и турнепса, несущие гены хитиназы под промотором 35S – мозаики цветной капусты. Эти растения были устойчивы к фитопатогенам.

Важным направлением в биотехнологии растений является получение культурных растений, устойчивых к гербицидам (которые используются в борьбе с сорняками). Так, гербицид паракват проявляет свою активность, ингибируя фотосинтез. Это осуществляется за счет свободных радикалов кислорода. Как известно, супероксиддисмутаза переводит радикал в молекулярный кислород и перекись водорода. Был выделен ген SOD (супероксиддисмутаза) и включен в вектор под промотором 35S – вируса мозаики цветной капусты и перенесен в геном люцерны. У такой люцерны была повышена устойчивость к действию таких гербицидов как ацифлуорфен и паракват.

Несмотря на успехи в области трансгенеза растений, следует объективно оценивать возможности технологии рекомбинантных ДНК.

Чужеродные фрагменты ДНК в реципиентных клетках могут проявлять низкую активность, поскольку физико-химические характеристики (рН, ионная сила, температурный режим) могут быть не оптимальными для данной культуры. В том же случае, если чужеродный ген экспрессируется в значительных количествах, то его продукт может угнетать рост самих растений.

Большинство хозяйственно-ценных признаков растений контролируется мультигенными системами, т. е. взаимодействием сложного комплекса генов.

Гербициды – химические вещества, которые применяют для уничтожения растений, в частности для борьбы с сорняками. Широко распространены такие гербициды как бетанал, нитрофен, симазин, паракват и др.

Свободные радикалы – это неустойчивые частицы с избыточной энергией. Они имеют неспаренный электрон, поэтому нестабильны и легко вступают в химические реакции. В организме свободные радикалы образуются в процессе метаболизма, а также при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды (радиация, загрязненная атмосфера, табачный дым, химические соединения, попадающие в организм с пищей и т.п.). Такие молекулы стремятся отнять электрон у других «полноценных» молекул, вследствие чего «пострадавшая» молекула сама становится свободным радикалом – развивается разрушительная цепная реакция.

Прежде чем осуществлять трансформацию клеток необходимо иметь полную информацию о структуре и организации этих генов в геноме и механизмах их регуляции. Так, например, простой перенос *nif*-генов (генов азотфиксации) в геном томатов не эффективен, так как экспрессия этих генов осуществляется механизмом, характерным для эукариот, и должна быть использована система защиты нитрогеназы от кислородного отравления. Не изученность механизмов функционирования азотфиксации не позволяет решить эту проблему.

По-прежнему остается слабо разработанной система культивирования растительных тканей и регенерация растений. Не решена проблема обеспечения стабильной интеграции и экспрессии чужеродных генов на разных стадиях развития растений.

Основными факторами, определяющими продуктивность растений, являются: углеродное питание и потребление азота, резистентность к стрессовым условиям – засухе, засоленности почвы, болезням.

Растения, выращиваемые в естественных условиях, почти никогда не используют в полном объеме свой генетический потенциал. Об этом свидетельствует уже то, что рекордные урожаи в несколько раз превышают средние урожаи.

Только после исследований фундаментальных механизмов формирования ответной реакции растения на комплекс факторов среды можно решать проблему повышения продуктивности, используя современные ДНК-технологии.

Необходимо дальнейшее изучение структуры генома и регуляции его экспрессии. В этом отношении перспективным является исследование механизма транспозиции генов у высших организмов. Маркирование растительных генов транспозируемыми элементами в качестве зонда может обеспечить идентификацию отдельных генов.

Успешное решение задач повышения продуктивности растений методом технологии рекомбинантных ДНК возможно только опираясь на фундаментальные исследования механизмов ассимиляции ценных продуктов в растениях, механизмов развития растений, механизмов резистентности к паразитам и стрессовым факторам, методов культивирования растительных клеток и регенерации растений.

Глава X

Получение клонов и трансгенных животных

Характеристика предзародышевого развития млекопитающих

Механизмы индивидуального развития организма и в частности, млекопитающих и человека, всегда были в поле зрения не только эмбриологов, но и генетиков, цитологов, биохимиков. Развитие молекулярной биологии и в последние годы биотехнологии, способствовали новому прогрессу в развитии эмбриологии.

Новые методические возможности клонирования эмбрионов, получение химерных и трансгенных животных позволят не только решать хозяйственные проблемы, но и фундаментальные проблемы биологии развития и геронтологии.

Как известно, яйцо выполняет три основные функции: 1 – передает зародышу гаплоидный набор хромосом; 2 – обеспечивает зародыш цитоплазмой; 3 – обеспечивает зародыш питательными веществами до начала самостоятельного питания. Этим и объясняется большой размер яиц. Даже у млекопитающих размер яиц равен 50-250 мкм, что значительно больше соматических клеток.

Яйцо покрыто защитной оболочкой, которая имеет различную структуру у разных видов.

В процессе оогенеза (созревания яйца), так же как и спермия, исходная диплоидная клетка претерпевает деление и образуется тетраплоидный ооцит. Когда такой ооцит достигает дефинитивного размера, его ядро претерпевает первое мейотическое деление. При этом цитоплазма делится на две неравные части. В результате второго мейоза образуется крупное яйцо с гаплоидным геномом и 3 гаплоидных полярных тельца (рис. 145). Полярные тельца дегенерируют и разрушаются.

Зрелое яйцо может быть оплодотворено в течение короткого промежутка времени (для млекопитающих это 12-48 часов).

Спермии, как и яйца также живут недолго. Однако в некоторых случаях (насекомые, летучие мыши) спермии, находясь в половых путях самки, могут оставаться жизнеспособными на протяжении нескольких лет. Механизмы различия в сроках жизни половых клеток не ясны. В настоящее время разработаны способы криоконсервации спермы, что дает возможность не только использовать ее в племенном животноводстве для искусственного осеменения, но и осуществлять оплодотворение яйцеклеток *in vitro*.

Процесс оплодотворения условно можно разбить на 3 стадии: проникновение спермия в яйцо, активация яйцеклетки и слияние гаплоидных ядер яйца и спермия.

При контакте спермия с яйцом осуществляется его прикрепление к наружной поверхности яйца. Показано, что

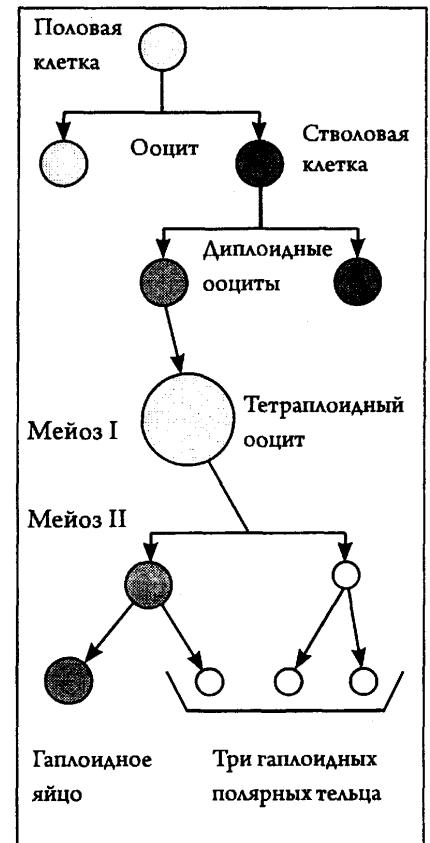


Рис. 145. Схема созревания яйца.

спермии становятся клейкими под влиянием фертилизина, который выделяется яйцом. Спермии, в свою очередь, тоже выделяют клейкое вещество – антифертилизин. Эти вещества являются видоспецифичными.

Для проникновения в яйцо, спермии выделяют в среду после контакта с яйцом гиалуронидазу, фермент растворяет оболочку и проникает в яйцо.

После проникновения в яйцо происходит его активация: ядерная оболочка растворяется и ядро яйцеклетки завершает мейоз (если он не был завершен). Яйцо становится непроницаемым для других спермиев. Блок полиспермии характерен для животных, механизм этой реакции еще не ясен.

Для некоторых видов пресмыкающихся и насекомых имеет место полиспермия (проникновение в яйцо более одного спермия). В таком случае ядро одного спермия сливается с ядром яйцеклетки, а остальные спермии дегенерируют в яйце. Период сразу после проникновения ядра спермия до слияния двух гаплоидных ядер можно назвать стадией двух пронуклеосом. Ядра двигаются друг к другу и их хромосомы располагаются на митотическом веретене, происходит первое деление дробления, после чего образуются две диплоидные клетки и яйцо становится зародышем.

После оплодотворения зародыш многократно делится без увеличения размеров с образованием мелких клеток. Этот этап дробления осуществляется синхронно, так как яйцо делится на два бластомера, затем на 4, 8 и т. д. Со стадии 8-ми бластомеров может наступать десинхронизация и скорость деления в разных частях зародыша начинает различаться. Период дробления завершается образованием бластулы (рис. 146).

Исследование механизмов оплодотворения и стадий развития позволило разработать технологию оплодотворения в системе *in vitro* и обеспечить ранние стадии развития зародыша вне организма. Это явилось этапом в разработке клонирования и получения трансгенных организмов, и созданием нового направления – репродуктивной технологии.

Оплодотворение яйцеклеток вне организма

Система оплодотворения яйцеклетки животных *in vitro* позволяет исследовать механизмы этого явления, что имеет важное практическое значение. Только владея техникой оплодотворения вне организма и методикой культивирования эмбрионов на ранних этапах развития, можно применить технологию рекомбинантных ДНК на животных. Ибо манипуляции с ДНК животных можно проводить только на ранних этапах развития. Кроме того, естественные методы гормональной регуляции воспроизводительной функции самок сельскохозяйственных животных ограничивают генетические работы в животноводстве. Например, для смены одного поколения крупного рогатого скота необходимо 5-6 лет. Поэтому развитие техники оплодотворения *in vitro* позволит

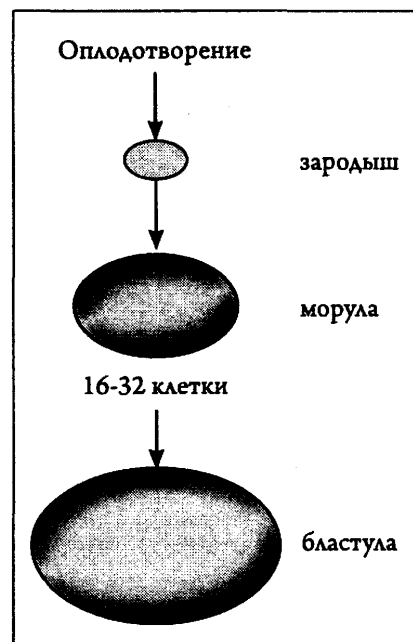


Рис. 146. Период дробления зародыша завершается образованием бластулы.

обеспечить прогресс в животноводстве и будет иметь значение в биологии развития человека. Так, это позволит увеличить темпы получения эмбрионов генетически выдающихся самок, максимально повысить эффективность использования спермы высокоценных самцов, осуществить клонирование ценных животных и получать трансгенных животных.

Оплодотворение вне организма может быть разбито на несколько этапов: созревание ооцитов, капацитация сперматозоидов, оплодотворение и ранние этапы развития эмбриона (рис. 147).

Созревание ооцитов *in vitro*

Ооциты извлекают из яичников крупного рогатого скота, используя специальную ультразвуковую аппаратуру после убоя животных. У коров отбирают ооциты 1-2 раза в неделю и получают 5-6 ооцитов. В среднем около 40 % полученных ооцитов могут быть использованы в дальнейшей работе. Ооциты отслаивают из фолликулов (диаметр 2-6 мм) и переносят в среду ТСМ с добавлением 10 % сыворотки крови от коровы в эструсе. Промывают их и отбирают только ооциты с компактным кумулюсом и однородной цитоплазмой.

Отобранные ооциты переносят в среду ТСМ 199 с добавлением 20 % прогретой сыворотки крови коров, находящихся в эструсе, вносят $3-5 \times 10^6$ /мл гранулезных клеток. Гранулезные клетки содержатся в среде, в которой ооциты отделялись от фолликулов. Для получения гранулезных клеток, эту среду центрифугируют 5 мин при 500 g, промывку гранулезных клеток осуществляют дважды. Осадок гранулезных клеток суспендируют в среде для созревания ооцитов.

Совместное культивирование ооцитов и гранулезных клеток осуществляют при температуре 38,5 °С, в атмосфере 5 % CO₂ в стандартных чашках Петри в 2 мл среды в течение 24 часов.

Капацитация сперматозоидов

В 1951 г. М.К.Чанг обнаружил, что оплодотворение у млекопитающих может наступить только тогда, когда спермии находятся несколько часов в яйцеводе до наступления овуляции. Это явление было названо капацитацией и означает, что в спермии должны произойти физиолого-биохимические изменения, которые обеспечивают спермиям способность к оплодотворению.

Капацитация включает начальные изменения мембраны спермиев, что обеспечивает им прохождение акросомной реакции и слияние плазменной и внешней акросомной мембран. В настоящее время первую фазу обозначают как капацитацию, а вторую – как акросомную реакцию.

Исследования этих процессов позволили обнаружить, что глюкозоаминогликаны и, в частности, гепарин обеспечивают капацитацию спермиев. В настоящее время разработаны способы капацитации сперматозоидов сельскохозяйственных животных с использованием гепарина.

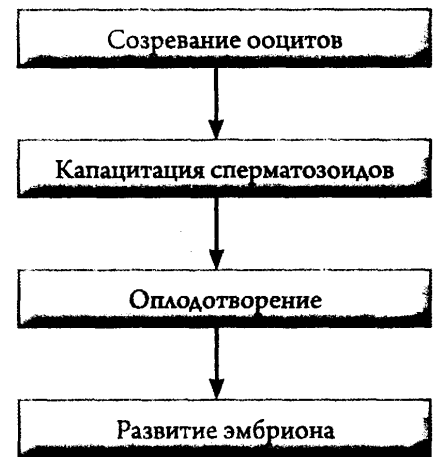


Рис. 147. Основные этапы развития эмбриона.

Капацитация – созревание спермиев в яйцеводе, во время которого происходит комплекс метаболических изменений, обеспечивающих способность спермиев к оплодотворению.

Оплодотворение *in vitro* и ранние стадии развития эмбрионов

Эмбрионы культивируют совместно с кумулюсными клетками и трофобластами. Оплодотворение проводят в капле среды Тироида. После созревания *in vitro* ооциты частично освобождают от кумулюсных клеток и переносят в микрокапли по 5 ооцитов, в каждую суспензию ооцитов добавляют смесь сперматозоидов (табл. 39). Спустя 44-48 ч после оплодотворения определяют состояние ооцитов. После этого эмбрионы переносят на монослой эпителиальных клеток и инкубируют их при 37-37,5 °С в атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении 5 суток.

Установлено, что эмбрионы крупного рогатого скота плохо развиваются *in vitro* с 8 до 16-ти клеточной стадии, в то время как 4-х клеточные эмбрионы и эмбрионы после достижения 16-ти клеточной стадии проходят развитие более успешно. Вероятно, развитие 8-16-ти клеточных стадий *in vitro* блокировано функционированием каких-то неизвестных нам механизмов.

Исследование процессов оплодотворения проводится на различных видах животных. Первый теленок с использованием метода оплодотворения *in vitro* был получен в 1982 г.

Необходимо отметить, что эффективность оплодотворения *in vitro* пока невысока. Так из 13 самок свиней, которым были трансплантированы 1-4 клеточные эмбрионы, полученные *in vitro*, беременными были только 2.

Спустя 21 день после трансплантации 8-ми клеточных эмбрионов свиней живыми были только 51 эмбрион из 229 пересаженных эмбрионов.

Прогресс в этой области позволит решить комплекс теоретических и практических задач, и в этом отношении важные результаты получены по биологии развития лабораторных мышей.

Методы получения и культивирования предимплантационных зародышей мышей

Попытки культивирования зародышей млекопитающих вне организма предпринимались более 100 лет назад и, как правило, заканчивались неудачно. И только после изучения механизмов развития и разработки методов культивирования это стало возможным.

Эмбриональное развитие зародышей мышей изучено лучше по сравнению с развитием зародышей других видов млекопитающих. Это связано с хорошей генетической изученностью и экономическими преимуществами разведения мышей.

Мыши (*Mus musculus*) относятся к животным с полиэстральным циклом, длительность которого варьирует от 3-х до 9-ти суток. Протекание эстрального цикла у мышей зависит от светового режима, обычно начало овуляции у них совпадает со серединой темного периода суток. Мыши являются полиовулирующими

1. Пайеты с замороженной спермой оттаивают на водяной бане при 39 °С, 30-40 с
На 250 мл спермы накладывают 1 мл среды для капацитации (модифицированная среда Тироида, не содержащая ионов кальция).
2. Инкубируют 10-20 мин, за это время большинство подвижных сперматозоидов всплывают в верхний слой.
3. Отбирают верхний слой 0,5-0,8 мл и промывают сперматозоиды свежей средой дважды центрифугируя при 500 g в течение 10 мин.
4. Сперматозоиды инкубируют 15 мин в растворе с гепарином (200 мкг/мл).
5. Суспензию разбавляют так, чтобы в 1 мл содержалось 50 миллионов сперматозоидов.

Табл. 39. Схема подготовки сперматозоидов к оплодотворению

Стадии развития	Время, ч
Одноклеточные	0-29
Образование пронуклеуса	6-12
Синтез ДНК в пронуклеусе	9-16
Начало первого деления	17-20
3-х и 4-х клеточная стадия	42-58
5-ти и 8-ми клеточная стадия	49-60
Морула (16-32 клетки)	68-77
Бластула	74-82

Табл. 40. Время наступления различных стадий развития.

животными и при спонтанном (естественном) эструсе в течение нескольких часов может овулировать от 5 до 15 яйцеклеток.

В эксперименте индуцируют овуляцию введением фолликулостимулирующего гормона – сыворотки жеребых кобыл, а через 48 ч – лютеинизирующего хориогонического гонадотропина (ХГТ) человека внутривбрюшинно в дозе 2-5 МЕ (Международные единицы) на мышшь. Через 12-14 часов после введения ХГТ наступает овуляция. Рассчитав время наступления овуляции, и проведя спаривание в течение 1-2 ч, можно синхронизировать оплодотворение и получить зародыши одной стадии развития. Необходимо учитывать, что образование женского пронуклеуса начинается через 2-4 ч после оплодотворения. Трансформация головки спермия в мужской пронуклеус у мышшей завершается на стадии анафазы и телофазы 2-го мейотического деления ооцита. Развитие мужского пронуклеуса происходит быстрее женского, и он обычно больше и светлее, что определяется различием в степени спирализации хромосом. Спустя 5 ч после образования пронуклеусов в них начинается синтез ДНК, и процесс репликации завершается за 7-12 ч (это определяется генетическими различиями). После завершения синтеза ДНК, пронуклеусы сближаются, растворяются ядерные оболочки, а хромосомы формируют метафазную пластинку 1-го деления.

Временные параметры раннего развития мышшиных эмбрионов различаются у мышшей разных генетических линий, чем и обусловлены столь большие различия средних показателей (табл. 40).

Одноклеточные зародыши располагаются в ампуле яйцевода, двухклеточные в верхней трети, четырехклеточные – в средней трети, а 8-16 клеточные в нижней трети яйцевода, морула переходит в матку (рис. 148).

Способ получения зародышей мышши

Для того чтобы получить одноклеточные зародыши, необходимо извлечь яйцевод и на предметном стекле под стереомикроскопом вскрыть дистальный конец ампулярной области яйцевода и отделить кумулюс, в котором заключены зиготы. Для освобождения зародыша от кумулюсных клеток используют раствор гиалуронидазы. Через 2-3 мин освобожденные зиготы переносят пастеровской пипеткой в свежую среду (температура 37 °С), чтобы отмыть их от фермента.

Манипуляции с зародышами необходимо проводить в стерильных условиях и быстро, так чтобы они не находились больше 20-минут при комнатной температуре и не подвергались действию естественного освещения, так как ультрафиолет подавляет дробление зародыша. Зародыши очень чувствительны к изменению рН и осмотическому давлению раствора. Хотя осмолярность создается молярной концентрацией всех солей, входящих в состав питательной среды и равняется сумме кратных количеств их ионов, основным компонентом, поддерживающим осмотический баланс, является



Рис. 148. Локализация зародыша в процессе развития.

Раствор гиалуронидазы.
 Растворяют 300 МЕ в 1 мл Дюльбекко-фосфатного буфера рН 7,2.
 Его стерилизуют, используя ультрафильтрацию. Перед применением нагревают в термостате до 37 °С.

NaCl. Необходимо учитывать, что концентрация NaCl в питательном растворе не должна превышать 120 мМ, в противном случае происходит ингибирование синтеза белка и клеточного роста.

W.Whitten в 1956 г. предложил среду ВМОС-1 для культивирования зародышей мышей, а в 1971 г. она была модифицирована и названа ВМОС-2. Эта среда может использоваться для культивирования мышинных зигот (табл. 41). Как основа этой среды был использован кребс-рингерсовский солевой раствор.

Экспериментально установлено, что наиболее благоприятной воздушной средой для развития эмбрионов является газовая смесь сжатого воздуха и 5 % CO₂.

Культивирование эмбрионов удобнее всего осуществлять микрокапельным методом, он обеспечивает экономный расход питательной среды и позволяет наблюдать за развитием зародыша. Капли помещают в

пластиковые стерильные чашки Петри под слой вазелинового масла. Слой вазелинового масла поддерживает стерильность среды, предотвращает испарение и не мешает газообмену. Оптимальной температурой развития мышинных эмбрионов является 37-35,5 °С.

Дальнейшее совершенствование метода культивирования эмбрионов вне организма и введение чужеродных генов в клетки позволяет решать задачи контроля экспрессии генов, механизмы регуляции развития млекопитающих, клонирования животных и получения химерных организмов.

Технология трансплантации эмбрионов

Стимуляция суперовуляции

Технология трансплантации эмбрионов включает несколько этапов: суперовуляцию, искусственное осеменение, извлечение эмбриона, оценку его состояния, кратковременное или длительное хранение и трансплантацию, или пересадку суррогатной матери.

Большая часть половых клеток у самок погибает в результате атрезии фолликулов. Однако все растущие фолликулы реагируют на гонадотропин и способны в этом случае доходить до полного созревания. Введение в организм самки гонадотропина в фолликулярной или лютеиновой фазе полового цикла в сочетании с простагландином, который индуцирует регрессию желтого тела, приводит к множественной овуляции, которую называют суперовуляцией.

Индукция суперовуляции у мышей описана в предыдущих разделах. Приведем пример суперовуляции у крупного рогатого скота.

Начиная с 9-14 дня полового цикла, вводят фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). Через 2-3 дня после этого животным вводят простагландин F₂α или его аналог, чтобы обеспечить регрессию желтого тела. Гормон вводится многократно, одна из схем

Компонент	Г/л	мМ	осмолярность
NaCl	4,14	70,89	141,8
KCl	0,356	4,78	9,56
K ₂ HPO ₄	0,162	1,19	2,38
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,294	1,19	2,38
Лактат Ca·5H ₂ O	0,557	1,17	5,13
NaHCO ₃	1,900	22,61	45,22
Пируват Na	0,036	0,33	0,66
Лактат Na	2,494	22,28	44,56
Глюкоза	2,0	5,56	5,56
Альбумин бычий	3,0	-	-
Пенициллин	10000	-	-
Стрептомицин	50 мг	-	-
Тридистиллированная вода	до 1 л	-	-
Всего:			257,23

Табл. 41. Состав среды ВМОС 2.

ФСГ		
Дни обработки	Доза, мг	Время, сутки
1	6	7:18
2	4	7:18
3	2	7:18
4	2	7:18
F ₂ α		
Дни обработки	Доза, мг	Время, сутки
10	3	7
12	4	12:18

Табл. 42. Схема суперовуляции коров, предложенная Ханселом В. и Хилва Б.А.

представлена в таблице 42. При использовании такой схемы супероуляции охота наступает через 40-50 ч после первой инъекции простагландина. Осеменение проводят через 12 и 24 ч после наступления охоты.

Эмбрионы извлекают через 7 дней после осеменения.

Извлечение эмбрионов

Сроки извлечения эмбрионов определяются скоростью продвижения эмбрионов в половом тракте. Эмбрионы крупного рогатого скота поступают из яйцевода в матку между 4-м и 5-м днем начала охоты или между 3-м и 4-м днем после овуляции.

Используют два способа извлечения эмбрионов: хирургический (после забоя животного) и нехирургический. При использовании хирургического способа извлекать эмбрионы можно сразу после оплодотворения. В случае нехирургического способа получать эмбрионы можно не ранее 5-го дня после начала охоты, так как необходимо, чтобы они проникли в рога матки. Для этого гибким катетером, используя 200-300 мл фосфатного буфера Дюльбекко, обогащенного глюкозой и бычьим сывороточным альбумином с антибиотиками, вымывают эмбрионы из одного, а потом и из второго рога матки. Промывную жидкость собирают во флаконы и после отстаивания просматривают под микроскопом. Обычно удается извлечь около 50 % овулирующих яйцеклеток.

Эмбрионы хранят до пересадки в чашках Петри в среде TCM 199 с 20 %-ной эмбриональной сывороткой.

Хранение эмбрионов

Эмбрионы крупного рогатого скота можно культивировать *in vitro* до 24 ч, при этом они не теряют способность приживаться у реципиентов. Если эмбрионы свиней культивировать вне организма 48 и более ч, то они не приживаются при пересадке.

Для увеличения сроков хранения эмбрионов ведутся разработки способов криоконсервации эмбрионов. Показано, что чувствительность эмбрионов к низкой температуре зависит от вида животного и стадии развития эмбриона. Особенно чувствительны к охлаждению эмбрионы свиней, существующие методы криоконсервации не позволяют охлаждать эмбрионы свиней ниже 10-15 °С. Эмбрионы овец относительно хорошо переносят охлаждение до 0 °С на любых стадиях развития, от одно-двухсуточной стадии до бластоцисты.

Эмбрионы крупного рогатого скота очень чувствительны к охлаждению на ранних стадиях развития, а на стадии бластоцисты они хорошо выдерживают охлаждение. Было показано, что существует зависимость между скоростью замораживания эмбриона и скоростью оттаивания. Так, если эмбрионы охлаждают медленно (1°С/мин) до очень низкой температуры (-50 °С) с последующим погружением в жидкий азот, то их необходимо и медленно

Овуляция – выход женской яйцеклетки из яичника в полость тела.

Криоконсервация находит применение в различных областях биотехнологии. Однако и этот способ имеет свои недостатки, которые необходимо учитывать при его использовании. Отметим три основных недостатка:

- 1 – высокая стоимость содержания запасов замороженных продуктов;
- 2 – возможна утрата материала при выходе из строя холодильных установок;
- 3 – высокая стоимость транспортировки замороженных образцов.

оттаивать. Если же эмбрионы замораживают медленно только до -25°C с последующим переносом в жидкий азот, то их можно оттаивать очень быстро.

Хотя методы криоконсервации требуют совершенствования, уже получены интересные результаты. Получены 8 ягнят после пересадки 12 самкам по 2 (т. е. 24) заморожено – оттаянных морул. Успешные пересадки эмбрионов после замораживания-оттаивания осуществлены у крупного рогатого скота и лошадей. Такая особенность криоустойчивости крупного рогатого скота пока не ясна.

Пересадка эмбрионов

Пересадка эмбрионов может быть эффективной только в том случае, если охота у донора проходит синхронно с развитием эмбриона. Для этого суррогатная мать (донор) специально готовится.

Технология пересадки эмбрионов сводится к следующему. В пайету набирают 1 мл свежей питательной среды (в которой культивируют эмбрионы), после чего пузырек воздуха и затем среду с эмбрионом (2-3 мл). Пайету с эмбрионом помещают в катетер Кассу и вводят его в рог матки. Выдавливают содержимое в рог матки. Высокую эффективность пересадки можно обеспечить введением эмбрионов в оба рога матки. В таком случае получают двойню.

Суррогат – заместитель, обладающий лишь некоторыми свойствами заменяемого предмета, продукта.

Применение клеточной инженерии в животноводстве

Исследование тотипотентности клеток и клеточных ядер

Манипуляцию эмбриональными клетками или пересадку ядер соматических клеток в зрелый ооцит с целью получения клонов относят к клеточной инженерии, так как это позволяет «конструировать» новый организм. Разработка основ клеточной инженерии продиктована двумя причинами: исследованием механизмов развития и получением в необходимом количестве элитных животных. Дело в том, что число потомков от одной особи у высших животных, как правило, небольшое, кроме того, животные с высокой продуктивностью рождаются не часто и их свойства не сохраняются в следующих поколениях.

Вместе с тем, фундаментальные исследования ядер соматических (дифференцированных) клеток показали, что они сохраняют всю необходимую для развития организма генетическую информацию. Для того, чтобы эта информация была реализована в новом организме, ядро соматической клетки необходимо пересадить в зрелый ооцит.

Образуемая при оплодотворении диплоидная зигота дифференцируется так, что в конечном итоге образуется организм, состоящий из разнообразных типов клеток, которые формируют

Клеточная инженерия – конструирование организма, основанное на манипуляции клетками как функциональными единицами клеточных систем. Наиболее интенсивное развитие клеточных технологий в настоящее время основано на использовании стволовых клеток.

ткани. Зигота является тотипотентной, т. е. она способна образовывать все типы клеток тела (т. е. соматические клетки).

Если предположить, что геном зиготы сохраняется неизменным в процессе дифференцировки, то тогда любая соматическая клетка теоретически могла бы обеспечить развитие нового генетически идентичного организма. Напротив, если предположить, что в процессе дифференцировки изменяется сам геном (утрачивается часть генома или, напротив, увеличивается), то тогда соматическая клетка не способна была бы обеспечить развитие нового организма.

Решение этого вопроса имеет большое теоретическое и практическое значение, и хотя принципиально ответ на этот вопрос получен более 30 лет назад, это решение не является простой задачей. Дело в том, что подобрать подходящие условия для демонстрации тотипотентности соматической клетки достаточно трудно, тем более что эксперименты с отрицательными результатами нельзя рассматривать как доказательство отсутствия тотипотентности. Они могут интерпретироваться как неудачно подобранные условия развития.

Доказательства тотипотентности клеток на ранних стадиях развития

Существование однояйцовых близнецов может служить доказательством сохранения полного набора генетического материала зиготы обоими ядрами после деления. Однако экспериментально тотипотентность клеточных ядер амфибий на ранних этапах развития была изящно доказана Spemann H. еще в 1928 г.

Он перевязывал оплодотворенное яйцо тритона *Triturus* тонким волоском, так что ядро оставалось в одной половинке цитоплазмы. Ядро при этом нормально делилось, а часть цитоплазмы, содержащая ядро, продолжала обычное дробление пока не формировала 16 бластомеров. В таких условиях образующиеся ядра были маленьких размеров и к стадии 16 бластомеров они могли пройти через лигатуру из волоска в безъядерную цитоплазму. После того как одно из ядер проходило через лигатуру, Spemann затягивал волосок так, чтобы разделить ядро полностью на две части (рис. 149). В результате образовывались два генетически однотипных зародыша. Этот эксперимент доказывает, что после 4-х митотических делений ядра сохраняют весь генетический потенциал и способны формировать зародыши, т. е. они тотипотентны.

В 1936 г. Horstadius S., Wolsky A. опубликовали результаты экспериментов, проведенных на зародышах морских ежей. Они разделили зародыш на стадии 4-х клеток и каждая клетка дала личинку – плутеуса (рис. 150). Однако наибольший интерес представляло доказательство тотипотентности соматических клеток.

Хотя показать неизменность генома ядра в дифференцированной клетке по сравнению с зиготой можно, используя биохимический и молекулярно-генетические методы. Наиболее убедительным является метод эмбриологический, т. е. пересадка ядра соматической клетки в ооцит и развитие зародыша.

Spemann H. Die Entwicklung sietlicher und dorso-ventraler keimhälften bei verzögerter Kernversorgung // Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie, 1928, 132, 105-134.

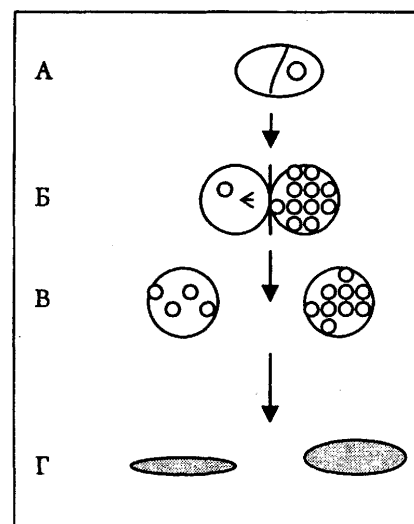


Рис. 149. Схема эксперимента Spemann на зародыше *Triturus*. А – зародыш перетянут волоском, ядро в одной половине. Б – после достижения стадии 16-ти бластомер, одно из ядер переходит через лигатуру во второй участок цитоплазмы, лигатура из волоска затягивается так, что две половинки разделяются. В – из двух половинок яйца развиваются зародыши. Г – формируются два генетически однотипных зародыша (близнецы), которые различаются по размеру.

Пересадка клеточных ядер

Принцип эмбриологического подхода, как отмечал Дж. Гордон, состоит в том, что геном соматической клетки испытывается на способность к дифференцировке. Не существует какого-либо другого способа выявить наличие отдельных нефункционирующих генов в соматической клетке, кроме формирования нового зародыша и целого организма.

Впервые метод пересадки ядер использовали Comandon J. и Fondrune P в 1939 г. на амебах. Первые успешные пересадки ядер были осуществлены Briggs R., King T. в 1952 г. на клетках лягушек *Rana pipiens*.

Наиболее четкие результаты по пересадке ядер были получены в группе Gurdon J.B. в Оксфорде, которые показали, что при дифференцировке не происходит каких-либо необратимых изменений генома, которые лишают его способности обеспечивать развитие организма от эмбриона до взрослой особи, т.е. ядра соматических клеток тотипотентны. Суть эксперимента сводилась к следующему. Ядро неоплодотворенной яйцеклетки *Xenopus laevis* инактивировали облучением, т.е. осуществляли энуклеацию. Из эпителиальных клеток кишечника головастика извлекали ядра микропипеткой. Важно то, что для пересадки ядер были выбраны клетки эпителия с генетическим маркером. Таким генетическим маркером являлась мутация О-пи, она проявлялась в отсутствии ядрышка в ядре этих клеток. Донорами клеток для выделения ядра были гетерозиготы по этой мутации, а, следовательно, в их ядрах имелось по одному ядрышку (1-пи). Такие ядра пересаживались в яйцеклетку. Если полученный зародыш после пересадки имел во всех своих клетках 1-пи, это означало, что его клетки происходят от ядра с этим генетическим маркером.

Ядро, выделенное из клетки эпителия, вводили в энуклеированную яйцеклетку и наблюдали за развитием. Необходимо отметить, что очень часто яйца не развивались, но в некоторых случаях, иногда 1 % давали нормальных особей. Gurdon считал, что такой результат пересадки связан с нарушением ядер в процессе манипуляции и следует сконцентрировать внимание на положительных результатах.

Наряду с этим, Briggs R., King T., проведя многочисленные исследования пересадки ядер, пришли к другому выводу. Если ядра для пересадки выделялись на ранних стадиях развития (бластула), то примерно 80 % пересадок давали нормальное развитие. В том случае, если ядра выделяли из клеток на стадии гаструлы, получалось не более 20 % нормальных зародышей. Если они брали ядра со стадии нейрулы, то получить нормальные зародыши вообще не удавалось. На основании этих результатов они пришли к выводу, что при дифференцировке клеток происходит изменение ядер, в т. ч. генетического материала. Эти экспериментальные

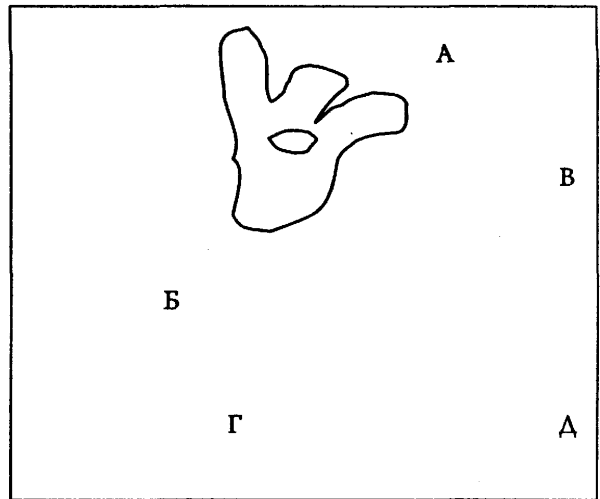


Рис. 150. Тотипотентность blastомеров морского ежа на стадии 4-х клеток, проведенной Horstadius S., Wolsky A. (1936 г.)

А- нормальная личинка Б-Д- личинки, полученные из одного blastомера на стадии 4-х клеток, которые меньше по размеру обоих исходных blastомеров.



Xenopus laevis

King T.J., Briggs R. Serial transplantation of embryonic nuclei// Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 1956, 21, 271-290.

противоречия остались окончательно нерешенными, однако в пользу тотипотентности свидетельствует большое количество экспериментальных данных и наиболее яркими являются тотипотентность растительных клеток и получение клонов животных. Наряду с этим, существуют многочисленные данные о непостоянстве генома в онтогенезе.

Под непостоянством генома в онтогенезе следует понимать структурное изменение в ДНК соматических клеток в процессе онтогенеза. Природа этих изменений может быть различной.

Клонирование эмбрионов

Клонирование, т. е. получение клонов – генетически идентичных особей основано на тотипотентности клеточных ядер по крайней мере находящихся на ранних стадиях развития. Суть клонирования сводится к пересадке ядер из соматической клетки от одного донора в яйцеклетки реципиентов, у которых предварительно удалены их ядра. Клонирование эмбрионов условно может быть разбито на 4 этапа: 1 – выделение интактного диплоидного ядра донора; 2 – энуклеация ооцита; 3 – пересадка диплоидного ядра в энуклеированную яйцеклетку; 4 – активация ооцита и слияние мембран яйца и ооцита (рис. 151). В отличие от амфибий, у которых сама пересадка ядра стимулирует развитие, у млекопитающих необходима дополнительная стимуляция. Это осуществляется действием электрического импульса.

Широкомасштабное клонирование эмбрионов крупного рогатого скота было проведено в США и Канаде. Ядра-доноры были получены от 34-64 клеточных эмбрионов, которые извлекали хирургическим методом. Реконструированные ооциты пересаживали коровам-реципиентам, из 302 стали беременными 110 (36,4 %), 10 эмбрионов погибли, и было получено 100 телят.

Технология клонирования животных далека от совершенства, однако, исходя из преимуществ этого метода разведения животных, он интенсивно развивается. Так, этот подход позволяет: получать эмбриональные клетки на стадии 64 клеток и тем самым получить большое количество клонов; 2 – повторно клонировать путем пересадки ядер от клонированных эмбрионов, чтобы повысить потенциальные возможности технологии; 3 – регулировать пол животных; 4 – получить эмбрионы от разных генетических линий, которые могут быть заморожены и размножены после тестирования клона на продуктивность.

Перспективным в клонировании является и использование эмбриональных стволовых клеток.

Получение однояйцовых близнецов

Получение однояйцовых близнецов основано на микрохирургическом разделении эмбрионов млекопитающих на ранних стадиях развития на две или четыре равные части (рис. 152).

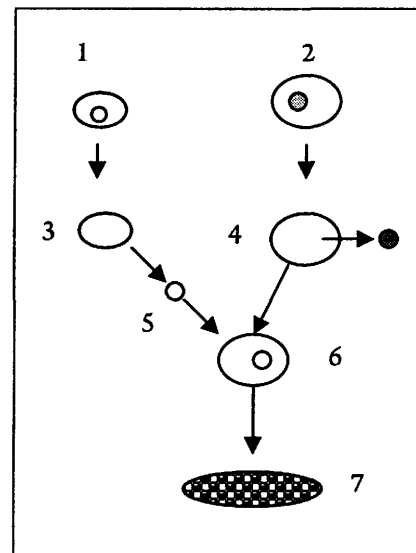


Рис. 151. Общая схема клонирования: 1 – соматическая клетка с диплоидным ядром; 2 – половая клетка (ооцит) с гаплоидным ядром; 3 – выделение диплоидного ядра из соматической клетки; 4 – удаление гаплоидного ядра из ооцита; 5 – перенос диплоидного ядра соматической клетки в ооцит; 6 – ооцит с диплоидным ядром соматической клетки; 7 – развитие эмбриона.

Первое потомство однояйцовых млекопитающих (мышей) было получено в 1970 г., а первые двойни у овец получила Виллаалдсен С.М. в 1979 г. разделением двух клеточных эмбрионов. Он использовал метод заключения эмбриона в агар вместе с поврежденной зоной пеллюцидой и лигатурованный яйцевод для временного культивирования эмбрионов до стадии поздней морулы. Выживаемость половинок эмбрионов после пересадки составляла около 50 %. Гибель части эмбрионов обусловлена механическими повреждениями во время манипуляции. Эффективность этой технологии может быть значительно увеличена, если будет усовершенствована методика манипуляции с эмбрионами. Установлено, что на стадии 8-ми клеток каждый бластомер имеет потенциальную возможность развиваться в бластоцисту, но при этом эмбрионы получаются меньшего размера по сравнению с контролем. Пересадка реципиенту таких бластоцист дает не более 10 % приплода.

Эти результаты позволили прийти к выводу, что уменьшение числа клеток в эмбрионе снижает способность таких эмбрионов нормально развиваться, а стадия развития эмбриона, на которой используют разделение, не имеет значения.

Так как защита эмбриона со стороны зоны пеллюциды значительно снижается после образования морулы, то в дальнейшем для получения однояйцовых близнецов стали использовать поздние морулы и бластоцист.

В настоящее время используют технику разделения эмбрионов на стадии поздней морулы на две равные части одновременно с разделением зоны пеллюциды. Это удобно и тем, что такие эмбрионы извлекают из донора не хирургическим путем.

Техника разделения эмбрионов разработана для овец, коз, свиней, крупного рогатого скота и др. животных.

Так, эмбрион свиньи разрезают стеклянной иглой на две половины и примерно 40 % зоны пеллюциды. После этого разрезают слой трофобласты внутри зоны пеллюциды. Полученные половинки пересаживают в рог матки реципиента на расстоянии 5 см от маточно-трубного соединения.

В настоящее время установлено, что приживаемость и эффективность развития эмбрионов зависит от продолжительности культивирования *in vitro*. Так, если культивирование превышает 4 ч, то это снижает эффективность пересадки. Эффективность пересадки снижается в 3 раза при культивировании в течение 24 часов по сравнению с 4-х часовой инкубацией. Для устранения эффективности пересадки ведутся исследования в двух направлениях. Разработка оптимальной системы культивирования эмбрионов *in vitro* и разработка системы криоконсервации эмбрионов.

Получение однояйцовых близнецов имеет большое значение для развития животноводства и исследования развития млекопитающих. Эта технология позволяет увеличить выход телят от одного

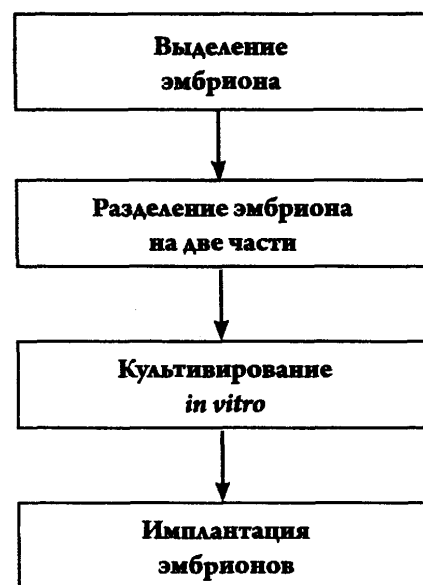


Рис. 152. Схема, отражающая основные стадии получения однояйцовых близнецов

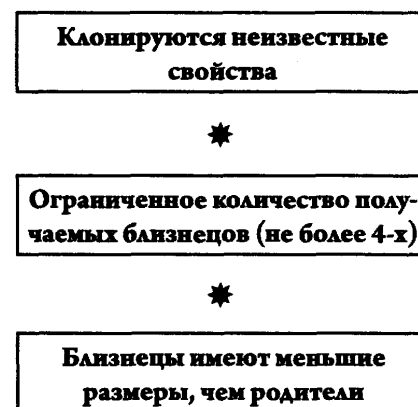


Рис. 153. Некоторые ограничения получения однояйцовых близнецов по сравнению с методами клонирования

донора и получить генетически идентичных потомков, что, в свою очередь, позволяет уменьшить стоимость спермопродукции, удешевить тестирование образцов.

Вместе с тем, метод получения однояйцовых близнецов имеет и ряд ограничений по сравнению с методом клонирования (рис. 153). Методом деления эмбрионов клонируются не свойства высокопродуктивного родителя, а его потомки, которые еще не тестированы по продуктивности. Из одного эмбриона можно получить максимум трех, четырех новорожденных. И, наконец, деление эмбрионов сопровождается образованием бластоцисты с уменьшением числа клеток, имеющих меньшие размеры.

Получение химерных животных

Определение химеризма

Рассматривая способы культивирования и экспериментальные манипуляции с эмбрионами нельзя не рассмотреть и технологию получения химер, тем более что этот метод имеет длительную историю.

С химерами мы встречаемся в античной литературе. У Гомера – это чудовище с головой льва, туловищем козы и хвостом дракона, кентавр – полуконь-получеловек, гарпия – хищная птица с грудью и ликом женщины. Особенно много химер в Апокалипсисе, апокалиптическая саранча имела туловище лошади, человеческое лицо с львиными клыками и хвостом скорпиона. Все эти мифические образы наделялись исключительным могуществом, соединяя воедино самые яркие качества отдельных видов.

Следуя этим установившимся взглядам, химера – это «составное» животное, которое включает в себя клеточные популяции, происходящие более чем от одной оплодотворенной яйцеклетки.

Необходимо различать «первичный химеризм» и «вторичный химеризм» (рис. 154).

Первичных химер создают путем агрегации, т. е. комбинируя клетки от разных эмбрионов на самых ранних стадиях развития.

Вторичные химеры создаются трансплантацией или пересадкой тканей (почек, кожи, переливание крови) или возникают спонтанным переносом клеток между матерью и плодом. У крупного рогатого скота плоды-двойняшки почти всегда имеют общее плацентарное кровообращение и у них в крови выявляется вторичный химеризм. Известно, что если двойни разнополые, самки почти всегда бесплодны – это явление называется «фримантизм», а такие самки «фримантинны». Этот феномен был обнаружен еще в Древнем Риме.

Существует еще одно понятие – «мозаик». У мозаичного индивидуума генетические различия клеточных популяций возникают в самом ходе развития, а причинами могут быть соматические мутации на ранних этапах развития, соматические рекомбинации.

Химера – это животное, которое состоит из клеточных популяций различных организмов, т. е. клетки этих организмов несут разные типы геномов.

Мозаик – организм, состоящий из генетически измененных клеточных популяций, возникающих в результате соматических мутаций.

Первичный химеризм

Создается путем комбинации клеток разных организмов на ранних стадиях развития

* * *

Вторичный химеризм

Создается пересадкой тканей взрослому организму или переносом клеток матери во время развития

Рис. 154. Схема, характеризующая первичный и вторичный химеризм.

Использование химер

Экспериментальные химеры являются важным инструментом исследования онтогенеза клеточных популяций и взаимоотношения между разными типами клеток. Удобным объектом в решении этих задач являются насекомые. У млекопитающих клетки в онтогенезе мигрируют и взаимодействуют друг с другом, что сильно затрудняет исследование их судьбы. У насекомых, в частности, у дрозофил миграция клеток выражена слабо, и клон формирует в процессе развития компактную группу клеток.

Перспективным является использование химер в животноводстве для получения селекционного материала, так как этот подход позволяет объединить клетки овцы и козы и использовать другие межвидовые комбинации.

Получение химер

Суть создания химер сводится к получению агрегации клеток двух эмбрионов на стадии дробления либо введением отдельных клеток внутрь бластоцисты. Эти процедуры осуществляют в системе *in vitro*, и после этого их переносят в матку суррогатной матери. Общая схема создания химер представлена на рис. 155.

Хотя первые попытки получения химер были предприняты Уоддингтоном (Waddington) в 30-х годах XX века, первые успешные результаты получил Tarkowski в 1961 г.

Позже Mintz В. в 1971 г. упростила эту методику. Она предложила удалять *zona pellucida* ферментом проназой. После этого эмбрионы сближали друг с другом в питательном растворе при 37 °С. Сближение можно проводить стеклянными иглами или волосяными петлями. Иногда для облегчения агрегации эмбрионов используют агглютинацию.

Полная агрегация обычно совершается за 24–48 ч. Убедившись в том, что ни один бластомер не вытолкнут, их переносят в ложнобеременную самку.

Инъекционный метод используют тогда, когда агрегация не возможна, в частности, если удаление *zona pellucida* нарушает дальнейшее развитие эмбриона или при получении межвидовых химер.

Для того чтобы проследить за судьбой клеток в химерном организме, клетки метят красителями или изотопами или же используют генетические маркеры.

В последние годы начались интенсивные разработки технологии получения химер сельскохозяйственных животных.

Показана высокая эффективность получения химер крупного рогатого скота объединением морул без *zona pellucida*. В результате этих исследований обнаружено, что передача химерам родительского типа носит случайный характер, т. е. потомство может развиваться из клеток любого эмбриона или же от сочетания эмбрионов. В качестве примера можно привести результаты

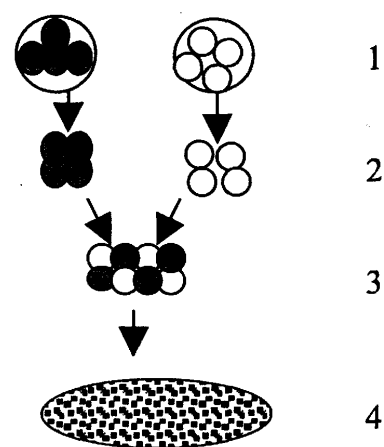


Рис. 155. Схема агрегационного метода получения химер: 1 – эмбрионы на ранних стадиях дробления; 2 – клетки, выделенные из различных эмбрионов; 3 – формирование клеточных агрегатов двух эмбрионов; 4 – развитие химерного эмбриона.

экспериментов, которые получил Г. Брен с соавторами еще в 1985 г. Они соединили половинки 5-6-ти дневных эмбрионов коров двух пород – бурой швицкой и голштинофризской. Пять из семи полученных телят не имели признаков химеризма. Один теленок был химерой двух пород, однако, доминировала масть бурой швицкой породы. Другой теленок был химерой неопределенного происхождения.

Интересные результаты получены на овцах. Химерные животные были получены объединением бластомеров одного вида. Объединяли 2-, 4- и 8-ми клеточные эмбрионы. Один такой эмбрион состоял из клеток от 2-х до 8-ми родителей. Эмбрионы переносили в лигатурованный яйцевод овцы для развития до стадии ранней бластоцисты. Нормально развивающиеся бластоцисты (определяли после выделения) вновь пересаживали в матку реципиента и получали ягнят, большинство из которых были химерными по группам крови и внешним признакам.

Для получения донорских клеток эмбрион обрабатывали проназой 0,5 %, что приводило к удалению *zona pellucida*. После такой обработки клетки культивировали 3 ч. Эмбрионы без прозрачной оболочки культивировали 1 ч в антисыворотке к клеткам печени овцы, три раза отмывали и переносили в раствор сыворотки крови морской свинки на 1 ч. Лизированные таким образом клетки трофобласта удаляли пипетированием, а клетки соответствующей внутренней клеточной массы вводили инъекционной пипеткой через *zona pellucida* в трофобласт бластоцисты реципиента. После пересадки в матку суррогатной матери получали химерных ягнят.

Получены межвидовые химеры между овцой и козой. Большинство химер были похоже на ягнят, но у трех (из 17) руно имело поперечные валики и лоскуты волос.

Дальнейшее развитие техники получения химерных животных может дать важные теоретические и практические результаты.

Получение трансгенных животных

Общая схема трансгенеза

Животных, которые содержат в своем геноме чужеродный (рекомбинантный) ген или многократно увеличенные гены называют трансгенными. Перенесенный (реципиентный) ген называют трансгеном. Белок, синтезирующийся на мРНК этого гена, называют трансгенным продуктом. Трансгенные животные могут приобретать новые свойства, которые будут наследоваться.

Для получения трансгенных животных микроинъекцией генов используют эмбрионы на ранних стадиях развития – стадия двух пронуклеусов или двух клеточных эмбрионов. Только в таком случае можно получить животных, у которых в соматических и что особенно важно генеративных клетках содержатся трансгены.

В настоящее время имеются новые возможности метода химерного клонирования в сочетании с другими методами клеточных и молекулярных технологий. В частности химерное клонирование и использование эмбриональных стволовых клеток. Modwinskiy A. в 1995 г. ввел эмбриональные клетки в бластоцисты, которые были лишены собственной зародышевой массы.

Получены мыши, в эмбрионы которых были введены эмбриональные стволовые клетки с тетраплоидными бластомерами (Nagy A., Gocza E., Diar E.M. // Development. 1990.-Vol. 110.-P. 815-821).

Трансгенный организм (животное, растение) – это организм, который несет чужеродный ген, который эволюционно не характерен для данного вида, или же имеет многократно увеличенные гены путем специальной манипуляции в системе *in vitro*.

Трансген – это ген, который получен из другого организма или синтезирован *in vitro* и встроен в геном организма.

Трансгенный продукт – это белок, который синтезирован на трансгене.

Получение трансгенных организмов состоит из нескольких этапов: 1 – получение необходимой генетической конструкции, – вектора. 2 – приготовление раствора ДНК для микроинъекций; 3 – подготовку донора и извлечение эмбрионов или яйцеклеток; 4 – визуализацию пронуклеусов и микроинъекцию ДНК; 5 – пересадку инъецированных эмбрионов в яйцеводы (если используется промежуточное культивирование) или в матку синхронизированных реципиентов; 6 – получение трансгенных животных; 7 – скрининг трансгенного потомства (рис. 156).

Приготовление раствора ДНК для микроинъекций

ДНК, используемая при получении трансгенных животных, клонируют в клетках бактерий в форме векторов. Обнаружено, что ДНК в линейной форме в 5 раз лучше интегрируется в ДНК реципиента по сравнению с кольцевыми молекулами ДНК [Brinster R.L., 1985]. Присутствие векторных последовательностей ДНК в составе трансгена снижает интенсивность экспрессии гена в 1000 раз. Поэтому кольцевые молекулы ДНК переводят в линейную форму, используя рестриктазы, и стараются удалить все векторные последовательности ДНК. Решение этой задачи облегчается тем, что исследователи используют векторы, несущие в своих полилинкерных последовательностях сайты, разрезанные редкими рестриктазами, например, Not I и Sfi I. Это позволяет вырезать необходимый фрагмент ДНК, удалив полностью все последовательности вектора.

Раствор ДНК, использующийся для введения в пронуклеус зародыша, должен быть стерильным и не содержать органических растворителей, которые токсичны для эмбрионов. Поэтому методики выделения ДНК не должны содержать органических растворителей таких как фенол, хлороформ или эфир. Лучшие результаты дает очистка ДНК в агарозе и последующее прямое выделение ДНК из геля препаративной ионообменной колоночной хроматографией (краткое описание дано в таблице 43).

Конечная концентрация ДНК подбирается так, чтобы в одном мкл содержалось 1-2 пг ДНК. Это соответствует 200-400 копиям ДНК, если они имеют 5000 пар нуклеотидов (размер среднего гена).

При инъекции такого количества ДНК в пронуклеус частота интеграции ДНК в геном оптимальна и соответствует 20-40 %.

Обнаружено, что ДНК, введенная в пронуклеус путем микроинъекции, интегрируется в единственном сайте в виде тандемных последовательностей. Хотя и не установлена прямая зависимость между концентрацией микроинъецированной ДНК и числом интегрированных в геном копий, установлено, что при снижении числа копий значительно снижается и частота интеграции. С другой стороны, использование слишком высоких концентраций ДНК (например, 10 пг/мкл) резко снижает выживаемость эмбрионов.

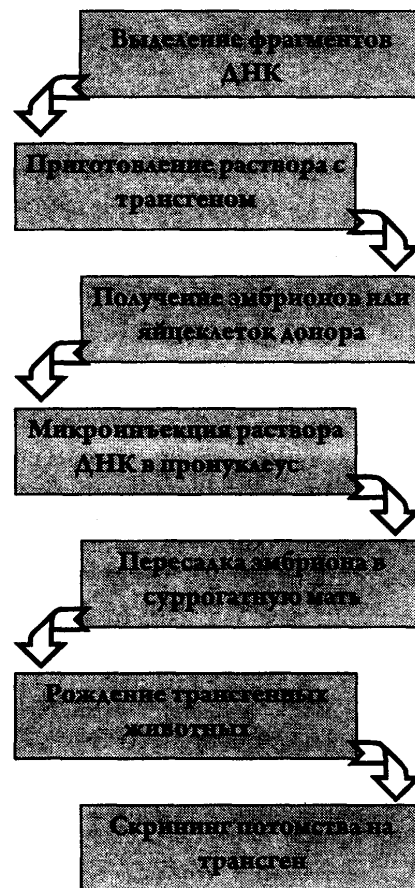


Рис. 156. Схема получения трансгенных организмов.

Тандемные последовательности – нуклеотидные последовательности, которые представлены одинаковыми нуклеотидами, соединенными «голова» – «хвост».

Подготовка доноров и извлечение эмбрионов

При получении трансгенных животных важным является выбор вида животных или генетической линии. Так, необходимо учитывать имеет ли ее генетический фон прямое отношение к предполагаемому использованию трансгенных животных. Существуют имбредные линии мышей, не способные к суперовуляции. Кроме того, есть линии мышей, яйца которых культивировать *in vitro* очень трудно. Генетические причины этих особенностей остаются неясными. Это необходимо учитывать при подборе животных.

Для получения оплодотворенных яиц используют суперовуляцию. На мышках показано, что суперовуляция зависит от ряда факторов, в частности, возраста, массы животных, генотипа животных и времени инъекции гонадотропина. Наиболее подходящий возраст мышей 3-5 мес., сроки введения гонадотропина взаимно связаны и зависят от светового цикла содержания животных.

Схема инъекций для мышей, содержащихся в помещении со световым периодом от 8 до 20 ч, должна быть такой: гонадотропин сыворотки жеребой кобылы вводят между 15⁰⁰ и 16⁰⁰, а человеческий хориогонический гонадотропин спустя 46 ч – между 13⁰⁰ и 14⁰⁰, т. е. за 3-4 ч до введения лютеинизирующего гормона. Обычная доза гонадотропина составляет 2-5 МЕ. Самку подсаживают к плодовитому самцу и на следующее утро определяют наличие копулятивной пробки. При индукции суперовуляции у овец используется другая схема (табл. 44).

Визуализация пронуклеусов и микроинъекция ДНК

Для микроинъекции фрагментов ДНК используют различные оптические системы. Это могут быть инвертированные микроскопы с фиксированным штативом или прямые микроскопы. Удобно пользоваться дифференциальной интерференционно – контрастной оптикой, которая обеспечивает хорошее разрешение мембран пронуклеуса.

В настоящее время используют инъекционные иглы двух типов. В одном случае положительное давление, необходимое для инъекции, контролируется микродозаторным насосом, который связан с системой, заполненной вазелиновым маслом. В другом случае инъекция осуществляется с помощью шприца из матового стекла, заполненного воздухом. Стеклоинъекционные иглы оттягивают на микрокузнице. Их делают из стандартных толстостенных капилляров (боросиликатное стекло), наружный диаметр которых равен 1,0 мм, а внутренний – 0,58, кончик должен быть не менее 1 мкм. Полученные иглы необходимо использовать в тот же день, так как на них собирается пыль, и они могут забиваться, со временем их края становятся менее острыми.

Микроинъекция проводится в каплях забуференного раствора Дульбекко. Наносят серию капель (15) диаметром 1,5 мм. Одна

1. Рекombинантную ДНК (10-20 мкл) обрабатывают соответствующими рестриктазами.
2. Полученный раствор наносят на стандартный 1 % агарозный гель и проводят электрофорез. За ходом электрофореза следят в ультрафиолете.
3. Когда необходимый фрагмент ДНК отделится от других электрофоретических зон, вырезают в геле лунку (шириной 0,5 см) непосредственно перед необходимой полосой и заполняют этот колодец 0,7 % агарозой с низкой точкой плавления (BRL).
4. После застывания агарозы проводят электрофорез так, чтобы необходимая полоса ДНК перешла в агарозу с низкой точкой плавления.
5. Вырезают полосу ДНК из агарозы с низкой точкой плавления и инкубируют в пробирке при 70 °С. После того, когда гель расплавится, замеряют объем и добавляют 5 объемов 0,5 М NaCl в ТЭ-буфере (10 мМ ТрисHCl pH 5,1, 1мМ ЭДТА). Смесь ДНК/агароза очищают на ионообменной колонке NACS-52 Prepac (BRL).
6. Колонку промывают 2,0 М NaCl в ТЭ-буфере.
7. Наносят на колонку теплую (40 °С) смесь ДНК/агароза.
8. Промывают колонку 5 мл буфера при 42 °С для освобождения от агарозы и других примесей.
9. Элюируют связанную ДНК 3-мя объемами по 0,1 мл 2,0 М NaCl в ТЭ-буфере.
10. ДНК осаждают 0,6 мл холодного (-20 °С) 95 % этанола.
11. Собирают осадок ДНК центрифугированием при 12000 об/мин. Высушивают и растворяют в малом объеме ТЭ-буфера. Разводят ДНК до необходимой концентрации и используют для инъекции.

Табл. 43. Основные этапы выделения ДНК из геля препаративной ионообменной колоночной хроматографией.

капля представляет собой раствор ДНК для инъекций. В подготовленные капли вносят пастеровской пипеткой по два яйца.

Оплодотворенные яйца от суперовулировавших спаренных самок культивируют в течение 1 ч в среде М16 с 10 % бычьим сывороточным альбумином при 37 °С и 5 % CO₂ в воздухе. Отбирают яйцеклетки с пронуклеусами и переносят их в капле среды РВ₁. В микрокапилляр набирают раствор ДНК из первой капли. С помощью манипулятора ориентируют яйца так, чтобы оба пронуклеуса были в фокусе. Мужской пронуклеус имеет больший размер, чем женский. Яйцо удерживают пипеткой, приложив к шприцу Агла отрицательное давление. Капилляр вводят в мужской пронуклеус коротким резким уколом для того чтобы проколоть мембрану. После введения раствора ДНК пронуклеус должен увеличиться в объеме, потом он сократится до обычных размеров. Микрокапилляр выводят из яйца. После этого удачно прооперированные яйца промывают 6-ю каплями среды М16, содержащей 10 % бычьего сывороточного альбумина и оставляют на ночь в капле М16 с 10 % бычьим сывороточным альбумином при 37 °С и 5 % CO₂ в воздухе.

Пересадка инъекцированных эмбрионов

Эмбрионы с инъекцированной ДНК трансплантируют псевдобеременным самкам (для этого самок спаривают со стерильными (вазэктомированными) самцами). В некоторых случаях трансплантируют 2-х клеточные эмбрионы на следующее утро после операции. Это удобно, так как у значительного процента оперированных эмбрионов развитие блокируется на 1 клеточной стадии, а это время позволяет убедиться, что этот блок пройден.

Микроинъекцированные яйцеклетки переносят реципиенту хирургической трансплантацией, так как бескровный доступ к яйцеводам не только у мелких, но даже и у крупных млекопитающих невозможен. Для этого реципиентам под наркозом вскрывают брюшную полость, локализуют яичники и яйцевод, специальный катетер с содержащимися в нем эмбрионами вводят в яйцевод и инъекцируют эмбрионы.

Когда пересаживают эмбрионы крупного рогатого скота нехирургическим путем в матку реципиента, их культивируют *in vitro* до стадии морулы.

Изучение трансгенного потомства

Трансгенных животных получают с использованием традиционных методов разведения животных с соблюдением полноценных рационов питания. Если у явно беременных самок не произойдет благополучных родов, необходимо произвести кесарево сечение.

День	Обработка
0	Выявление в охоте
7	19 ⁰⁰ – ФСГ, 4 мг донорам
8	7 ⁰⁰ – ФСГ, 4 мг донорам 19 ⁰⁰ – простагландин (1 мл) реципиентам
9	7 ⁰⁰ – ФСГ, 3 мг донорам
10	17 ⁰⁰ – ФСГ, 2 мг донорам
11	7 ⁰⁰ – выявление охоты доноров и реципиентов и осеменение доноров 19 ⁰⁰ – повторное осеменение доноров
12	14 ⁰⁰ – вымывание эмбрионов, микроинъекция и пересадка реципиентам

Табл. 44. Индукция суперовуляции у овец и синхронизация охоты у доноров и реципиентов.

Кесарево сечение – операция искусственного родоразрешения путем вскрытия брюшной полости и матки и извлечения плода через операционную рану.

Скрининг трансгенного потомства

Доказательство интеграции трансгена осуществляется блот-анализом или дот-блот-анализом. Для выделения ДНК осуществляют биопсию хвоста, каждое животное нумеруют. Ткань хвоста разрезают ножницами на маленькие фрагменты и погружают в 2 мл солевого раствора, забуференного фосфатом (PBS), все операции проводят при 0 °С. Ткань гомогенизируют ножевым гомогенизатором.

Полученный образец гомогенизируют при 1000-2000 об/мин, 10 мин. Собирают супернатант и переносят его в 1 мл буфера А (75 мМ NaCl, 25 мМ ЭДТА, рН 8) и добавляют 1 мл буфера Б (10 мМ ЭДТА, 1 % ДСН, 400 мкг/мл протеинкиназы К). Полученные лизаты инкубируют при 37 °С в течение ночи. Образцы экстрагируют один раз фенолом и один раз хлороформом, ДНК осаждают спиртом.

Для анализа полученной ДНК используют дот-блот-гибридизацию ДНК. Выделенную из хвоста ДНК, обрабатывают рестриктазой, которая вырезает трансген из остальной конструкции (для этого используют ту же рестриктазу, которую использовали при выделении трансгена). Фрагменты рестрикции подвергают электрофорезу в агарозном геле. ДНК переносят из геля на мембрану и осуществляют гибридизацию с соответствующим зондом (рис. 157).

Получение трансгенных животных с помощью ретровирусов

Кроме прямой микроинъекции ДНК в мужской пронуклеус, трансгенных животных можно получить, используя ретровирусы. Необходимо отметить, что первые трансгенные мыши были получены Jaenish R. в 1976 г. путем инфицирования предимплантационных эмбрионов ретровирусами, однако позже стали чаще использовать метод прямой микроинъекции ДНК в пронуклеус.

Частота трансформации почти такая же, как и при микроинъекции, а сама техника значительно проще, суть которой сводится к следующему. Ранние морулы освобождаются от оболочки, подвергаются кратковременному воздействию инфекционным вирусом (в геном которого встроен необходимый фрагмент ДНК) и морула трансплантируется псевдобеременным самкам.

Сравнивая два подхода получения трансгенных организмов, необходимо отметить: что трансгенные животные, полученные путем интеграции ретровирусов, всегда являются мозаиками с одним сайтом интеграции. Это объясняется тем, что инфицирование осуществляется на стадии морулы, состоящей из 8-16 клеток. В то же время трансгенные животные, полученные микроинъекцией ДНК, не мозаичны и они передают новый трансген 50 % потомкам (так как скрещиваются с нормальными мышами).

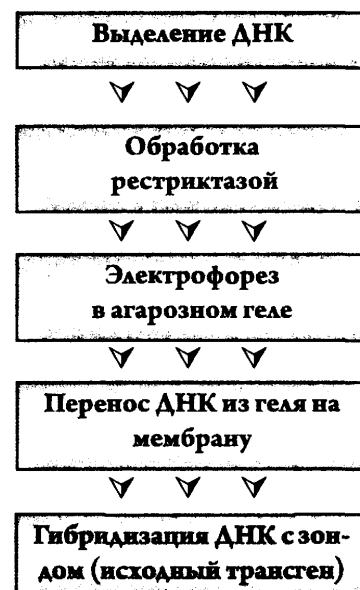


Рис. 157. Схема проведения скрининга трансгенного потомства с использованием дот-блот-гибридизации.

ДНК-зонд – фрагмент ДНК, меченный радиоактивной или другой меткой для его последующего выявления.

Блоттинг – перенос разделенных молекул из одной среды (геля) на твердый носитель (нитроцеллюлозный фильтр, бумага).

Стволовая клетка – соматическая клетка способная дифференцироваться в любой тип клеток данного организма. В результате митотического деления стволовых клеток осуществляется замещение погибших клеток в многоклеточном организме.

Использование ретровирусов имеет важное преимущество, поскольку они могут быть использованы для переноса генов в клетки взрослого организма, в частности клетки крови для исправления генетических дефектов. Наиболее перспективным в этом отношении является использование эмбриональных стволовых клеток.

Ретровирусами можно успешно трансформировать клетки зародышевого пути других видов млекопитающих и человека.

Получение трансгенных животных с применением микрочастиц золота

Swain W. с соавторами предложил новый метод эффективного переноса генов в клетки различного происхождения на основе использования микрочастиц золота. Суть метода в следующем: клонированные фрагменты ДНК сорбируются на микрочастицах золота, которые вводятся в клетки с использованием электропорации в сочетании с электрофорезом. Показано, что перенесенные таким образом гены в культуре клеток мыши и человека активно экспрессируются. Частота трансформации клеток при использовании этой технологии $10^3 - 10^4$. Метод является универсальным и может использоваться для трансформации клеток бактерий, животных и растений.

Swain W.F., Mc Cade D.E., Haynes J.R., Yang N. Gene transfer to mammalian cells using ACCELL™ technology /Keystone symp. Mol. and Cell Biol., Apr. 1-6, 1992 //J. Cell Biochem.-1992.-Suppl. 16L -H. 25.

Использование трансгенных животных

Трансгенные животные с устойчивостью к заболеваниям

Трансгенные животные представляют собой уникальную модель для исследования биологии развития млекопитающих. Наряду с этим, они могут быть использованы и в практике.

Потери, вызванные заболеваемостью сельскохозяйственных животных, составляют более 10 % стоимости полученной продукции. Методами селекции на устойчивость к разнообразным заболеваниям нельзя радикально решить эту проблему.

Защитные механизмы от инфекционных заболеваний обеспечиваются или путем препятствия вторжению возбудителя или изменением системы рецепции. Вторжению и размножению возбудителя в организме препятствуют иммунные механизмы и экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости, а также иммунологически активные молекулы: интерферон, интерлейкины, нейропептиды.

Большое количество работ в настоящее время проводится по использованию антисмысловых РНК и антисенс-олигонуклеотидов. Суть идеи сводится к тому, что экспрессия антисмысловой РНК в клетке приводит к последующей гибридизации ее со смысловой РНК и, следовательно, к ингибированию синтеза белков на таких РНК. Наиболее перспективными в этом отношении являются антисмысловые РНК и РНК вирусов, что подавляет репликацию

Антисмысловая РНК – последовательность, комплементарная молекуле специфической мРНК. Наряду с антисмысловой РНК (антисенс РНК), которая синтезируется в клетке благодаря встроеному гену, антисенс-олигонуклеотиды являются экзогенными, т.е. они вводятся в организм. Впервые этот метод был применен в 1978 г. для ингибирования репликации вируса саркомы Рауса. В этом случае вводили 13-ти нуклеотидное звено РНК, комплементарное мРНК вируса. Хотя этот метод достаточно прост и высокоспецифичен, он имеет ряд недостатков: плохое проникновение олигонуклеотидов через плазматическую мембрану клетки; низкая стабильность этих олигонуклеотидов.

вирусного генома. В частности по этой технологии получены трансгенные куры, устойчивые к вирусу лейкоза. Показано, что клеточные линии, содержащие трансгенную антисмысловую РНК, имели на 90-98 % более высокую резистентность против аденовируса по сравнению с контрольными линиями.

Трансгенные животные с новыми хозяйственно-полезными свойствами

Одна из основных задач животноводства – повышение надоев, скорости роста и улучшение качества продукции.

Рост животных контролируется многими генами, зависит от условий питания и факторов окружающей среды и контроль над этими важными хозяйственными признаками является очень сложной задачей. Один из подходов в решении этой проблемы основан на использовании генов, кодирующих разнообразные факторы роста – гормон роста, инсулиноподобный фактор роста и др.

Первые трансгенные мыши с геном гормона роста крысы (1982) имели увеличенную в два раза массу тела. У трансгенных свиней с геном рилизинг-фактора гормона роста конечная живая масса была на 15,7 % выше обычных – контрольных животных. В то же время овцы с геном гормона роста, хотя и содержали повышенный уровень этого гормона в организме, не отличались от контрольных по скорости роста. Эти работы с одной стороны показывают перспективность использования трансгенных животных, а с другой – свидетельствуют о сложности и недостаточной изученности систем регуляции роста животных.

Трансгенные животные как продуценты биологически активных веществ

В медицинской практике широкое применение находят такие образующиеся в тканях человека белки как фактор свертываемости крови, гормон роста, инсулин, интерлейкин-2 и другие. Получение подобных белков сопряжено с рядом трудностей.

Практическое получение этих белков может быть осуществлено путем создания рекомбинантных микроорганизмов, несущих ген соответствующих белков человека. Однако этот подход позволяет получить только некоторые белки, поскольку синтезирующиеся в клетках микроорганизмов белки не могут быть нормально гликозилированы или карбоксилированы, что приводит к потере их биологической активности.

Эти белки могут быть синтезированы в культуре клеток, однако выход белка в этих системах низкий. Промышленные биореакторы для культивирования клеток животных достаточно дороги.

Перспективным подходом при получении белков могут быть трансгенные животные, несущие гены соответствующих белков. Хотя получение трансгенных животных сложная задача, однако полученные животные могут продуцировать относительно

Карбоксилирование – непосредственное введение карбоксильной группы – COOH в органические соединения действием CO₂. В организме карбоксилирование происходит под действием специфических ферментов; например пируваткарбоксилаза катализирует карбоксилирование пировиноградной кислоты. Карбоксилаза играет существенную роль в окислении промежуточных продуктов расщепления углеводов, жиров и белков в организме.

Вид животного	Содержание белка, %
Кобыла	2,2
Корова	3,3
Коза	3,7
Свинья	4,9
Овца	5,8
Собака	7,1
Крольчиха	10,4

Табл. 45. Содержание белка в молоке разных видов животных по В.И.Георгиевскому.

большое количество белка с относительно низкой стоимостью. Перспективным является использование молочной железы крупного рогатого скота как места синтеза необходимых белков, т. е. использование ее в качестве биореактора. Это связано с тем, что молочная железа обладает огромной синтетической белковой продуктивностью. Общая концентрация белков в молоке в зависимости от вида животного достигает 2 – 10 % (табл. 45).

Для коммерческого производства рентабельным является производство фармацевтически важных белков, если в 1 л содержится более грамма такого белка. Одним из этапов в получении трансгенных животных, продуцирующих гетерогенный белок с молоком, является использование промоторов, обеспечивающих экспрессию необходимых белков в молочной железе. В настоящее время выделены и используются такие промоторы генов, экспрессирующихся в молочной железе как β -казеин, α S1-казеин, α -лактоальбумин, β -лактоглобулин.

В настоящее время получены такие рекомбинантные белки, синтезирующиеся в молочной железе как: человеческий белок С, антигемофильный фактор IX, α -1-антитрипсин, лактоферрин, человеческий сывороточный альбумин, интерлейкин 7-2, урокиназа, тимозин. Однако большинство этих белков получено в эксперименте.

На промышленном уровне разработана (1992 г., Великобритания) технология получения человеческого альфа-1-антитрипсина в молочной железе трансгенных овец. Получена овца, в молоке которой содержится до 35 г/л этого белка (это около половины всех белков молока). Это позволяет получать 10 кг этого белка в год от одного животного, что достаточно для лечения 50 пациентов с эмфиземой легких.

Наиболее серьезные успехи в применении трансгенных животных, способных продуцировать белки для терапии, достигнуты в США, Шотландии и Нидерландах. В Нидерландах был получен трансгенный теленок, несущий ген человеческого лактоферрина, который транспортирует железо и обладает антибактериальными свойствами. В молоке трансгенных коз синтезировался активатор плазминогена, который используется для устранения тромбов.

Использование трансгенных животных в научных исследованиях

Основными проблемами, связанными с получением и использованием трансгенных животных, в частности в сельском хозяйстве, являются низкая жизнеспособность эмбрионов, низкая степень интеграции трансгенов, иногда неконтролируемая экспрессия трансгена и высокая стоимость таких животных. Эти вопросы могут быть решены только после детального изучения механизмов интеграции трансгена, контроля генетической активности генома.

Трансгенные организмы являются уникальной моделью в исследовании механизмов регуляции генов в процессе развития,

Каждый год ученые выявляют от 100 до 200 новых антибиотиков. Разработка технологий и испытания новых антибиотиков обходятся очень дорого и в производство передаются только те образцы, которые имеют наибольший терапевтический эффект и экономический интерес. На их долю приходится 1-2 % от всех обнаруживаемых антибиотиков. Специалисты полагают, что увеличение эффективности этого поиска может быть достигнуто на основе технологии рекомбинантных ДНК.

Тромб – кровяной сгусток, который образуется в кровеносном сосуде или в полости сердца, что приводит к затруднению или прекращению тока крови.

1. Биология развития
2. Механизмы онтогенеза
3. Механизмы регуляции генов
4. Регуляция активности иммунной системы
5. Механизм экспрессии вирусных ДНК и чужеродных генов

Табл. 46. Некоторые научные направления, которые могут развиваться с применением трансгенных животных.

исследовании механизмов онтогенеза, функциональной активности иммунной системы, биологии развития млекопитающих, механизмов экспрессии вирусных ДНК (табл. 46).

Так, на трансгенных мышях, несущих ген вируса человека группы JC, вызывающего прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, показано, что геном этого вируса реплицируется в почках и головном мозге, однако поражается только мозг. JC вирус реплицируется в большей части в олигодендроцитах, вызывает их деструкцию и демиелинизацию. Оказалось, что олигодендроциты экспрессируют вирусный «энхансер», который распознает и активирует геном вируса JC.

Как известно, мыши давно используются в качестве модели при тестировании химических веществ, ядов и лекарственных препаратов. В настоящее время трансгенных мышей используют для оценки риска при канцерогенезе и иммунодефиците с последующим переносом этих данных на человека.

Для изучения роли интронов в регуляции эффективности экспрессии генов использованы трансгенные мыши, содержащие и не содержащие интронные последовательности генов гормона роста, металлотионеина и β -глобина под промотором гена эластазы и металлотионеина. Показано, что экспрессия интронсодержащих генов была в 10-100 раз выше, чем соответствующих генов, не содержащих интронов.

Все живые организмы независимо от уровня организации обладают способностью активно отвечать (изменяя уровень метаболизма) на разнообразные внешние воздействия. Число внешних факторов, оказывающих влияние на биологические системы, чрезвычайно многообразно, велико и число возможных вариантов ответа организма на внешние воздействия. Мы знаем, что в формировании ответной реакции центральную роль играет модуляция активности специфических генов, которая направлена на повышение резистентности организма. Однако мы не знаем механизмов, обеспечивающих активность генов.

В исследовании этих фундаментальных свойств биологических систем большую, а может и основную роль, могут сыграть трансгенные организмы. Не исключено, что исследование механизмов взаимодействия генома со средой может оказаться более перспективным, чем прямое исследование трансгенных организмов.

Нет сомнений, что потенциальные возможности трансгенных животных будут реализованы в полном объеме только по мере накопления знаний механизмов экспрессии трансгенов. В настоящее время этот процесс только начинает исследоваться, и уже установлен ряд особенностей функционирования трансгенов. Кроме того, получен целый комплекс совершенно необычных результатов. Остановившись на некоторых особенностях, необходимо отметить, что интенсивность экспрессии (количество синтезированных мРНК) не находится в прямой зависимости от количества копий трансгена. Интенсивность экспрессии трансгенов зависит от наличия регуляторных последовательностей. Был сконструирован

Лocus – место расположения того или иного гена в хромосоме.

минилокус гена β -глобина человека, который имел размер в 38 тыс. пар нуклеотидов и содержал кроме регуляторной последовательности этого гена, последовательности расположенные за 20 тыс. пар нуклеотидов перед геном β -глобина и через 15 тыс. пар после гена β -глобина. В таком случае такой ген β -глобина человека экспрессировался тканеспецифично, причем уровень экспрессии зависел не от локализации регуляторного минилокуса, а от количества копий минилокуса на геноме мышцы.

На трансгенных мышцах, содержащих от 1 до 10 копий гена β -казеина крысы с прилегающими к нему регуляторными последовательностями, показано, что этот ген экспрессируется в молочной железе лактирующих мышцей на уровне 0,1-1% от экспрессии собственного эндогенного гена β -казеина. Было показано, что ткане- и стадийспецифичность экспрессии этого гена определялась специфическими регуляторными последовательностями, однако на уровень экспрессии трансгена влияло и место его интеграции в геном мышцы.

Выявлено достаточно большое число случаев потери тканеспецифической экспрессии трансгена. Так, из 11 трансгенных мышцей, несущих химерный ген, только у 6-ти наблюдалась тканеспецифическая экспрессия химерного гена, а у остальных мышцей, которым был инъецирован трансген вместе с плазмидой pBR 322 этого не наблюдалось [Shani M., 1986].

Трансгены не всегда сохраняют стабильность и довольно часто могут перестраиваться в процессе функционирования. Vize P.D. с соавторами (1988) показали, что рекомбинантный ген соматотропина свиньи под промотором гена металлотионеина человека претерпел перестройки и не экспрессировался. С целью выяснения возможных механизмов нестабильности трансгенов Ninomiya T., Hoshi M. и Yuki A. (1989) получили трансгенных мышцей, которые содержали либо 20, либо 80 копий трансгена с разной ориентацией трансгена относительно друг друга: голова-хвост, голова-голова и хвост-хвост. Анализ таких последовательностей в ряду поколений показал, что структуры, представленные инвертированными повторами (т. е. ориентация голова-голова и хвост-хвост) терялись при передаче трансгена потомству.

Имеются указания, что экспрессия трансгена может изменяться в процессе онтогенеза. Wolgemuth D. с соавторами в работе, опубликованной в Nature в 1989 г. отмечают, что трансген Нох-1,4, у которого 3'-конец замещен на соответствующую часть гена Т-АГ SV-40 у взрослых трансгенных мышцей экспрессировался в семенниках. Однако на эмбриональной стадии наблюдалась сложная картина экспрессии трансгена, он экспрессировался в 5 раз интенсивнее, чем эндогенный ген Нох-1,4, кроме того, он экспрессировался в эмбриональном кишечнике трансгенных мышцей, тогда как эндогенный ген Нох-1,4 в этой ткани не экспрессировался. Такая сверхпродукция Нох-1,4 у трансгенных мышцей приводила к нарушению развития кишечника (чрезмерное развитие толстого кишечника).

Возможность переноса ДНК при помощи микроинъекций в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки мышцей была показана Гордоном и др. в 1980 году [J.W. Gordon, G.A.Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Bardosa, F.H. Ruddle / Proc. Natl.Acad. Sci. USA. - 1980.-77, 7380-7384]. Авторы инъецировали в несколько сотен оплодотворенных яйцеклеток плазмидный вектор pBR 322, который содержал ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV) и часть гена обезьяньего вируса 40 (SV 40). Было получено 78 потомков от суррогатных матерей, два из которых содержали плазмидную ДНК. Авторы сделали вывод о возможности использования рекомбинантных плазмид в качестве вектора.

Наличие трансгена в клетке может приводить и к изменениям функции собственных генов клетки, механизмы которых пока не ясны.

Получены трансгенные мыши, несущие ген *Myo D* под контролем энхансер-промотора креатининкиназы мышечной ткани мышей. У таких мышей *Myo D* экспрессировался в скелетных мышцах и в больших количествах в сердечной мышце, где в норме *Myo D* не экспрессируется. Такие животные достигают больших размеров и погибают на 16-18 день эмбрионального развития. Анализ РНК в сердце этих животных показал, что синтез сердечного α -актина подавляется, а скелетный α -актин и миогенин активируются. Следовательно, эктопично экспрессированный *Myo D* может активировать гены скелетных мышц в не скелетной ткани развивающегося животного.

В заключение отметим, что использование трансгенеза в исследовании механизмов регуляции генома является наиболее перспективным в решении столь сложной фундаментальной проблемы как проблема регуляции генной активности.

Генотерапия

Понятие генная терапия трактуется в узком и широком смысле. Если определять полное значение генотерапии, то она включает: идентификацию генома индивидуума, устранение молекулярных нарушений его генома, предотвращающих проявление патологий, а при желании или необходимости воссоздание новой генетической информации, обеспечивающей желаемые свойства фенотипа (рис. 158). Эта задача может решаться в различном исполнении (см. текст на полях).

По мнению доктора Ditta Bartels (1988), вместо активного вмешательства в геном эмбриона человека с целью корректирования наследственных болезней, что может иметь непредсказуемые последствия, целесообразно ограничиться отбором *in vitro* и имплантацией генетически здоровых эмбрионов. Для этого общество должно законодательно разрешить эксперименты, направленные на уничтожение эмбрионов с генетическими нарушениями и запретить вмешательство в геном зародыша с целью исправления генетических дефектов.

Вместе с тем, перенос генов – один из возможных способов лечения наследственных заболеваний у человека. При этом в качестве вектора могут быть использованы производные ретровирусов, у которых deletированы, необходимые для репликации гены *gag*, *pol* и *env* и встроены необходимые трансгены с их регуляторными последовательностями. В качестве клеток реципиентов можно использовать соматические клетки человека, наиболее удобны – стволовые клетки костного мозга. Эти клетки могут быть легко выделены, способны расти в культуре и после введения в них вектора их легко вновь ввести в тот же организм. Стволовые клетки долго существуют в организме.

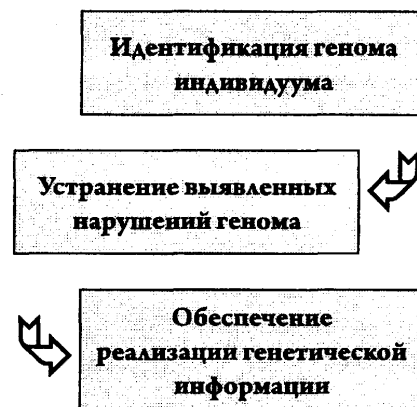


Рис. 158. Некоторые этапы генотерапии.

Генная терапия *ex vivo*.
Введение гена или генов в изолированные клетки больного. После того как клетки больного трансформированы и прокультивированы *in vitro* их опять вводят в организм больного с помощью трансфузии, инфузии или инъекции.

Генная терапия *in vivo* – введение гена (генов) непосредственно в орган или ткань больного с целью устранения генетического нарушения.

Генная терапия с использованием стволовых клеток – введение гена (генов) в оплодотворенное яйцо или клетки эмбриона на ранних стадиях развития. В таком случае чужеродный ген оказывается в ядрах всех клеток развивающегося организма, в том числе и половых и изменяет его фенотип.

Генная терапия с использованием «антисмысловых» последовательностей – лечение *in vivo* генетических заболеваний путем блокирования синтеза генетически измененного белка включением в геном нуклеотидных последовательностей комплементарных специфической мРНК.

Можно использовать в качестве реципиентов трансгена гепатоциты (эмбриональные) или фибробласты.

Первые эксперименты по генотерапии гемопоэтических стволовых клеток костного мозга с использованием ретровирусных векторов были проведены в начале 80-х годов на мышцах с недостаточностью аденозиндеаминазы (АДА). Это было связано с тем, что недостаточность АДА является заболеванием клеток костного мозга и его можно лечить трансплантацией клеток костного мозга. Недостаточность АДА у человека ведет к тяжелому (летальному) комбинированному иммунодефициту.

14 сентября 1990 г. был проведен первый в истории эксперимент по генной терапии синдрома недостаточности аденозиндеаминазы у человека. Пациентом стала 14-летняя девочка, которая получила 1 млрд. собственных Т-лимфоцитов. Клетки были получены у самого пациента, трансформированы вирусом, несущим соответствующий ген. В течение нескольких месяцев вводились рекомбинантные клетки. 9 марта 1992 г. в институте Сан-Рафаэле, Милан, 5-ти летнему мальчику были введены периферические лимфоциты, предварительно выделенные у пациента, трансформированы ретровирусом, несущим ген аденозиндеаминазы. На следующем этапе планируется введение ему трансформированных клеток костного мозга.

К концу 1992 г. в США было осуществлено около 32 клинических процедур генной терапии. Эти операции проводились на безнадежно больных людях. Интересно, что большинство американцев высказывается за применение генотерапии.

Важным этапом в развитии генотерапии является разработка метода, основанного на использовании молекулярного комплекса ДНК-связывающего белка и «разоруженного» ретровируса для доставки активных генов в дефектные клетки. Эта технология была разработана D.Curiel (Ун-т Северной Каролины) и M. Cotten (Ин-т вирусной патологии, Австрия). В качестве белка, связывающего ДНК, используется полилизин. Геном ретровируса разрушается УФ-лучами, что обеспечивает безопасность заражения вирусом. Кроме того, эта методика позволяет вводить в клетку ДНК больших размеров, так как ДНК не включается в геном вируса (как обычно), а располагается снаружи «убитой» вирусной частицы.

В настоящее время описано более 4500 состояний у человека, которые наследуются моногенными признаками (доминантными или рецессивными). Уже клонировано более 3000 генов человека, что позволяет осуществлять генетические трансформации соматических клеток.

Вторым важным направлением генотерапии является лечение онкозаболеваний у человека. Это осуществляется также трансформацией соматических клеток. Пациентам вводят собственные лимфоциты, в состав генома которых включен ген, синтезирующий фактор некроза опухоли (TNF). Трансформированные лимфоциты TNF были названы опухолеинфильтрующими лимфоцитами (TIL).

Известно около 5000 наследственных болезней, из них 2000 приводят к тяжелой форме инвалидности. Исследование связи обычных патологий с геномом показало, что почти 500 заболеваний связаны с появлением мутаций. Большинство известных мутаций передаются из поколения в поколение, сохраняясь в популяции. Но иногда мутации, приводящие к патологиям, появляются заново в клетках зародышевого пути. Такие заболевания как ахондроплазия (карликовость) возникают как замена одного нуклеотида – гуанина на цитозин в гене-регуляторе гормона роста. При этом ни у кого из родственников больного нет этого заболевания.

Первоначальные опасения потенциальной опасности генной инженерии человека и животных не оправдались. В последнее время признано целесообразным применение генной терапии для лечения многих заболеваний. Ограничение остается в том, что это лечение должно быть направлено на конкретных больных и касается их соматических клеток.

Ведутся исследования по переносу гена интерлейкина-2 в лимфоциты человека.

Примером еще одного подхода в генотерапии является эксперимент по лечению опухоли мозга крыс. В опухолевые клетки вводили ген вируса простого герпеса. Это приводило к тому, что клетки становились чувствительными к лекарству ганцикловиру, в то время как нормальные клетки не поражались этим препаратом.

По мнению специалистов, лет через десять смогут лечить болезнь Альцгеймера, используя генетические модификации соматических клеток. Нет сомнений, что успехам в области генотерапии будут способствовать результаты, полученные при выполнении программы «Геном человека», направленной на полное определение нуклеотидных последовательностей всего генома человека.

Глава XI

Инженерная энзимология

Предмет и задачи инженерной энзимологии

Инженерная энзимология – новое научно-техническое направление, которое возникло на стыке энзимологии, химической технологии и биотехнологии. Основные задачи инженерной энзимологии связаны с использованием ферментов, полиферментных систем и целых клеток в технологических процессах, направленных на получение новых продуктов, улучшение качества существующих продуктов или улучшение технологических показателей.

Решение задач инженерной энзимологии стало возможно благодаря знанию свойств и механизмов действия ферментов и разработке промышленных систем иммобилизации ферментов.

Инженерная энзимология интенсивно развивающаяся область, однако мы остановимся на самых основных методах исследования в этой области и рассмотрим основные свойства ферментов, характеристику носителей, использующихся для иммобилизации, методы иммобилизации, области применения иммобилизованных ферментов и клеток, перспективы инженерной энзимологии.

Основы методологии иммобилизации ферментов

Несмотря на преимущества использования выделенных ферментов в промышленности, вплоть до 80-х годов использовались только гидролитические ферменты в пищевой промышленности.

Такая ситуация связана с тем, что выделенные ферменты используются однократно, так как трудно отделить фермент от исходных субстратов и продуктов реакции, что делает их применение достаточно дорогим. Кроме того, выделенные ферменты неустойчивы при хранении. В последние годы наметились экспериментальные подходы в преодолении трудностей использования ферментов в промышленности. Прежде всего, это связано с разработкой систем многократного использования ферментов, т. е. более чем в одном цикле. Это стало возможным благодаря разработке систем иммобилизации ферментов.

Понятие «иммобилизованный фермент» было использовано на первой конференции по инженерной энзимологии, которая состоялась в 1971 г. в Хенникере (США). Однако этот методический подход начал использоваться гораздо раньше (табл. 47). Еще в 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что инвертаза, адсорбированная на активированном угле, сохраняла свою ферментативную активность. Метод ковалентного связывания ферментов с носителем впервые был применен Н. Грубхорфером и Д. Шлейтом в 1953 г. И только в 60-х годах начали понимать практическую значимость методов иммобилизации (табл. 48), так как был обнаружен ряд

Инженерная энзимология – обеспечивает получение новых продуктов, улучшение качества существующих продуктов, или технологических показателей на основе использования ферментов, полиферментных систем и целых клеток.

Иммобилизация ферментов – связывание ферментов с водонерастворимым носителем и тем самым приводящее к ограничению движения молекул в пространстве.

1916	Нельсон и Гриффин показали, что инвертаза, которая была адсорбирована на активированном угле, сохраняла свою ферментативную активность
1953	Разработали методы ковалентного связывания фермента и носителя
1971	Начали использовать понятие «иммобилизованный фермент»

Табл. 47. Некоторые этапы формирования методологии иммобилизованных ферментов.

преимуществ использования таких ферментов по сравнению с растворимыми ферментами:

во-первых, иммобилизованные на водонерастворимой матрице ферменты легко могут быть отделены от конечного продукта и субстратов реакции, что позволяет:

1 – остановить реакцию в нужный для экспериментатора момент; 2 – использовать фермент многократно; 3 – получать чистый продукт.

Во-вторых, в таких системах (гетерогенных) легко можно осуществлять ферментативный процесс непрерывно (в проточном режиме) и регулировать скорость реакции, изменяя скорость потока с субстратами.

В-третьих, иммобилизация может вести к стабилизации ферментов и направленному изменению их свойств.

В-четвертых, изменяя свойства носителя (действием физических факторов – свет, звук и др.) можно регулировать активность ферментов, связанных с этим носителем. Само понятие «иммобилизация» (связывание, ограничение подвижности) означает не только связывание фермента или другого биологически активного лиганда с нерастворимым носителем, но, прежде всего, ограничение свободы движения молекул в пространстве. И в этом смысле, иммобилизация – это формирование внутримолекулярных или межмолекулярных «спивок» белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными реагентами, а также присоединение фермента к полимерным реагентам.

Характеристика матриц для иммобилизации

Природные носители для иммобилизации ферментов

В настоящее время в качестве носителей или матриц для иммобилизации ферментов используют разнообразные соединения. В идеале матрица должна удовлетворять ряду требований: 1 – обладать высокой химической и биологической стойкостью; 2 – обладать механической прочностью, не должна изменяться под давлением и хорошо храниться при температуре 30 °С; 3 – должна иметь открытую и крупнопористую структуру, чтобы обеспечивать хорошую проницаемость для ферментов, субстратов и образующихся продуктов; 4 – легко образовывать производные при комнатной температуре и в водной среде; 5 – желательно, чтобы она имела невысокую стоимость (рис. 159).

В настоящее время отсутствует матрица, удовлетворяющая одновременно всем требованиям, предъявляемым к «идеальной матрице». Это привело к разработке разнообразных носителей, выбор которых осуществляется в зависимости от конкретных задач. Все носители могут быть квалифицированы как природные и синтетические.

Природные полимеры, использующиеся в качестве носителей, имеют достаточное количество реакционно-функциональных групп, легко могут быть модифицированы и вступают в реакции

	Преимущества
1.	Хорошее отделение ферментов от субстратов и конечных продуктов
2.	Обеспечение непрерывности ферментативных процессов, регуляции ферментативной активности
3.	Обеспечение стабилизации ферментов
4.	Возможность изменения свойств носителя и тем самым, регулирование активности иммобилизованных ферментов

Табл. 48. О некоторых преимуществах иммобилизованных ферментов.

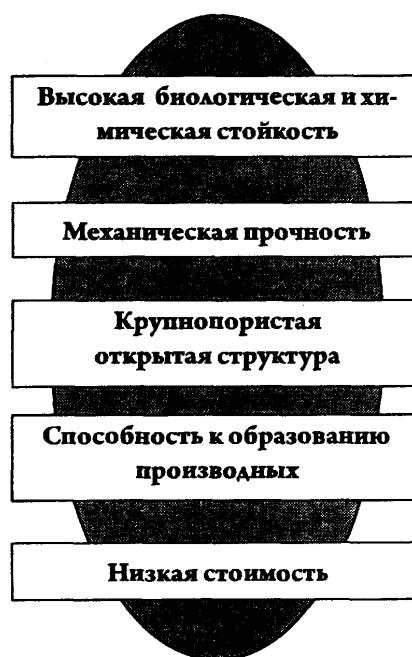


Рис. 159. Основные требования, которые предъявляют к матрицам для иммобилизации ферментов.

с биомолекулами. Основным недостатком природных полимеров является низкая устойчивость к действию микроорганизмов и относительно высокая стоимость.

Наибольшее распространение в качестве носителей для иммобилизации ферментов получили полисахариды: агароза, целлюлоза и их производные.

Агароза характеризуется хорошей гелеобразующей способностью, она биологически инертна. При охлаждении горячего 2-6 % водного раствора агарозы ниже температуры 45 °С она полимеризуется с образованием крупнопористого геля, представляющего смесь из заряженных и нейтральных полисахаридов. При формировании геля индивидуальные полисахаридные цепи образуют спирали, агрегирующие с образованием узлов (рис. 160).

При температуре около 100 °С агароза плавится, поэтому в отличие от сефадекса ее нельзя автоклавировать. Высушивание агарозы сопровождается деструкцией геля, и в связи с этим ее хранят в виде водной суспензии. В состав агарозы кроме чередующихся поли-β-галактопиринозил-3,6-ангидро-α-L-галактопиранозольных остатков входят и сульфатные, метоксильные, кетальпируватные и карбоксильные группы. Содержание сульфата в агарозе является показателем ее чистоты. Агароза имеет большие поры, в которые легко проникают белки с молекулярной массой до миллиона. Жесткость агарозы достаточна, чтобы придавать ее частицам сферическую форму. Размер пор агарозного геля поддерживается водородными связями, которые формируются между нитями спирали агарозных цепей. Любой фактор (температура, мочевины, гуанидинхлорид, фенол и др.), разрушающий водородные связи, приводит к растворению агарозы. Для предотвращения разрыва водородных связей агарозу сшивают эпихлорогидрином, что повышает ее устойчивость к хаотропным реагентам.

На основе агарозы готовят различные модификации матриц. Так, фирма «Pharmacia» (Швеция) и «Bio-Rad Labs» (США) модифицируя различные функциональные группы, получают производные агарозы (табл. 49).

При производстве сефарозы агароза подвергается специальной обработке, в частности, из нее удаляются заряженные полисахариды. В зависимости от концентрации агарозы различают 5 типов сефарозы и 6 типов биогеля А.

Агар и агароза не синонимы, а различные препараты, которые отличаются друг от друга по физико-химическим свойствам. Агар, как и агарозу, получают из красных водорослей, точный состав агара не установлен. Он содержит два основных полисахарида: агарозу и агаропектин. Гели агара образуются так же, как и гели агарозы. К преимуществам агара можно отнести низкую стоимость и нетоксичность. Он формирует относительно прочные гели даже при низких концентрациях (0,5 %) в растворе.

Альгиновые кислоты и их производные состоят из связанных β-1,4-связями остатков D-маннурановой кислоты:

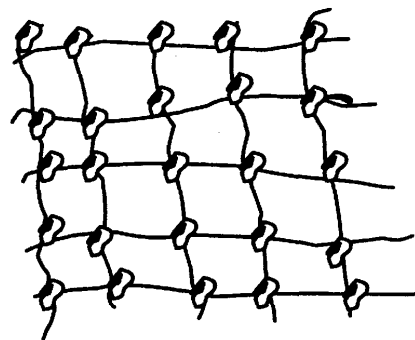


Рис. 160. Схематическое изображение структуры полимера агарозы.

Функциональные группы	Название	Концентрация, %
	Сефароза 6В	6
	Сефароза 4В	4
	Сефароза 2В	2
-OCH ₂ COOH	КМ-сефароза 6В	6
O-CN	Бромциан-сефароза 4В	4
	Биогель А-(0,1)	
	Биогель А	
	Биогель А-5	6
	Биогель А-15	4
	Биогель А-50	2
	Биогель А-150	1

Табл. 49. Производные агарозы

Агар – состоит из агарозы, которая является линейным полимером, состоящим из остатков D – и L- галактозы, и агаропектина, в котором остатки галактозы частично этерифицированы серной кислотой. Агар – один из лучших природных гелеобразователей.

Альгиновая кислота – полисахарид, являющийся одним из компонентов клеточных стенок водорослей.

Растворимость альгиновых кислот зависит от температуры и рН раствора. Альгинаты кальция образуют гели, их используют для иммобилизации ферментов, клеток и органелл.

Целлюлозные носители – представляют собой поли- β -1,4-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозу.

Целлюлоза характеризуется высокой гидрофильностью и содержит большое число гидроксильных групп. Для химической устойчивости целлюлоза «сшивается» эпихлоргидрином. Целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза. Гранулированная целлюлоза является хорошим носителем для иммобилизации, она относительно дешева и находит широкое применение. Гранулированную целлюлозу легко модифицируют и получают ее производные.

Существует несколько методик получения гранулированной целлюлозы, которые включают несколько стадий (рис. 161). Гранулированная целлюлоза обладает высокой пористостью, хорошей механической прочностью, выраженной гидрофильностью и находит применение в инженерной энзимологии и хроматографии.

Декстран – полисахарид, состоящий из α -1,6-связанной глюкозы – разветвленный полисахарид, выделяемый из клеток бактерий *Leuconostoc mesenteroides*. На основе декстрана, сшитого эпихлоргидрином, выпускаются «сефадексы» (Швеция, «Pharmacia»). При высушивании сефадексы легко сжимаются, а в водных растворах сильно набухают. Чем меньше количество сшивков, тем сильнее проявляется их способность набухать. В различных марках сефадексов содержится небольшое количество карбоксильных групп, что обеспечивает их сродство к катионам. Сефадексы типа П различаются между собой по степени химических сшивков и, как следствие, по степени пористости и способности набухать в воде.

Хитиновые носители – являются природными аминополисахаридами. По структуре они сходны с целлюлозой, у которой CH_2OH группа заменена ацетатным остатком (рис. 30). Как известно, хитин формирует наружный скелет насекомых, ракообразных и клеточные стенки грибов. Он обладает пористой структурой, нерастворим в воде, разбавленных кислотах, щелочах и органических растворителях. Он легко модифицируется глютаровым альдегидом.

При деацетилировании (обработке концентрированными растворами щелочей) хитин переходит в хитозан. Имея свободные аминогруппы, хитозан легко связывается с белками. В отличие от хитина хитозан легко растворяется в минеральных и органических кислотах и его можно использовать при иммобилизации фермента в виде растворов при рН 3-7.

Имеющиеся результаты по использованию хитозана в качестве носителя для иммобилизации ферментов показали, что ферменты в ковалентно связанной форме обладали высокой каталитической активностью и устойчивостью к действию микроорганизмов. Белки, иммобилизованные с хитозаном, характеризовались повышенной термостабильностью.

Существует несколько методик получения целлюлозы в виде сферических гранул, которые включают несколько общих стадий.

1. Получение жидкой фазы, содержащей целлюлозу или ее производные;
2. Затвердевание жидких капель;
3. Регенерация целлюлозы в виде твердых сферических частиц;
4. Заключительная промывка.

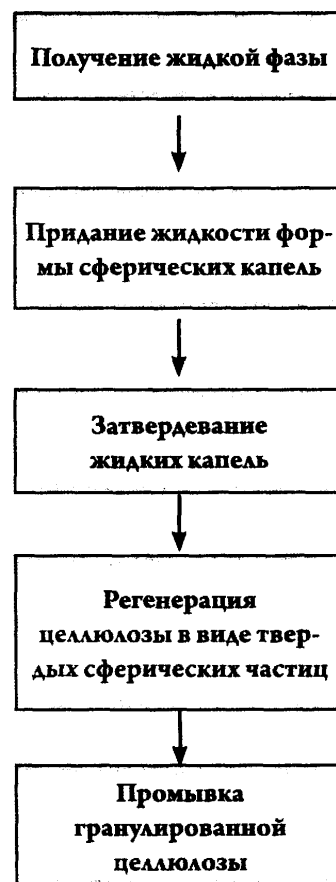


Рис. 161. Основные этапы получения гранулированной целлюлозы.

В качестве носителей используют и белки, чаще всего для этих целей используют коллаген, кератин и фибрин. Использование белков в качестве матриц имеет то преимущество, что они являются естественной матрицей для мембраносвязанных ферментов. Обычно они формируют фибриллярную пленку толщиной 80 мкм. Имобилизацию ферментов с белками можно проводить как в присутствии, так и без сшивающих агентов.

Главным недостатком таких носителей является их биodeградация и иммуногенность.

Коллаген – фибриллярный белок, относящийся к группе склеропротеидов. Он является самым распространенным белком высших животных. Коллаген легко выделяется, имеет высокую гидрофильность (способен сорбировать до 5 г воды на 1 г белка), содержит большое число реакционных групп, способных связывать ферменты. Его широко используют в качестве сорбента при культивировании клеток (рис. 162).

Коллаген можно модифицировать и получать на его основе матрицы с определенными свойствами. Если блокировать аминокислотные группы, можно изменить поверхностный заряд носителя. Его можно перевести в азидную форму. В таком случае карбоксильную группу коллагена этерифицируют и обрабатывают гидразином и азотной кислотой.

Из коллагена получают желатин, который тоже может использоваться в качестве матрицы для иммобилизации ферментов. Для получения желатина коллаген длительно кипятят в воде, что приводит к гидролизу некоторых ковалентных связей в коллагене. В результате такой обработки нерастворимый коллаген переходит в растворимую смесь полипептидов. Благодаря способности образовывать гелевую структуру, желатин может быть удобным носителем для ферментов.

Еще одним склеропротеидом является кератин, который получается из шерсти, волос, роговых покровов. Как известно, существуют две структурные формы кератинов: α и β . В α -кератине содержится большое количество цистеина, что может обеспечить иммобилизацию ферментов, содержащих свободные SH-группы. β -кератин (белок шелка и паутина) не содержит остатков цистеина, но имеет высокое содержание глицина и аланина, что и обеспечивает формирование зигзагообразной структуры полипептидной цепи. Так как механические свойства у α и β -кератина различны (β -кератин нерастворим в воде, имеет большую гибкость, а α -кератин имеет большую механическую прочность), то в зависимости от задач можно использовать различные формы кератина.

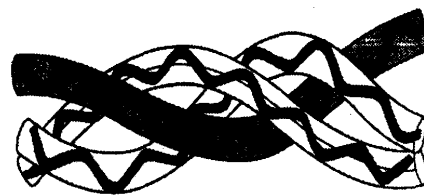


Рис. 162. Фото коллагена.

Кератины – фибриллярные белки, входящие в состав рогового слоя волос, рогов, шерсти, перьев, чешуи, ногтей, копыт.

Липидные носители

Как известно, большая группа ферментов функционирует в составе клеточных мембран (так называемые мембраносвязанные ферменты). В формировании конформации ферментов большую роль играют липидные компоненты мембран. Использование липидов в качестве носителей для иммобилизации ферментов

позволяет приблизиться к моделированию природных ферментных систем.

Природные липиды достаточно разнообразны. Их делят на глицеролипиды, сфинголипиды и нейтральные липиды

Чаще всего липиды используются в виде монослоя (на различных поверхностях) или бислоя (липосомы, рис. 60).

Полярные липиды способны формировать мономолекулярные пленки на границах раздела фаз (вода-воздух, вода – неполярный растворитель). В таком состоянии липидные молекулы расположены таким образом, что их полярные головы (заряженная часть) погружены в водную фазу, а углеводородные (не заряженные «хвосты») направлены в воздушную среду (рис. 163).

Такая липидная пленка может адсорбировать белки (электростатические и гидрофобные взаимодействия) и обеспечивать их функциональную активность.

В качестве поверхности для получения липидного монослоя можно использовать силикагель, аэросил или другие твердые носители. Для получения липидного монослоя на твердый носитель наносят фракции заряженных липидов. Изменяя систему растворителей и твердого носителя, можно получать монослои с различной ориентацией липидных компонентов. Так, если липид растворен в органическом растворителе (бензол, гептан и др.) и адсорбируется на полярном силикагеле, то в таком монослое углеводородные цепи будут ориентированы наружу. В том случае, если липиды из полярного растворителя адсорбируются на неполярном носителе (графитовая сажа), то в таком монослое полярные головки липидов ориентированы в сторону растворителя.

Липосомы были описаны в 1964 г. В настоящее время их делят на три типа: мультиламеллярные, моноламеллярные и макровезикулярные.

Мультиламеллярные липосомы представляют собой замкнутые упорядоченные структуры, состоящие из нескольких липидных бислоев, отделенных друг от друга водной средой (рис. 164). Расстояние между соседними липидными бислоями около 7,5 нм, диаметр центрального водного ядра равен приблизительно 0,15 мкм, а суммарный диаметр мультиламеллярных липосом может колебаться от 1-2 до 15 мкм.

Моноламеллярные (простые липосомы) состоят из одного замкнутого липидного бислоя с диаметром от 20 до 50 нм (рис. 165). Они могут образовываться после ультразвуковой обработки мультиламеллярных липосом.

Макровезикулярные липосомы могут образовываться слиянием моноламеллярных липосом. Индукция может осуществляться ионами кальция, а также присутствием в составе липосом фосфолипидов с различными зарядами. Такие липосомы могут иметь диаметр от 60 до 100 мкм. Размер и форма липосом зависит от способа и условий их приготовления (кислотность среды, присутствие в среде солей, природы используемых липидов).

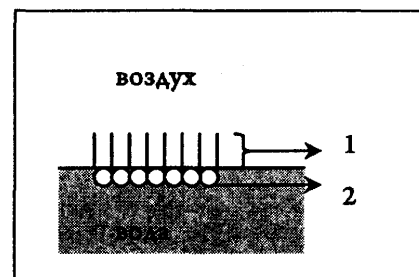


Рис. 163. Схема образования монослоя полярных липидных молекул на границе раздела фаз вода-воздух. Полярные головки молекул липидов гидрофильны и располагаются в воде, а не полярные «хвосты» молекул (жирные кислоты) – гидрофобны и располагаются в воздухе.

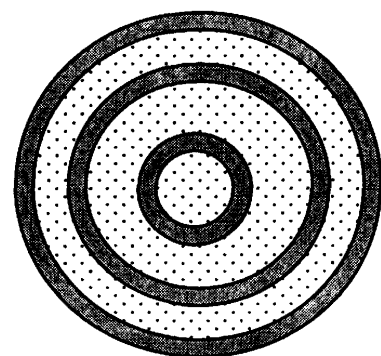


Рис. 164. Схема мультиламеллярной липосомы, которая состоит из трех липидных бислоев, отделенных друг от друга водной средой.

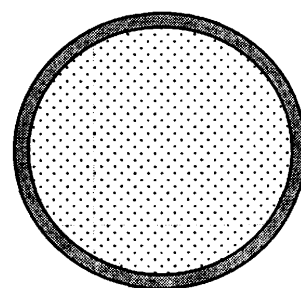


Рис. 165. Схема моноламеллярной липосомы.

Синтетические полимерные носители

Носители на основе стирола

Синтетические носители чрезвычайно разнообразны. После активации, т.е. присоединения реакционно-активных групп, они могут использоваться не только для сорбции ферментов, но и для ковалентной связи биологических соединений.

Многие промышленные ионообменные смолы получают на основе стирола. Сополимеры стирола в виде сферических частиц с различными сшивающими агентами получают гранульной полимеризацией. Чаще всего в качестве сшивающего агента используют дивинилбензол.

Характеристику таких носителей (размер пор, удельную поверхность) можно сильно варьировать в зависимости от концентрации сшивающего агента и концентрации мономеров. Примерами носителей на основе стирола являются ионообменники Дауэкс и Амбелит.

В состав синтетических гелей можно вводить реакционные ангидридные группы и аминокгруппы, что обеспечивает для ферментов высокую связывающую способность.

Полимеры на основе акриловой кислоты

Наиболее распространенным производным акриловой кислоты является акриламид. Полиакриламидные гели состоят из углеводородного скелета с присоединенными к нему карбоксильными группами. Эти гели стабильны при pH 1-10, не содержат заряженных групп, они биологически инертные и не подвергаются микробиологической атаке. Недостатком полиакриламидных гелей является низкая механическая прочность.

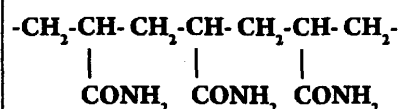
Химической обработкой можно получить твердые носители на основе полиакриламидных гелей. Так, при взаимодействии с этилендиамином при 90 °С можно получить аминоэтилпроизводные, а при действии избытка гидроксила при 50 °С – гидразиновые производные.

На основе модифицированных полиакриламидных гелей выпускают (Bio-Rad Laboratories) – «биогель Р». Он может иметь различные размеры пор: 50-100; 100-200; 200-400 и 400 меш. Для иммобилизации ферментов выпускаются энзакрилы (Koch-Light Ltd., Великобритания) – это гидразиновые производные полиакриламидных гелей.

Еще одним производным акриловой кислоты, который используется в качестве носителя для иммобилизации, является хлорангидрид метакриловой кислоты. При его взаимодействии с винилином, образуется мономер, который может полимеризоваться с образованием соединения с альдегидными группами, названный «винакрил».

Эупергит С (фирма Rohm Pharma, Дармштадт) представляет собой оксирановые акриловые шарики, которые получают сополимеризацией метакриламида, метилбисакриламида и

Полиакриламидные гели состоят из углеводородного скелета с присоединенными к нему карбоксильными группами.



Полиакриламидные гели биологически инертны и не подвергаются микробной атаке. Они механически непрочны, что ограничивает их применение в качестве матрицы.

амилглицидилового эфира. Шарики имеют диаметр (150 ± 20) мкм (для высокоэффективной хроматографии эупергит С выпускается в виде микрошариков с диаметром 30 мкм), эупергит выдерживает высокие давления (в отличие от агарозных шариков скорость потока жидкости не уменьшается при давлении от 0,1 до 1,0 бар). Благодаря высокому содержанию эпоксидных групп, шарики эупергита С имеют высокую емкость (1 г сухих шариков могут связывать до 140 г альбумина).

Химическая связь лиганда (фермента) с матрицей эупергита С обеспечивает высокую степень иммобилизации.

Носители на основе поливинилового спирта

Носители на основе поливинилового спирта обладают высокой реакционной способностью. Они могут быть модифицированы путем ввода в их состав различных функциональных групп: альдегидных, хлоротриазиновых, дисульфидных и др. Для получения гидрофильных гелей носители на основе поливинилового спирта могут быть шиты глутаровым альдегидом в кислой среде или эпихлоргидрином в щелочной. Еще одним достоинством этих носителей является их высокая емкость по отношению к белкам.

В заключение отметим, что количество носителей, использующихся для иммобилизации ферментов, чрезвычайно разнообразно. Это позволяет в зависимости от задач подобрать наиболее оптимальные из них. В настоящее время в этом направлении ведутся интенсивные разработки и проявляется тенденция к использованию синтетических крупнопористых материалов, которые способны как «губка» удерживать разнообразные биологические лиганды.

Активация полимерных носителей

Формирование имидокарбонатных групп на матрице

Под активацией носителя или матрицы понимают проведение химической реакции с активатором, в результате которой на поверхности носителя образуются электрофильные группы, обладающие высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным группам на белке (аминогруппы, SH-группы, карбоксильные группы).

В этом разделе рассмотрим только некоторые способы активации электрофильных групп.

Получение этих производных основано на реакции полимеров (углеводов) с циангалогенами. Так называемый бромциановый метод активации агарозы до недавнего времени был самым распространенным способом получения аффинных сорбентов (табл. 50). Бромциан (BrCN) в водной среде взаимодействует с двумя соседними гидроксильными группами агарозы с образованием активного имидокарбоната (I) и неактивного карбамата (II). Эта реакция осуществляется при температуре ≤ 20 °C, pH 11-12,5. Создание сильнощелочной среды необходимо для повышения нуклеофильности носителя за счет частичной ионизации OH-групп. Наряду с этим, в этих условиях реакция активации осуществляется с низким

В настоящее время существуют различные методики активации агарозы, приведем метод, предложенный Porath J., Aspberg K. и др. в 1973 г.

1. 10 г агарозы промывают 25 мл фосфатного буфера методом фильтрования.
2. Агарозу переносят в пробирку, содержащую буфер (табл.).
3. Медленно добавляют бромциан в указанных количествах и встряхивают 10' при 5 °C.
4. Агарозу собирают на пористом стеклянном фильтре и промывают холодной дистиллированной водой до нейтральной реакции фильтрата.
5. К активированной агарозе целесообразно немедленно присоединить соответствующий лиганд. Для присоединения к матрице лиганда 20 мл CNBr-активированной агарозы промывают 0,25 М раствором NaHCO_3 (50мл).
6. К промытой CNBr-активированной агарозе добавляют 0,25 М раствор NaHCO_3 (20мл), содержащий растворенный лиганд (50-500 мг).
7. Смесь осторожно встряхивают или перемешивают при 0-4 °C в течение ночи.
8. Для того, чтобы обеспечить модификацию всех активированных гидрофильных групп агарозы их блокируют, проводя реакцию с 1,0 М глицином (pH 8,0) на протяжении 6-12 ч при 0 °C.

Табл. 50. Активация агарозы бромцианом.

выходом и в результате более 80 % эфира цианата трансформируется с образованием неактивного карбамата.

Для повышения эффективности образования имидокарбамата осуществляют перенос циановой группы на триэтиламин.

В этом случае реакция активации осуществляется при pH 7-8 с образованием реакционноспособного комплекса триэтиламмонийнитрила (более реакционноспособного, чем BrCN), который атакует неионизированную OH-группу полисахарида.

При этом снижается расход BrCN и увеличивается эффективность образования имидокарбоната до 50 %.

Несмотря на это, этот способ активации агарозы имеет недостатки, которые привели к поиску новых методов активации. Прежде всего: CNBr₂ приводит к образованию заряженных изомочевинных групп, которые приводят к биоселективной адсорбции, и возникающие при активации агарозы производные изомочевинных групп могут подвергаться нуклеофильной атаке, в таком случае носители теряют свойства. Изомочевинная группа, которая образуется при реакции с первичным амином, положительно заряжена при нейтральных pH. В том случае, если алкильная группа, которая присоединяется к изомочевинной группе, обладает сильной гидрофобностью, то вокруг изомочевинных групп диэлектрическая проницаемость сильно понижена, а это приводит к распределению заряда по всей поверхности геля.

Еще один серьезный недостаток этого способа активации матрицы связан с неустойчивостью имидокарбамата во времени, а это означает, что присоединение лиганда к активированной матрице должно проводиться сразу после ее активации.

Несмотря на указанные ограничения активации агарозы бромцианом, этот метод успешно применяется при активации носителя, дает хорошие результаты и позволяет получить различную степень модификации активированной агарозы (табл. 51).

Активация матриц оксирановыми (эпоксидными) группами

Активация матриц оксиранами имеет два важных преимущества перед имидокарбонатным (бромциановым) методом. Лиганды, связанные с оксирановыми группами, очень устойчивы, и лиганд находится на длинной «ножке» от носителя, что дает возможность избежать потери активности фермента из-за возможных стерических затруднений, которые могут возникать в процессе иммобилизации. Реакция протекает в щелочной среде (pH 8,5-11,0). Реакционная способность образующейся эфирной группы в отношении реакционных групп белков следующая: SH > NH₂ > OH (табл. 52).

Использование оксирана при активации матрицы может приводить к дополнительной сшивке матриц, в результате

Степень модификации	Концентрация агарозы в геле, масс/об	Объем буфера, мл	Объем водн. р-ра CNBr, мл
Высокая (~300 ммоль/г)	4	10	4
	6	15	6
Умеренная 140 ммоль/г	4	0,8	0,8
	6	1,2	1,2
Слабая 100 ммоль/г	4	0,6	0,2
	6	0,7	0,3

Табл. 51. Некоторые характеристики степени модификации активированной агарозы.

1. Для иммобилизации фермента берут навеску эпоксиактивированной сефарозы 6В, ее промывают на пористом стеклянном фильтре водой и оставляют для набухания.
2. Готовят раствор лиганда, для этого его перемешивают с приготовленным гелем в течение 16 ч при 25-40 °С (водяная баня) без магнитной мешалки.
3. Избыток лиганда отмывают, используя раствор для присоединения, после этого дистиллированную воду, 0,1 М бикарбонатный буфер pH 8,0 и в конце 0,1 М ацетатного буфера pH 4,0.
4. Избыточные оксирановые группы блокируют, обрабатывая гель 1,0 М этаноламином в течение ночи.
5. Избыток этаноламина отмывают водой, и полученный иммобилизованный фермент используют или хранят при 4-8 °С.

Табл. 52. Методика активации матрицы оксирановыми группами.

матрица становится нерастворимой в кипящей воде и более устойчива в кислотах.

Эпоксидированная агароза при обработке растворами аммиака может быть превращена в аминопроизводные, которые обработкой янтарным ангидридом могут быть сукцинированы и активированы N-гидрооксисукцинимидом.

Способы иммобилизации ферментов

Иммобилизация ферментов ковалентным соединением с матрицей

Существует большое количество способов иммобилизации ферментов. От метода иммобилизации в большой степени зависит активность полученных биокатализаторов. Это необходимо учитывать при выборе носителей и способов иммобилизации. Все многообразие методов иммобилизации ферментов можно разбить на две группы: химические методы, которые основаны на ковалентном связывании фермента с носителем (рис. 166) и физические методы, которые основаны на адсорбции ферментов на матрице (рис. 167), на включении фермента в формирующуюся матрицу, или оболочку (микрокапсулу, липосому).

Выбор носителя определяется свойствами его поверхности, т. е. наличием реакционных групп, способных взаимодействовать с ферментами. Подбирая носитель, и способ иммобилизации, можно обеспечить сохранность активности фермента или даже направленно изменять ее.

При этом способе иммобилизации молекула фермента связана с носителем химической связью. В этом случае иммобилизованный фермент можно представить в виде системы, состоящей из трех элементов: матрицы (М), R- реакционной группы, которую называют «спивкой», «ножкой», «спейсером» и т. д. и фермента – (Ф), т.е. М-R-Ф. Такой способ иммобилизации имеет как минимум два достоинства. Во-первых, эта система связывания достаточно прочная и не разрушается в результате изменений ряда физико-химических свойств, таких как рН реакционной среды, температура, осмотичность и др. Во-вторых, химическая связь фермента с матрицей позволяет стабилизировать активность фермента.

Основные принципы конструирования ферментных препаратов при ковалентном связывании их с матрицей

Для того чтобы стало возможным образование системы М-R-Ф необходимо (рис. 166), чтобы на матрице присутствовали химически активные группы, способные вступать в реакцию с белком. Если таких групп на выбранной матрице нет, то тогда проводят активацию матрицы, т. е. их пришивают к ней, используя подходящие реагенты, что было уже нами рассмотрено. После этого к

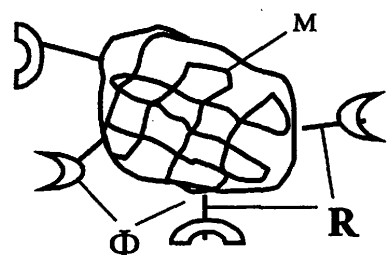


Рис. 166. Схема, демонстрирующая формирование ковалентных связей: ковалентной связи фермента (Ф) с водонерастворимой матрицей (М), через реакционную группу (R).

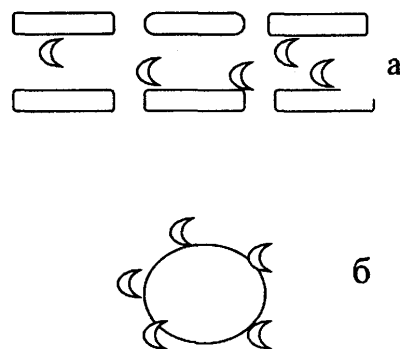


Рис. 167. Схема, демонстрирующая адсорбцию фермента на различных матрицах: а – включение ферментов в пористые волокна; б – сорбция фермента на поверхности волокна.

активированной матрице добавляется раствор фермента в таких условиях, которые могут обеспечить осуществление химической реакции с ферментами.

При этом необходимо учитывать то, что в некоторых случаях иммобилизация фермента может приводить к жесткой фиксации его структуры и тем самым вести к потере ферментативной активности. В таком случае могут быть два решения – подбор новой матрицы или изменение сшивающего реагента, в частности, увеличение по длине или «ножки» спейсера, что позволяет удалить молекулы фермента от носителя на такое расстояние, которое не будет затруднять изменение пространственной конформации. В этом смысле, изменяя характеристики носителей и сшивающих реагентов, можно разработать конструкцию с высокой и стабильной ферментативной активностью.

В некоторых случаях иммобилизацию ферментов ковалентной связью можно обеспечить, не используя матриц, а только фермент и сшивающий реагент, в таком случае носитель формируется непосредственно в процессе иммобилизации, т. е. конструирование ферментных сеток или же молекулы фермента, сшиваясь между собой, формируют носитель. В зависимости от природы и количества сшивающих реагентов можно получать как водорастворимые, так и водонерастворимые агенты.

Примеры ковалентной иммобилизации ферментов

Недостатки и преимущества иммобилизации ферментов путем ковалентного связывания с носителем

Как уже отмечалось, при ковалентном связывании фермента с носителем может наблюдаться потеря его активности. Кроме этого этот метод достаточно дорог и его реализация требует высокой квалификации исполнителей. Это привело к тому, что в настоящее время этот метод иммобилизации пока не находит применения в промышленности.

Наряду с этим, он достаточно перспективен, так как позволяет создавать системы с высокой активностью и контролируемыми свойствами и занимает лидирующее место в лабораторной практике. Он широко используется в аффинной хроматографии, иммуноферментном анализе, в синтезе особо чистых препаратов. Можно полагать, что дальнейшее развитие этого метода иммобилизации ферментов позволит использовать его и в промышленности.

В качестве примера рассмотрим присоединение целлобиазы к сефарозе, активированной бромцианом. Иммобилизация через углеводную часть не влияет на ферментативную активность, поскольку при этом практически не затрагивается белковая часть фермента. Этапы ковалентной иммобилизации фермента описаны в таблице 53.

Активность фермента характеризуется скоростью катализируемой реакции в мкмольх превращающегося субстрата за одну мин или мкмольх образующегося продукта за одну мин.

Удельная активность выражается в мкмольх/(мин·мг).

1. Дают активированной агарозе набухнуть. Для этого промывают ее (5 г) на фильтре из пористого стекла 1 л 10^{-3} НСl и промывают 0,1 М NaHCO_3 до pH 8,3, содержащий 0,5 М NaCl. (1 г агарозы после набухания дает 3,5 мл геля).
2. 1 мл геля, разбавленный дист. водой в 10 раз, обрабатывают метaperиодатом натрия (конечная его концентрация 0,02 М) в течение 4 ч при комнатной температуре в темноте.
3. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 0,36 М этиленгликоля.
4. Проводят диализ против дистиллированной воды в течение 7 ч при 4 °С, после чего добавляют равный объем 0,1 М натрий-фосфатного буфера pH 6,0, содержащего 0,2 мг/мл цианоборгидрида натрия и 0,1 М этилендиамина. Оставляют смесь на ночь при температуре 4 °С.
5. Проводят диализ против 10 мМ натрий-ацетатного буфера pH 4,8 при 4 °С.
6. Осуществляют ковалентное связывание целлобиазы с сефарозой, для чего смешивают 0,6 мл раствора фермента с 2,4 мл сефарозы в 0,1 М NaHCO_3 до pH 8,3. Осторожно перемешивают в течение 12 ч при 4 °С.
7. Отмывают комплекс фермент-агароза 10 мМ натрий-ацетным буфером pH 4,8 и ресуспендируют в этом же буфере.

Табл. 53. Ковалентная иммобилизация целлобиазы на сефарозе, активированной бромцианом.

Иммобилизация ферментов путем адсорбции на нерастворимых носителях

Из ныне существующих методов иммобилизации метод адсорбции является наиболее старым, достаточно простым и широко используемым. Пожалуй, первая успешная иммобилизация фермента (инвертаза) путем адсорбции была проведена еще в 1916 г. Дж. Нельсоном и Э. Гриффином на активированном угле и геле гидроксида алюминия. В 1969 г. И. Шибата с сотрудниками осуществили гидролиз N-ацетил-D,L-аминокислоты, адсорбированной на носителе L-аминоацилазы.

Адсорбция фермента с носителем обеспечивается, прежде всего, электростатическим взаимодействием и водородными связями. Удержание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться неспецифическими Ван-Дер-Ваальсовыми взаимодействиями. Типы связей зависят от свойств носителя и фермента и условий проведения иммобилизации. В некоторых случаях эти адсорбционные взаимодействия могут быть достаточно прочными.

Основными факторами, влияющими на адсорбцию фермента, являются удельная поверхность и степень пористости носителя, значения pH и ионной силы раствора фермента, его концентрации и температуры проведения адсорбции.

Увеличение концентрации фермента в растворе увеличивает адсорбцию, повышение температуры (не вызывающей денатурации белка) также усиливает адсорбцию. При высокой концентрации солей, присутствующих в растворе, может происходить вытеснение адсорбированного белка с поверхности носителя.

Следовательно, эффективность адсорбционной иммобилизации ферментов определяется балансом ряда указанных факторов, которые устанавливаются экспериментально.

Методы адсорбционной иммобилизации

Иммобилизация ферментов путем адсорбции его на нерастворимом носителе обеспечивается контактом раствора фермента с носителем. После этого не адсорбированные молекулы фермента отмываются и образец готов к использованию.

В зависимости от техники проведения метод адсорбции может быть представлен в нескольких вариантах: статический способ, суть которого сводится к тому, что к водному раствору фермента добавляется носитель и оставляется на несколько суток без перемешивания. В результате осуществляется диффузия фермента к поверхности носителя и его адсорбция. Недостатком этого способа является длительность инкубации. Более эффективным способом адсорбции является адсорбция с перемешиванием, при этом раствор фермента с носителем перемешиваются, что обеспечивает более быструю и равномерную адсорбцию фермента.

Адсорбция – поглощение вещества поверхностным слоем твердого тела (адсорбентом). При адсорбции ферментов и клеток применяют такие носители как модифицированная целлюлоза, модифицированный сефадекс, желатин, поливинилхлорид, полисахариды, ионообменные смолы.

Адсорбция фермента может быть осуществлена и методом электроосаждения. При этом в водный раствор фермента погружают два электрода, на поверхность одного из которых помещают слой носителя. При включении электрического тока молекулы фермента перемещаются в направлении носителя и осаждаются на нем.

Еще одним способом адсорбции фермента на нерастворимых носителях является метод адсорбции в колонке. Хроматографическая колонка заполняется носителем и через нее перистальтическим насосом прокачивают раствор фермента. Скорость потока подбирается так, чтобы частицы носителя оставались во взвешенном состоянии, образуя так называемый «кипящий слой». Этот метод наиболее удобен в технологическом отношении, так как он обеспечивает адсорбцию фермента, промывку его и функционирование в одной колонке без дополнительных манипуляций.

Хорошие результаты метод адсорбции дает при дополнительной модификации носителя, что может обеспечить его дополнительные (не ковалентные) взаимодействия с ферментом. Как например модификация носителя гидрофобными соединениями или ионами металлов.

Преимущества и недостатки адсорбционной иммобилизации

Основным преимуществом этого метода иммобилизации является доступность и дешевизна сорбентов, простота методик. Адсорбция – это мягкий метод иммобилизации, который не влияет на активность ферментов. Недостатком этого метода является низкая прочность связывания фермента с носителем и возможность десорбции при изменении условий. Отсутствие разработанных методических рекомендаций, позволяющих осуществить правильный выбор носителя и условий проведения иммобилизации конкретных ферментов, также является недостатком этого метода.

Иммобилизация ферментов путем включения его в гели

Суть метода сводится к тому, что молекулы ферментов или выделенные клетки включаются в структуру геля. Так как средний диаметр молекулы фермента колеблется от 200 до 2000 нм, а средние расстояния между соседними цепями в геле меньше, то фермент не может быть вымыт из геля раствором, при этом субстраты легко проникают в гель. Кроме того, в иммобилизации ферментов в структуру геля важную роль играют ионные и водородные связи, возникающие между ферментом и полимерными цепями геля. Так как пространство между цепями геля заполнено водой (от 50 до 90 % массы геля составляет вода), то вокруг фермента или иммобилизованных клеток создается стабильное водное окружение,

Показано, что твердые носители при использовании их в больших концентрациях могут ингибировать рост иммобилизованных клеток и их функциональную активность. Это объясняется тем, что на их поверхности адсорбируются различные белковые соединения, участвующие в регуляции функций клеток. Следовательно, при выборе системы иммобилизации необходимо учитывать не только свойства носителей, но и соотношения: носитель-фермент; носитель-клетка.

которое можно сравнить с естественной (клеточной) локализацией фермента.

Существуют два основных способа иммобилизации ферментов в гели, которые зависят от особенностей полимеризации геля.

В первом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем переводят в гелеобразное состояние, например, при охлаждении.

Во втором случае – в раствор мономеров, содержащих ферменты, добавляются сшивающие агенты, которые и придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки (так называемые сшитые гели).

Иммобилизация ферментов в не сшитых полимерных гелях

Этот способ иммобилизации основан на свойствах природных полисахаридов: агар-агара, агарозы и др. образовывать гели при охлаждении из горячих водных растворов.

Метод состоит в том, что водную суспензию полисахаридов нагревают до 80-90 °С до полного растворения и этот раствор медленно охлаждают. Перед началом гелеобразования, а это при температуре 40-50 °С в систему добавляют водный раствор фермента. Дальнейшее медленное охлаждение раствора приводит к образованию геля, содержащего иммобилизованные ферменты (табл. 54).

Показано, что полимеризация таких природных углеводов как альгинат зависит от концентрации Ca^{2+} , а каррагинанаот Al^{3+} , Mo^{2+} , Fe^{2+} , K^+ и NH_4^+ . Технологически удобно получение геля с иммобилизованными ферментами в виде сферических полимерных частиц. Для этого в раствор соответствующих мономеров вносят раствор ферментов и полученную смесь по каплям добавляют в водный раствор соответствующих катионов, в результате образуются сферические полимерные частицы, несущие иммобилизованные ферменты.

Для получения однородных по размеру гранул, что является важным технологическим параметром, раствор мономеров вместе с катализатором пропускают через иглы, формирующие капли стандартных размеров. Nuls A. в 1985 г. разработал методику получения однородных капель за счет разрыва струи жидкости полимеров под влиянием резонанса, который создается специальным вибратором.

Другим природным полимером, применяемым для иммобилизации ферментов, является коллаген. В настоящее время существуют три способа иммобилизации ферментов в коллагеновый матрикс: макромолекулярное комплексообразование, импрегнирование и электроосаждение (табл. 55).

Способ иммобилизации, описанный в таблице 55, можно использовать только в том случае, если ферменты, которые иммобилизуют, устойчивы к длительной инкубации в кислых или щелочных растворах. В противном случае можно использовать метод

1.	Растворить 100 мг агара в 4,5 мл 0,9 %-го NaCl нагреванием до 100 °С, охладить р-р до 50 °С.
2.	Добавить 0,5 мл раствора ферментов к 4,5 мл раствора агара при 50 °С и перемешать смесь.
3.	Вылить смесь на нейлоновую сеточку (размер ячеек 100 меш) на стеклянной пластинке и охладить до 5 °С.
4.	Полученный полимер можно хранить до использования в 0,1 М натрий-фосфатном буфере рН 7,0.

Табл. 54. Включение ферментов в агар.

	Этапы
1.	Коллаген диспергируют в водном растворе с низким рН (2,0-4,5) или высоким (8,5-12).
2.	В этот раствор вносят водный раствор фермента.
3.	Смесь инкубируют 20 часов.
4.	Смесь наносят тонким слоем на инертную подложку и высушивают, при этом образуется коллагеновая пленка с включенным в нее ферментом.

Табл. 55. Способ иммобилизации ферментов в коллагеновый гель.

импрегнирования, при котором раствором фермента пропитывают уже полученную коллагеновую матрицу.

При иммобилизации ферментов методом электроосаждения смесь дисперсии коллагена и раствора фермента помещают в электрическое поле (между двумя электродами). На одном из электродов молекулы коллагена формируют белковую мембрану, толщина и конфигурация которой зависит от параметров электрического поля. Этот процесс осуществляется очень быстро и его можно контролировать, что очень важно для сохранения структуры ферментов.

Иммобилизация ферментов в спитые полимерные гели

Ковалентные сшивки в геле позволяют повысить механическую прочность матриц и прочно удерживать ферменты в них. Ковалентно спитыми могут быть как природные полимеры, так и синтетические. Так, для образования сшивок между молекулами коллагена, его обрабатывают глутаровым альдегидом или другими реакционноспособными агентами.

Достаточно часто при иммобилизации в гели используют полиакриламидные гели (ПААГ). Для этого готовят раствор мономеров акриламида и метиленбисакриламида, вносят раствор с ферментами и катализатором, который индуцирует полимеризацию.

Белки не взаимодействуют с ПААГом и, следовательно, не удерживаются в геле. Для того, чтобы ферменты не вымывались из полиакриламидного геля необходимо обеспечить высокую степень сшивки носителя, т. е. необходима высокая степень полимеризации, а это обеспечивается удалением кислорода из раствора мономеров при полимеризации.

Хотя включение ферментов в ПААГ используется широко, ковалентное связывание может иметь преимущество перед этим методом иммобилизации. Этапы иммобилизации ферментов в ПААГ описаны в таблице 56.

Преимущества и недостатки иммобилизации ферментов путем включения в гель

Этот метод иммобилизации достаточно прост в исполнении, он позволяет получать матрицы любой формы (частицы, пленки). При иммобилизации в геле ферменты равномерно распределены в объеме носителя. Благодаря разнообразию используемых полимеров (природные и синтетические) можно осуществлять иммобилизацию отдельных ферментов, полиферментных систем, органелл или целых клеток. Многие гели обладают высокой механической, химической и тепловой стойкостью и это позволяет многократно использовать иммобилизационные образцы.

Важным преимуществом этого способа иммобилизации является и то, что многие ферменты проявляют высокую стабильность

1. Растворить 110 мг метиленбисакриламида и 1 г акриламида в 10 мл 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 М Трис-НСl, рН 7,0. В этом растворе растворить 15 мг фермента (уреазы).
2. Из полученного раствора удалить кислород, для этого в течение 20-ти мин продувать раствор азотом.
3. К раствору добавить 0,2 мл диметиламинопропионитрила и перемешать, добавить 0,5 мл раствора персульфата калия (10 мг/мл) и осторожно перемешать.
4. Закрыть колбу пробкой и оставить на 20 мин для полимеризации.
5. Измельчить гель встряхиванием, а затем многократным пропусканием его через иглу шприца.
6. Промыть гель 50 мл 0,1 мМ ЭДТА, 0,5 М NaCl, 0,1 М трис-НСl, рН 7,0. Промывать до тех пор, пока в промывных растворах не будет обнаруживаться активность ферментов.
7. Ресуспендировать гель, содержащий фермент, в 15 мл 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-НСl, рН 7,0.

Табл. 56. Включение ферментов (уреаза) в полиакриламидный гель.

в составе гелей и защищают от бактериального загрязнения, так как клетки бактерий не могут проникать в мелкопористые полимерные матрицы.

Недостатком этого метода является то, что в некоторых случаях создается препятствие проникновению в гели субстратов, особенно в случае высокомолекулярных субстратов.

Иммобилизация ферментов с использованием полупроницаемых оболочек

При этом способе иммобилизации водный раствор фермента отделяется от раствора субстрата полупроницаемой мембраной, через которую проходят молекулы субстрата, но не проходят молекулы фермента. Полупроницаемая мембрана может быть получена различными способами (табл. 57).

Иммобилизация ферментов путем инкапсулирования сводится к формированию полупроницаемой оболочки вокруг биомолекул. Оболочка может быть получена из различных материалов: целлюлозы, полистирола, полиуретана, полиэфиров, поликарбонатов, полисульфаниламидов, липидов. Метод микрокапсулирования был разработан Т.Чангом в 1964 г.

В зависимости от условий получения размер микрокапсул может колебаться от нескольких десятков до сотен микрометров, при этом толщина мембраны составляет сотые-десятые доли микрометра, диаметр пор в таких мембранах несколько нанометров.

Можно выделить два основных способа получения микрокапсул. В первом случае раствор фермента диспергируется в диэтиловом эфире, содержащем эмульгатор. К полученной эмульсии, не прекращая перемешивания, добавляют эфирный раствор полимера, чаще всего нитрат целлюлозы. При соприкосновении с поверхностью эмульсионных капель, так как полимер нерастворим в воде, он образует тонкую оболочку – микрокапсулу. Готовые микрокапсулы отделяют центрифугированием и промывают.

При втором способе микрокапсулы образуются на поверхности водных капель, содержащих ферменты, за счет межфазной поликонденсации двух компонентов, один из которых растворен в водных каплях эмульсии, а другой – в объеме органической фазы. Наиболее распространенными являются полиамидные микрокапсулы, которые образуются поликонденсацией 1,6-гексаметилендиамина (водная фаза) и хлорангидрида себациновой кислоты (органическая фаза). Необходимо отметить, что этот способ микрокапсулирования можно использовать только в том случае, если ферменты не инактивируются при высоких значениях рН.

Для повышения стабильности фермента в микрокапсуле в водный раствор фермента вводят инертный белок (гемоглобин) в 10 % концентрации, он обеспечивает внутреннее давление в микрокапсуле и стабильность фермента. Можно использовать и другой прием для стабилизации фермента, им можно иммобилизовать

Готовят растворы:

А – 2,6 г Span 85; 25 мл циклогексана.

Б – 1,0 мл раствора каталазы (650 ед./мл) в 50 мМ фосфатном буфере рН 7,0.

В – 0,1 г бутадиенового каучука; 50 мл циклогексана и перемешивать до полного растворения.

Г – 15 мл циклогексана и 10 мл растительного масла.

1. При непрерывном перемешивании добавить смесь А к смеси Б.

2. Не прекращая перемешивания добавить смесь В.

3. Добавить смесь Г, продолжая перемешивать.

4. Полученные микрокапсулы суспендировать в фосфатном буфере с твином 20 для предотвращения агрегации. В колбе, содержащей все компоненты, создают вакуум 26 мм рт.ст. для упаривания циклогексана (перемешивание продолжается). Упаривание должно быть медленным.

5. Микрокапсулы осадить центрифугированием, а масло удалить (супернатант). К осадку добавить 15 мл фосфатного буфера, суспендировать и вновь отцентрифугировать. Микрокапсулы промывают таким образом 3 раза.

6. Полученные микрокапсулы суспендируют в фосфатном буфере, содержащем твин 20 для предотвращения агрегации.

Табл. 57. Методика получения микрокапсул.

фермент путем адсорбции на инертных носителях и после этого заключить в микрокапсулы. Кроме микрокапсулирования ферменты можно заключать в липосомы.

Включение ферментов в липосомы

Первые эксперименты по включению ферментов в липосомы были проведены в 1970 г. Дж. Сесса и Дж. Вейсманом.

Существует несколько способов получения липосом.

Раствор фосфолипидов в органическом растворителе (хлороформе) упаривают в вакууме и липиды образуют тонкую пленку по поверхности пробирки. После этого в пробирку вносят водный раствор фермента и интенсивно встряхивают до полного удаления пленки липидов с поверхности и оставляют на некоторое время. В созданной таким образом дисперсии липидов происходит образование мультламеллярных липосом, содержащих раствор фермента. Чтобы предотвратить окисление липидов все процедуры необходимо проводить в атмосфере инертного газа

В другом варианте раствор липидов в хлороформе наслаивают на водный раствор фермента, после чего органический растворитель удаляют упариванием в токе азота, а образовавшуюся липидную пленку диспергируют, используя ультразвук в водном растворе.

При этом способе длительный контакт ферментов с органическими растворителями может приводить к инактивации ферментов.

Для получения липосом можно использовать модифицированные липиды, в состав молекул которых введены группы, содержащие кратные углерод-углеродные связи. В результате полимеризации происходит ковалентная сшивка липосомальной оболочки.

После включения ферментов в липосомы, которые получают так как уже описано, их подвергают облучению ультрафиолетовым светом в присутствии инициатора. При этом происходит полимеризация мономерных молекул липидов с образованием ковалентно сшитой замкнутой липидной бислойной мембраны. Полимерные липосомы обладают высокой стабильностью по сравнению с обычными липосомами.

Включение ферментов в волокна

Этот метод иммобилизации был предложен Д. Динелли в 1972 г. и мало чем отличается от микрокапсулирования. В этом случае вместо сферических микрокапсул получают нити. Для этого эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе волокнообразующего полимера (поливинилхлорид, производные целлюлозы, поли-1-метилглутамат) продавливают через фильеры в жидкость, вызывающую коагуляцию полимера (например, толуол). В результате полимер образует волокна, полые внутри и содержащие капли водного раствора фермента. Полученные волокна достаточно высокой механической прочностью и с ними легко работать.

В настоящее время липосомы используются в качестве «контейнера» и средства доставки лекарств в ткани организма. Они нетоксичны, подвергаются биodeградации и при определенных условиях могут поглощаться клетками, их мембраны могут сливаться с клеточной мембраной и таким способом поставлять содержимое (лекарственное вещество) в определенные типы клеток. Наряду с этим вещества, которые включены в липосому, защищены от действия ферментов. Еще одним преимуществом липосом в качестве лекарственных форм является постепенное высвобождение лекарственного вещества, что увеличивает действие лекарства.

Как считают специалисты, липосомы могут использоваться в качестве доставки антираковых препаратов. Это связано с тем, что размер липосом больше диаметра пор капилляров, т. е. липосомы могут не выходить за пределы кровотока. При такой ситуации снижается токсическое действие препаратов (антираковые препараты токсичны). С другой стороны, это свойство липосомных препаратов может служить основой для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в очаги воспаления и большие опухоли, так как капилляры, снабжающие эти области, как правило, сильно перфорированы.

Для иммобилизации ферментов можно использовать и получаемые в промышленности полимерные полые волокна, которые используют для диализа белков.

Двойное эмульгирование

При этом способе иммобилизации готовят эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе полимера и получают микрокапсулы, как уже описано. Полученные микрокапсулы вновь диспергируют в воде, в результате формируется водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащая еще более мелкие капли только раствора фермента. Органические компоненты полимеризуются и образуют сферические частицы с иммобилизованными в них ферментами.

Преимущества и недостатки иммобилизации с использованием полупроницаемых оболочек

Этот метод достаточно прост в исполнении и универсален. Он может быть использован для иммобилизации ферментов, ферментных систем, органелл и целых клеток. При этом способе иммобилизации можно получить высокий процент включения ферментов в носитель. Ферменты, включенные в полупроницаемые оболочки, сохраняют свою каталитическую активность на высоком уровне. Этот способ обеспечивает защиту ферментов от повреждающего действия микроорганизмов, так как они не способны проникать через мембраны.

Основным недостатком мембранных систем в иммобилизации является невозможность использования высокомолекулярных субстратов, для которых созданная мембрана непроницаема.

Иммобилизация клеток

Методы иммобилизации клеток и области их применения

Изолированные клетки (бактерии, растительные и животные клетки) давно стали объектом биотехнологии. Однако разработка методов иммобилизации клеток началась как переориентация с иммобилизованных ферментов на иммобилизованные клетки. Это связано с тем, что при использовании целых клеток нет необходимости проводить сложные процедуры очистки и стабилизации ферментов, и, кроме того, клетки способны осуществлять как одностадийный, так и многостадийный процессы. Необходимо учитывать, что иммобилизованные ферменты не имеют альтернативы в том случае, если используются внеклеточные ферменты (экскретируемые в среду), например, целлюлазы или липазы.

Для иммобилизации клеток чаще всего используют их включение в сетку геля или инкапсулирование в полупроницаемые

Диализ (гр. Dialysis – отделение) – освобождение коллоидных растворов и растворов высокомолекулярных веществ от растворенных в них солей и других низкомолекулярных веществ; осуществляется с помощью полупроницаемых мембран (из коллодия, пергамента и др.), через которые не просачиваются сравнительно крупные коллоидные частицы; применяется в производстве искусственных волокон, фармацевтических препаратов и др.

Эмульгаторы – вещества, способствующие образованию эмульсий; эмульгаторами являются мыла, желатин и многие синтетические вещества.

мембраны. В зависимости от задач проводят иммобилизацию нежизнеспособных клеток, которые сохраняют необходимую специфическую активность. Так как клетки имеют большие размеры по сравнению с ферментами, то их иммобилизацию можно осуществлять в гели с низкой степенью сшивок, что обеспечивает высокую степень диффузии субстратов и конечных продуктов.

Для обеспечения катализа многостадийных реакций, например, превращения глюкозы в этанол, проводят иммобилизацию в мягких условиях, в частности, обеспечивающих хорошие условия газообмена. В некоторых случаях иммобилизованные клетки сохраняют жизнеспособность на протяжении многих месяцев.

Методически процесс иммобилизации клеток мало отличается от процесса иммобилизации ферментов (табл. 58).

Иммобилизованные клетки находят применение в таких областях как производство лекарственных препаратов, охрана окружающей среды, промышленность и при проведении различных анализов. Так, в промышленности иммобилизованные клетки и ферменты используют для синтеза аминокислот, антибиотиков, производства сахарных сиропов, трансформации стероидов. В охране окружающей среды – это обработка сточных вод и получение метана. Рассмотрим несколько примеров такого применения.

Использование иммобилизованных клеток бактерий для трансформации стероидов

Использование иммобилизованных клеток бактерий как биокатализаторов имеет ряд преимуществ по сравнению со свободно живущими клетками и иммобилизованными ферментами.

Некоторые стероидтрансформирующие ферменты особенно гидроксилазы и дегидрогеназы являются высоколабильными белками и их выделение и очистка затруднены. Поэтому использование иммобилизованных клеток, содержащих ферменты, трансформирующие стероиды, заслуживает особого внимания.

Большинство разработок связано с 11 α – 11 β -гидроксилированием и трансформацией стероидов до C₁₉ и C₂₂-стероидов. Стероидные соединения трансформируются клетками *Arthrobacter globiformis*, включенными в гель, в реакторах трех типов: в колонке с вытеснением, в непрерывно-проточном реакторе с продуванием воздуха и реакторе с перемешиванием.

В реакторе типа 1 и 2 трансформация стероидных соединений идет непрерывно, а реактор 3 работает в полунепрерывном режиме: в конце трансформации продукт удаляют, носитель с клетками промывают повторно буфером и вновь используют. Между трансформациями гранулы геля с иммобилизованными клетками хранят при 4 °С.

Ферментативную активность иммобилизованных клеток в непрерывных и периодических условиях трансформации оценивают по количеству продукта, выраженного в процентах от исходного количества субстрата или в молях/мин.

1. Осторожно мешать равные объемы раствора альгината натрия (4 % масса/объем) и суспензии клеток (по 50 мл).
2. Набрать эту смесь в шприц емкостью 10 мл и капать раствор по каплям в раствор (из банки, 1 л) 0,2 М CaCl₂.
3. Оставить частицы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе CaCl₂ на 20 мин для полимеризации.

Табл. 58. Включение клеток в гель альгината кальция.

Сточные воды содержат сложную смесь твердых и растворенных веществ. При первичной обработке удаляют твердые частицы и легко удаляемые вещества в результате фильтрации. Растворенные вещества подвергают биологическому окислению или трансформации. В результате – концентрация вредных веществ снижается до предельного уровня или же они превращаются в безопасные соединения.

Наиболее распространенным критерием концентрации загрязняющих веществ в бытовых сточных водах является показатель биохимической потребности в кислороде (БПК) – равный количеству растворенного кислорода, поглощаемого единицей объема сточных вод за определенное время при 20 °С. Продолжительность периода инкубации обычно указывают в виде подстрочного индекса, т. е. при 5 сут – БПК₅.

Иммобилизация растительных клеток

Из 30000 известных природных соединений в клетках высших растений обнаружено до 90 % этих соединений. В настоящее время многие промышленно важные соединения, используемые в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из растительных клеток. Как правило, эти вещества имеют сложное химическое строение и их трудно синтезировать. Получение некоторых веществ из растений, растущих в природных условиях, ограничено и, вероятно, в ближайшем будущем эта проблема будет усугубляться. Решение этого вопроса связано с поиском альтернативных источников этих соединений. Одним из таких источников являются культуры растительных клеток.

Методы иммобилизации должны быть достаточно мягкими, так как растительные клетки очень чувствительны к изменениям среды. В этом отношении самым подходящим является включение клеток в гели. Иммобилизацию клеток необходимо проводить в стерильных условиях, так как растительные клетки растут медленно и очень чувствительны к быстро растущим клеткам бактерий. Концентрация иммобилизованных клеток может составлять от 20 до 50 % по массе геля.

Для иммобилизации растительных клеток широко используют альгинат кальция (табл. 59) или другие носители. Условия иммобилизации в гель альгината кальция очень мягкие, этот полимер можно стерилизовать автоклавированием. Известно, что стабильность геля увеличивается с увеличением концентрации полимера, однако, при высоких концентрациях альгината суспензия альгинат-клетки становится очень вязкой. В связи с этим необходимо экспериментально подбирать концентрацию геля. Используя иглы разного диаметра можно получать гранулы разных размеров от 2 до 4 мм в диаметре.

Для иммобилизации растительных клеток используют и другие носители: каррагинин, агар, агарозу, полиакриламид.

Области применения иммобилизованных растительных клеток связанных с получением биологически активных веществ достаточно разнообразны. Так, иммобилизованные клетки *Digitalis lanata* используются для получения дигоксина 12-β-гидроксилированием производного дигитоксина. Эти клетки, иммобилизованные в альгинатном геле, могут быть использованы и для гидроксилирования метилдигитоксина в метилдигок-

СЖИ В ПЕРИОДИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ И МОГУТ ИСПОЛЬЗОВАТЬСЯ В ТЕЧЕНИЕ

180 суток (каждые 3-е суток гранулы с иммобилизованными клетками переносят в свежую среду). Необходимо отметить, что время функционирования выделенных клеток в состоянии иммобилизации гораздо больше функционирования этих клеток в суспензии, что свидетельствует о стабилизации клеток при иммобилизации.

При периодических условиях трансформации весь процесс может быть представлен как цикл, состоящий из этапов поступления субстратов, их трансформации благодаря активности иммобилизованных клетками ферментов, получения продуктов и восстановления иммобилизованных клеток или ферментов.

При непрерывных условиях трансформации осуществляется иммобилизация клетки или ферменты используются длительно и не требуют восстановления после одного цикла.

1. Готовят раствор альгината натрия на стерильной среде (20 мин при 121 °С).

2. Растительные клетки суспендируют (2 г сырой массы) в охлажденном растворе альгината (8,0 г) в стерильном стакане.

3. Полученную суспензию переносят в пластмассовый шприц (10 мл), из которого удален поршень.

4. Шприц укрепляют над колбой Эрленмейера, в которой находится 50 мл среды с 50 мл CaCl₂. Суспензия из шприца должна медленно капать в раствор с кальцием.

5. Образовавшиеся гранулы альгината выдерживают в растворе 30 мин, после чего их промывают водой и переносят в среду, содержащую 5мМ CaCl₂.

Табл. 59. Включение растительных клеток в альгинатный гель.

Иммобилизованные клетки *Catharathus roseus* в агарозном геле используются в синтезе индолсодержащих алкалоидов в частности аймалина, серпентина и катарантина.

Клетки *Morinda citrifolia*, иммобилизованные в альгинатный гель, используются для получения антрахинонов (табл. 60). Продуктивность включенных в гель клеток в 10 раз выше, чем этих же клеток в суспензии. Необходимо учитывать, что при длительном культивировании клеток в суспензионных культурах они претерпевают значительные функциональные изменения.

Показано, что клетки в культуре суспензии теряют высокую исходную продуктивность. Эта проблема может быть решена на основе иммобилизации клеток. Обнаружено, что у иммобилизованных клеток удлиняется стационарная фаза, а синтез многих веществ осуществляется тогда, когда клетки не делятся.

Использование иммобилизованных клеток млекопитающих для определения гормонов

Большинство клеток плотных тканей, почки, печень, кожа, являются поверхностно-зависимыми. Клетки этих типов культивируют на подложке, и они формируют монослой. В процессе роста клетки млекопитающих образуют прочные контакты не только с подложкой, но и между соседними клетками. Учитывая это, их можно рассматривать как иммобилизованные. Однако, если для иммобилизации ферментов необходима предварительная химическая модификация матриц, то образование контактов между клетками млекопитающих и подложкой осуществляется благодаря биологическим свойствам самих клеток, т. е. адгезии.

Клетки млекопитающих, способные к иммобилизации на поверхности, находят широкое применение в различных областях биологии, и в частности клинических исследованиях. Применение клеток в культуре играет большую роль в исследовании процессов роста и дифференцировке клеток, механизмов старения клеток и метаболизма чужеродных соединений.

Интенсивное развитие современных методов биотехнологии сделало возможным использование иммобилизованных клеток млекопитающих в биотестах – высокочувствительных специфических системах, предназначенных для количественного определения ряда биологически активных веществ.

Принципы биотестирования основаны на том, что клетки-мишени узнают и взаимодействуют только с теми молекулами, которые обладают биологической активностью, в то время как другие молекулы, даже близкие по структуре, никакого ответа в клетках-мишенях не вызовут и, следовательно, не будут определяться в биотесте. На этом принципе основаны методы определения биологической активности гормонов *in vitro*. Эти функционально-специфические методы оценки позволяют определять не только различия в концентрации гормонов, но и выявить различия в их биологической активности (табл. 61).

1. Клетки *M. citrifolia* (15 г сырой массы) смешать с 25 мл 3 % раствора альгината и 5 мл среды (образуются гранулы).
2. Полученные гранулы проинкубировать на качалке (100 об/мин) в среде (25 мл), не содержащей гормонов.
3. В процессе культивирования отбирают пробы и определяют содержание антрахинонов и количество клеток в гранулах геля.
4. Отобрать гранулы геля и промыть их.
5. Часть гранул используют для экстракции 80 % этанолом (30 мин) и определяют спектрометрически ($\lambda - 434$ нм) количество экстрагированного антрахинона. Показано, что через 22 суток инкубации клеток *M. citrifolia* количество антрахинона, синтезированного клетками в суспензии, составляет 1 пмоль на клетку, а иммобилизованными клетками – 9,5 пмоль на клетку.

Табл. 60. Схема получения антрахинонов иммобилизованными клетками *Morinda citrifolia*.

Адгезия клеток (от латинского – прилипание). Это способность клеток слипаться друг с другом или субстратом. Адгезия обусловлена гликокомплексом и липопротеидами плазматических мембран. Адгезированные клетки могут распадаться после удаления ионов Ca^{2+} из среды. У опухолевых клеток нарушены механизмы адгезии и они легко переносятся в разные участки.

Биотестирование – система оценки качественных или количественных определений биологически активных соединений с использованием биологических систем.

Иммобилизация клеток млекопитающих

Жизнедеятельность клеток в большой степени определяется их взаимодействием с подложкой или матрицей для роста. Все клетки, полученные из тканей млекопитающих, имеют на поверхности отрицательный заряд, и они хорошо прикрепляются к стеклянной или полистирольной подложке с отрицательно заряженной поверхностью. Для прочного связывания клеток с поверхностью ее обрабатывают гликопротеидами, которые получают из сыворотки крови или клеток, например, фибробластов. Иногда используют полилизин, коллаген и другие вещества, способствующие адгезии клеток.

После приготовления полистирольных плат в каждую лунку вносят по $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл культуральной среды. При большей концентрации клеток ответ культуры на действие гормона не достигает максимального значения, что связано с уменьшением рецепторов за счет высокой концентрации клеток.

Платы с культурами помещают в инкубатор (37°C) в атмосферу «воздух + 5 % CO_2 ». Атмосфера в инкубаторе должна быть насыщена, чтобы предотвратить испарение культуральной среды.

Каждые 3-4 суток культуральную среду удаляют стерильной пастеровской пипеткой и добавляют свежую порцию среды, предварительно нагретую до 37°C . В качестве биотеста иммобилизованные клетки используют на 7-10 сут после начала культивирования, в этот период способность клеток реагировать на действие гормона максимальна. После чего вновь готовят иммобилизованные клетки (полунепрерывная система трансформации).

Выбор ответной реакции клеток при биотестировании

В результате взаимодействия между гормоном и рецепторами клетки происходят изменения в метаболизме клетки. Необходимо выбрать наиболее специфические и ярко выраженные изменения в тканях-мишенях (клетках), так как на основании этих характеристик оценивают свойства, наличие гормона или других биологически активных веществ.

При выборе метаболических параметров тест-клеток необходимо учитывать такие факторы как специфичность выбранных показателей клеток-мишеней, чувствительность ответа, точность измерения, воспроизводимость биотеста (рис. 168).

При оценке специфичности биотеста, необходимо учитывать, что действие других биологически активных веществ могут вызывать такой же ответ. Например, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий, тиреотропный и хориогонический гонадотропный гормоны имеют идентичные α -субъединицы и обладают перекрестной активностью при взаимодействии с рецепторами тиреотропного гормона.

Для решения вопроса о специфичности действия необходимо сравнить ответные реакции тест-клеток на различные, близкие

1. Готовят раствор с известной концентрацией ТТГ в растворе Хенкса и испытуемого образца с неизвестной концентрацией в ней ТТГ.
2. Готовят серию последовательных разведений каждого образца.
3. Удаляют культуральную среду из монослоя клеток и промывают их раствором Хенкса.
4. К каждому монослою добавляют соответствующую дозу ТТГ в растворе Хенкса и $0,5 \text{ мМ}$ 3-изобутил-1-метилксантина. Он инактивирует клеточную фосфодиэстеразу и, тем самым, усиливает ответ по АМР. Также в ряд культур вносят испытуемый образец с неизвестной концентрацией ТТГ.
5. Инкубируют культуры при 37°C в течение 20 мин в среде, содержащей 5 % CO_2 .
6. Отбирают инкубационную среду и в каждую лунку добавляют по $0,5 \text{ мл}$ абсолютного этанола, охлажденного во льду.
7. Закрывают платы и помещают их в холодильник на -20°C на 24 ч (в этих условиях происходит лизис клеток и осаждение белка, а сАМР остается в растворе).
8. Осажденный белок удаляют центрифугированием (2000 g , 15 мин, 4°C).
9. Этанольные экстракты (по 200 мкл) переносят в стеклянные пробирки и выпаривают в токе азота досуха.
10. Сухие осадки растворяют в буфере (25 мМ трис- HCl , 50 мМ NaCl , 8 мМ теофиллина, 6 мМ меркаптоэтанола) и определяют в них содержание сАМР, которое выражают в пикомолях на 1 монослой.

Табл. 61. Проведение биотеста на тиреотропный гормон (ТТГ).

по структуре вещества, которые могут присутствовать в исследуемой биологической жидкости, и подобрать такие клеточные тест-системы, которые обладают высокоспецифичным ответом.

Следующим фактором, который необходимо оценивать при разработке иммобилизованных клеток-мишеней, является чувствительность ответа. Чувствительность ответа – это наименьшее количество вещества, на которое отвечает тест-система по сравнению с нулевой дозой этого вещества. Количество этого вещества находят на основании экспериментальной кривой доза-ответ (рис. 169). При оценке этого параметра необходимо установить влияние условий инкубации (температура, рН-среды, ионная сила), плотность клеток-мишеней в монослое, время действия стимулятора и выбрать оптимальные параметры с дальнейшим их соблюдением в процессе работы.

Точность измерения действия гормона или других биологически активных веществ является показателем эффективности анализа. Она определяется по графику зависимости точности измерения от дозы вещества. При оптимизации проведения эксперимента необходимо подобрать условия для наиболее точного определения действия вещества.

Воспроизводимость биотеста – это отклонения показателей ответной реакции тест-культур при независимых экспериментах. Хорошей воспроизводимостью можно считать такую воспроизводимость, которая не превышает 10-15 % для доз вещества, которые соответствуют максимальной точности кривой доза-ответ.

Основные принципы проведения биотестирования

Тестирование биологически активных веществ осуществляют на стандартных 24-луночных и 96-луночных планках. Для этого монослой клеток получают культивированием в плате.

Повторы монослоев клеток, полученных из одной и той же исходной ткани и того же посева культуры клеток, являются идентичными и реагируют на исследуемое вещество одинаково. Для того чтобы получить верную информацию каждая доза исследуемого вещества должна быть испытана на достаточном количестве повторов – не менее трех.

При проведении биотеста необходимо так проводить эксперимент, чтобы между временем внесения исследуемого вещества и временем снятия ответа клеток было одинаковым для всех образцов. Для этого прекращение инкубации осуществляют в такой последовательности, в какой вносили образцы.

По окончании инкубации с гормонами или другими биологически активными веществами осуществляют экстракцию продуктов реакции из инкубационной среды клеток, оценивают ответ клеток на каждую исследуемую дозу стимулятора и определяют количество продукта реакции в каждом экстракте. Полученные данные представляют в виде кривой доза-ответ (рис. 170).

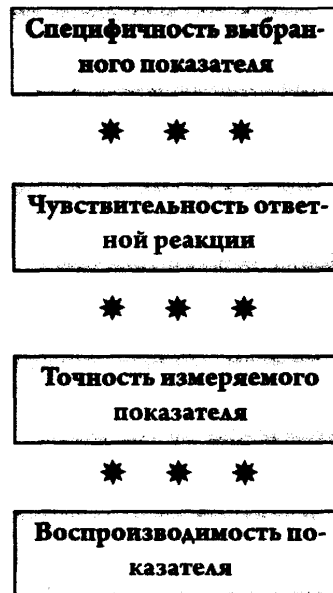


Рис. 168. Критерии, которые необходимо использовать при разработке биотеста.

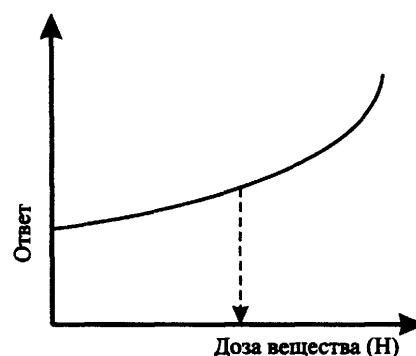


Рис. 169. Определение чувствительности биотеста по кривой доза-ответ.

Пунктирной стрелкой указано минимальное количество вещества, регистрируемого этим методом, по концентрации этого вещества и определяют чувствительность метода.

Точность измерения – это показатель воспроизводимости ответной реакции системы. Точность зависит от количества исследуемого вещества. Так, если концентрация вещества низкая, т. е. на уровне чувствительности, то ошибка измерения будет очень высокой. И, если концентрация вещества будет очень высокой, то точность ее определения будет низкой (рис. 168). Для каждого вещества существует свой диапазон концентрационной точности.

Последовательность операций при определении концентрации биологически активных веществ следующая: 1. Рассчитать средние значения ответа клеток и стандартную ошибку для каждой известной дозы вещества. 2. Построить график зависимости средних значений от дозы стандартного вещества. 3. Провести эти процедуры для испытуемого вещества неизвестной концентрации и провести экстраполяцию экспериментальных данных со стандартной калибровочной кривой. Следовательно, сравнивая данные, полученные для испытуемого вещества с кривой для стандарта, можно рассматривать биологическую активность полученного образца. В ряде случаев удобнее пользоваться кривой, построенной в логарифмических координатах.

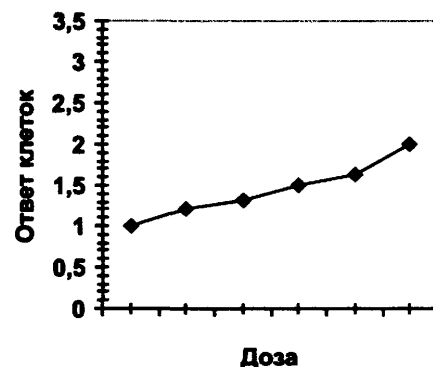


Рис. 170. Кривая доза-ответ. Она представляет собой зависимость средних величин (S) ответа клеток от дозы тестируемого вещества.

Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток

Получение глюкозо-фруктозных сиропов

Использование ферментов в технологии имеют глубокую историю и, в свое время, это направление относилось к технической биохимии. Сейчас оно относится к биотехнологии по той причине, что оно обогатилось и новыми современными методами биотехнологии.

В настоящее время не менее чем в семи крупномасштабных технологических циклах используются иммобилизованные ферменты или клетки (рис. 171).

Кратко рассмотрим некоторые из этих технологических процессов.

Получение глюкозо-фруктозных сиропов связано с неоспоримым преимуществом фруктозы как пищевого продукта по сравнению с обычным сахаром. Как известно, мед на 50 % состоит из фруктозы, она на 60-80 % слаще сахара и потреблять ее можно в меньших количествах. Фруктоза в отличие от глюкозы и пищевого сахара может потребляться и больными диабетом, она в меньшей степени влияет на заболевания зубов по сравнению с сахаром.

Несмотря на большие преимущества фруктозы по сравнению с сахаром, до 70-х годов она не производилась в промышленных масштабах. В 1973 г. в США компанией «Клинтон Корн» был внедрен промышленный способ превращения глюкозы во фруктозу. В производстве использовался иммобилизованный фермент глюкозоизомеразы.

Глюкозоизомеразы катализируют превращения глюкозы, которую получают при гидролизе крахмала в смесь глюкозы и фруктозы. В таком глюкозо-фруктозном сиропе содержится около 43 % фруктозы, 50 % глюкозы и 6 % ди- или олигосахаридов. Эти сиропы используют при производстве тонизирующих и ацидофильных напитков, мороженого, кондитерских изделий, консервированных фруктов.

В настоящее время производство глюкозо-фруктозных сиропов осуществляется во многих странах по несколько разным технологиям. Так, в Японии глюкозоизомеразу получают из клеток микроорганизмов, адсорбируя ее на ионообменной смоле.

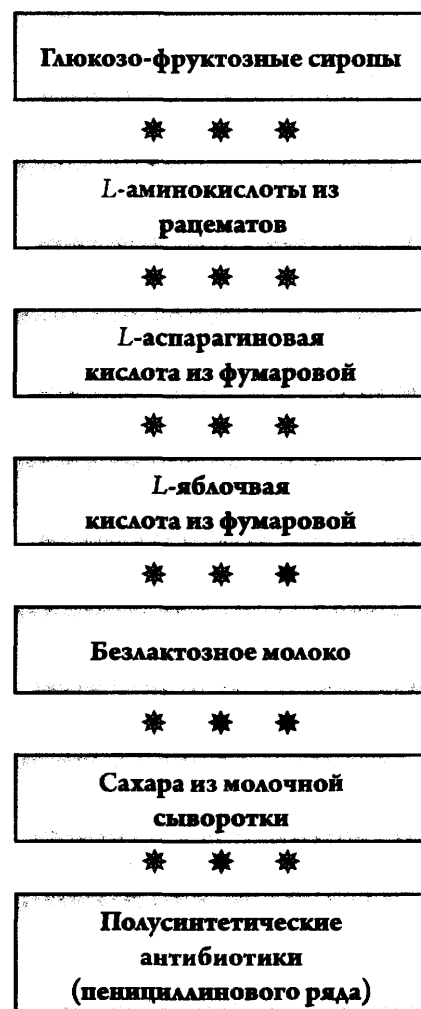


Рис. 171. Крупномасштабные технологические циклы, в которых используются иммобилизованные ферменты или клетки.

Иммобилизованный таким образом фермент помещают в колонну. Через колонну пропускают сырье (глюкозный сироп) и получают глюкозо-фруктозный сироп.

Продуктивность такого процесса от 1 до 9 т глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента. Время инактивации фермента около 50 суток.

В настоящее время функционируют технологии получения 100 %-ой фруктозы из глюкозных сиропов. Такая технология состоит из двух стадий. На первой стадии глюкоза окисляется в D-глюкозон под действием пиранозо-2-оксидазы (полученной из *Polyporus obtusus*). На второй стадии – глюкозон восстанавливается до фруктозы на палладиевом катализаторе.

Совершенствование технологии позволило улучшить характеристики иммобилизованного фермента и сделать этот процесс высокорентабельным. Так, по экономическим оценкам венгерских специалистов, производство глюкозо-фруктозных сиропов из кукурузного крахмала с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы в полтора раза более экономично, чем получение сахара из сахарной свеклы по традиционной технологии.

Получение L-аминокислот

В промышленных масштабах необходимо для корректировки рациона питания, в лечебных и профилактических целях. Аминокислоты получают, используя химические методы, однако в этом случае получается смесь оптических изомеров (L- и D-аминокислоты), зеркальные изомеры. Как известно, в синтезе белков организма используются только L-аминокислоты (за исключением метионина), в то время как D-аминокислоты не представляют ценности. Химическими методами не удается разделить L- и D-аминокислоты.

Первая промышленная технология получения L-аминокислот из рацемической смеси была реализована в Японии в 1969 г., однако она была недостаточно экономична. После перехода в 1976 г. на иммобилизованную аминоксилазу экономическая эффективность процесса возросла в 1,5 раза.

Суть метода состоит в том, что в качестве исходного вещества используются ацилированные D- и L-аминокислоты, которые получают обычным химическим синтезом. Фермент аминоксилаза гидролизует один ацил-1-изомер, отщепляя от него ацильную группу, а это приводит к резкому увеличению его растворимости по сравнению с ацилированным D-изомером. Используя эти различия в растворимости, отделяют L-аминокислоту в чистом виде.

Если оставшиеся ацил-D-аминокислоты нагреть, то часть D-аминокислот перейдет в L-формы и вновь образуется рацемическая смесь, состоящая из L- и D-аминокислот. После этого повторяется обработка этой смеси иммобилизованной аминоксилазой. Такой двухэтапный процесс повторяется многократно.

Иммобилизовать аминоксилазу (гидролизует все аминокислоты, она специфична к ацильной группе аминокислот) достаточно

Взаимопревращения изомеров обеспечиваются изомеразми. Изомеразы осуществляют перенос каких-либо групп от одного участка молекулы к другим, их называют мутазами, а оптически активные соединения в рацематы – рацемазми, в эписмеры – эписмеразми. Изомеразы широко распространены в природе, особенно у микроорганизмов. Они характеризуются высокой специфичностью. Известно более 50 изомераз.

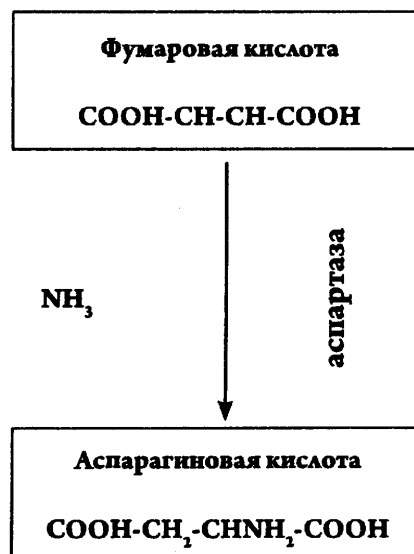


Рис. 172. Образование аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты в одну стадию с использованием аммиака и аспаргазы.

легко, она хорошо абсорбируется на ионнообменных смолах, которыми заполняют реакционную колонну. Время полуинактивации иммобилизованной аминоксилазы составляет 65 сут. После падения активности иммобилизованного фермента в колонну вновь добавляют раствор свежего фермента.

L-аспарагиновую аминокислоту получают в больших количествах. Хотя она не относится к незаменимым аминокислотам, она находит применение в качестве добавки в кондитерские изделия и напитки для придания сладкого или кисловатого вкуса (в сочетании с глицином). Аспарагиновую аминокислоту получают ферментативным синтезом из фумаровой кислоты и аммиака, реакция протекает в одну стадию и катализируется аспартазой (рис. 172). В результате молекула аммиака присоединяется к фумаровой кислоте по месту двойной связи с образованием *L*-аспарагиновой кислоты. При получении *L*-аспарагиновой кислоты впервые в технологической практике были использованы иммобилизованные клетки микроорганизмов, содержащие относительно высокие количества аспартазы (разработаны в Японии в 1976 г.).

Клетки бактерий заключают в гель и из него формируют кубики размером 2-3 мм, ими заполняют колонну объемом 1 м³ и через нее пропускают раствор фумарата аммония. На выходе из колонны *L*-аспарагиновую кислоту кристаллизуют, собирают ее центрифугированием и промывают холодной водой. Этот процесс полностью автоматизирован и осуществляется в непрерывном режиме. В фирме «Танабе Сейяку» (Япония) получают 1700 кг чистой *L*-аспарагиновой кислоты в сутки.

L-яблочная кислота находит применение в качестве заменителя лимонной кислоты в продуктах питания.

L-яблочную кислоту ферментативным путем получают так же, как и *L*-аспарагиновую кислоту из фумаровой кислоты. В качестве катализатора в этой реакции используют фумарозу, которая катализирует присоединение воды по двойной связи фумаровой кислоты, в остальном реакция идет так же, как и в случае получения *L*-аспарагиновой кислоты.

В обычных интактных клетках микроорганизмов время полуинактивации фумаразы составляет 6 сут., в том случае, если клетки иммобилизованы в полиакриламидный гель, это время увеличивается до 55 сут., а если иммобилизация осуществляется в каррагиновый гель, то 160 сут.

Получение безлактозного молока

Получение безлактозного молока связано с тем, что лактоза (или молочный сахар) характеризуется низкой растворимостью и малой сладостью. Она кристаллизуется в составе молочных изделий и продуктов, и это придает им неприятный вкус.

Под действием лактазы или β -галактозидазы лактоза распадается на глюкозу и галактозу (рис. 173). Молоко, которое не содержит лактозу, может употребляться в производстве продуктов и

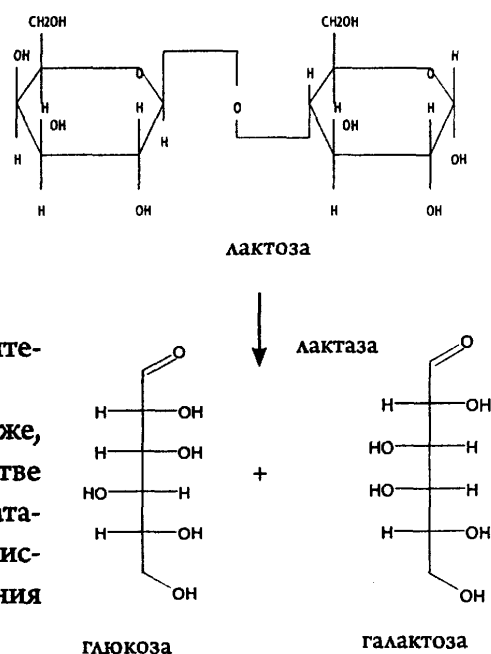


Рис. 173. Превращение лактозы в глюкозу и галактозу при участии лактазы или β -галактозидазы.

также людьми, организм которых страдает лактозной недостаточностью. Безлактозное молоко отличается от обычного и вкусовыми свойствами, оно более сладкое, так как глюкоза слаще лактозы. Имобилизованная лактаза достаточно стабильна и через 50 сут работы она сохраняет около 80 % исходной активности. Первый промышленный комплекс производства безлактозного молока был построен в Италии и только один завод в Милане производит не менее 10 т безлактозного молока в сут.

Получение 6-аминопенициллановой кислоты

Получение 6-аминопенициллановой кислоты химическим синтезом достаточно сложная задача. Получение новых более эффективных аналогов пенициллина связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности «ядра» антибиотика, которым является 6-аминопенициллановая кислота (рис. 174).

Самый простой путь получения антибиотиков этого класса — это получение 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) и дальнейшее ацилирование ее аминогруппы с получением полусинтетического аналога. В настоящее время для получения 6-АПК используют иммобилизованные бактериальные клетки, содержащие пенициллинамидазу или чистый фермент пенициллинамидазу. Большая часть 6-АПК в настоящее время получается с помощью иммобилизованных ферментов.

Компания «Танабе Сейяку» использует бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидный гель, при этом общий выход 6-АПК составляет около 80 %.

В настоящее время ведется разработка новых технологий по использованию иммобилизованных ферментов и клеток для получения целевых продуктов.

Получение сахаров из молочной сыворотки

Получение сахаров из молочной сыворотки представляется достаточно перспективным, так как большая часть молочной сыворотка не используется, в то же время около 5 % в ее составе приходится на лактозу. Если сыворотка высушена, то 75 % приходится на лактозу. Ферментативный гидролиз лактозы позволяет получать глюкозу и галактозу, которые в 1,5 раза слаще пищевого сахара.

Пенициллины, группа близких по химическому строению природных и полусинтетических антибиотиков. Ядро молекулы пенициллина — 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) — гетероциклическое соединение, состоящее из 4-членного β-лактамного (А) и 5-членного тиазолидинового (В) колец. Пенициллины различаются характером радикала (R) в боковой цепи.

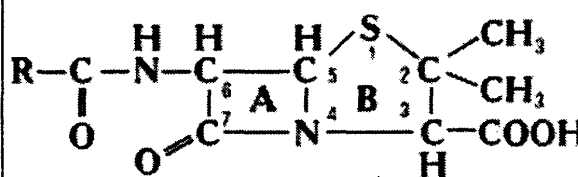


Рис. 174. Формула антибиотиков пенициллинового ряда.

Глава XII

Биосенсорика

Характеристика биосенсоров

Существует несколько определений биосенсора, однако наиболее общее определение было дано Taylor R. F., согласно которому «Биосенсор – это аналитическое устройство, содержащее в своем составе биологически чувствительный элемент, связанный с преобразователем». В качестве биологически чувствительного элемента могут быть использованы: ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты, мембраны или целые клетки, а преобразователи могут быть оптические, калориметрические, электрохимические и другие.

Основная идея в биосенсорах заключается в том, что биологическая молекула, выполняющая функцию датчика, изменяет свои характеристики под влиянием различных факторов и изменения передаются преобразователю, который переводит эту информацию в электрический сигнал (рис. 175).

Или другими словами, в результате взаимодействия между молекулами биодатчика и определяемыми веществами или исследуемыми факторами, свойства молекул биодатчика (цвет, конформация, активность и др.) меняются. Эти изменения являются «сигналом» для регистрирующего устройства. Конструкция биодатчика должна быть такова, чтобы величина «сигнала» была пропорциональна концентрации исследуемого вещества или анализируемого фактора.

Первый коммерческий биосенсор появился в 1974 г. Исследования в этой области ведутся чрезвычайно интенсивно, и в настоящее время удалось достичь больших успехов в этом направлении биотехнологии.

Существующие биосенсоры условно могут быть разбиты на два типа. Первый тип – «биоаффинные биосенсоры». В них молекула, включенная в биодатчик «узнает» на основе биологического узнавания (антитело-антиген; фермент-субстрат, рецептор-лиганд и др.) соответствующую молекулу, присутствующую в исследуемой смеси. В результате этого взаимодействия (образования комплекса) свойства биодатчика меняются, что и является сигналом для преобразователя. Это позволяет определять содержание вещества в исследуемой смеси:

Второй тип – «фермент-метаболические биосенсоры». В этом случае биодатчиком является фермент, который, взаимодействуя с субстратом в среде, образует продукт реакции. Образовавшийся продукт реакции является «сигналом» для преобразователя. Величина «сигнала» пропорциональна концентрации анализируемого субстрата, и, следовательно, можно определить содержание субстрата в смеси.

Завершая краткую характеристику биосенсоров можно отметить, что любой биосенсор состоит из двух основных элементов:

Taylor R.F. The world Biotechnology Repts.- 1986.- Vol. 2. P. 7, San-Francisco.



Рис. 175. Конструктивная схема биосенсорного устройства. Определяемое вещество связывается с биодатчиком, при этом характеристики (оптические свойства, электропроводность и др.) изменяют преобразователь и регистрируются. Определяемое вещество связывается только в случае специфического узнавания с биодатчиком.

биодатчика и преобразователя. Совершенно очевидно, что создание биосенсоров относится к междисциплинарной области и объединяет молекулярную биологию, физику полимеров и микроэлектронику. Так, конструирование биосенсора с высокой эффективностью реакции «узнавания» осуществляется в рамках биологических наук, а разработка системы регистрации «сигнала» проводится в рамках технических наук. Схематично функционирование биосенсора показано на рисунке 176.

Теоретически любая биомолекула или биохимическая реакция могут быть использованы при создании биодатчиков, так как при функционировании биомолекул реализуется принцип структурно-функциональной взаимосвязи. Это означает, что любые специфические взаимодействия будут сопровождаться структурными изменениями взаимодействующих молекул. При выборе биологической системы узнавания необходимо исходить из того, что реакция должна быть высокоспецифичной и протекать с высокой эффективностью.

В настоящее время чаще всего находят применение коммерческие биосенсоры, основанные на использовании иммунных реакций, ферментов, мембран и нуклеиновых кислот.

Биосенсоры на основе иммунных реакций

Система узнавания основана на высокоспецифичном взаимодействии антител (Ат) с антигеном (Аг), в результате которого образуются комплексы Ат/Аг. В данном случае связывающим агентом являются антитела, а лигандом – антиген. Распределение антигена между связанной и свободной (т.е. остающейся в растворе) фазами находится в прямой зависимости от общего количества присутствующего антигена, что позволяет определять его количество в растворе. Принцип связывания основан на том, что при неизменном количестве связывающего агента и заданной величине константы равновесия (K), характеризующей сродство антитела к антигену, отношение связанного лиганда к свободному в состоянии равновесия будет находиться в количественной зависимости от суммарного количества присутствующего лиганда.

В биосенсорах используется новый подход, который основан на использовании электрохимических преобразователей для оценки реакции связывания антиген-антитело. В качестве электрохимических преобразователей используют амперометрические – типа электрода Кларка и потенциометрические.

Достаточно перспективным является использование ферментных меток с антителами – иммуноферментный анализ (ИФА). Способность ферментов эффективно катализировать химические реакции позволяет осуществлять их регенерацию в концентрациях, сравнимых с концентрациями изотопных меток.

Принцип работы амперометрического иммуноферментного датчика в биосенсорах для тестирования антигенов основан на

Сенсор – от слова чувствительный, т. е. способный чувствовать или изменяться в ответ на изменение его окружения.

Биосенсор – аналитическое устройство, содержащее биологически чувствительный элемент, связанный с преобразователем и обеспечивающий регистрацию изменений биодатчика.

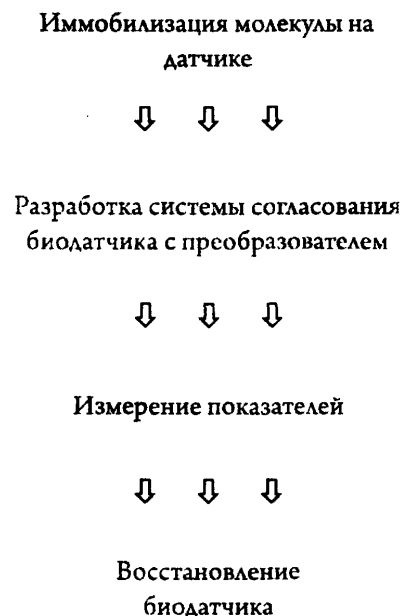


Рис. 176. Основные этапы функционирования биосенсоров.

иммобилизации антител к соответствующему антигену в мембрану – носитель. При наличии в растворе соответствующих антигенов они будут специфично связываться с антителами на поверхности датчика. Если в качестве метки используется, к примеру, каталаза, которой предварительно мечены антигены, то при образовании комплексов антитело-антиген будет выделяться кислород (каталаза разрушает перекись водорода и в среду выделяется O_2), по концентрации которого при известной концентрации перекиси, можно определить количество связанных антигенов.

Иммуносенсоры позволяют определить концентрации разнообразных низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений в очень низких пикомолярных концентрациях. Время анализа составляет несколько минут или даже секунда, так как реакция узнавания антитело-антиген осуществляется достаточно быстро.

Биосенсоры на основе нуклеиновых кислот

Эти биосенсоры могут создаваться с использованием как одно-, так и двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот. При этом могут использоваться разные типы «узнавания». Так, при использовании в биодатчике одноцепочечной ДНК или РНК, может функционировать «узнавание» комплементарных пар азотистых оснований модельной нуклеиновой кислоты с чужеродной (выявляемой) нуклеиновой кислотой (рис. 177).

Конструирование биодатчиков на основе одноцепочечной нуклеиновой кислоты состоит из нескольких стадий. Молекулу (фрагмент) нуклеиновой кислоты необходимо ковалентно связать с «носителем». Иммунизацию проводят так, чтобы достичь высокой плотности молекул на «носителе» (чаще всего в качестве «носителя» используют пленки из нитроцеллюлозы или нейлона). «Носитель» с биомолекулой является биодатчиком. В самом простом случае работа такого биодатчика сводится к тому, что азотистые основания одноцепочечной нуклеиновой кислоты «узнают» и по принципу комплементарности образуют водородные связи с азотистыми основаниями ДНК, которые присутствуют в исследуемой среде. Такой процесс называют гибридизацией нуклеиновых кислот. Наличие чужеродной ДНК с комплементарными последовательностями нуклеотидов узнают по изменению физико-химических свойств датчика или по носителю «метки», которая заранее вводится в состав этой молекулы. Свойства метки должны изменяться при образовании гибридного комплекса.

Биосенсоры, в которых используют одонитевые ДНК, называют «ДНК-зондами». В настоящее время они используются для обнаружения таких генетических заболеваний как серповидная клеточная анемия, фенилкетонурия и др. Такие биосенсоры используются и при контроле на наличие вирусов и бактерий в биологических жидкостях, пищевых продуктах, медицинских препаратах и окружающей среде.

Иммунизация фермента – связывание фермента с носителем, в качестве носителя могут использоваться различные соединения природного и искусственного происхождения.

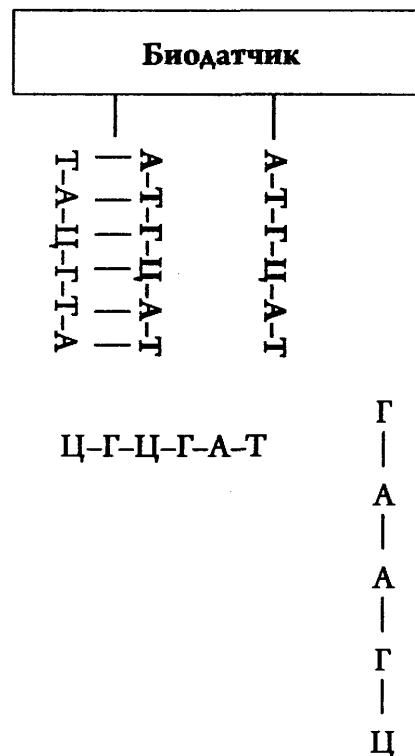


Рис. 177. Принцип функционирования биодатчика на основе одноцепочечной нуклеиновой кислоты.

С биодатчиком связывается только фрагмент ДНК комплементарный последовательности ДНК биодатчика, при этом формирование гибридного фрагмента приведет к изменению преобразователя. Фрагменты ДНК, не комплементарные ДНК биодатчика, остаются в растворе в свободном виде.

Генные болезни – это группа заболеваний, обусловленных мутациями на генном уровне. Чаще всего, они проявляются наследственными нарушениями обмена веществ – ферментопатиями. По характеру метаболических нарушений эти заболевания разделяют на болезни, связанные с нарушением аминокислотного, углеводного, липидного, минерального и других видов обмена.

Для нуклеиновых кислот характерен ряд свойств, которые могут использоваться при конструировании биосенсоров:

1. Разные пространственные формы (А-, И-, Z-формы, линейная и кольцевая молекулы), которые различаются по физико-химическим свойствам и изменение внешних условий инициирует переход между этими формами.

2. Двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот являются «жесткими», а одноцепочечные – являются «гибкими» молекулами.

3. Азотистые основания нуклеиновых кислот являются хромофорами и поглощают свет в УФ-спектре, они образуют комплементарные связи с азотистыми основаниями противоположной цепи.

4. Спиральная молекула ДНК имеет специфическое распределение реакционноспособных групп на поверхности молекул, что обеспечивает специфическое взаимодействие с ДНК.

Биодатчики на основе жидких кристаллов, суперспиральных кольцевых двухцепочечных молекул ДНК

Суперспиральная ДНК, входящая в состав датчика, узнается ферментами (рестриктазами, нуклеазами), они способны узнавать определенные последовательности нуклеотидов и расщепляют одну или две сахарофосфатные цепи ДНК. В результате расщепления цепи ДНК происходит снятие суперспиральных витков ДНК, при таком переходе из суперспирали в линейную форму будет меняться структура жидкокристаллической дисперсии. В этом случае происходит появление аномальной оптической активности у исследуемых дисперсий.

Следовательно, интенсивная полоса в спектре кругового дихроизма жидкокристаллической дисперсии используется в качестве критерия наличия в исследуемой системе вещества, расщепляющего сахарофосфатную цепь ДНК. Так, обработка молекулы ДНК в составе датчика нуклеазой, специфически узнающей последовательность ААГЦТТ, ведет к росту амплитуды полосы в спектре кругового дихроизма (рис. 178).

Минимальная концентрация нуклеазы, которую можно определить биодатчиком на основе жидкокристаллической дисперсии ДНК, составляет 5×10^{-5} мкг/мл. Любые факторы, нарушающие целостность молекулы ДНК, входящей в состав датчика, могут быть определены использованием этого метода.

Биосенсоры на основе светочувствительных мембран

Светочувствительные биосенсоры – это аналитические устройства, биодатчиками которых являются фотоувствительные биологические структуры, способные воспринимать, преобразовывать и хранить оптическую информацию.

Фенилкетонурия – заболевание, связанное с патологией фермента (фенилаланингидроксилазы), отвечающего за обмен фенилаланина. Это заболевание занимает одно из ведущих мест среди нарушений аминокислотного обмена. Фенилаланин – это незаменимая аминокислота, т.е. она никак не может синтезироваться в нашем организме из других аминокислот, и потому обязательно должна поступать с пищей. В норме, часть фенилаланина, поступившего к нам в организм, расходуется на синтез белков. Другая же (основная) часть превращается при помощи фенилаланингидроксилазы в тирозин, из которого в дальнейшем образуются различные биологически активные вещества. Если же активность фермента снижена, то организм ребенка страдает как от недостатка этих веществ, так и от повышенного накопления в своих органах и тканях фенилаланина и его производных, что, в свою очередь, оказывает токсическое действие на центральную нервную систему, обуславливая тяжелые нарушения психического развития. В связи с тем, что почки не справляются с реабсорбцией повышенного количества фенилаланина, он выводится с мочой. Именно благодаря наличию в моче фенилкетона, данное заболевание и получило свое название – «фенилкетонурия».

Исследование молекулярных процессов зрения, фотосинтеза и других фоточувствительных систем показали их высокую квантовую эффективность, чувствительность и динамичность, что стимулировало разработки принципов переработки информации на молекулярном уровне. В настоящее время ведутся исследования по созданию принципиально новых типов высокочувствительных и информационно-логических устройств. Результаты этих исследований показали возможность создания молекулярных устройств и природных биомолекул, в частности природных хромофор-белковых комплексов, которые входят в состав фоторецепторных и энергообразующих мембран.

С этой точки зрения большой интерес представляют пурпурные мембраны (ПМ) галобактерий. В этих высокоспециализированных мембранах осуществляется векторный трансмембранный перенос протонов. ПМ на 3/4 состоит из белка – бактериородопсина и на 1/4 из кислых липидов. Бактериородопсин (Бр) – белок, состоящий из 248 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 26,5 кДа. Поглощение света Бр (максимум поглощения в видимой области – 570 нм) обеспечивается альбумином ретинола, который ковалентно связан с остатком лизина-216 белка, образуя с ϵ -аминогруппой основания Шиффа (рис. 179).

Бактериородопсин в мембране может находиться в двух устойчивых формах – темноадаптированной и светоадаптированной, между которыми возможны переходы. В светоадаптированной форме Бр ретинол находится полностью в трансконформации, а темноадаптированный представляет собой эквимольную смесь из 13-цис и полностью трансизомеров. Как 13-цис-Бр, так и полностью транс-Бр обладают фотохимической активностью и проходят цикл фотохимических превращений (табл. 62).

В ходе фотохимических превращений Бр происходит перенос протонов из внутриклеточного объема через мембрану во внешнюю среду, что приводит к созданию градиента электрохимического потенциала ионов водорода на мембране. Как известно, энергия, запасенная в виде разности потенциалов, используется для синтеза АТФ, мембранного транспорта, движения клеток и др. целей. Точный механизм фотонного транспорта в молекуле Бр еще не установлен.

Возможность использования Бр в конструировании биосенсоров основана на том, что Бр сохраняет электрохимические свойства при встраивании его в искусственные липидные мембраны (липосомы). В таком случае, действие света вызывает перенос заряда между разделенной мембраной отсеков и создает разность электрического потенциала, которая может быть измерена с помощью обратимых электродов. На таких искусственных мембранах с Бр может возникать фотопотенциал до 200 мВ.

Использование в биосенсорах бислойных липидных мембран имеет серьезный недостаток – они нестабильны. Для решения этих проблем были проведены исследования, которые показали, что бактериородопсин сохраняет свои свойства к обратимым

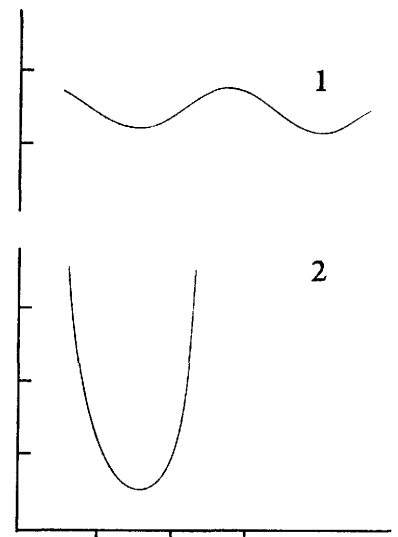


Рис. 178. Спектры КД жидкокристаллических дисперсий, сформированных из молекул ДНК рBR 322 в полимер-содержащем растворе. 1 – спектр КД исходных молекул, 2 – спектр после обработки рестриктазой Hind III в течение 1 часа.

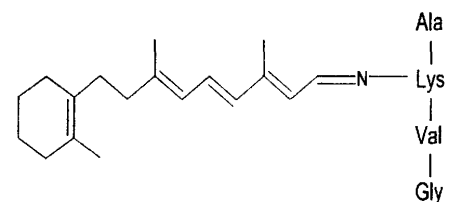


Рис. 179. Хромофорная группа бактериородопсина – ретинол, связанный шиффовым основанием с Lys-216 полипептидной цепи бактериородопсина.

1. В ходе цикла происходит депротонирование и последующее репротонирование Шиффова основания и изомеризация ретинола относительно двойной связи C(6)-C(14). В ходе фотоцикла полностью транс-Бр проходит через 6 метаболических состояний – интермедиаторов J, K, L, M, N и O, время жизни которых лежит в диапазоне 0,4 нс – 5-10 мс.
2. Установлено, что после поглощения кванта света (длина волны 570 нм), светоадапт-Бр переходит в синглетное возбужденное состояние, время жизни которого составляет 400-700 опс [Sharkov A.V. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 808, 94-102].

Табл. 62. Фотохимический цикл светоадаптированного полностью транс-Бр.

фотохимическим превращениям в условиях частичного обезвоживания, причем в пленках с влажностью > 60 % цикл его превращения практически остается таким же, как и в водной суспензии.

Наряду со сходством фотохимических процессов, протекающих в суспензии и в сухих препаратах мембран, между ними существуют и существенные различия (табл. 63). Несмотря на это, иммобилизация бактериородопсина или пурпурных мембран на полимерных матрицах с пониженным содержанием воды является весьма перспективным в биосенсорике.

Сухие мембраны с добавками, модифицирующими спектральные и кинетические свойства Бр, получили название «Биохром». Такие пленки сохраняют функциональную активность в течение многих месяцев, а в некоторых случаях и лет и могут воспроизводить до 10^4 циклов переключения «свет-темнота». Такие системы представляют большой интерес и для решения задач микроэлектроники.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке методов получения ориентированных пленок, содержащих бактериородопсин. Приоритет в этой области исследований принадлежит американским ученым П.Л. Датсону и Ж.Д.М. Тиеду, которые ведут эти исследования в Пенсильванском университете с 80-х годов.

В настоящее время разработаны различные способы ориентации пурпурных мембран: методом центрифугирования, в магнитном поле вследствие анизотропии диамагнитной восприимчивости белков, на заряженных поверхностях, в электрическом поле воздушного конденсата, в электрическом поле, приложенном непосредственно к суспензии, на межфазной границе воздух/вода вследствие гидрофобных взаимодействий. Имеются попытки получения препаратов пурпурных мембран, иммобилизованных в полиакриламидном геле.

Неплохие результаты по получению упорядоченных пленок пурпурных мембран удается получить при использовании электрофоретического метода осаждения мембран на плоском электроде. Так как в состав пурпурных мембран входят кислые липиды, которые в нейтральной среде имеют отрицательный заряд, то фрагменты таких мембран электрофоретически подвижны и при pH 7,0 перемещаются к аноду. Этот метод имеет и ряд недостатков, так этим методом трудно получить препараты большой или, напротив, малой площади, трудно получить пленки малой толщины (менее сотен монослоев).

Для получения организованных молекулярных ансамблей используется послойное нанесение мономолекулярных пленок на твердой подложке, которое было предложено Ленгмюром. Этот метод основан на формировании монослоев на границе раздела фаз «вода-воздух» с последующим переносом пленки на твердофазную подложку. Этот подход технологичен и позволяет получить монослой смешанного состава, а также формировать «сверхрешетки». Такие системы достаточно стабильны для проведения

При малой влажности положение максимума в спектре поглощения многослойных пленок сдвинуто на 5-10 нм в коротковолновую область по сравнению с максимумом в суспензии.

Темновая и световая адаптации в мультислойных пленках отличается от таковой в водной суспензии.

В сухих препаратах наблюдается фотопревращение и 13-цис-Бр, в фотоцикле которого отсутствует депротонированный интермедиат М.

Фотоцикл полностью транс-Бр в сухих мембранах редуцирован по сравнению с водной суспензией – в нем отсутствуют интермедиаты L и O.

Табл. 63. Некоторые различия между свойством бактериородопсина в составе суспензии и сухих растительных препаратов.

Ленгмюр Ирвинг (1881-1957) – американский физик и физико-химик. Исследовал поверхностные явления (адсорбция, молекулярные слои), работы по термоэлектронной эмиссии, вакуумной технике. Нобелевская премия в 1932 г.

строгих количественных измерений, и в то же время молекулярная организация пурпурных мембран достаточно сложна, что позволяет модифицировать такие структуры с целью управления фотосигналом.

В качестве фоточувствительного элемента в биодатчиках могут использоваться и фитохромы. Они представляют собой тетрапиррольный хромопротеин, который играет важную роль в фоторегуляции процессов развития и морфогенеза у растений. У фитохрома очень высока чувствительность к красному свету. Под действием света с длиной волны 660 нм фитохром (Фх) переходит в длинноволновую форму (Фхд), которая сенсibiliзирует биологический ответ, а свет с длиной волны 730 нм индуцирует обратный переход. Переход Фх в Фхд осуществляется в течение нескольких пикосекунд с квантовым выходом 0,5.

Вследствие внутримолекулярного переноса протона и конформационных переходов молекулы фототрансформация Фх → Фхд сопровождается регенерацией электрического потенциала (это осуществляется не только *in vivo*, но и *in vitro*). Одним из проявлений такой активности является экстракт Тананда, притягивание проростков к отрицательно заряженной поверхности при освещении красным светом. Возможность выделения фитохрома и его свойства позволяют использовать его в биоэлектрических фотопреобразователях.

Рассматривается возможность использования и других оптически активных молекул в качестве высокочувствительных сенсоров, так, в частности стенторин-фоточувствительный белок простейших *Stentor* и люцеферин-люцеферазную систему светлячков и светящихся бактерий.

Как отмечалось, информация, регистрируемая биодатчиками, поступает в преобразователь. В следующем разделе рассмотрим принципы функционирования некоторых типов преобразователей.

Принципы функционирования преобразователей, использующихся в биосенсорах

Потенциометрические полупроводниковые преобразователи

В биосенсорах используются преобразователи различных типов: оптические, акустические, кондуктометрические, колориметрические и электрохимические (рис. 180). Подбор преобразователя осуществляется на основе особенностей тех реакций, которые используются в биодатчике и подобрать единый преобразователь для всех случаев невозможно. Чаще всего используются потенциометрические полупроводниковые преобразователи.

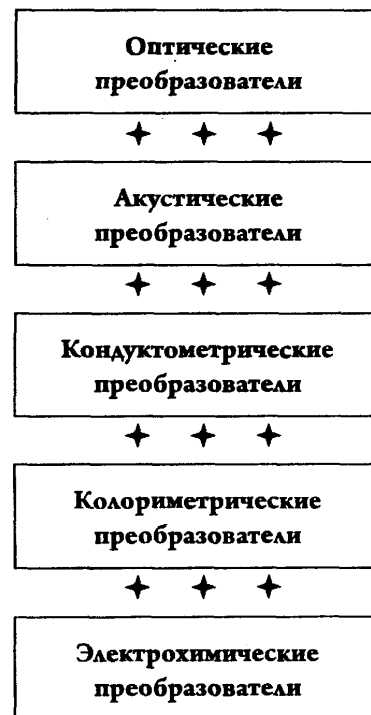


Рис. 180. Основные типы преобразователей, которые используются в биосенсорах.

Из электрохимических преобразователей, использующихся в биосенсорах, наиболее широкое распространение получили потенциометрические полупроводниковые преобразователи, в том числе и ионселективные полевые транзисторы (ИСПТ). Эти преобразователи имеют ряд преимуществ перед другими преобразователями и, прежде всего, миниатюрность, возможность формирования матрицы-носителя для биологических веществ, возможность совмещать в одном датчике и биосенсор и систему обработки результатов. Полевые транзисторы позволяют определять не только концентрацию ионов K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Na^+ , H^+ и др., но и поверхностный заряд, редокс-потенциал биохимических систем. Возможности регистрации изменения поверхностного заряда позволяют осуществлять прямое тестирование многих реакций биосенсоров, сопровождающихся изменением зарядов, таких как взаимодействие антител с антигеном и другие. Впервые ИСПТ был описан в 1972 г. для измерения ионных потоков в мембранах нервных клеток. Ионселективный полевой транзистор – это прибор, сочетающий химическую чувствительность стеклянного электрода со свойствами полевого транзистора, обычно использующегося в микроэлектронике и характеризующегося высоким отношением входного сопротивления к выходному.

Уравнение, описывающее работу ИСПТ, составляют из учета потенциалов, возникающих в электрической цепи. Общее выражение для тока ИСПТ, который находится в растворе, будет равно (формулы 1, 2).

Уравнения 1, 2 описывают вольтамперные характеристики ИСПТ, не отражая механизмов ионной селективности. Основным следствием из уравнений является зависимость I_c (ток стока) от потенциала на границе электролит-мембрана φ , который зависит от рН, т. е. $\varphi = f(\text{pH})$ и это позволяет рассматривать ИСПТ как потенциометрический преобразователь, регистрирующий концентрацию протонов в растворе.

На границе мембрана-раствор в присутствии ионов в растворе устанавливается потенциал, который описывается уравнением Нернста: (формула 3).

Предполагается, что активность ионов в мембранах высока и постоянна. Если подставить это выражение в уравнение (1) и (2), то получим зависимость тока транзистора от изменения активности иона в растворе (формула 3).

Величина RT/zF определяет угол наклона зависимости φ от $\ln a$ и при 25 °С для одnorядных ионов равна 59 мВ/lnа.

Теория рН чувствительных ИСПТ, к которым относится большинство используемых в настоящее время транзисторов, достаточно хорошо разработана и с ней можно познакомиться в работах [Bergveld P., Sibbald A.].

Первый ИСПТ, содержал мембрану из SiO_2 , которая обеспечивала чувствительность к рН. Однако, в дальнейшем от использования SiO_2 в качестве мембраны отказались, так как она обладала низкой селективностью, быстрой гидратацией в водных растворах

$$I_c = a (V_3 - V_n - E_c - \varphi_0 - V_c/2) - V_c/2) V_c, V_c < V_c^H \quad (1)$$

$$I_c = a/2 (V_3 - V_n - E_c - \varphi_0)^2, V_c < V_c^H \quad (2)$$

где V_3 – потенциал затвора, V_n – новое значение порогового потенциала, учитывающее разность работ выхода металл-электролит, электролит-мембрана, мембрана-полупроводник, E_c – потенциал, возникающий на границе электрод сравнения-раствор, φ – потенциал, возникающий между раствором и поверхностью мембраны, V_c – потенциал стока, V_c^H – потенциал стока в режиме насыщения.

$$\varphi = \varphi_0 - RT/zF \ln a \quad (3)$$

где R, F – константа газовая и константа Фарадея, T – температура, z – валентность ионов, активность ионов в растворе.

Bergveld P., Sibbald A. Comprehensive analytical chemistry Eds Svehla G., Elsevier Sci. Publ., 1988, 23, 188 p.

Bergveld P. Biosensors, 1986, 2, P. 15-33].

El'sraya A. V., Strikha V.I." Stud. Biophys" 1989, 132, N1/2, P. 83-92.

Ельская А. В., Паламарчук В. И., Сандровский А.К. и др. // Электрохимия, 1989, 5, 674-679.

Anzai J., Leo S., Osa T. //Chem. And Pharm. Bull., 1989, 37, 12, 3320-3322.

и потерей изолирующих свойств. В настоящее время часто используют мембраны из Si_3N_4 и Ta_2O_5 , которые обладают чувствительностью 52-58 мВ/рН, временем ответа около секунды, имеют низкий дрейф.

Иммобилизация биоматериала на транзисторах

В настоящее время ведутся интенсивные разработки по иммобилизации биоматериала на затворном диэлектрике ИСПТ.

Иммуноглобулин G (IgG) человека (используется в качестве антигена) ковалентно пришивали глютаровым альдегидом к диэлектрику – оксиду кремния, который предварительно обрабатывали γ -аминопропилэтоксисиланом (он содержит свободные аминогруппы). Количество иммобилизованного белка при таком связывании составляло 0,2-0,4 нг/мл. IgG сохранял функциональную активность в течение 3 недель при 4 °С и выдерживал 6 циклов связывания с антителами. Эта работа была проведена El'sraya A.V. et al., 1989. Аналогичная процедура была использована для иммобилизации глюкозооксидазы на ИСПТ [Ельская А.В. и др., 1989]. Для иммобилизации α -химотрипсина на затворный диэлектрик формировали мембрану из стеариновой кислоты [Anzai J. et al., 1989]. С ней ковалентно связывали фермент, используя глютаровый альдегид. Такой биосенсор обладал чувствительностью к субстрату на уровне 10^{-4} М.

Светоадресуемый потенциометрический сенсор

Калифорнийская компания Molecular Devised Card предложила в 1988 г. новый вариант полупроводникового потенциометрического прибора. Этот преобразователь был назван – light adressable potentiometric sensor – LAPS. Он является дальнейшим развитием идеи управления параметрами полупроводника за счет внешнего электрического поля.

LAPS и ИСПТ являются полупроводниковыми преобразователями, которые регистрируют изменение поверхностного потенциала благодаря влиянию внешнего электрического поля. Главной особенностью LAPS, отличающей его от ИСПТ, является возможность считывать электрический (химический) сигнал с любой точки преобразователя с помощью световой адресации.

В качестве преобразователя используется тонкая кремниевая пластинка, которая контактирует с электролитом. Кремний от электролита отделен диэлектриком – оксинитридом кремния толщиной 100 нм. Через диэлектрик течет постоянный ток порядка единицы нА/см². Для работы преобразователя подается через контролирующий электрод потенциал смещения Ψ . Контролирующий электрод в данном случае является и электродом сравнения. В полупроводнике возникает переменный фототок при освещении его импульсным светом. Освещение различных точек преобразователя позволяет измерять переменный фототок поочередно в каждой из

<p>Полупроводники – вещества у которых электропроводность увеличивается с ростом температуры, при низких температурах электропроводность у них мала. Полупроводники характеризуются высокой чувствительностью электропроводности к содержанию у них примесей и дефектов в кристаллах. Благодаря этим особенностям полупроводники находят широкое применение в технике и в частности в биосенсорах.</p> <p>Диэлектрик – вещество, которое обладает низкой электропроводностью, изолятор (стекло, фосфор, сера и др).</p>

них и независимо регистрировать происходящие там электрохимические процессы.

Так как диэлектрическая мембрана из Si_3N_4 обладает рН чувствительностью, то в растворах с различным рН на границе электролит-мембрана образуются различные по величине потенциалы, которые приводят к сдвигу кривых фототока вдоль оси потенциала. Кроме этого, преобразователь может регистрировать окислительно-восстановительный потенциал и трансмембранный потенциал мембраны, которая размещена на поверхности оксинитрида кремния.

Для измерения окислительно-восстановительного потенциала на поверхность диэлектрика наносятся небольшого размера золотые площадки. Когда в электролите содержится редокс-пара, например, ферри-ферроцианид, потенциал золотого контакта определяется соотношением их концентраций по закону Нернста. В таком случае изменение фототока будет обусловлено изменением окислительно-восстановительного потенциала соединений, присутствующих в электролите.

Преобразователи LAPS используются для определения ферментативной активности, например, в иммуноферментном анализе. Подбор ферментов в этом случае осуществляется так, чтобы результатом реакции являлось изменение рН или изменение редокс-потенциала.

На основе LAPS был создан биохимический биосенсор для определения следовых количеств ДНК (10^{-12} г/мл) [McKnabb S. et al., 1989]. Используя LAPS, можно добиться высокой степени миниатюризации биосенсоров, позволяющих оценивать содержание лекарственных веществ, гормонов и патогенов.

Амперометрические преобразователи

Принцип работы амперометрического преобразователя иммуноферментного электрода показан на рис. 181. Для примера рассмотрим вариант конкурентного иммуноферментного анализа. Для определения концентрации антигена, антитела к этому антигену иммобилизуют с мембраной-носителем. При наличии антигенов в растворе они будут связываться с антигенами на мембране. Для определения антигенов соответствующие антигены метят ферментом, например каталазой. А так как в исследуемом растворе будут присутствовать как меченные каталазой, так и не меченые (определяемые) антигены, то они будут связываться с антителами на мембране в определенном соотношении, которое зависит от соотношений концентраций меченых и немеченых антигенов. Так как каталаза разрушает H_2O_2 с образованием H_2O и O_2 , то концентрация O_2 легко определяется электродом Кларка, что позволяет определить количество антигенов в растворе.

McKnabb S., Rupp R., Tedsco J.L.
//Biotechnology, 1989, 7, 343-347.

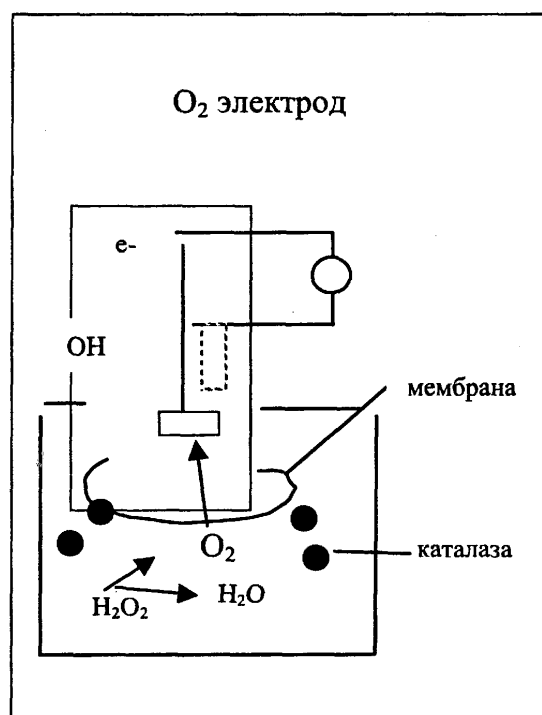


Рис. 181. Принцип амперометрического иммуноферментного сенсора на основе кислородного электрода. Каталаза расщепляет перекись водорода с образованием кислорода и воды, концентрация кислорода регистрируется электродом Кларка.

Оптические преобразатели внутреннего отражения

Спектроскопия внутреннего отражения основана на использовании системы, состоящей из двух прозрачных сред с различными коэффициентами преломления n_1 и n_2 . Свет, падая на границу раздела сред, из среды n_1 при некотором критическом угле падения θ испытывает полное внутреннее отражение (ПВО). При ПВО часть электромагнитных волн проникает в среду с n_2 на глубину в несколько сотен нанометров, и вновь возвращается в среду n_1 . Это явление называется генерацией исчезающих волн (ИВ) (evanescent waves) и используется в биосенсорах.

Рассмотрим особенности использования ИВ в биосенсорах. В световодах (световых волокнах) ПВО обеспечивается структурой волокна. Свет, поступающий в оптическое волокно с одного торца, после многократных отражений выходит через противоположный торец. Этот луч может быть использован для тестирования химических реакций, которые сопровождаются флуоресценцией, изменением поглощения или рассеяния. Если на поверхность световода нанесена поглощающая среда, то она будет приводить к ослаблению интенсивности света, распространяющегося внутри волокна. Это ослабление определяется числом полных внутренних отражений, а также свойствами внешней среды, которая граничит со световодом и имеет коэффициент преломления n_2 . Если на поверхности световода расположить антитела или антигены, которые содержат флуоресцентную метку (благодаря специальному мечению), то эффект ИВ позволяет возбудить флуоресценцию и при ее дальнейшей регистрации оценить количество связанной метки, а это означает и количество антител или антигенов (в зависимости от того, где локализована метка). На этом основано использование оптических иммуносенсоров.

Иммобилизация антител или антигенов на поверхности световода имеет два важных преимущества. Во-первых, ИВ возникают в ограниченной части пространства, непосредственно примыкающей к световоду, следовательно, интенсивность отраженного света определяется средой, содержащей иммунореагенты. Во-вторых, антитела, иммобилизованные на поверхности световода, превращают его в систему, которая одновременно производит связывание с антигенами, усиление и детектирование сигнала, вызванного образованием комплекса антитело-антиген. При этом иммунологическая реакция индуцируется простым погружением световода в исследуемый раствор. Важно то, что молекулы антигенов, которые находятся вне зоны ИВ, не влияют на величину регистрируемого сигнала. Эта особенность позволяет исключить отмывку несвязанных антигенов, что приходится делать при использовании гетеротрофного иммунологического анализа.

В настоящее время используются три варианта измерений с использованием исчезающих волн (рис. 182).

Остановившись на аналитических возможностях этого метода необходимо отметить, что он позволяет определять концентрации

Использование ИВ для возбуждения флуоресцентной метки и регистрации флуоресценции под прямым углом к возбуждающему свету.



Регистрация флуоресцентного сигнала (возбуждение без применения ИВ), испытывающего полное внутреннее отражение, с использованием эффекта ИВ.



Комбинированный вариант.

Рис. 182. Варианты измерений, при которых используются исчезающие волны.

IgG человека в концентрации 10^{-7} М, время проведения одного анализа занимает не более 20 мин.

При выборе световодов предпочтение отдают цилиндрическим кварцевым оптическим волокнам диаметром 1 мм, имеющим активную зону с иммобилизованным иммунореагентом около 50 мм. В качестве источника света применяется галогенная лампа, а измерение интенсивности светового сигнала производится кремниевым фотодиодом.

Биосенсоры, основанные на использовании в качестве преобразователя исчезающих волн, находят применение в клиническом анализе. Так, на основе этого метода можно осуществлять определение ген-содержащего белка ферритина в концентрации 10^{-11} М, лидокаина (антиаритмический препарат), который определяется в концентрации 1 мкг/мл. Биосенсор на основе ИВ является высокочувствительным, и такой сенсор может быть быстро подготовлен для анализа. Этот метод может использоваться в пищевой и медицинской промышленности, и при оценке состояния окружающей среды.

Преимущества биосенсоров перед другими аналитическими устройствами и области их применения

Биосенсоры как аналитические устройства имеют ряд преимуществ по сравнению с другими аналитическими приборами:

1. Высокая специфичность анализа. Это позволяет исключить предварительную подготовку исследуемых образцов, направленную на выделение и очистку исследуемых веществ.

2. Возможность анализировать малые объемы исследуемых образцов.

3. Высокая скорость проведения анализов (несколько сек или мин).

4. Возможность контролировать результаты анализа по принципу «обратной связи» благодаря микропроцессорам, которые совмещены с биосенсором.

5. Простота в проведении анализов, что снижает требования к высококвалифицированной подготовке персонала.

Интерес к биосенсорам интенсивно растет и с 1974 г., когда был разработан первый коммерческий биосенсор, только к 1985 г., т. е. за первые 10 лет разработок было опубликовано 213 статей и выдано 119 патентов в этой области. В настоящее время издаются специализированные журналы по биосенсорике.

Биосенсорные устройства используются в различных отраслях науки и промышленности, и области их применения будут расширяться (табл. 64). Оценка банка биосенсоров затруднена из-за коммерческого характера этой сферы. Однако даже имеющиеся неполные сведения убедительно свидетельствуют о перспективности развития этого направления биотехнологии.

Ферритин – обеспечивает депонирование железа в селезенке.

Область применения	Вложение средств, млн. долларов
Медицина	200
Ветеринария и сельское хозяйство	105
Охрана окружающей среды	67
Мониторинг промышленных процессов	59

Табл. 64. Области применения биосенсоров по данным на 1990 г.

Часть II

Промышленные аспекты биотехнологии

Промышленные аспекты биотехнологии строятся на фундаментальных знаниях свойств биологических систем. Однако это не простой перенос знаний из лабораторий в заводской цех, скорее – это активная адаптация технологий к новым условиям эксплуатации. Задача эта достаточно сложная. Именно неумением решать эту задачу и объясняется огромный разрыв между фундаментальными разработками ученых и развитием промышленности. Пожалуй, центральной проблемой адаптации лабораторных исследований к промышленным масштабам является проблема масштабирования. Масштабирование – это не механическое увеличение объемов или размеров установки, это иное формирование новых принципов регуляции, контроля и анализа. Проблемы адаптации лабораторных исследований всегда решаются для конкретных условий и требуют конкретных решений.

Основной целью любой из биологических технологий является получение максимально возможного целевого продукта с заданным составом. Продуктивность биологического объекта определяется его генетической системой, а реализация этих возможностей зависит от условий манипуляции, культивирования и управления процессами, или другими словами, если особенности биологического объекта определяют его потенциальные продуктивные возможности, то производственные возможности обеспечивают их реализацию. В этой части книги мы познакомимся с наиболее общими технологическими этапами производства.

Управление технологическими процессами является той производственной сферой, которая позволяет решать глобальные задачи современности, используя для этого фундаментальные знания молекулярно-биологических и физиологических процессов.

Каждый технологический процесс имеет свои особенности, и познакомиться с некоторыми из них в рамках одного учебного курса невозможно. Однако для всех промышленных технологий можно выделить наиболее общие этапы.

В этой части мы и познакомимся с наиболее общими характеристиками основных этапов биологических технологий: подготовительным, производственным и завершающим этапами производства. Основная задача этой части книги показать, что для промышленной биотехнологии необходимо выделять общие и частные вопросы. Решение любого частного вопроса становится более эффективным, да и вообще возможным, если Вы правильно определили его место в последовательности производственных процедур.

Глава I

Подготовительный этап биотехнологических производств

Задачи подготовительного этапа

Подготовительный этап биотехнологического процесса включает в себя (рис. 183):

I. Постановку задачи, выбор стратегии ее решения, подготовку технической документации и технических инструкций.

II. Подбор, получение или приобретение продуцентов.

III. Подбор, производство или приобретение биореакторов или промышленных установок.

IV. Приготовление питательных сред и подготовка условий культивирования.

V. Нарращивание маточных культур или продуцентов.

VI. Запуск производства, т.е. переход к следующему производственному этапу.

Постановка задачи и выбор стратегии ее решения

Оценка критериев продуктивности биотехнологического процесса

При постановке задачи получения целевого продукта необходимо исходить не только из возможностей биологических систем производить тот или иной продукт, но и из потенциальных затрат на производство этого продукта различными способами, т.е. из его рентабельности. Вторым условием успешности постановки биотехнологической задачи является корректность ее постановки.

Постановка задачи не может быть удачной без всестороннего и глубокого анализа состояния вопроса.

Итак, при постановке задачи необходимо: глубокое знание вопроса (удачный выбор), знание потенциальных продуцентов (корректность постановки) и предварительная оценка рентабельности возможного производства, которая зависит от продуктивности используемой системы.

Продуктивность производственной системы характеризует количество продукта, которое получается на единицу объема биореактора в единицу времени из потребляемого субстрата (рис. 184).

Продуктивность биотехнологической системы зависит от многих факторов, основными из которых являются: активность продуцента; коэффициенты выхода продукта из потребляемого субстрата и количество активной биомассы в биореакторе (т.е. количество биомассы, которое участвует в образовании продукта, рис. 185).

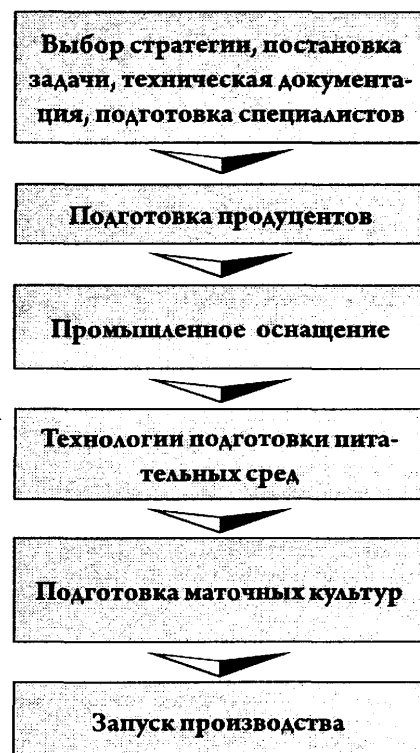


Рис. 183. Основные задачи подготовительного этапа биотехнологических производств.

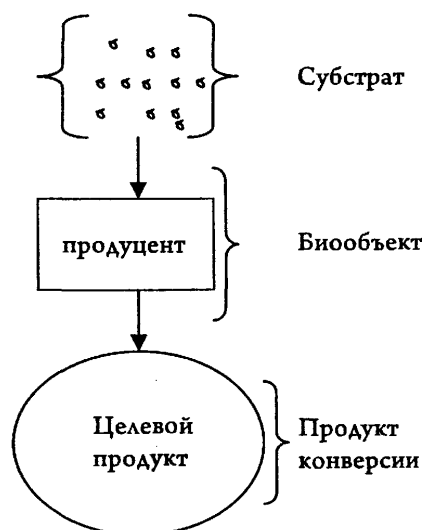


Рис. 184. Схема биотехнологического производства целевого продукта. Целевой продукт является результатом превращения (конверсии) субстрата биологическими системами.

Обобщенная зависимость продуктивности Π (формула 1) позволяет решать вопрос повышения продуктивности данного процесса. Так, если мы попытаемся повысить продуктивность за счет увеличения количества продуцента в реакторе, то нам придется решать вопрос интенсификации массопереноса, если мы намерены увеличить продуктивность за счет увеличения скорости потребления субстрата, то нам необходимо дополнительно исследовать механизмы регуляции потребления продукта клетками продуцента.

Выход продукта определяется как количество получаемого продукта из определенного количества субстрата ($Y_{P/S}$). Или иными словами, это – коэффициент эффективности использования субстрата при получении желаемого (целевого) продукта. В некоторых случаях этот коэффициент называют экономическим коэффициентом конверсии.

Увеличение выхода продукта позволяет снизить себестоимость целевого продукта, так как в структуре себестоимости получаемого продукта значительную часть составляет цена субстрата (сырья).

Необходимо отметить, что даже незначительное увеличение коэффициента $Y_{P/S}$ может привести к значительному повышению продуктивности процесса (см. уравнение 1).

Максимальное значение выхода продукта V_{max} у разных видов и штаммов продуцента различается. Так как для биологических систем характерен принцип функционирования альтернативных путей метаболизма, то в зависимости от выбора путей метаболизма выход целевого продукта будет различен. Показано, что его вариабельность может быть значительна (от 0,47 до 0,69 в случае получения лизина при использовании *Brevibacterium flavum* в качестве продуцента).

Величина выхода продукта определяется экспериментально ($Y_{эксп}$) или теоретически ($Y_{теор}$). $Y_{теор}$ определяется на основе баланса массы и энергии (формула 2). Однако на практике $Y_{теор}$ не достижимо, так как по законам термодинамики вся свободная энергия не может перейти полностью в продукт.

Экспериментальное значение выхода продукта используется для контроля и управления процессом биосинтеза. При оценке эффективности разных биосинтетических процессов используют отношение $Y_{теор}/Y_{эксп} = \eta$, которое обозначают как энергетический выход процесса биосинтеза.

На выход продукта влияют организационные факторы (тип биореактора, квалификация специалистов), генетические и биохимические особенности продуцента.

На подготовительном этапе проводят анализ выхода продукта и продуктивность выбранного процесса.

Важным показателем в оценке эффективности производства являются и такие показатели как удельные энергозатраты и непродуктивные затраты субстрата и энергии в процессах биоконверсии.

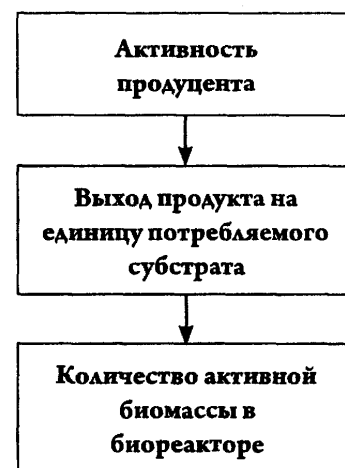


Рис. 185. Основные факторы, которые определяют продуктивность биотехнологического производства.

Конверсия – от латинского – изменение, превращение.

$$\Pi = q_s \cdot Y_{P/S} \cdot X \text{ [г / (л·ч)]} \quad (1)$$

где Π – продуктивность;
 $Y_{P/S}$ – выход продукта;
 X – концентрация продуцента в биореакторе.

$$Y_{P/S_{теор}} = \frac{\delta_s \cdot Y_s}{\delta_p \cdot Y_p}$$

(2)

где Y_s , Y_p – степень восстановления продукта или субстрата;
 δ_s , δ_p – массовая доля углерода в субстрате и продукте, соответственно.

Удельные энергозатраты

Энергозатраты в процессе производства вносят значительный вклад в рентабельность и себестоимость целевого продукта. Они зависят от целого ряда факторов, которые необходимо учитывать в каждом конкретном случае. Наибольших затрат требует эксплуатация биореакторов, и это определяется типом реактора, сбором и очисткой целевого продукта.

Наряду с этим в производстве имеют место и так называемые непродуктивные затраты, т.е. это те затраты, которые не связаны с ростом клеточной биомассы и получением целевого продукта.

В настоящее время существуют различные методы определения непродуктивных затрат. Как правило, они основаны на определении газобалансовым методом количества кислорода, которое используется на потребление небольшого количества углеродного субстрата. Отношение экспериментально определяемого окисления к полному химическому окислению данного субстрата и является коэффициентом непродуктивных затрат (β). В общем виде этот коэффициент выражается уравнением (3). Для оптимизации непродуктивных затрат в биотехнологическом процессе необходимо знать, какие биохимические процессы лежат в основе непродуктивного использования субстрата и энергии в жизнедеятельности продуцентов.

Решение задач рентабельности и эффективности биотехнологического процесса на этапе его подготовки является необходимым в формировании выбора технологических условий производства. При необходимости осуществляется экспериментальная оценка необходимых параметров на пилотных установках.

Конечно, выбор стратегии решения задачи будет различным в зависимости от конкретных обстоятельств. Остановившись на наиболее общих особенностях этого, необходимо отметить, что формирование ее занимает достаточно много времени и требует составления краткосрочного и длительного прогноза на альтернативных принципах. Или, другими словами, необходимо моделировать различные варианты решения одной и той же задачи и выбирать оптимальный из возможных.

В зависимости от типа задачи и будет определяться характер и требования к технической документации.

Техническая документация регламентирует последовательность технологического процесса, условия его осуществления и она должна обеспечивать получение целевого продукта по утвержденным требованиям, соблюдение безопасности в отношении внешней среды и работающего персонала.

Учитывая достаточно высокую степень коммерциализации биотехнологии, остановимся кратко на патентовании и охранной стороне технической документации в биотехнологии.

Энергетический выход биотехнологического процесса – это максимально возможное приближение выхода продукта к теоретически ожидаемому. Чем сложнее система биоконверсии, тем ниже η , и наоборот.

$$\beta = L - \frac{Y_{\text{эксп}}}{Y_{\text{теор}}} \leq 1$$

(3)

Себестоимость продукции - это полная стоимость текущих затрат на производство и реализацию продукции. Отношение чистого дохода (прибыли) к себестоимости продукции отражает **рентабельность** производства.

Техническая документация – это инструкция, технические условия, регламенты, которые определяют последовательность и условия технологического процесса и условия соблюдения техники безопасности

Патентование в биотехнологии

Как уже отмечалось, одной из основных задач биотехнологии является получение целевого продукта. Так как биотехнологические продукты являются коммерческими продуктами, то компании их производящие заинтересованы в защите от конкурирующих фирм. Для решения вопросов защиты государство, которое заинтересовано в инновациях, предоставляет ученым-разработчикам исключительные права, так называемые права на интеллектуальную собственность. Интеллектуальная собственность включает права на коммерческие секреты, авторские разработки, товарные знаки и изобретения. Так, в коммерческие секреты входит конфиденциальная информация о специфических особенностях способа производства и состава готовых продуктов. Опубликованные в открытой печати научные работы тоже защищаются от несанкционированного использования авторским правом. Товары – это слова или символы, которые обеспечивают идентификацию определенного продукта или способа производства.

Патент – это наиболее признанная форма охраны интеллектуальной собственности. Патент обеспечивает исключительные права патентообладателя (патентовладельца) на коммерческое использование изобретения. Наряду с этим, патент – это общедоступный документ, содержащий подробное описание изобретения, что должно позволить третьим лицам решать вопрос о приобретении этого патента.

Особенности патентования изобретений несколько различны в разных странах. С интенсивным развитием биотехнологии предмет патентования сильно изменился, и в настоящее время идут обсуждения о целесообразности и этичности патентования живых организмов и новых штаммов.

Среди основных категорий патентов выделяют патенты на продукты и патенты на способы. К продуктам относят гомогенные вещества, композиции и различные устройства. К способам – методы получения продуктов, действия и операции или способы использования продуктов.

Для того чтобы какой-либо способ или продукт можно было запатентовать, он должен удовлетворять 4 основным требованиям (рис. 186).

Научные теории, математические методы, терапевтические методы лечения не являются патентоспособными.

Патент не может быть выдан на природные продукты. Однако компании обходят эти ограничения, патентуя, как правило, способы очистки природных продуктов.

Необходимо учитывать, что получение патента еще не означает, что можно производить и продавать запатентованный продукт. До выхода на рынок продукт должен пройти сертификацию, т.е. удовлетворять требованиям качества и безвредности согласно существующему законодательству.

Эдисон, который владел более чем тысячей патентов, говорил, что «каждый патент – это приглашение к судебному процессу».

Патент на рекомбинантный эритропоэтин только в 1996 году принес доход более 1 млрд. долларов.

Эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов и используется для предупреждения анемии (низкое содержание гемоглобина в крови) у больных с почечной недостаточностью, которые подвергаются диализу.

**Новизна, т. е. изобретение
нигде не запатентовано**

* * *

**Изобретательский уровень.
Не должно быть очевидным в
данной области**

* * *

**Полезность устройства,
способа, вещества**

* * *

**Содержать описание,
достаточное для применения
специалистами**

Рис. 186. Основные требования к изобретению.

Контроль соблюдения вытекающих из патента прав возлагается на патентовладельца. Это означает, что против любого лица, нарушившего право, может быть возбуждено судебное дело. По вопросу патентования генетически модифицированных продуктов долго велись споры. Однако в 1980 г. Чакрабартти был выдан первый патент на генетически модифицированные бактерии. С 1980 г. выдаются патенты США на полноразмерные гены. В вопросах патентования биотехнологических продуктов много проблем и спорных моментов. В частности, патентование частично секвенированных последовательностей кДНК человека, многоклеточных организмов и фундаментальных исследований.

Патентование стимулирует инновации и обеспечивает права изобретателей на придуманные ими технические решения. Наряду с этим, существует мнение, что патентование сдерживает научные исследования и влияет на развитие фундаментальной науки.

Итак, подготовительный этап биотехнологического процесса начинается с постановки задачи, выбора стратегии ее решения, подготовки или приобретения технической документации и рабочих инструкций.

Подбор, получение или приобретение продуцентов

Продуценты подбираются исходя из характеристики целевого продукта. Продуценты должны отвечать ряду требований (см. главу «объекты биотехнологии» I части): обеспечивать высокий и стабильный выход целевого продукта, легко культивироваться (не требовательны к условиям культивирования), оставаться стабильными в процессе длительного хранения (рис. 187).

В настоящее время, существуют многочисленные коллекции клеточных и генетических банков, основной задачей которых является создание новых и сохранение уже имеющихся биологических объектов. Правда, учитывая все те же особенности коммерциализации биотехнологии, все труднее приобретать вновь созданные объекты биотехнологии, в частности трансформированные клетки бактерий и т.д. Эта особенность только подчеркивает, что основной, «рабочей лошадкой» любого биотехнологического процесса является биологический объект.

Особенности получения новых продуцентов мы рассмотрели в первой части настоящей книги.

Подбор, производство или приобретение биореакторов или промышленных установок

Краткая характеристика некоторых биореакторов уже была рассмотрена в первой части книги. В настоящее время создано целое направление – инженерная биотехнология, которая занимается разработкой и изготовлением новых типов биореакторов. Пожалуй, наиболее перспективными являются биореакторы, обеспечивающие непрерывный процесс культивирования

Коммерческие секреты – конфиденциальная информация о специфических особенностях способа производства и состава продуктов, которые компания хочет сохранить в тайне и оградить от использования третьими лицами.

Высокий и стабильный выход целевого продукта

Невысокая стоимость сред и простота культивирования

Сохранение характеристик продуцента при длительном культивировании

Рис. 187. Основные требования к продуцентам, которые используются в биотехнологии.

продуцентов. Такие биореакторы должны быть оснащены системой автоматического управления, системой поддержания условий культивирования и системой автоматического сбора целевого продукта и продуцентов.

Одновременное решение этого сложного комплекса задач требует поиска новых технических решений, что и должно входить в задачу инженерной биотехнологии.

В настоящее время интенсивно развивается разработка новых типов биореакторов, их классификация рассмотрена нами в первой части книги. Техническое оснащение биотехнологического производства базируется на общих принципах химической технологии. Однако для биологических технологий характерен целый ряд особенностей, которые необходимо учитывать при выборе и конструировании биореакторов (рис. 188).

Естественно, выбор биореактора осуществляется исходя из решаемой задачи. Для исследовательских целей выбирается аппарат с универсальной системой перемешивания, в то время как для промышленных целей целесообразно выбирать специализированную систему перемешивания. Важным критерием выбора биореактора является система пеногашения или пенорегулирования.

После предварительного выбора типа биореактора анализируют его особенности с учетом характеристики продуцента, проводят расчеты механической прочности приводов, поверхностей теплопередачи, производительности сечений технологических подводов/отводов и др. характеристик.

Достаточно сложной задачей является идентификация условий аэрации и перемешивания и поэтому приходится проводить предварительные промышленные эксперименты. Именно этим объясняется разработка новых щадящих режимов перемешивания и необходимо подбирать свою систему для конкретного продуцента.

Этап подбора и конструирования биореактора является очень важным и ответственным, поэтому прежде чем принять окончательное решение нужно провести все необходимые расчеты и предварительные испытания.

Приготовление питательных сред и подготовка условий культивирования

Требования к растворимости

Некоторые характеристики и основные требования к питательным средам мы уже рассматривали в первой части книги.

Большинство широко используемых питательных сред можно приобрести у фирм производителей. Хорошо зарекомендовали себя так называемые сухие питательные среды. Порошкообразные среды дешевле жидких, они дольше, чем жидкие, сохраняют свою стабильность при длительном хранении в обычных условиях, с ними меньше проблем при транспортировке. Изготовители сред

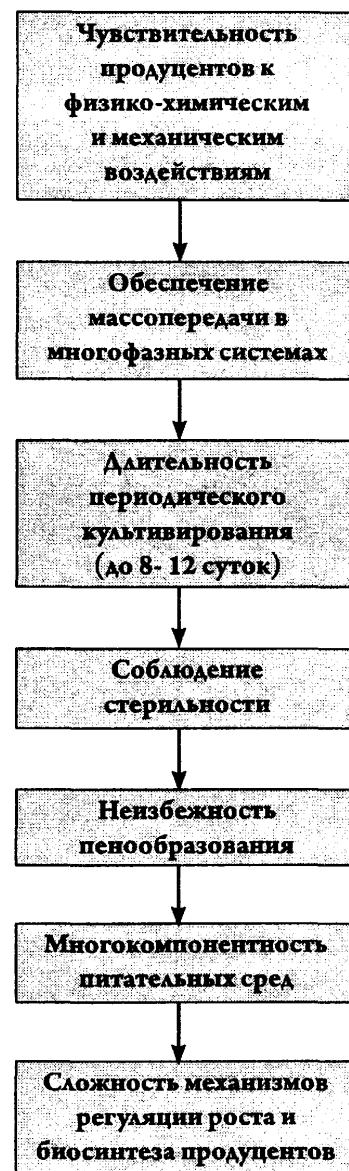


Рис. 188. Отличительные (от химических процессов) особенности биотехнологических процессов ферментации.

Маточный раствор – это раствор, в котором все компоненты содержатся в концентрации в 10 или в 100 раз большей, чем в окончательном рабочем растворе. Для получения рабочего раствора из маточного его разводят соответственно в 10 или в 100 раз. Это делается для удобства хранения.

указывают состав и инструкцию приготовления сред, что упрощает процедуры их приготовления.

Хорошие питательные среды, кроме обеспечения оптимального роста продуцентов, должны: обладать хорошей растворимостью компонентов, стабильностью и стерильностью и быть нетоксичными. Все питательные среды готовятся на воде, и она расходуется в наибольших количествах. Поэтому к воде предъявляют особые требования. При подготовке воды используют двойную дистилляцию, очистку на ионообменных смолах с последующей дистилляцией или применяют системы обратного осмоса.

При промышленном культивировании требуются достаточно большие объемы среды, и ее приготовление может превратиться в задачу достаточно трудную для исполнения. В таких случаях готовят так называемый маточный раствор. Раствор среды в 10 или 100 раз концентрированней, чем окончательный рабочий раствор. После этого маточный раствор разводят до необходимой концентрации компонентов перед применением.

При приготовлении таких маточных растворов и возникает проблема плохой растворимости некоторых компонентов питательных сред и, прежде всего фосфата кальция, особенно в щелочных растворах. В связи с этим при приготовлении сред растворы фосфатов не смешивают с кальцием до тех пор, пока они полностью не растворятся. Если необходимо растворять тирозин или цистин (которые растворяются хуже других аминокислот), то их предварительно растворяют в 0,1 н HCl, а после этого нейтрализуют раствор.

Контроль токсичности питательных сред

Наличие токсических компонентов в питательных средах в отношении продуцентов недопустимо. Для устранения этого необходимо иметь сертификат качества на каждую партию питательной среды и всех компонентов, использующихся при культивировании и производстве, не следует использовать лекарственные препараты и антибиотики, которые могут содержать токсические вещества.

При использовании больших партий сред, которые готовятся или модифицируются в лаборатории, необходимо дополнительно тестировать их на токсичность.

Стабильность питательных сред и их особенности

Многие компоненты питательных сред нестабильны и в процессе хранения теряют свою активность. Для того чтобы устранить это используют несколько приемов: готовят их отдельно перед использованием, тем самым сокращают сроки хранения или хранят их в условиях замедляющих процесс деградации (низкая температура).

Так, нистатин, глутамин и др. компоненты – наиболее лабильные компоненты питательной среды. Поэтому их готовят в

Осмоз (от греческого – толчек, давление), односторонняя диффузия растворителя через полупроницаемую мембрану, которая отделяет раствор от чистого растворителя.

Если растворитель и раствор разделить мембраной, которая не проницаема для растворенного вещества, но проницаема для растворителя (полупроницаема), то растворитель будет проходить (диффундировать) через мембрану в раствор до тех пор, пока химический потенциал в двух отделах не выровняется. Это явление объясняется стремлением системы к термодинамическому равновесию и выравниванию концентрации вещества по обе стороны мембраны.

Обратный осмос – если к раствору приложить избыточное давление ΔP , то тогда осмос прекратится и растворитель из раствора начнет диффундировать к чистому растворителю, так как растворенные вещества не могут пройти через мембрану. Это явление называют обратным осмосом. Обратный осмос используют для концентрирования веществ и для очистки воды (ведь вода универсальный растворитель).

стерильном и концентрированном виде (маточный раствор х 100) и вносят в готовую среду перед употреблением.

Сыворотка, инсулин и другие гормоны также нестабильны, их хранят отдельно при минус 20 °С и вносят в раствор непосредственно перед использованием.

При 37 °С такие витамины как тиамин, рибофлавин и пиридоксин в течение 7-ми сут. теряют активность на 50 %, что необходимо учитывать при культивировании продуцентов.

Контроль стерильности питательных сред

Способы стерилизации мы уже рассмотрели в первой части книги. А сейчас познакомимся с контролем питательных сред на стерильность. Этот контроль необходимо проводить на подготовительном этапе технологического процесса.

Контаминацию сред на бактерии или грибы выявляют простыми методами культивирования. Образцы индикаторных сред инкубируют при 37 ° и 30 °С в течение 14 сут., и выявляют микробные осадки после прокрашивания по Граму.

Контаминацию сред микоплазмами осуществляют на специальных средах и идентифицируют их микроскопически после субкультивирования среды на агаре или используют набор красителей (см. часть 1).

Для выявления вирусов наиболее эффективной является методика полимеразной цепной реакции.

Еще одним важным этапом приготовления питательных сред является оценка их ростовых свойств.

Перед покупкой питательных сред и сыворотки необходимо испытать их способность обеспечивать необходимый рост клеток продуцентов и образование целевого продукта.

При этом необходимо учитывать, достаточна ли продолжительность испытаний – число пересадок (пассажей), количество измерений и корректность оценки образования целевого продукта.

И, наконец, после подготовки и тестирования питательных сред приступают к подготовке условий культивирования. К ним относится стерилизация и готовность к работе биореактора, помещений и вспомогательной аппаратуры.

Наращивание маточных культур

В промышленной биотехнологии «производительной силой» являются штаммы-продуценты. На подготовительном этапе подбирают штамм-продуцент, обеспечивающий получение необходимого целевого продукта.

Одним из важнейших этапов подбора продуцентов является разработка и адаптация их к питательным средам и условиям культивирования. В биотехнологии чаще всего используют дешевые питательные среды. В связи с этим необходимо помнить, что промышленные продуценты должны удовлетворять ряду строгих требований (рис. 189).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это реакция, которая обеспечивает амплификацию (синтез отдельного фрагмента ДНК) в системе *in vitro*. Использование полимеразной цепной реакции позволяет увеличить исходное количество ДНК в 10^8 раз. Это означает, что микроколичество вирусной ДНК можно увеличить до концентрации, которую легко выявить и охарактеризовать обычными методами.

Маточная культура - культура клеток, которая используется для наращивания биомассы, т.е. исходная культура, соответствующая принятым характеристикам.

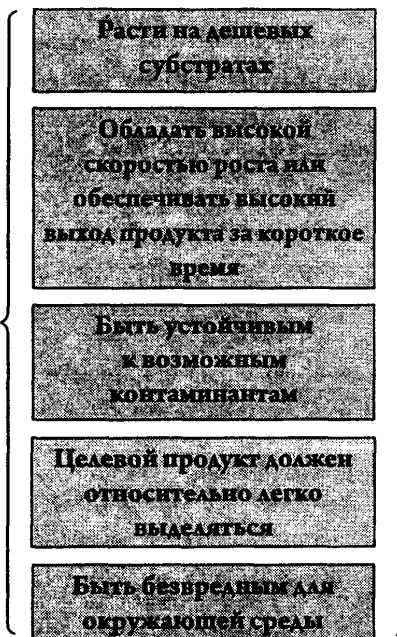


Рис. 189. Требования, предъявляемые к продуцентам.

Полученные ценные промышленные штаммы-продуценты поддерживаются в виде чистых культур в лаборатории. Для перевода чистой культуры в промышленное производство (обычно лабораторные культуры хранят на косяках питательной среды, на агаре) необходимо нарастить в достаточном количестве маточную культуру. Эта культура, которая непосредственно переносится в промышленные реакторы. На этом этапе биотехнология сталкивается с проблемой масштабирования, т.е. перехода от лабораторных масштабов к промышленным, это не простая задача и решается она в несколько этапов.

На первом этапе наращивают продуценты в колбах небольшого объема, 1-2 л, после выхода культуры на стационарную фазу их наращивают в бутылях на 10-20 л и переводят в реактор.

На каждом этапе наращивания маточной культуры контролируют интенсивность ее роста.

При оценке качества культур определяют:

1. Отсутствие контаминантов.
2. Динамику роста культуры на приготовленной среде.
3. Способность культуры образовывать целевой продукт и соответствие его стандарту, принятому для данной культуры.

Подготовленная маточная культура должна соответствовать характеристике полученного лабораторного штамма.

Получение маточной культуры в достаточных количествах позволяет обеспечить промышленный запуск производства или перейти к процессу ферментации.

Глава II

Производственный этап биотехнологического процесса

Общие требования к производственному этапу биотехнологического процесса

В этой главе мы познакомимся с общими характеристиками производственного этапа биотехнологического процесса. Рассмотрим задачи, которые необходимо решать для обеспечения этого этапа, и, наконец, некоторые особенности регуляции производственных этапов, так как эти особенности в значительной степени определяют режимы работы на этом этапе.

«Производительной силой» в любом биотехнологическом процессе является биологический объект – культура клеток, тканевая культура, трансгенный организм, комплекс молекул (мембраны) или отдельные молекулы (антитела в биосенсорах) и т.д. И естественно, эффективность, продуктивность и продолжительность функционирования будет зависеть от особенностей объекта и условий его культивирования. Производственный этап биотехнологического процесса направлен на обеспечение условий эффективного и продолжительного функционирования используемого объекта или продуцентов.

Следовательно, производственный этап – это совокупность последовательных операций от начала функционирования объекта и до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации, которые могут быть обусловлены исчерпанием питательных компонентов среды, старением или изменением характеристик объекта или какими-либо другими причинами. Для этого в процессе производства необходимо контролировать десятки физико-химических параметров среды культивирования (рис. 190). В зависимости от задач производства количество контролируемых параметров может сильно варьировать. Все необходимые параметры измеряются автоматически и в динамике. В случае отклонения от необходимых характеристик проводится их коррекция: внесением необходимых ингредиентов или, напротив, их удалением.

Более сложным является динамичный контроль в процессе производства состояния биологических объектов. Многие из этих параметров являются расчетными. Чаще всего оценивают интегральные характеристики биообъектов (рис. 191). Для контроля промышленных процессов используют компьютеры и микропроцессоры. В идеале вся система контроля и управления производством должна быть автоматизирована.

Исходя из этого основные задачи, которые необходимо решать биотехнологу на этом этапе производства, сводятся к обеспечению максимально благоприятных условий функционирования биообъекта (максимальное получение целевого продукта при минимальных затратах).

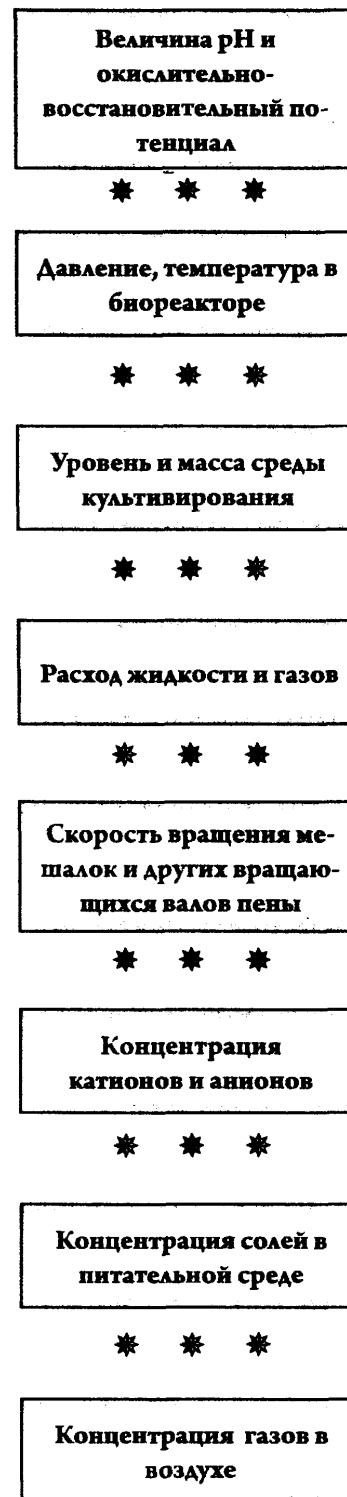


Рис. 190. Некоторые параметры среды культивирования, которые контролируются в процессе производства.

При этом мы должны понимать, что это возможно только тогда, когда мы в совершенстве знаем биологию биообъекта, его «требования» к условиям среды, его потенциальные адаптивные возможности и генетический потенциал.

Основные задачи, которые необходимо решать на производственном этапе биотехнологического процесса

Поддержание и контроль асептических условий

Все задачи, которые приходится решать на производственном этапе, могут быть разделены на две группы: общие и частные.

Основной задачей производственного этапа является максимально эффективное получение целевого продукта, а это возможно только при условии оптимизации функционирования используемого в биотехнологии объекта.

Так как культура клеток (природных штаммов или генетически трансформированных) является наиболее распространенным сегодня объектом биотехнологии (см. объекты биотехнологии), то на примере культивирования клеток мы и рассмотрим задачи производственного этапа.

Одной из задач производственного этапа биотехнологического производства является поддержание и контроль асептических условий (стерильность). Обеспечение асептических условий начинается с подготовительного этапа – это стерилизация оборудования, стерилизация питательных сред и поддержание стерильности маточных культур.

Так как в процессе производственного этапа осуществляется газообмен со средой, а в некоторых случаях и культуральными средами, то необходимо обеспечивать поддержание условий стерильности. Конечно, эта задача решается по-разному в зависимости от условий культивирования и объемов биореакторов. Так, если в процессе культивирования необходимо получать сотни тонн целевого продукта, то тогда, как правило, ограничиваются высокой степенью «чистоты», но не 100 % асептичности, что очень трудно при таких масштабах.

Решение проблемы асептики связано с использованием предварительно очищенного от контаминантов воздуха с помощью специальных воздушных фильтров и стерильностью используемых питательных сред в процессе культивирования.

Накопленный опыт показал, что решение вопросов стерильности требует жесткого соблюдения условий производства.

Условия обеспечения и контроля стерильности были рассмотрены в гл. IV первой части книги.

Обеспечение и контроль условий роста культур

Следующей задачей производственного этапа биотехнологического производства является обеспечение и контроль над условиями роста культур.

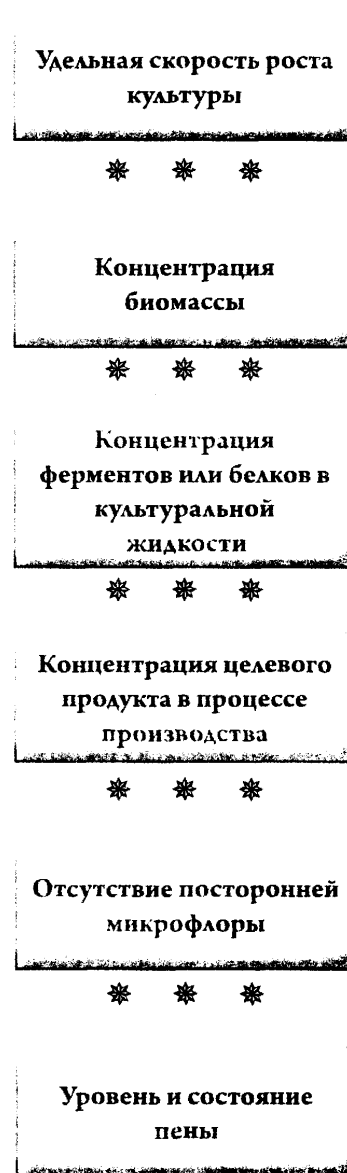


Рис. 191. Основные параметры продуцентов, которые контролируются в процессе производства.

Наиболее значительными факторами в процессе культивирования являются (рис. 192):

- контроль температурного режима (термостатирование);
- обеспечение массо- и газообмена;
- контроль качества питательной среды – это уменьшение питательных веществ и увеличение метаболитов, которые могут ингибировать дальнейший рост культур;
- контроль состояния продукта.

Кратко рассмотрим некоторые особенности решения этих задач.

Мы уже указывали, что одной из фундаментальных особенностей биологических объектов являются жесткие требования к температуре, т.е. небольшое отклонение температуры от оптимума для данного объекта (всего на несколько градусов) приводит к резкому изменению функциональной активности объекта. В связи с этим, поддержание необходимого температурного режима в процессе культивирования или эксплуатации биообъектов является важнейшим этапом в контроле промышленного процесса.

Эта задача усугубляется тем, что в процессе культивирования постоянно изменяется температура и приходится осуществлять отвод тепла или (напротив) подогрев среды.

Так, в аэробных условиях происходит тепловыделение, причем, чем выше интенсивность роста, тем больше скорость разогрева культуральной среды.

Наиболее простым способом отвода тепла является отвод оборотной водой через змеевики, водяные рубашки и другие приспособления. Для обеспечения контроля температуры приходится или использовать воду, имеющую различную температуру, или регулировать скорость оборота воды.

Несколько проще осуществлять контроль повышения температуры, так как сегодня существуют различные системы подогрева как электрические, так и водяные. Контроль температуры осуществляется автоматически.

Важным фундаментальным свойством биологических объектов является их гетерогенность, т.е. неоднородность. Давайте вспомним, что сама клетка является структурированной системой биополимеров. Даже в жидкой среде, в которой культивируют одноклеточные организмы, система является гетерогенной, так в этой среде мы имеем жидкую, твердую и газообразную компоненты. Более того, в процессе жизнедеятельности клетки утилизируют часть компонентов из среды и постоянно выделяют экзосметаболиты, т.е. они создают гетерогенность химического и газового состава. Такая гетерогенность неизбежно будет приводить к изменению функционирования самого объекта или, другими словами, сам объект неизбежно и постоянно формирует отклонения от оптимальных для него условий функционирования. Этими особенностями могут объясняться отсутствие оптимальных условий функционирования биологических объектов в природной среде. Задача биотехнолога обеспечить максимальную продуктивность объекта в искусственных условиях путем устранения



Рис. 192. Наиболее часто контролируемые факторы на производственном этапе.

Для пеногашения используют поверхностно-активные вещества. Добавление веществ, подавляющих пенообразование, влияет на массообмен в культуральной жидкости. Добавление небольших концентраций лаурил сульфата натрия снижает перенос кислорода на 56 % (по сравнению с чистой водой), что, в свою очередь, будет влиять на рост культуры в реакторе.

факторов «самоуничтожения» и, конечно, создавая объекты с новыми необходимыми свойствами. Одним из подходов в устранении усиливающейся гетерогенности культивируемых систем является обеспечение газообмена и массообмена в процессе культивирования.

Обеспечение газообмена и массообмена в процессе культивирования

К сожалению, обеспечение необходимого газо- и массообмена достигается только особенностями перемешивания культур, что не всегда может оптимально решить эту задачу. Проблемы газо- и массообмена уже рассматривались в разделе, посвященном биореакторам. В этом разделе мы отметим, что перемешивание – достаточно сложная задача, так как при ее решении необходимо учитывать, что интенсивное перемешивание приводит к пенообразованию, что является крайне нежелательным явлением. Использование пеногасителей создает проблемы из-за их побочного действия и соблюдения стерильности.

Особое внимание следует обратить на стабилизацию плотности пены. Показано, что доля пенной фазы в общем процессе массопередачи кислорода довольно большая. Идеальным было бы превращение содержимого биореактора в гомогенную подвижную фазу.

Для роста аэробных культур необходимо обеспечить поступление кислорода в клетки в количествах, необходимых для оптимального роста данной культуры. Это возможно при хорошей растворимости кислорода в воде. Другой же путь – это изменение парциального давления кислорода в газе (это достигается увеличением общего давления). Этот подход используется реже, так как он связан с целым рядом технических сложностей.

В том же случае, если мы имеем дело с культивированием анаэробов, которым не требуется аэрация, приходится решать задачу полного удаления кислорода из среды. Удаление кислорода может быть обеспечено введением в реактор инертного газа или вытеснение кислорода углекислотой, которая выделяется в процессе метаболизма культивируемого объекта. Герметизация биореактора создает свои трудности, так как затрудняется обеспечение перемешивания и теплообмена. Задачи газо- и массопереноса решаются экспериментальным подбором конкретных условий для того или иного технологического процесса. Для корректного управления газо- и массопереносом постоянно осуществляется контроль состава, содержания кислорода и углекислого газа в среде культивирования, и при необходимости регулируется интенсивность перемешивания.

Состав и качество питательной среды в процессе производства

Важнейшим фактором оптимального роста клеточных культур является состав и качество питательной среды.

Состав и качество питательной среды динамично изменяется, что выражается в уменьшении содержания питательных для клеток

Механическое перемешивание в биореакторе повышает интенсивность смешения фаз по сравнению с естественной конвекцией, которая обусловлена движением частиц свободно поднимающихся или опускающихся диспергированных фаз. Наряду с этим, перемешивание способствует уменьшению размера частиц и агрегатов, что обеспечивает более однородное распределение клеточных структур в культуральной среде, а это, в свою очередь улучшает массоперенос и газообмен в гетерогенных смесях.

Суспензии клеток в жидкости могут быть столь вязкими, что только механическое перемешивание может обеспечить диспергирование газа в жидкой среде.

Некоторые микроорганизмы в процессе культивирования выделяют большое количество углеводов или других биополимеров в среду, что приводит к сильному увеличению вязкости культуральной среды, и только интенсивное перемешивание может обеспечить дальнейший рост культуры.

Наряду с этим, чрезмерно интенсивное перемешивание приведет к образованию пены и даже разрушению биологических структур. Выбор оптимальной системы перемешивания, которая обеспечивала бы максимальный рост культур, достаточно сложная и важная задача.

веществ и непрерывном увеличении продуктов жизнедеятельности клеток (экзометаболитов). Более того, компоненты, входящие в состав питательных сред, могут изменяться с разной скоростью, что приводит не просто к обеднению состава, а и к изменению соотношения между компонентами.

Контроль состава культуральной среды, пожалуй, одна из самых трудных задач производственного этапа биотехнологического процесса. Процесс культивирования делят на периодическое культивирование и непрерывное культивирование.

При периодическом культивировании в состав питательной среды не вводят дополнительных компонентов, а после завершения цикла культивирования выделяют целевой продукт. Такой способ культивирования оправдан тогда, когда целевой продукт накапливается в процессе культивирования. Однако и при периодическом культивировании на производственном этапе осуществляется контроль состава среды, что позволяет оценить скорость процесса ферментации и определить момент остановки процесса.

В случае непрерывного биотехнологического процесса необходимо обеспечивать поддержание заданного стационарного состояния среды. Для этого используют автоматические системы регистрации и подачи необходимых компонентов в биореактор. Управление комплексом этих процессов осуществляется компьютерными системами. Чаще всего на практике используется полунепрерывный процесс культивирования.

В среде культивирования контролируют такие параметры как температура, давление, скорость вращения мешалки, вязкость среды и содержание кислорода.

Давление в реакторах контролируют с помощью мембранных манометров, дающих пневматический сигнал, который может быть преобразован в электрический.

Для определения вязкости среды часто оценивают мощность, которая потребляется мешалкой при разной скорости вращения. На основании этих данных рассчитывают вязкость среды.

Величину pH среды определяют с помощью pH-электродов (стеклянный мембранный электрод). Концентрацию растворенного в воде кислорода определяют гальваническими (потенциометрическими) или полярографическими (электрод Кларка) зондами. Эти зонды измеряют не концентрацию, а парциальное давление кислорода.

В том случае, если возникает необходимость определить содержание каких-либо специфических веществ в среде (метаболитов и др.), то могут использоваться специально разработанные для этой цели биосенсоры. С устройством и принципом действия биосенсоров мы знакомимся в главе XII первой части книги.

Так, для определения содержания глюкозы в биореакторе был разработан биосенсор на основе иммобилизованного конканавалина А (белок из растения канавалин мечевидный), который избирательно связывает сахара.

Экзометаболиты – метаболиты клеток, которые выделяются в среду культивирования в процессе нормальной жизнедеятельности. В процессе жизнедеятельности клетки выделяют (экскретируют) белки, ферменты, углеводы, липиды, фенолы и др. вещества. В некоторых случаях экзометаболиты могут составлять значительную долю синтезирующихся в клетке веществ. Процесс экскреции регулируется различными факторами. Если целевым продуктом являются экзометаболиты, то это облегчает процесс их получения.

Автоселекция – самопроизвольная селекция клеток в процессе длительного культивирования. Основными факторами такой автоселекции являются спонтанные мутации, нестабильность генома в процессе интенсивного культивирования. В результате автоселекции могут утрачиваться исходные свойства маточной культуры.

Полунепрерывный процесс культивирования. Это такая система культивирования микроорганизмов или культур клеток, при которой с определенным интервалом времени отбирают часть биомассы, а в оставшуюся культуру вносят такой же объем свежей питательной среды, т. е. осуществляют периодическое разведение культуры. Этот метод значительно увеличивает время культивирования, однако наступает момент, когда требуется полное обновление культуры.

Парциальное давление – давление газа или пара в смеси, которое имел бы этот газ и пар, если бы он один занимал весь объем смеси.

Контроль состояния биообъекта в процессе производства

Важнейшим этапом контроля производственного этапа является постоянный контроль состояния биообъекта. Ведь утрата производственных качеств биообъектом равноценна производственной катастрофе. А потеря качеств может произойти по различным причинам. Вот некоторые из них: автоселекция и контаминация.

Если в ферментере объемом 50 м^3 с коэффициентом заполнения 0,6 и длительностью культивирования 4-5 суток содержится от 10^{12} до 10^{15} клеток, то учитывая обычную частоту мутаций $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-15}$, то за одну генерацию может образоваться 10^5 – 10^7 мутантных форм. В зависимости от форм мутаций в такой культуре может начаться автоселекция и промышленный штамм быстро будет утерян.

Быстрые изменения свойств продуцентов могут произойти и в случае контаминации. Так, если в «чистую» культуру попадает быстрорастущая культура гриба или бактерий, то они достаточно быстро могут ингибировать рост продуцента.

Наиболее эффективным можно считать комплексный контроль состояния биообъекта, т.е. оценку состояния самого объекта и оценку качества и количества целевого продукта в процессе культивирования.

При оценке качества и количества целевого продукта используют различные методы определения в зависимости от характера продукта. Его характеристики должны удовлетворять принятым стандартам для данного производства. Отклонение в количественных и качественных характеристиках целевого продукта свидетельствует об изменении характеристик продуцентов.

При оценке состояния биообъектов необходимо учитывать то, что наиболее быстрыми являются экспресс-методы оценки. К большому сожалению, такие методы только разрабатываются. А в настоящее время, чаще всего используют морфологические методы и методы генетического контроля, которые имеют свои особенности для каждого продуцента.

Остановившись на проблемах и трудностях в обеспечении производственного этапа биотехнологического процесса, отметим, что наибольшей проблемой является недостаточность знаний о биологических объектах, использующихся в качестве продуцентов, и, прежде всего, знаний по разработке адаптационной оптимизации культивирования.

Адаптационная оптимизация основана на знании механизмов адаптации конкретного продуцента к условиям культивирования, составлении прогноза и хода биотехнологического процесса, что должно обеспечить коррекцию параметров среды для обеспечения высокой эффективности биотехнологического процесса.

Решение этих проблем невозможно без фундаментальных знаний процессов адаптации биообъектов.

Экспресс-методы – методы, которые обеспечивают быстрое получение информации. Как правило, экспресс-методы дают предварительную информацию.

Морфологические методы – позволяют определить форму, размеры и структуру клеток. Известно, что морфологические параметры определяются генетической системой биообъекта и, следовательно, изменение морфологии отражает генетическую или функциональную нестабильность.

Контроль состояния культур клеток (продуцентов) может быть основан на контроле популяции клеток или состоянии отдельных клеток. При популяционном контроле определяют биомассу клеток, динамику роста культуры, химический состав клеток в культуре, содержание и активность ферментов и др. Современные методы клеточной биологии позволяют оценивать такие характеристики клеток как размеры, интенсивность биосинтетических процессов в клетке и др.

Сложность биологических систем, их высокая динамичность и адаптивность затрудняет процессы контроля. В качестве примера можно вспомнить, что в процессе роста, культура проходит ряд этапов – лаг-фаза, экспоненциальная фаза роста, стационарная фаза роста. Требования клеток к среде на разных фазах роста неодинаковы и продолжительность фаз может изменяться в зависимости от условий культивирования, а это в свою очередь влияет на выход целевого продукта и рентабельность процесса. Следовательно, в процессе культивирования необходимо не только следить за брутто-характеристиками биологических процессов, но постоянно и эффективно контролировать поведение реальной популяции клеток в реакторе и осуществлять оперативный контроль над этими процессами, что является достаточно сложной задачей.

В некоторых случаях условия биотехнологического производства таковы, что требуют полной утилизации компонентов питательной среды, так как они могут оказать вредное воздействие на целевой продукт, не могут быть сброшены в среду из-за токсичности или же достаточно дороги. Эта задача может быть решена различными способами: использованием системы дозревания готового продукта, или использованием специальной системы очистки среды, что является технологически трудной задачей.

Исходя из сложности управляемых процессов, системы управления могут быть в виде трех уровней.

Первый уровень сложности управления связан с регулированием параметров биотехнологического процесса на основе принципа обратной связи и для его реализации используются микропроцессоры. Микропроцессоры могут устанавливаться непосредственно на всех этапах процесса.

Второй уровень сложности рассчитан на более детальный анализ параметров биотехнологического процесса и для его реализации используются компьютеры.

На третьем уровне сложности анализируются десятки и сотни переменных параметров, решается большое количество модельных уравнений, принимаются решения об управлении процессами – все это реализуется системой компьютеров.

Автоматизация биотехнологических процессов является одной из интенсивно развивающихся областей промышленной биотехнологии.

Еще одной проблемой в процессе производственного этапа являются особенности контроля в зависимости от характеристик целевого продукта.

Дело в том, что в биотехнологическом производстве можно получать целевой продукт в виде биомассы клеток или в виде отдельных метаболитов, или экзометаболитов. Эти особенности видов целевых продуктов накладывают свои требования к контролю всего производственного процесса.

В случае получения метаболитов как целевых продуктов, необходимо определять стадии максимального содержания нужных метаболитов, обеспечивать, как правило, многостадийный процесс

Под системой автоматизации биотехнологических исследований понимают программно-аппаратный комплекс на базе средств измерительной и вычислительной техники. Комплекс предназначен для проведения комплексных научно-исследовательских процессов на основе использования моделей и экспериментальных данных.

Микропроцессор – это программно-управляемое электронное цифровое устройство, предназначенное для обработки цифровой информации и управления процессом этой обработки, выполненное на одной или нескольких интегральных схемах с высокой степенью интеграции электронных элементов.

культивирования, а каждая стадия характеризуются своими параметрами. Система культивирования может несколько упрощаться, если необходимые клеточные метаболиты выделяются в культуральную среду в виде экзометаболитов. В таком случае их легко выделить по сравнению с метаболитами клеток, однако они могут выступать и в качестве ингибиторов клеточного роста.

Управление биотехнологическими процессами

Одним из преимуществ биотехнологических процессов перед традиционными технологиями является то, что они могут быть отнесены к управляемым процессам. Возможность управления биологическими объектами основана на фундаментальном свойстве всего живого – способности приспосабливаться к условиям существования, т. е. адаптироваться. Процесс адаптации – не что иное как процесс такой динамической перестройки метаболизма (см. концепцию метаболизма – гл. III), при которой важно сохранение структурно-функциональных свойств живого при постоянно изменяющихся условиях питания, температуры и других факторов среды.

Регламентируя условия осуществления биотехнологического процесса, т. е. изменяя комплекс физико-химических параметров, мы можем получать на выходе (не зная все особенности перестройки метаболизма биосистем) желаемый продукт. Или, другими словами, регуляция биотехнологического процесса основана на некоторых принципах (рис. 193).

Совершенно очевидно, что управление биотехнологическими процессами возможно только в случае знания совокупности сведений используемого биотехнологического объекта (см. гл. III). Наряду с этим, необходимо знать поведение биообъекта в конкретных условиях, часто они уникальны и могут приводить к нетипичным проявлениям реакций.

Так, реализация биотехнологических процессов может осуществляться в периодическом или непрерывном режимах культивирования.

При периодическом культивировании одноклеточные культуры будут проходить все фазы своего развития, т. е. lag-фазу; экспоненциальную фазу – log, стационарную – const и фазу отмирания – let. Выход целевого продукта будет зависеть от времени сбора продукта.

В том же случае, если используется непрерывное культивирование, то культура в таких условиях, как правило, всегда находится в стационарной фазе или близкой к ней. Поддерживая необходимые параметры в биореакторе на стационарном уровне, можно обеспечить регулирование продуктивности системы.

Следовательно, процесс управления производством сводится к контролю и поддержанию необходимого стационарного состояния условий культивирования. Для этого используют различные

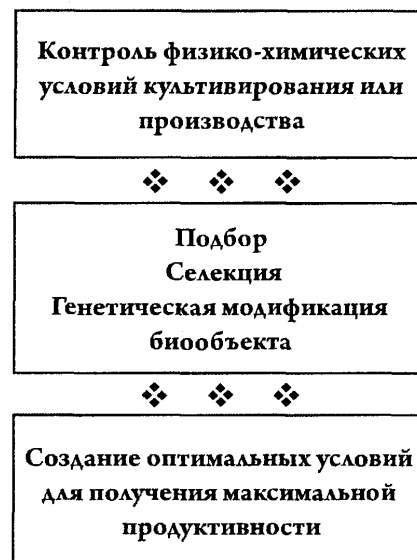


Рис. 193. Основные принципы регуляции биотехнологического процесса.

Управление – действия, направленные на сохранение функциональных и структурных характеристик системы.

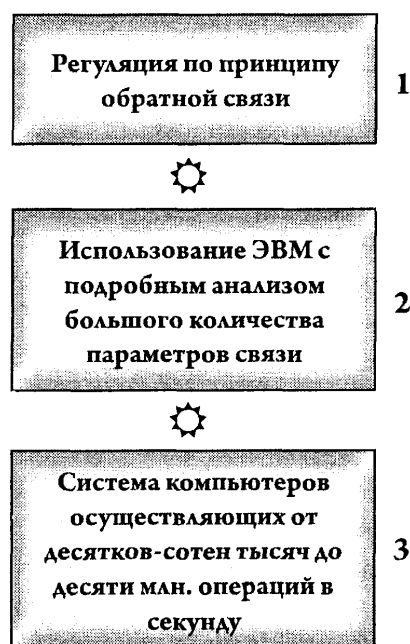


Рис. 194. Схема, демонстрирующая уровни управления и регуляции биотехнологических процессов

аналитические приборы: сенсоры для определения ведущих параметров среды, электроды, расходомеры и т. д., которые соединены в одну систему с дозаторами, микропроцессорами и компьютерами.

Для управления процессами, в частности ферментативными, используют микропроцессоры. Микропроцессор способен выполнять до нескольких миллионов операций в секунду.

Процессы управления в биотехнологии можно условно разбить на три уровня сложности: первый (достаточно простой), второй и третий – наивысший уровень сложности (рис. 194).

Несмотря на интенсивные темпы развития систем управления и автоматизации, многие биотехнологические процессы не могут быть автоматизированы. Это связано с рядом особенностей биологических систем.

Биологические системы являются саморегулирующимися и это может приводить к неконтролируемым изменениям в процессе культивирования. С одной стороны, это лежит в основе управления, а с другой – биологические системы изменяют свои параметры и в ответ на неконтролируемые параметры среды. Так, сезонные изменения влияют на продуктивность независимо от контролируемых условий роста. Одноклеточные объекты чувствительны и к таким глобальным факторам как солнечная активность и др. гелиофизические факторы.

Глава III

Завершающий этап биотехнологического производства

Общая характеристика завершающего этапа

Одной из главных задач завершающего этапа биотехнологического производства является выделение и очистка целевого продукта. Задача очистки целевого продукта усложняется тем, что биотехнологу приходится иметь дело с разбавленными растворами и сложной смесью растворимых внеклеточных метаболитов, продуктов разрушения клеток и компонентов питательной среды. При концентрировании целевого продукта в процессе производства происходит ингибирование роста продуцентов и их гибель, а на завершающем этапе приходится осуществлять концентрирование целевого продукта. В зависимости от типа целевого продукта (биомасса или отдельные метаболиты – ферменты, гормоны) используют различные типы концентрирования и выделения. Так как продукты в биотехнологии имеют биологическое происхождение (ферменты, гормоны, витамины и т.д.), то в чистом виде они могут терять свою активность. Для обеспечения ее сохранности используют различные способы стабилизации (сушку, консервацию).

Так как в процессе производства биологические объекты (продуценты) не в состоянии полностью использовать все компоненты питательных сред, кроме того, в процессе жизнедеятельности они образуют большое количество разнообразных соединений, кроме целевого продукта, то возникает проблема их утилизации.

Применяемый метод очистки в каждом конкретном случае определяется не только локализацией целевого продукта, его молекулярной массой, но и масштабом производства. Так, для выделения гормонов, интерлейкинов и других дорогих препаратов используют хроматографические методы, которые невыгодно использовать в промышленных масштабах.

Итак, завершающий этап биотехнологического производства включает: концентрирование, выделение и очистку целевого продукта, его стабилизацию и фасовку, а также утилизацию побочных продуктов (рис. 195).

Концентрирование и выделение целевого продукта

Характеристика целевых продуктов

Как правило, целевой продукт содержится в культуральной среде. В процессе культивирования продуцентов состав культуральной среды достаточно сильно изменяется. В ней присутствуют клетки-продуценты, экзометаболиты – вещества которые выделяются

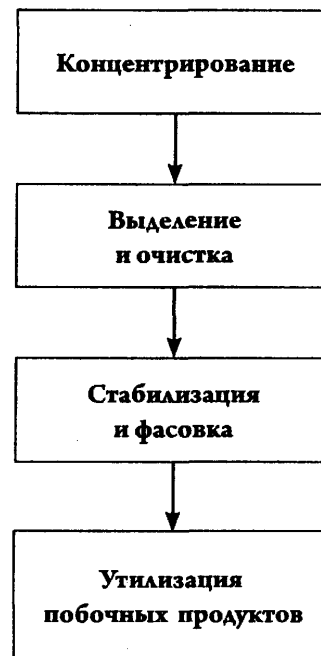


Рис. 195. Этапы биотехнологического производства.

Целевой продукт – это очищенные вещества, смесь веществ или биомасса клеток, которые имеют хозяйственную ценность и получают как конечный продукт биотехнологического производства.

Концентрирование – увеличение содержания целевого продукта в объеме.

продуцентами в процессе роста, остатки питательных веществ, продукты разрушения продуцентов. Необходимо отметить, что состав экзометаболитов может быть очень разнообразным и зависит от клеток-продуцентов и особенностей их культивирования.

В состав экзометаболитов входят: белки, углеводы, липиды, ферменты, аминокислоты и витамины.

Следовательно, культуральная среда представляет собой смесь: клеток, фрагментов разрушенных клеток, макромолекул и солей. В зависимости от особенностей биотехнологического процесса культуральная среда будет различаться по концентрации клеток, метаболитов и других компонентов, вязкости и цвету, и это будет определять выбор способа выделения целевого продукта. Однако в любом случае мы имеем дело с разбавленными водными растворами или суспензиями, которые содержат от 0,1 до 5 г/л веществ. Этим и объясняется необходимость проведения процедуры концентрирования целевого продукта.

Концентрирование сводится к уменьшению содержания воды в образцах и, следовательно, увеличению содержания целевого продукта в объеме.

Необходимо отметить, что концентрирование целевого продукта может рассматриваться и как один из способов его выделения.

В настоящее время используют различные способы концентрирования, и выбор способа зависит от особенностей целевого продукта. Например, целевым продуктом могут служить биомасса клеток, экзометаболиты, эндометаболиты. Так как размер компонентов является важным критерием в выборе способов концентрирования и выделения целевого продукта, то приведем пример условной градации нерастворимых в воде частиц по размерам (табл. 65).

Центрифугирование (сепарирование) и упаривание

Наиболее универсальным способом концентрирования является упаривание (удаление воды). При этом удаляются молекулы воды и небольшое количество летучих веществ. Необходимо учитывать, что при упаривании температура среды не должна превышать той критической температуры, при которой целевой продукт будет терять свою активность или разрушаться. Для устранения этого используют вакуумные установки. Упаривание и дальнейшая сушка применяется тогда, когда получают белково-витаминный концентрат.

Гораздо чаще при концентрировании используют такие способы как: седиментация, фильтрование, сепарирование, центрифугирование и флотация.

Использование указанных способов обеспечивает как концентрирование, так и частичную очистку целевого продукта.

Так, для выделения крупных и мелких частиц (см. табл. 65) целесообразно использовать седиментацию, сепарирование или

1.	Крупные частицы от 0,1 до 1 мм
2.	Мелкие частицы от 0,01 до 0,1 мм
3.	Инфрамелкие частицы от 0,001 до 0,01 мм
4.	Высокомолекулярные вещества от 10 до 1000 нм (10^5 - 10^3)
5.	Низкомолекулярные вещества от 0,1 до 10 нм (10^7 - 10^5)

Табл. 65. Градация нерастворимых веществ и частиц в воде по размерам (Н.П. Елинов, 1995).

Центрифугирование – разделение неоднородных смесей на составные части под действием центробежной силы. Центробежная сила, которую испытывает частица в центробежном поле равна mv^2/r , где m – масса частицы, v – скорость ее вращения, r – радиус вращающего ротора.

В промышленности применяют различные типы центрифуг: осадительные, шнековые, непрерывного действия с выгрузкой осадка через сопла, саморазгружающиеся сепараторы и др.

Седиментация – это осаждение частиц в поле гравитационных сил.

Декантация (от французского *decanter* – сцеживать, сливать) означает сливание или удаление жидкости от отстоявшегося или сформировавшегося осадка.

центрифугирование. Все эти способы основаны на осаждении частиц в жидкой среде.

Седиментация – это осаждение частиц в поле гравитационных сил. На скорость седиментации (осаждения) влияют размеры частиц, вязкость среды. Чем больше размеры частиц, тем быстрее они осаждаются в естественном гравитационном поле. Седиментация может использоваться в случае первичного осаждения клеточной массы и только в том случае, если клетки относительно велики и вязкость раствора небольшая. Так можно концентрировать клетки дрожжей. Однако в этом случае получаемые осадки достаточно рыхлые и требуют дополнительного уплотнения и обезвоживания. Для этого используют центрифугирование или сепарирование. При этом скорость осаждения значительно возрастает за счет центробежных сил.

Параметры центрифугирования или сепарирования подбираются так, чтобы крупные частицы осаждались, а мелкие оставались в растворе. В настоящее время существует достаточно большое количество промышленных центрифуг и сепараторов, которые обеспечивают эффективное осаждение целевого продукта, при этом получают пастообразный продукт. В этом случае можно удалить от 60 до 75 % жидкой фазы, отделение жидкой фазы от образовавшегося осадка осуществляют декантацией. Для этого используют различные типы насосов или специальные системы перелива. Эффективность осаждения частиц в центробежном поле зависит не только от массы осаждаемых частиц, их радиуса и скорости вращения, но и от вязкости среды. Вязкость культуральной среды увеличивается в том случае, если продуценты выделяют в среду полисахариды или большое количество белка. В таком случае, до центрифугирования культуральную среду дополнительно разводят водой и только после этого проводят центрифугирование, что значительно увеличивает объем работы и себестоимость продукта.

В зависимости от выделяемых веществ применяют различные типы центрифуг, которые различаются конструкциями роторов. В случае работы с большими объемами применяют центрифуги непрерывного действия или шнековые центрифуги (рис. 196).

В ряде случаев целесообразно осуществлять процедуру, направленную на формирование агрегатов выделяемых компонентов (клеток или молекул). При этом упрощается процедура осаждения центрифугированием или сепарированием, так как можно значительно уменьшить число оборотов вращения ротора или время осаждения.

Предварительная обработка среды для дальнейшего выделения целевого продукта может включать: тепловую обработку, изменение величины pH, добавление осадителя и др.

Если агрегаты формируются достаточно хорошо или они формируют большие комплексы, то можно обойтись без

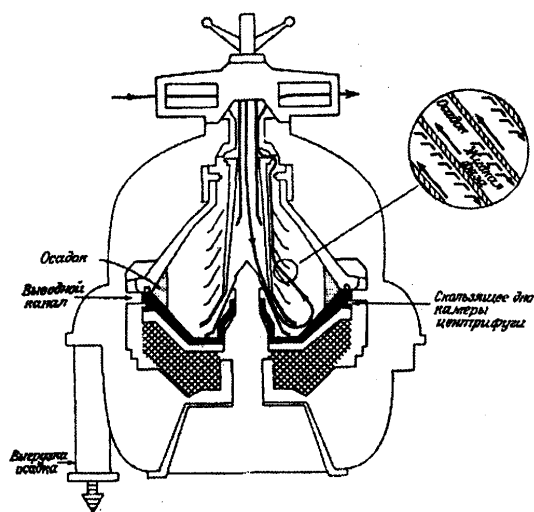


Рис. 196. В этой центрифуге непрерывного действия осадок твердых веществ отделяется в потоке между двумя коническими поверхностями. Жидкость отбирают из верхней части аппарата.

Меры безопасности при центрифугировании.

1. Проводить регулярное техническое обслуживание оборудования.
2. Следить за состоянием роторов.
3. Проводить точную балансировку емкостей для центрифугирования.
4. Предотвращать образование пены в проточных системах.
5. Не допускать загрязнения окружающей среды.

Современные промышленные центрифуги обеспечивают производительность 90 - 120 л в час с 95 % осаждением клеток. Клетки, которые выделены методом центрифугирования, сохраняют жизнеспособность и могут быть использованы в биологических экспериментах. В том случае, если они используются как целевой продукт, их необходимо инактивировать.

центрифугирования, заменив его обычным осаждением путем отстаивания. При отстаивании в отличие от центрифугирования, формирующийся осадок целевого продукта достаточно рыхлый, что затрудняет процесс декантации. В таком случае для удаления жидкости используют различные приспособления – вакуумные насосы или делительные воронки. Окончательное формирование плотного осадка осуществляют методами центрифугирования или фильтрования, но предварительное отстаивание значительно уменьшает объем центрифугируемой жидкости. Для этого используют различные типы центрифуг (табл. 66).

Фильтрация и флотация

Особенности фильтрации

Крупные ассоциаты могут быть собраны и методом фильтрации на специальных крупных фильтрах – тканевых, сетчатых, волокнистых фильтрах или ситах. Условия фильтрации, как и центрифугирование, зависят от характеристик выделяемых продуктов и подбираются для каждого образца индивидуально.

Если количество фильтруемого материала невелико, то его можно сконцентрировать на рамном фильтре-прессе. В этом случае осадок периодически снимают с фильтра. В крупномасштабном производстве используют непрерывное фильтрование. Для этого применяют ротационные (барабанные) вакуум-фильтры. Осадок накапливается на фильтре и после этого он снимается с фильтра специальным шнуром или ножом.

При фильтровании небольших объемов жидкости применяют метод фильтрации, при котором непрерывный параллельный фильтру поток жидкости уносит накапливающуюся на фильтре массу. При этом способе фильтрации удастся повысить концентрацию целевого продукта в 10 и более раз.

Фильтрующие свойства зависят от предварительной обработки суспензии и условий фильтрования. На скорость фильтрования влияет величина рН. Предварительная тепловая обработка суспензии может значительно снизить удельное сопротивление осадка за счет коагуляции белков.

Как правило, фильтрование используется в сочетании с другими методами концентрирования.

Наряду с различными способами осаждения можно использовать и такой способ концентрирования целевого продукта как флотацию. Так, частицы могут избирательно прилипать к пузырькам воздуха (в процессе аэрации) и переходить в пену. Следовательно, пена обогащена этими частицами. Собирая ее, мы таким способом получаем концентрат этих веществ.

Для обеспечения флотации разработаны различные флотаторы – вещества, которые устраняют смачивание молекул и обеспечивают их концентрирование на поверхности жидкости. При использовании флотации жидкость откачивается насосом, а флотировавшие частицы концентрируют центрифугированием или

Тип центрифуги	Способ съема осадка	Производительность м ³ /ч
Камерные сепараторы	Остается в камерах	150
Саморазгружающиеся сепараторы	Периодическая выгрузка через радиальную щель	100
Центрифуга непрерывного действия	Непрерывная выгрузка через сопла	300

Табл. 66. Некоторые типы промышленных центрифуг.

Флокуляция (от латинского – хлопья) объединение частиц в рыхлые агрегаты.
Флокулянты – вещества, усиливающие процесс агрегации.

сепарированием. Это в десятки раз уменьшает объем центрифугируемой жидкости.

Характеристика флокулянтов

Как уже отмечалось, культуральная среда, в которой культивируют продуценты, является сложной дисперсной системой. Такая сложная гетерогенная система характеризуется агрегационной и седиментационной устойчивостью, что и определяет в какой форме будут находиться компоненты среды, в виде отдельных структур и молекул или в виде многокомпонентных агрегатов.

Способность отдельных клеток и соединений формировать агрегаты зависит от различных факторов (рис. 197):

1) размеры, форма, зарядные характеристики – генетические особенности клеток;

2) факторы среды – температура, вязкость среды, величина рН, концентрация целевого продукта, концентрация ионов в среде и др.;

3) наличие факторов оказывающих влияние на регулирование коллоидно-химических свойств дисперсных систем, т.е. наличие коагулянтов или флокулянтов (поверхностно-активных соединений).

Следовательно, при подборе флокулянтов необходимо учитывать роль перечисленных факторов в процессе флокуляции.

Мы не будем рассматривать теории флокуляции, они описаны в ряде монографий, в частности А.А.Баран, А.Я. Тесленко.

Флокулирующее действие зависит от природы используемого в качестве флокулянта полимера, его молекулярной массы и заряда, условий введения реагента в систему, характеристик культуральной среды.

Флокулянты сорбируются или химически связываются с поверхностью макромолекул. Высоким флокулирующим свойством обладают полиэлектролиты, при этом линейные полимеры обладают лучшими свойствами, чем клубкообразные макромолекулы.

Эффекты флокуляции объясняются образованием полимерных мостиков между макромолекулами и флокулянтами.

В настоящее время разработано большое количество синтетических флокулянтов. Большинство из них получено полимеризацией и сополимеризацией виниловых мономеров (винилацетат, винилхлорид, акриламид, метакриловая кислота, винилпирролидон и др.)

Наряду с химическими существуют и природные флокулянты. Их получают путем химической модификации природных полимеров – крахмала, альгината натрия, производных целлюлозы.

Одно из главных требований к флокулянтам – это отсутствие токсичности.

Природные флокулянты обладают рядом преимуществ перед химическими флокулянтами. Они способны к биодegradации, нетоксичны, и их относительно просто получить.

Необходимо отметить, что применение флокулянтов позволяет интенсифицировать процессы фильтрационного, сепарационного

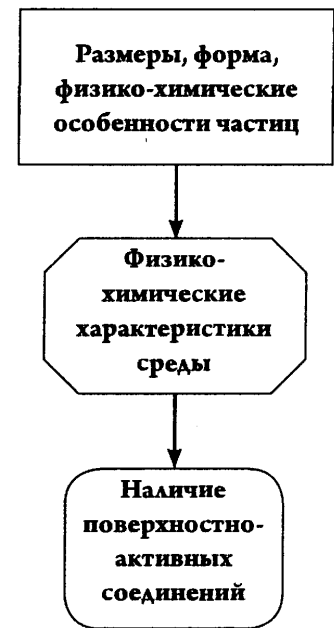


Рис. 197. Факторы, которые влияют на образование молекулярных и клеточных агрегатов.

А.А. Баран, А.Я. Тесленко
Флокуляции в биотехнологии.-
Ленинград: Химия, 1990, 142с.

Флотация – (от французского – плавать на поверхности воды) процесс распределения частиц на поверхности жидкости. Мелкие минеральные частицы, которые не смачиваются водой, тоже будут всплывать на поверхности жидкой фазы. Это явление используют для обогащения полезных ископаемых. Для этого применяют пенную флотацию, при которой частицы минералов в водной среде избирательно прилипают к пузырькам воздуха и поднимаются в пену, образуя концентрат.

Экстракция – извлечение, удаление веществ из смеси, которое осуществляется с помощью растворителей. В качестве растворителей используют водные растворы или органические растворители (спирты, хлороформ, метанол).

отделения биомассы от культуральной жидкости. Так, использование хитозана в концентрациях 0,001 – 0,003 мг/л среды в качестве флокулянта позволяет осадить более 99 % клеток – *Staphylococcus aureas*, что обеспечивает получение внеклеточного белка применяющегося в производстве иммунодиагностических препаратов.

Использование флокулянтов может обеспечить селективное выделение ферментов из культуральной среды. В процессе культивирования клетки могут накапливать липидные компоненты. Если липидов в клетке достаточно много, то такие клетки быстро флоатируют на поверхность водной фазы в процессе центрифугирования, их можно собрать с поверхности жидкой фазы и таким образом получить концентрат целевого продукта.

Известно, что сахаромицеты (клетки дрожжей) способны флоатировать, что используется для концентрирования их биомассы.

В том случае, если целевой продукт представлен не крупными и мелкими частицами, а инфрамелкими частицами и высокомолекулярными веществами, то система концентрирования и очистки усложняется. Для решения этой задачи необходимо использовать несколько стадий очистки.

На первой стадии удаляют целые клетки и крупные агрегаты, концентрируют необходимые макромолекулы, и в дальнейшем используют различные системы извлечения и очистки целевых продуктов, таких как экстракция, сорбция и хроматография.

Методы экстракции

В том случае, если целевым продуктом являются метаболиты клетки, то из клетки их извлекают экстракцией. В качестве экстрагента чаще всего применяют органические растворители. Так, в частности, получают антибиотики.

Многие антибиотики хорошо растворяются в органических растворителях и не растворяются в воде. Для получения антибиотиков, как правило, используют многостадийные экстракции.

На первой стадии из водной фазы переводят соединения в органическую фазу, затем из этой фазы переводят в новую фазу, при этом обеспечивается как концентрирование, так и очистка целевого продукта.

При получении пенициллина (в 1 л питательной среды содержится 35 г антибиотика) удаляют биомассу мицелия фильтрованием. Поскольку рКа пенициллина находится в диапазоне 2,5-3,1, то культуральную среду доводят до рН 2,0-3,0, после чего проводят экстракцию органическими растворителями.

Для этого используют противоточное распределение в системе культуральная водная среда-амилацетат (или бутилацетат) в отношении 10:1 (v/v). При этом в органическую фазу переходит практически весь пенициллин. Для дополнительной очистки проводят еще одну экстракцию воды раствором фосфатного буфера (рН 5-7,5). Антибиотик получают в виде натриевой соли осаждением из водно-бутаноловой смеси.

Метаболит – промежуточный продукт обмена веществ в клетках. Многие метаболиты регулируют метаболические и физиологические процессы в организме.

Сорбция (от латинского *sorbeo* – поглощаю) – поглощение твердым телом или жидкостью какого-либо вещества из окружающей среды. Существуют различные разновидности сорбции – адсорбция¹, абсорбция², хемосорбция³, десорбция⁴.

Поглощающее субстрат называют сорбентом, поглощаемое – сорбатом. Наиболее распространенные сорбенты – активные угли, силикагель.

¹ **адсорбция** – когда в сорбции принимает участие поверхность твердого вещества.

² **абсорбция** – поглощение вещества всем объемом сорбента.

³ **хемосорбция** – поглощение газа, при котором имеет место химическое взаимодействие между поглостителем и газом.

⁴ **десорбция** – выделение вещества из твердого сорбента, т.е. процесс обратной сорбции.

По такой же схеме выделяют эритромицин, бадитрацин и др. антибиотики.

Если необходимо выделить нативные белковые молекулы (ферменты), то используют не смешивающиеся водные системы. Примером может служить система декстран-полиэтиленгликоль (ПЭГ- 6000). В настоящее время в промышленности применяются противоточные аппараты (экстракторы) непрерывного действия, которые обеспечивают высокую производительность.

Для образования двух водных фаз используют водные растворы двух несовместимых полимеров. Образующиеся фазы содержат не менее 75 % воды. Из многих исследованных систем лучшей оказалась система ПЭГ-декстран. Для этой системы коэффициент распределения $[K = e(\text{ПЭГ-фаза}) / (\text{декстрановая фаза})]$ для большого количества ферментов лежит в диапазоне от 1,0 до 3,7. Для изменения коэффициента распределения в систему вносят разнообразные соли. Следовательно, изменяя состав, можно регулировать коэффициент распределения.

Сорбция

При выделении метаболитов применяют и такой способ как сорбцию. Из сорбентов наиболее известными являются активированный древесный уголь, силикагель, целлюлоза. Один из главных критериев сорбентов – это большая удельная поверхность. В качестве примера можно привести активированный уголь, у которого 1 г имеет поверхность от 600 до 1700 м², чем и объясняется его высокая сорбционная способность.

Сорбция используется при выделении аминогликозного антибиотика – стрептомицина.

Сорбционный метод можно использовать в нескольких разновидностях. Так, сорбенты могут использоваться в виде хроматографических колонок или вноситься непосредственно в культуральную среду. При внесении сорбента в среду он связывает вещества из среды, после этого сорбент с веществом легко может быть собран фильтрацией или центрифугированием. Затем проводится десорбция – отмывка метаболита от сорбента. Это удобный способ выделения и концентрирования целевых продуктов, представленных высокомолекулярными веществами.

Наиболее распространенный способ сорбции основан на использовании ионообменников, которые представляют собой диссоциирующие ионные пары, при этом один из ионов иммобилизован. Роль ионообменников могут выполнять и растворимые полимеры, образующие водные двухфазные системы. Для этого используют производные полиэтиленгликоля, которые обладают катионо- или анионообменными свойствами.

Молекулярные целевые продукты могут быть осаждены из культуральной среды с помощью различных реагентов – осадителей. Такие безреагентные способы осаждения как центрифугирование или сепарирование в данном случае не подходят, так как мы

Белок	Изоэлектрическая точка
Яичный альбумин	4,6
Сывороточный альбумин	4,9
Уреаза	5,0
β-лактоглобулин	5,2
γ-глобулин	6,0
Гемоглобин	6,8
Миоглобин	7,0
Хемотрипсин	9,5
Цитохром С	10,6
Лизоцим	11,0

Табл. 67. Изоэлектрическая точка некоторых белков.

имеем дело с частицами слишком малой массы. При использовании осадителей, выделенные молекулы формируют достаточно большие агрегаты, которые относительно легко могут быть осаждены традиционными методами осаждения.

Белки из культуральной среды выделяют высаливанием, изменением рН до изоэлектрической точки, снижением диэлектрической проницаемости раствора, снижением степени сольватации белковых молекул.

Методы осаждения белков сводятся к таким изменениям условий, при которых нарушается устойчивость исходной термодинамической стабильности раствора белка, что сопровождается осаждением белка. К методам, приводящим к уменьшению растворимости белка, относят: 1) добавление концентрированных растворов солей (высаливание); 2) изменение рН до такой величины, при которой заряд молекулы равен нулю (табл. 67); 3) снижение диэлектрической проницаемости среды, что сопровождается усилением электростатических взаимодействий между молекулами в растворе и выпадением их в осадок; 4) добавление неионных полимеров, которые снижают степень сольватации белков; 5) добавление солей многозарядных ионов металлов, обратимо осаждающих белки.

При высаливании чаще всего используют концентрированные растворы солей. Еще в конце XIX в. было показано, что различные катионы и анионы могут быть расположены в ряды Гофмейстера по высаливающей способности (табл. 68).

Традиционно чаще всего в качестве высаливающего агента применяется сульфат аммония, однако как видно из представленных рядов Гофмейстера он может быть заменен на другие ионы.

В том случае, если из культуральной среды необходимо осадить полисахариды (декстран, ксантан и др.), то это делают с использованием этанола или ацетона, а альгинаты осаждают хлористым кальцием, который формирует гели.

Хроматографические методы выделения

При концентрировании и выделении отдельных молекул может использоваться и хроматографический метод разделения, который применяется на этапах очистки (рис.198).

Варианты хроматографических методов разделения очень разнообразны: гель-фильтрация, ионообменная хроматография, афинная хроматография и др.

Гель-фильтрация применяется для разделения смесей различающихся по молекулярной массе. Небольшие по размеру молекулы способны проникать в гель, и поэтому они медленнее проходят через колонку, тогда как большие молекулы выходят из колонки первыми.

Следовательно, эффект разделения в этом случае основан на разнице времени прохождения разделяемых веществ через колонку.

Ряды Гофмейстера:

катионы: Th^{4+} , Al^{3+} , H^{2+} ,

Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cs^+ ,

Rb^+ , NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ ,

анионы: $-\text{OOC}-\text{CH}_2-$

$\text{C}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COO}^-$

$-\text{OOC}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COO}^-$,

F^- , IO_3^- , H_2PO_4^- , CH_3COO^- ,

Br_3^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , CNS^-

Табл. 68. Ряды Гофмейстера, которые демонстрируют возрастающую способность катионов и анионов осаждасть белки.

Хроматография (от греческого *chromatos* – цвет и *графия*) – метод разделения смесей, основанный на различном распределении их компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент). Разработаны различные способы хроматографии. В зависимости от агрегационного состояния элюента различают газовую и жидкостную хроматографию. В зависимости от формы проведения различают: колонную, тонкослойную, бумажную хроматографию.

При ионообменной хроматографии молекулы связываются с носителем за счет электростатических взаимодействий. В последующем осуществляют элюцию белков (или других молекул) используя буферные растворы с возрастающей ионной силой. Первыми из колонки выходят белки слабо связанные с сорбентами (в случае сорбента часто используется катионообменник – карбоксиметилцеллюлоза).

Аффинная хроматография (хроматография по сродству) основана на использовании высокой специфичности связывания природных соединений, в частности антитело-антиген, фермент-субстрат, лектин-рецептор. Этот вид хроматографии используется для выделения моноклональных антител или отдельных ферментов.

Так, для выделения из клеток фермента ДНК-полимеразы (обеспечивает синтез ДНК) методом аффинной хроматографии готовят носитель (агарозу, сефарозу или другой) так, что к носителю химически «привязывают» ингибитор ДНК-полимеразы. Пропускание многокомпонентного раствора через такую колонку приводит к тому, что с неподвижной фазой колонки высокоспецифично свяжутся только молекулы ДНК-полимеразы (они специфически связываются с ингибитором ДНК-полимеразы). Все оставшиеся молекулы пройдут через колонку свободно (они не связаны с ингибитором). После чего связанный фермент (ДНК-полимераза) с колонкой элюируют подходящим агентом и получают чистый продукт.

После разработки технологии получения моноклональных антител аффинная хроматография начала интенсивно развиваться. В настоящее время можно получить моноклональные антитела к любому белку. На основе моноклональных антител можно сделать хроматографическую колонку и выделить в чистом виде соответствующий белок, к которому получены антитела.

Если в традиционных методах хроматографии разделение веществ осуществляется на стадии десорбции путем изменения рН, концентрации солей, то в случае аффинной хроматографии разделение молекул осуществляется на стадии адсорбции – связывания с носителем. В этом смысле аффинная хроматография приближается к методу сорбции. Из этого следует, что в аффинной хроматографии необходимо проводить связывание до насыщения связывающего агента.

Применение аффинной хроматографии целесообразно в случае работы с дорогими и небольшими по объему образцами, т. е. уникальными препаратами.

При концентрировании и выделении низкомолекулярных веществ используют мембранную фильтрацию или ультрафильтрацию. В настоящее время ведутся интенсивные разработки в мембранных технологиях, и этот способ является достаточно перспективным не только в биотехнологии. Он основан на фильтрации многокомпонентных смесей через полимерные мембраны со специально созданным размером пор. Используя последовательно

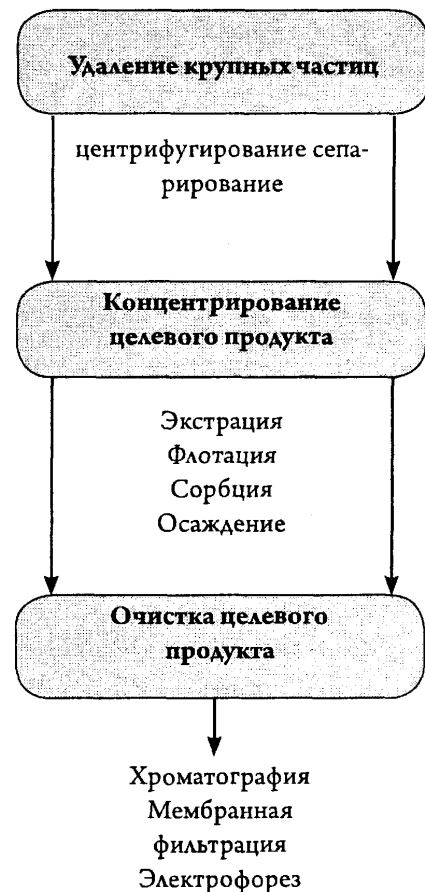


Рис. 198. Основные стадии концентрирования и очистки целевых молекулярных продуктов.

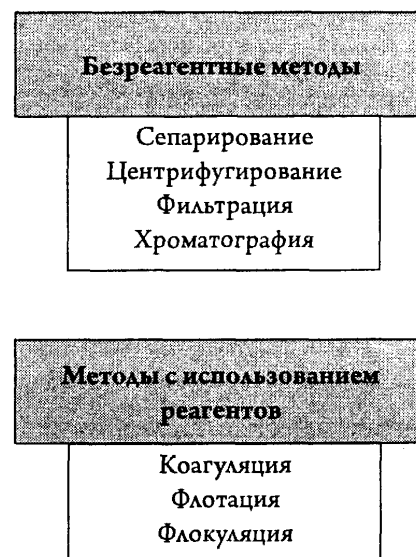


Рис. 199. Группы методов концентрирования и очистки целевого продукта.

различные типы мембран с диаметром пор от 5 до 60 нм можно разделить смеси на отдельные компоненты. Учитывая то, что полимеры различаются по своим размерам, можно подобрать такие типы мембран, которые позволяют выделить тот или иной тип молекул.

При мембранной фильтрации может формироваться поляризационный примембранный слой, который будет формировать сопротивление массопереносу.

Для снятия этого сопротивления прибегают к регуляции давления в приемнике, что ускоряет процесс фильтрации.

Мембранная фильтрация находит применение в технологии очистки аминокислот, интерферона, гормона роста и других биологически активных веществ.

Все способы концентрирования и выделения целевых продуктов могут быть разделены на две группы (рис.199): безреагентные (сепарирование, центрифугирование, фильтрация, хроматография) и с использованием реагентов (коагуляция, флокуляция, флотация) – реагентные методы.

Безреагентные методы позволяют обеспечить чистоту получаемого целевого продукта. Однако эффективность и затраты на использование этих методов не всегда удовлетворяют производителей. Фильтрование часто имеет низкую производительность, что связано с необходимостью очистки фильтров от фильтрующего материала.

Реагентные методы нашли достаточно широкое применение в различных отраслях, где используется концентрирование и обезвреживание сред, что связано с высокой эффективностью, простотой используемого оборудования. Однако это возможно лишь при наличии высокоэффективных нетоксичных реагентов.

В заключение отметим, что большую часть целевых продуктов в биотехнологии получают в результате культивирования продуцентов в жидких средах. Независимо от того, где содержится целевой продукт: в клеточной биомассе или в растворе как экзосметаболит, необходимым этапом получения готового продукта является концентрирование продуктов содержащихся в культуральной среде. Особенностью культуральной среды является относительно низкое содержание целевого продукта (от 0,1 до 10 %), первым этапом выделения и очистки целевого продукта является концентрирование содержащихся в ней веществ.

В настоящее время для концентрирования клеточных суспензий используют безреагентные методы – сепарирование, фильтрование, центрифугирование, мембранные технологии, флотацию и реагентные методы – осаждение, флокуляцию, хроматографию, флотацию.

Безреагентные и реагентные методы имеют недостатки. Безреагентные методы достаточно трудоемки, не всегда высокоэффективны и достаточно энергозатратны.

Реагентные методы более эффективны, однако не всегда позволяют получить высокочистые и безвредные целевые продукты (могут обладать токсичностью).



Рис. 200. Общие стадии очистки и выделение целевых продуктов из культуральной среды и биомассы клеток.

Наряду с этим, использование флокулянтов может обеспечить высокую эффективность, экономичность, малый расход реагента, возможность получения осадка с заданными характеристиками, что позволяет эффективнее использовать и безреагентные методы, если они используются в удачном сочетании.

Подбор методов концентрирования зависит от характера конкретной задачи, наиболее эффективным является сочетание различных методов концентрирования и выделения продукта.

Очистка целевого продукта

Хотя целевые продукты в биотехнологии достаточно разнообразны: клетки, очищенные молекулы, биосенсоры, они представлены двумя разновидностями – биомассой клеток и выделенными метаболитами или экзометаболизмом клеток. При получении этих целевых продуктов используются различные технические приемы.

Когда целевым продуктом являются клетки, то говорят о получении биомассы клеток. В таком случае, задача сводится к отделению клеток от культуральной среды (рис. 200). Клетки концентрируют одним из указанных способов (сепарированием, центрифугированием, фильтрацией и др.), а культуральная среда с ее содержанием в случае выделения экзометаболизмов обрабатывается по указанной схеме и из нее получают целевые продукты в виде экзометаболизмов (рис. 200). В том случае, если культуральная среда не используется, то тогда она является побочным продуктом. В зависимости от характеристики клеток используют различные технологические режимы очистки.

Выбор способа очистки клеточной биомассы зависит от характеристики клеток (размер, масса, концентрация и др.), характеристики культуральной среды (вязкость, компоненты среды и их концентрации), области применения целевого продукта (корм животных, пища людей, медицина или дальнейшая переработка) и рентабельности (рис. 201).

Так, получение хлебопекарных дрожжей – сахаромицетов на основе углеводов концентрируют флотацией (они легко флотируют), после этого клетки собирают фильтрованием на барабанных вакуум-фильтрах. Биомассу, собранную с фильтра, прессуют и получают способную к сбразиванию живую биомассу клеток.

В том случае, если необходимо очистить биомассу дрожжей, которую выращивают на метаноле, то первым этапом очистки является сепарация. Так как клетки различаются между собой по массе и размеру, чтобы получить очистку 80-90 % необходимо использовать две-три ступени сепарации.

Задача очистки достаточно сильно усложняется, если необходимо выделить мелкие клетки бактерий или их споры. В таких случаях содержимое реактора упаривают при условиях, которые обеспечивают высокую биологическую сохранность клеток (низкая температура и вакуум).

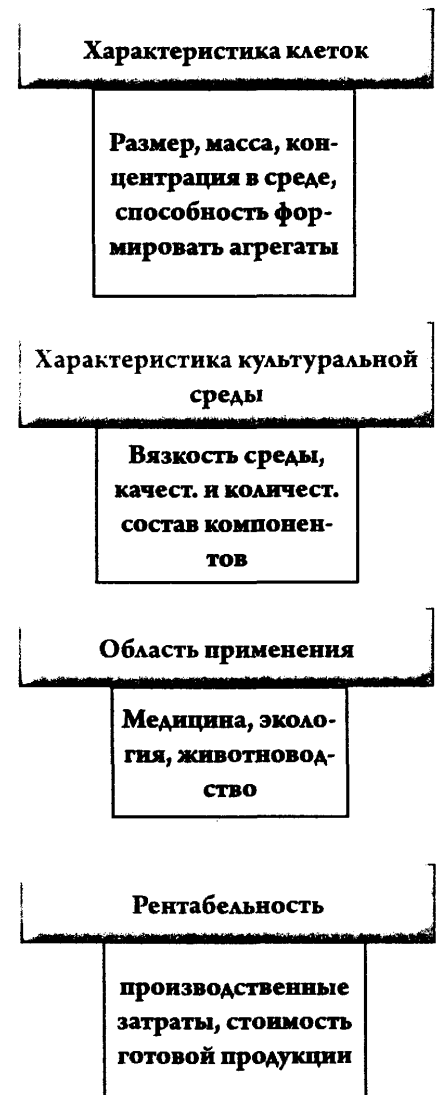


Рис. 201. Некоторые особенности, влияющие на выбор технологии.

Однако при этом в состав целевого продукта входят и сопутствующие продукты, содержащиеся в культуральной среде.

Необходимо отметить, что сегодня по-прежнему остается актуальной разработка новых способов очистки биомассы клеток продуцентов.

Задача получения и очистки целевого продукта в виде отдельных метаболитов значительно сложнее, чем получение биомассы.

При выделении целевого продукта из культуральной среды (экзометаболиты) прежде всего удаляют клетки-продуценты. Для этого используют сепарирование, фильтрацию или флотацию. Из очищенной культуральной среды извлекают целевой продукт. В зависимости от его свойств и характеристик используют методы осаждения (используя для этого спирты, органические растворители или высаливая, добавляя сульфат натрия или другие соли) или хроматографии. При получении метаболитов в качестве целевого продукта используют несколько стадий очистки, что позволяет получить конечный продукт в чистом виде. Количество стадий и способы очистки индивидуальны для каждого продукта.

Так при получении аминокислот, целевой продукт можно получить только путем кристаллизации из растворов, которые предварительно очищают, используя хроматографию (катионообменную с подбором рН среды).

В случае получения ферментов (которые содержатся в культуральной среде) чаще всего используют экстракцию, осаждение из раствора, выщелачивание, переосаждение и лиофилизацию.

В последнее время чаще начинает использоваться ультрафильтрация через мембраны с необходимым размером пор. Используя серию последовательных фильтраций через поры различного диаметра можно добиться высокой степени чистоты целевого продукта.

В настоящее время разрабатывается новый метод выделения метаболитов из жидких сред, который основан на комбинированном применении растворимых полимеров с функциональными группами и мембранной фильтрации. Суть этого подхода в том, что растворимый полимер обратимо связывается с низкомолекулярными компонентами раствора, которые являются целевыми продуктами (аминокислоты, антибиотики). Полученный комплекс легко концентрируется с помощью мембранной фильтрации, а после этого целевой продукт освобождается от полимера.

Достаточно часто в качестве целевого продукта используют эндометаболиты, т.е. метаболиты клетки. В качестве примера можно привести гормоны, интерферон и другие биологически активные вещества, которые получают технологией рекомбинантных ДНК.

Первым этапом в выделении метаболитов клетки является очистка клеток от среды и разрушение клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы). Для этого используются различные методы: механические, химические, ферментативные или комбинированные. Механические методы основаны на использовании гомогенизации, ультразвуковой обработки, последовательного замораживания – оттаивания.

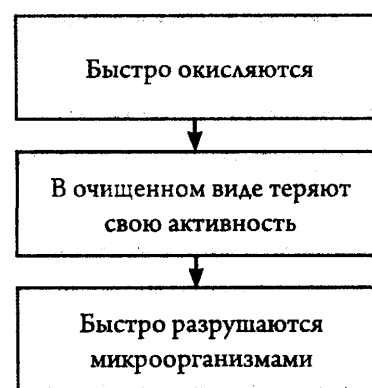


Рис. 202. Некоторые причины потери биологической активности продуктами биологического происхождения.

Химические методы предполагают использование различных растворителей, в частности детергентов, а ферментативные – использование ферментов, разрушающих оболочку клеток. После разрушения клеток выделяют необходимые метаболиты, используя тот же арсенал методов, который используют при выделении экзометаболитов.

Однако при необходимости получения метаболитов отвечающих по чистоте фармакопейным препаратам используют аффинную хроматографию на основе моноклональных антител.

Промышленное производство моноклональных антител (гибридомная технология) дало мощный толчок развитию производства чистых препаратов, включая и технологию рекомбинантных ДНК. Этот подход позволяет в один этап получить чистый фармакопейный продукт.

В заключение отметим, что целевой продукт может быть представлен: биомассой клеток; экзометаболитами или эндометаболитами. В зависимости от свойств целевого продукта используют различные способы концентрирования и очистки. Количество способов и стадий очистки может быть различно. Это определяется свойствами продукта, требованиями, предъявляемыми к целевому продукту, и областью его применения. Для каждого целевого продукта разрабатывают свое сочетание оптимальных методов очистки продукта. Так как все продукты биотехнологического производства имеют ряд особенностей (рис. 202) и не стабильны, то возникает необходимость стабилизации целевого продукта или сохранения его свойств во времени.

Стабилизация и фасовка целевого продукта

Как уже отмечалось, требования к целевому продукту зависят от области применения. Так, если биомасса используется в животноводстве в качестве витаминно-белковой добавки, то она, как правило, высушивается, фасуется в мешки и поставляется заказчику.

Если целевые продукты используются в качестве пищевых добавок, то они должны проходить микробиологический контроль, оценку специфической питательной ценности и обоснование сроков хранения. Для увеличения сроков хранения, а они определяют временем сохранности основных свойств продукта, разрабатываются способы стабилизации. Стабилизация целевого продукта должна решать несколько задач (рис. 203).

Наиболее распространенным способом стабилизации целевого продукта является его кристаллизация и сушка.

В настоящее время существует большое количество разнообразных сушильных агрегатов, что позволяет выбрать экономически обоснованную систему сушки. В биотехнологии наиболее широкое применение находят распылительные и вакуумные системы сушки целевого продукта. Это объясняется тем, что в биотехнологии приходится высушивать продукты из разбавленных растворов и использовать относительно низкую температуру разогрева.

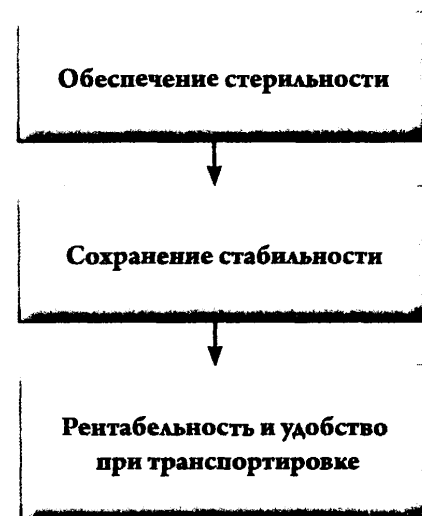


Рис. 203. Основные задачи, которые решаются при стабилизации биотехнологических продуктов.

В том случае, если целевой продукт должен храниться в растворе, то все процессы его очистки проводят со строгим соблюдением асептических условий и с включением в его состав антиокислителей, а в ряде случаев и консервантов. Однако их использование должно быть обоснованным и безвредным. Все этапы, как и стадия стабилизации биотехнологических процессов, выполняются согласно утвержденным технологическим условиям.

Еще одним способом стабилизации биологических продуктов является процесс замораживания. Однако для ряда белков была показана потеря активности после замораживания-оттаивания. Было показано, что замораживание-оттаивание ведет к денатурации белков. Еще в 50-х годах XX столетия было показано, что существуют вещества, которые могут обеспечить стабилизацию белков и тем самым сохранить их структуру после замораживания-оттаивания. Эти вещества были названы криопротекторами. В качестве криопротекторов используют глицерин, диметилсульфоксид, глюкозу, сахарозу, лактозу и др.

Необходимо отметить, что стабилизация биополимеров в водных растворах зависит от структуры воды.

В качестве примера можно привести стабилизирующий эффект сульфата аммония – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Сульфат аммония, который осуществляя высаливание белков (формирование осадка) обеспечивал длительную сохранность иммуноглобулинов в виде паст при 4 °С.

Стабилизация и консервирование биотехнологических продуктов наряду с преимуществами имеет и ряд недостатков:

1 – высокая стоимость содержания запасов замороженных продуктов; 2 – высокий риск потери всего материала при выходе из строя холодильных агрегатов; 3 – высокая стоимость транспортировки в замороженном состоянии этих продуктов (рис. 204).

Еще одним подходом стабилизации биологических продуктов является процедура замораживания-высушивания.

Замораживание-высушивание, или сублимационная сушка является одним из наиболее применяемых методов стабилизации фармацевтических препаратов, диагностических реагентов, которые характеризуются низкой термостабильностью (т.е. устойчивостью к высокой температуре).

Этот способ стабилизации имеет ряд преимуществ перед замораживанием-оттаиванием (рис. 205):

1. Позволяет обеспечить очень низкое содержание влаги и тем самым высокую стабильность продукта.

2. Так как после сушки продукт запечатывают в контейнер в вакууме или в среде инертного газа, это сводит до минимума окислительные процессы.

Наряду с этим не все продукты могут быть подвергнуты сублимационной сушке, так как в ряде случаев в процессе охлаждения образуется поверхностная пленка, тормозящая процесс сублимации.

Процесс упаковки готовой продукции должен обеспечивать сохранение стерильности, стабильности, надежности и удобства при транспортировке.

Криопротекторы – вещества, которые обеспечивают сохранение структуры после замораживания и, как следствие, активности соединений.

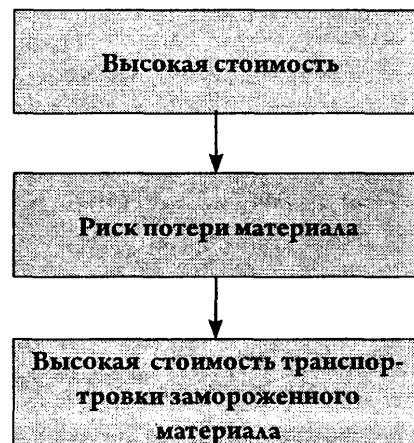


Рис. 204. Некоторые недостатки криостабилизации биологических продуктов.

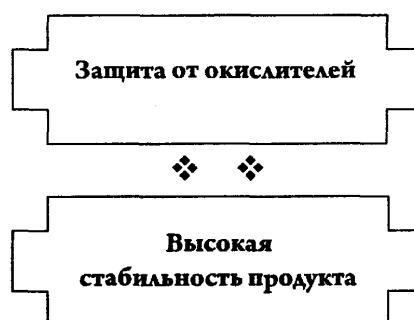


Рис. 205. Преимущества использования сублимационной сушки биопродуктов.

Рассмотрим несколько примеров стабилизации биотехнологических продуктов.

Инсулин сохраняет свою активность при хранении в водном растворе ацетата натрия, поэтому нет необходимости его хранения в замороженном состоянии. В то же время гормон роста человека (ГРЧ) не стабилен в жидком состоянии и для него был разработан способ замораживания-высушивания. Для повышения стабильности в раствор ГРЧ вводится манитол 0,5 % концентрации на 25 мМ солевом растворе, замораживается и высушивается из замороженного состояния.

Следовательно, процедура стабилизации биологических продуктов требует подбора особых методов для каждого продукта с учетом комплекса специфических факторов. В настоящее время ведутся новые исследования и разработки стабилизации и хранения целевых продуктов.

Глава IV

Этапы испытания новых продуктов биотехнологического производства и охрана природной среды

Требования к биотехнологическому производству и характеристика продуктов биотехнологии

В различных странах существуют свои государственные требования, предъявляемые к производству биологических продуктов, предназначенных для применения людьми или в сельском хозяйстве. Строгое соблюдение этих требований должно обеспечить, прежде всего, безвредность полученных продуктов и охрану окружающей среды. Несмотря на существующие различия в требованиях в разных государствах, эти требования могут быть сведены к нескольким общим положениям (рис. 206):

1 - производственные помещения должны удовлетворять санитарно-гигиеническим нормам, которые обеспечивают соблюдение стерильности в процессе производства; наличие устройств для уничтожения жидких и твердых отходов, кондиционирования воздуха, регулирования температуры и влажности в помещениях. Наличие отдельных специализированных помещений для переработки и хранения готовой продукции;

2 - все оборудование должно легко стерилизоваться. Должно регулярно проводится техническое обслуживание и контроль на стерильность в процессе производства;

3 - качество продукции должно контролироваться на всех этапах производства. Целевые продукты должны проходить сертификацию, подтверждающую их соответствие техническим условиям и пригодность для применения с указанием сроков и условий хранения;

4 - производственный персонал должен быть компетентным, строго выполнять все производственные процессы и инструкции и быть знакомым с уровнем ответственности.

Качество биотехнологической продукции и экологическая безопасность производства могут быть обеспечены только тогда, когда соблюдение принятых стандартов будет осуществляться на всех этапах производства, от сырья до получения целевого продукта.

Продукты биотехнологического производства должны удовлетворять следующим основным характеристикам (рис. 207):

- 1) обеспечивать специфический биологический эффект;
- 2) не иметь побочных эффектов;
- 3) быть безвредными (т.е. не токсичными, не канцерогенными, не мутагенными и не тератогенными);
- 4) не иметь генетических последствий, т. е. не вызывать неконтролируемые структурные изменения генома.

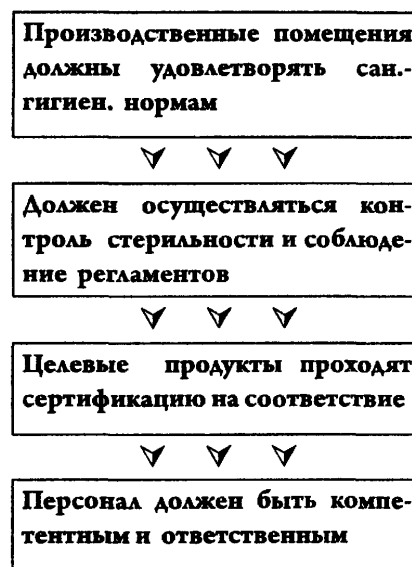


Рис. 206. Основные требования к производству биотехнологических продуктов.

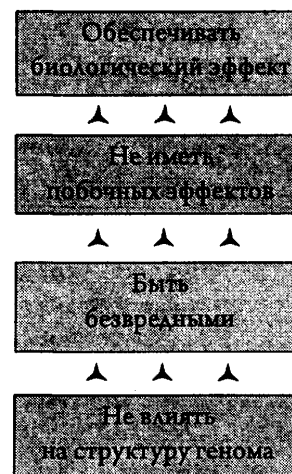


Рис. 207. Характеристика биотехнологических продуктов.

Для выполнения этих требований на всех этапах производства осуществляется строгий контроль производственных характеристик. Это позволяет свести до минимума получение целевого продукта, который не удовлетворял бы установленным регламентом требований.

Для биологических систем характерна высокая вариабельность метаболизма, что может приводить к уменьшению выхода или изменению свойств целевого продукта, что не всегда удается строго контролировать. Эти особенности и выдвигают ряд специфических проблем контроля и управления качеством как в процессе производства, так и при оценке готового целевого продукта.

Испытание целевого продукта

Мы не будем останавливаться на контроле этапов производства, они могут иметь свои специфические особенности в зависимости от производства. Рассмотрим наиболее общие подходы контроля целевого продукта.

Необходимо отметить, что продукты, полученные методами биотехнологии, подвергаются испытаниям, применяемым к фармацевтическим продуктам и дополнительным специфическим испытаниям, с которыми мы и познакомимся.

Методы испытания можно разделить на три группы: 1) физико-химические; 2) биологические; 3) новые недавно внедренные в практику методы (использование биосенсоров, зондов и др.).

Физико-химические методы оценки не позволяют осуществлять идентификацию целевых продуктов, однако позволяют получить общую характеристику продукта, что необходимо для сертификации. Наиболее часто применяющиеся тесты: это оценка плотности, вязкости, остаточной влажности, величины рН и спектра поглощения в УФ или видимой области и биохимическая оценка (рис. 208). Характер биохимической оценки зависит от особенностей целевого продукта и его состава. Это может быть ферментативная активность или другая специфическая активность, молекулярная масса, температура денатурации и др. условия.

Биологические методы оценки целевого продукта направлены на доказательство: 1 - отсутствия контаминантов; 2 - идентичности или подлинности продуктов; 3 - безвредности; 4 - биологической активности.

Поэтому оценку целевого продукта биотехнологического производства, как и фармацевтических препаратов, осуществляют по 4-м указанным категориям (рис. 209).

Новые методы оценки продуктов направлены на получение тех же характеристик биологической активности, однако для этого используют не классические методы биохимии, а современные методы клеточной биологии и компьютерные технологии.

Оценка продуктов на отсутствие контаминантов

Биологические продукты не должны содержать в своем составе каких-либо сопутствующих микроорганизмов или продуктов их

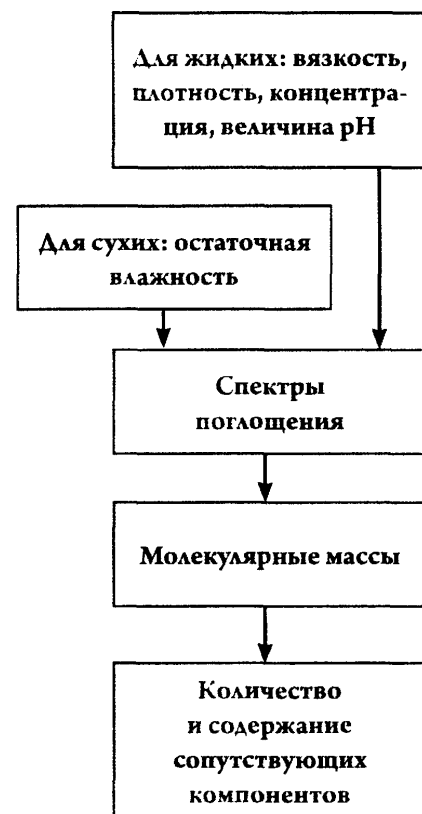


Рис. 208. Некоторые физико-химические характеристики целевых продуктов.

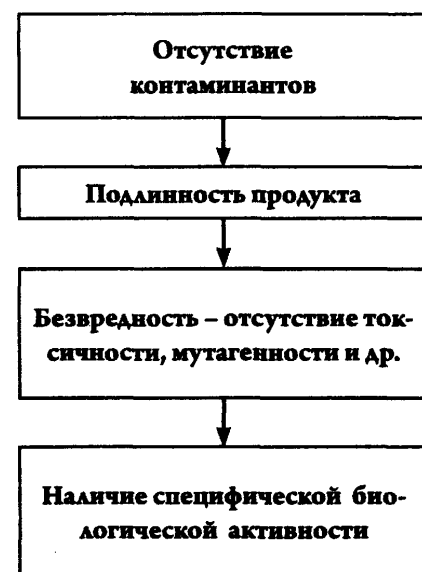


Рис. 209. Основные показатели биологических методов оценки целевых продуктов.

Зонд – соединение, меченное тем или иным способом и используемое для выявления других молекул в смеси.

жизнедеятельности, которые могут модифицировать или устранять активность целевого продукта и в этом смысле необходимо исходить из того, что используемый продукт, прежде всего, безвреден для людей и животных. Когда говорят о безвредности продукта, то подразумевают, что он не вызывает никаких патологий при его использовании.

Среди сопутствующих микроорганизмов в продуктах могут содержаться бактерии, грибы, вирусы, микоплазмы, которые вторично инфицировали целевой продукт. Учитывая то, что многие продукты биотехнологии являются питательной средой для микроорганизмов, они интенсивно могут на них размножаться. Этим и объясняется необходимость строгого контроля на контаминанты готовой биотехнологической продукции.

Испытаниям подвергается каждая новая партия продуктов. Партией называют то количество продукта, которое получено в одном технологическом цикле. Испытания на отсутствие контаминантов должны обеспечивать гарантию отсутствия сопутствующих бактерий, вирусов и микоплазм. В каждой стране существуют свои стандарты и требования к этим испытаниям. Для обеспечения стерильности получаемых продуктов необходимо строго выполнять ряд требований (рис. 210).

В зависимости от объема партии целевого продукта испытания проводятся на 3-5 случайно выбранных образцах продукта. Для того чтобы сделать правильное заключение необходимо осуществить серию испытаний, в зависимости от получаемых результатов. Если параллельные испытания 3-4 образцов одной партии близки по значениям результатов, то ограничиваются этим количеством испытаний. В том же случае, если полученные значения сильно отличаются друг от друга и от принятого стандарта, то проводят несколько дополнительных серий испытаний.

Суть испытаний сводится к тому, чтобы высеять образцы на специальные питательные среды для бактерий, обеспечить им рост и убедиться, что в оптимальных условиях для роста бактерий они отсутствуют. В таком случае делают заключение об отсутствии контаминантов. Существуют два основных методических подхода решения этого вопроса: 1) испытуемую пробу фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и помещают его в условия, которые обеспечивают рост микроорганизмов; 2) к испытуемым пробам прибавляют питательный раствор для микроорганизмов в различных соотношениях 1:10 – 1:100 и инкубируют их или же переносят на агаризованную среду с последующим контролем роста бактерий. Пример метода оценки бактериальной обсемененности продукта представлен в таблице 68.

Биологические продукты могут быть инфицированы микоплазмами. Выявить микоплазмы значительно труднее, чем бактерии. Для этого используют специальные плотные и жидкие питательные среды. В настоящее время разработано достаточно большое количество методов оценки наличия микоплазм.

Технологическую систему нельзя считать способной работать в соответствии с требованиями асептики и, следовательно,

Партия продукции – это готовая продукция, которая получена из одних продуцентов за один технологический цикл. Каждая партия должна проходить оценку на соответствие.

Проверять условия обеспечения стерильности аппаратуры до ее применения



При работе проводить манипуляции в «чистой» рабочей среде



Регулярно осуществлять проверку продукции на наличие микробных загрязнений

Рис. 210. Условия, которые необходимо соблюдать для обеспечения стерильности биотехнологических продуктов.

1. Приготовление навесок в стерильных условиях. 10 г испытуемого продукта суспендируем в 10 мл стерильного 0,9 % NaCl.
2. Готовят серию разведений полученного раствора (1 мл раствора + 9 мл стерильного 0,9 % NaCl); Конечная концентрация разведения 1 г в мл, 0,1 г в мл, 0,01 г в мл, 0,001 г в мл и 0,0001 г в мл.
3. Пересадка на различные питательные среды: среда Вильсона-Блера (для учета сульфидредуцирующих бактерий), среда Сабуро для учета колоний плесеней), магниевая среда (для учета колоний сальмонелл).
4. Культивируют полученные образцы при 37 °С 24 ч для получения накопительных культур.
5. После получения накопительных культур проводят пересадки и культивируют их при 24 °С или 37 °С
6. Культивируют 1-5 суток в зависимости от вида бактерий и проводят учет колоний.

Табл. 68. Метод оценки бактериальной обсемененности биотехнологических продуктов.

выпускать стерильные продукты, пока она не пройдет предварительные физические и микробиологические испытания с положительными результатами. Подтверждение о соответствии системы асептики осуществляется не реже одного раза в год.

При испытании технических систем на асептичность необходимо соблюдать ряд условий (рис. 211).

Наиболее надежные результаты по обеспечению стерильности можно получить, используя боксы с ламинарными потоками стерильного воздуха. В зонах, где осуществляется работа в стерильных условиях, необходимо применять стерильную одежду, правильно удалять использованное оборудование, не допускать проливания и разбрызгивания жидкости.

В том случае, если биотехнологические продукты используются в качестве фармацевтических препаратов или вакцин, то необходимо убедиться, что в продукте присутствует лишь один вакцинный вирус, или же содержащиеся вирусы полностью инактивированы.

Для решения этой задачи можно использовать несколько подходов:

1 – нейтрализация вакцинного вируса моноспецифической гипериммунной сывороткой и инокуляция полученным материалом культур клеток, которые подобны по показателю специфической восприимчивости.

2 – испытание на потенциальное присутствие нейрпатогенных агентов.

3 – выявление вирусной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.

Для проверки полноты инактивации образцы инокулируют животным или добавляют в культуру клеток, которые чувствительны к данному вирусу. При этом оценивают отсутствие патологических симптомов у животных, или цитотоксических эффектов клеток.

Оценка идентичности или подлинности биотехнологических продуктов

Подлинность, или идентичность продукта осуществляется по разработанным и утвержденным методикам для конкретных продуктов. Целью данного этапа является доказательство соответствия полученного в новом технологическом цикле продукта принятому стандарту.

В том случае, если целевым продуктом является индивидуальное, очищенное соединение, то идентичность каждой партии устанавливается простой проверкой наличия в ней молекул данного вещества и их количества. Если это подтверждено, то практически нет сомнений относительно биологической активности данного продукта. Однако чаще биотехнологические продукты имеют многокомпонентный, достаточно сложный состав и их соответствие принятому стандарту осуществляют по определению ряда физико-химических характеристик и их биологическому

Аппаратура должна быть оснащена регистрацией температуры во время стерилизации внутри оборудования

Используемая аппаратура должна обеспечивать необходимый уровень точности измерений

Рис. 211. Условия, обеспечивающие эффективность стерилизации.

Технические условия (ТУ) являются нормативным документом, утвержденным метрологической службой страны и действует на ее территории. Этот документ регламентирует технические требования к выпуску продукции, требования безопасности и охраны окружающей среды, правила приемки продукции, методы контроля качества продукции, а также способы транспортировки, хранения и упаковки продукции.

действию. Биологическое действие продукта (его пищевую ценность) определяют на модельных объектах. При этом необходимо учитывать, что биологический ответ модельного объекта зависит не только от испытываемого продукта, но и от самого модельного объекта, и в этом отношении необходимы новые разработки оценки подлинности многокомпонентных биотехнологических продуктов.

Сами требования к соответствию продукта разрабатываются авторами в виде технических условий (ТУ), утверждаются метрологической службой страны и являются законом для производителя. За несоответствие готовой продукции принятому стандарту ответственность несет производитель.

Вероятно, в будущем будут разработаны новые подходы для оценки идентичности биотехнологических продуктов и контроля их качества. В ряде случаев для осуществления производственной деятельности и проведения оценки качества продукции необходимо получить лицензию.

В настоящее время важным этапом в получении качественных биотехнологических продуктов является неукоснительное соблюдение Кодекса хорошей производственной практики. Это достигается соответствующим контролем и проверкой на всех стадиях производственного этапа.

С 1979 г. в США действуют единые правила добротной лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP), которые используются во всех промышленно развитых странах при производстве и оценке пищевых добавок, фармпрепаратов, агропромышленных продуктов.

Основные задачи GLP сводятся к:

- 1) заблаговременной разработке стандартных методик проведения испытаний, или SOP (Standard operating Procedure);
- 2) определению задач руководителя в каждом виде испытаний;
- 3) строгому выполнению всех операций ответственным исполнителем;
- 4) внесению результатов выполнения всех операций в специальный протокол с датой и подписями;
- 5) к проведению в случае выполнения сложных операций двойной проверки во избежание ошибок;
- 6) к информированию руководителя о ходе всех испытаний, которые проводились;
- 7) к хранению всех данных и записей, так чтобы можно было быстро отыскать необходимую информацию;
- 8) окончательный отчет должен содержать все имеющиеся данные и их обсуждение, дату и подписи лиц подтверждающих содержание отчета;
- 9) к работе службы качественной оценки испытаний. Сотрудники этой службы должны проводить внутреннюю инспекцию в установленном порядке и давать рекомендации по совершенствованию процессов проведения испытаний.

Лицензия – документ государственного образца, который дает право на осуществление определенного вида деятельности на протяжении оговоренного срока (1, 3, 5 лет) при выполнении лицензионных условий.

Лицензионные условия – установленный законом исчерпывающий перечень организационных, квалификационных и других специальных требований, которые необходимо выполнить при внедрении новых видов хозяйственной деятельности, подлежащей лицензированию.

Орган лицензирования определяется кабинетом министров Украины.

Для обеспечения высокого качества продукции Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 1968 г. утвердила «Требования для практики качественного производства при изготовлении и контроле лекарственных веществ для фармации». Они получили название GMP (Good Manufacturing Practice).

При получении фармакопейных препаратов методами биотехнологии и их испытании руководствуются требованиями GLP и GMP.

GMP – это единая система требований по контролю качества лекарственных средств от начала переработки сырья до готовой продукции. С 1975 г. правила GMP расширены и касаются различных химических и биологических веществ, ветеринарных и медицинских препаратов.

Принятые требования постоянно совершенствуются. Так, в 1991 г. на специальной конференции по GLP в г. Москве были включены дополнения по трем частям:

1 – управление качеством в промышленном производстве лекарственных средств: философия и основные составляющие;

2 – практика качественного производства и контроль качества;

3 – дополнительные и вспомогательные направления.

Мы не будем останавливаться на рассмотрении всех положений, их достаточно много, отметим лишь то, что соблюдение правил GLP обеспечивает выпуск качественных продуктов и гарантирует благополучие потребителей.

Оценка безвредности продуктов биотехнологии

Особенности контроля безвредности пищевых продуктов и пищевых добавок

Безопасность пищевых продуктов и добавок должна быть гарантирована еще до получения лицензии, которая разрешает их введение в потребительный оборот. Международный совет по пищевой биотехнологии считает, что нет необходимости в разработке новых нормативных актов, регулирующих производство и потребление пищевых продуктов, которые получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Так как любой пищевой продукт независимо от происхождения должен пройти проверку на токсичность, микробиологическую чистоту и аллергенность. Если в результате генетических манипуляций состав утвержденных пищевых продуктов не изменяется, то он проходит традиционные испытания.

В качестве примера можно привести получение химозина с помощью рекомбинантных ДНК.

Химозин – один из ключевых ферментов сычуга жвачных животных, который гидролизует к-казеин молока и образует сыр. Для получения этого фермента, был выделен ген, который кодирует

Требования GLP учитывают при испытании веществ на такие показатели безвредности как: микробная обсемененность; пирогенность; острая, подострая и хроническая токсичность, специфическая токсичность. К ней относят канцерогенность, антигенность, мутагенность, тератогенность и эмбриотоксичность.

Аллергия – от греч. другой и действие, повышенная или измененная чувствительность организма к аллергену – веществу, вызывающему аллергию. Реакция на аллерген может протекать по немедленному или замедленному типу. Наиболее распространенная аллергическая болезнь – бронхиальная астма. Развитие аллергических реакций имеет ярко выраженный индивидуальный характер.

этот фермент и встроен в ДНК *E.coli* К-12. В результате экспрессии этого гена *E.coli* обеспечивала получение химозина в промышленных условиях.

Было принято решение – если рекомбинантный химозин идентичен природному ферменту, то какое-либо дополнительное тестирование проводить не обязательно. Методом ДНК-гибридизации и секвенированием ДНК было показано, что рекомбинантный химозин имеет такую же молекулярную массу, как и природный химозин телят, обладает такой же биологической активностью.

После этого было показано, что рекомбинантный химозин не содержит в своем составе компонентов *E. coli*, т.е. он полностью очищен от клеток *E. coli* и их компонентов. Более того, было показано, что штамм *E. coli* К-12 не токсичен и не патогенен для человека. После доказательства отсутствия токсичности препарата на животных было выдано разрешение на коммерческое использование рекомбинантного химозина.

Необходимо отметить, что внедрение новых биологических технологий ставит перед обществом новые задачи, основная из которых может быть сформулирована как поиск оптимального риска. Это связано не только с тем, что риск таится в молекулярных технологиях, но и с тем, что благодаря внедрению этих технологий мы стали осознавать, что опасности могут таиться и в продуктах, которые были получены традиционными методами.

Так, штаммы продуцентов, которые получены традиционными, а не генноинженерными технологиями, могут содержать новые вещества, которые способны проявлять патогенные свойства. Более того, различные системы очистки целевых продуктов могут приводить к изменению «свойств» продукта. Осознание этого требует проведение испытаний на безвредность по полной схеме, даже если аналог нового продукта уже применяется на практике.

Развитие новых технологий и их внедрение в практику в большой степени зависит от социально-экономических причин. Примером может служить использование соматотропина коров в животноводстве.

Еще в 30-х годах XX века было показано, что введение коровам бычьего соматотропина (БС) увеличивает удойность на 25-30 %. Так как получение природного БС достаточно дорого и обеспечить его промышленное производство невозможно, он не нашел применения в практике.

Используя современные технологии рекомбинантных ДНК, ген БС был клонирован в *E.coli*, очищен и проверен на активность. Такой рекомбинантный БС обеспечивал повышение удойности, как и природный БС на 25-30 %. Его получение в промышленных объемах было вполне реальным.

Для его практического применения в животноводстве была проверена его безопасность. Было убедительно показано, что содержание БС в молоке было не выше, чем у контрольных животных (животных, не получавших БС). Кроме того, было показано, что БС неактивен в организме человека и он не оказывал никаких

Секвенирование ДНК – метод определения нуклеотидных последовательностей ДНК. Для этого может быть использован секвенирующий гель – пластина полиакриламидного геля, которая позволяет осуществлять электрофоретическое разделение олиго- и полинуклеотидов, различающихся по одному нуклеотиду.

Столь пристальное внимание к продуктам, полученным на основе ДНК-технологии, привело к пониманию важной роли потребляемых продуктов в функционировании организма, т.е. и продукты, полученные традиционными методами, могут таить в себе не меньшую опасность, чем генетически модифицированные. Следовательно, испытанию на безвредность должны подвергаться все продукты питания.

Ущерб, наносимый заморозками, только в США составляет около 1 млрд. долларов в год. Предполагалось, что удаление гена, обеспечивающего образование кристаллов льда в клетках, повысит устойчивость этих клеток к низкой температуре. Это объяснялось тем, что формирующиеся кристаллы льда при низкой температуре разрушают мембрану клеток, что ведет к некрозу. Полевые испытания штамма бактерий, имеющих ген образования кристаллов льда, сводились к тому, способен ли модифицированный штамм бактерий при распылении на листьях растений предотвратить их повреждение при заморозках. Испытания показали, что это увеличивало устойчивость растений к низкой температуре 1 °С.

побочных эффектов. Food and Drug Administration (FDA) – ведомство, которое контролирует безопасность продуктов в США, пришло к выводу, что БС может использоваться в сельском хозяйстве.

Однако группа специалистов выступила с предложением законсервировать решение FDA, так как молочная промышленность будет монополизирована крупными корпорациями в ущерб интересам независимых мелких производителей, и более того в качестве аргумента были высказаны соображения, согласно которым гормоны, полученные генноинженерными методами, могут вызвать образование злокачественных опухолей. Однако эти аргументы не имели никаких экспериментальных подтверждений.

Многочисленные проверки продуктов полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК показали, что эти опасения сильно преувеличены и многие опасения оказываются необоснованными. Важно, чтобы требования безопасности не доходили до абсурда и не тормозили использование новых перспективных технологий.

В настоящее время очень активно обсуждается потенциальная опасность полевых испытаний генетически модифицированных организмов (ГМО).

Первые полевые испытания ГМО были проведены в 1987 г. в США, штате Калифорния. Испытывали *Pseudomonas syringae*, который лишен гена обеспечивающего образования льда в клетках этих бактерий.

Анализ результатов полевых испытаний показал, что ГМО не распространяются за пределы участка, где проводится тестирование, не передают свои гены природным микроорганизмам и проявляют сходную биологическую активность как в лаборатории, так и в полевых условиях.

Испытания ГМО проводились в США, Великобритании, Австралии и др. странах.

Сегодня можно говорить, что большинство генетически модифицированных растений не отличаются от обычных природных растений. И хотя в настоящее время в США получено разрешение на использование таких генетически модифицированных растений как кукуруза, соя, картофель и хлопок, во Франции запрещено выращивание трансгенной кукурузы. В настоящее время разрабатываются различные приемы оценки биологической активности ГМО и, вероятно, только опыт и дополнительные исследования дадут окончательный ответ о пользе и возможной опасности таких продуктов. Имеющиеся результаты указывают, что опасность сильно преувеличена.

Оценка пирогенности

Важным этапом испытания продуктов биотехнологического производства является оценка безвредности.

В показатели безвредности входят: отсутствие пирогенности; острой, подострой и хронической токсичности, а также специфическая токсичность.

ГМО – генетически модифицированными организмами называют те организмы, в генетическую систему которых встроены «чужой» для данного вида ген на основе технологии рекомбинантных ДНК.

Фармакокинетика – исследование характера распределения лекарственных препаратов в организме, особенности его превращения и выведение из организма.

Пирогенность – ответная реакция организма, выражающаяся в изменении проницаемости сосудов, которая приводит к проявлению озноба, лихорадочных состояний и повышению температуры. Пирогенность оценивают по повышению температуры тела экспериментальных животных. Пирогенной активностью чаще всего обладают бактериальные токсины и другие соединения, влияющие на секрецию гистаминов.

При определении специфической токсичности оценивают канцерогенность, антигенность, мутагенность, тератогенность, раздражение слизистых оболочек, кожи в месте введения веществ. В ряде случаев определяют фармакокинетику препаратов. Полный цикл исследований проводят при получении фармакологических препаратов.

Пирогенными называют такие реакции организма, которые приводят к секреции гистамина, изменению проницаемости сосудов и, как следствие, к ознобу и лихорадочному состоянию.

К пирогенам относятся любые вещества, которые вызывают указанные эффекты. Чаще всего пирогенами являются бактериальные эндотоксины. Известно, что липополисахариды клеточных оболочек грамотрицательных бактерий являются сильными пирогенами (10 нг оболочек на 1 кг массы тела вызывает лихорадку у людей).

Суть метода оценки на пирогенность сводится к тому, что испытуемый препарат вводится внутривенно группе кроликов и измеряется повышение температуры тела. Метод основан на том, что: 1 – пороговая доза эндотоксина из различных источников для кроликов и людей одного порядка; 2 – пороговые лихорадочные реакции для кроликов несколько ниже, чем для человека. Все это позволяет считать, что кролики являются оптимальной биологической моделью для оценки пирогенности и экстраполяции этих данных на человека.

Испытания начинаются с подготовительного этапа. За трое суток до начала испытания отбираются те животные, которые не использовались на протяжении 2-х предыдущих недель. За 18 часов, не менее, кролики переносятся в специальную бесшумную комнату. За ночь до проведения испытания у животных отбирается корм. На этом этапе за 90 мин. до инъекции испытуемого вещества измеряется температура тела животных и еще раз спустя 3 часа после инъекции испытуемого препарата. Для последующих, основных испытаний отбираются только те кролики, изменение температуры тела которых не превышало 0,6 °С.

Основные испытания проводят не менее чем на 3-х кроликах. Испытуемый образец нагревают до 38,5 °С и вводят его в ушную вену каждому кролику с интервалом 4 мин. Объем вводимого раствора не менее 0,5 мл/кг и не более 10 мл/кг.

Исходная температура каждого кролика является средней величиной из двух измерений, которые проводят с интервалом 30 мин за 40 мин до инъекции испытуемого образца. Максимальная температура каждого кролика – это наивысшая его температура, зарегистрированная в последующие 3 часа при интервалах измерений 30 мин. Реакция оценивается по разности значений между максимальной и начальной температурой для каждого кролика.

Испытуемый материал выдерживает тест на пирогенность, если суммарная реакция группы из трех кроликов не превышает 1,15 °С. Если суммарная температурная реакция превышает 2,65 °С, то материал по данному тесту не проходит. Наряду с описанным методом оценки пирогенности существуют и другие методы определения пирогенной активности веществ.

<p>Токсичность – способность некоторых химических соединений и веществ биологической природы оказывать вредное (повреждающее) действие на организм. Токсичность определяют на животных и модельных объектах.</p>

Испытания продуктов на канцерогенность

Одним из важнейших этапов оценки специфической безвредности является испытание на канцерогенность.

Канцерогенными называют те вещества, которые индуцируют образование опухолей. Исследования, проведенные за последние 20 лет, показали, что многие опухоли людей и животных вызваны химическими веществами, причем, среди них встречаются как природные, так и синтетические вещества. Оказалось, что канцерогенные вещества могут вызвать и генетические изменения (мутации), которые сохраняются в геноме в ряду поколений.

Так как для формирования опухоли требуется определенное время, то испытания на канцерогенность являются длительными, трудоемкими и очень дорогими и, к большому сожалению, недостаточно точными.

Именно этим и объясняется то, что в настоящее время ведутся разработки новых экспресс-методов оценки безвредности. Последние 10-15 лет разработаны методы испытаний, которые рассчитаны на более короткие промежутки времени и позволяющие вести скрининг канцерогенной и мутагенной активности различных веществ. Все использующиеся методы можно разделить на две группы. Тесты *in vivo*, т.е. в организме и тесты *in vitro* – в культуре клеток.

Сравнивая продукты биологического происхождения с синтетическими (химически синтезированными веществами) необходимо отметить, что в случае биологических продуктов испытание их на канцерогенность или не проводится или проводится в случае вирусных препаратов, некоторых биотоксинов. Это связано с тем, что только для них выявлена канцерогенная активность. Такая активность экспериментально показана для многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в частности: ретровирусов, герпес-вирусов и вирусов гепатита В. Так как в отношении герпес-вируса и гепатита В очень желательны вакцинации, то в связи с этим очень важна оценка канцерогенной активности.

Поскольку в биотехнологии применяются разнообразные культуры клеток, то необходимо учитывать, что в процессе культивирования они могут трансформироваться, т.е. превращаться в раковые. Первые аденовирусные вакцины были получены из клеток опухоли человека и применялись в практике более 20 лет, в настоящее время принято решение использовать в производстве вакцин только нормальные культуры клеток человека, т.е. не раковые.

Это связано с тем, что раковые клетки могут приводить к освобождению онкогенного агента, который связан с нуклеиновыми кислотами трансформированной клетки и может индуцировать онкогенез.

В связи с этим возникла необходимость жестко контролировать отсутствие трансформации нормальных клеток в культуре. Ведь в культуре клетки могут трансформироваться как спонтанно, так и вирусами.

Канцерогенность – это индукция образования опухоли. Канцерогенные вещества – это химические соединения, вызывающие при определенных условиях развитие раковых опухолей в организме. К канцерогенным веществам относятся различные классы химических соединений: полициклические углеводороды, азокрасители, ароматические амины, нитрозоамины и др. Канцерогенным эффектом обладает и ряд соединений биологического происхождения: стероидные гормоны, метаболиты триптофана и др.

Онкогенез – процесс развития опухоли, от *onkos* – опухоль и *генез* – происхождение, зарождение, развитие. Онкогенез – это изучение процесса превращения нормальных клеток и тканей в опухолевые. Этот процесс включает ряд предопухолевых стадий и завершается опухолевой трансформацией. Одними из индукторов онкогенеза являются онковирусы, и прежде всего РНК-содержащие вирусы. Целый ряд химических веществ способен индуцировать опухоли – их называют канцерогенными веществами. Лучше всего изучены в отношении канцерогенности полициклические углеводороды, азокрасители, ароматические амины, нитрозоамины. Канцерогенностью обладают и природные соединения – стероидные гормоны, метаболиты триптофана.

В заключение отметим, что существующие жесткие требования к оценке безвредности продуктов биотехнологии гарантируют гораздо большую безопасность по сравнению с традиционными продуктами, которые вообще не проходят никакой оценки потенциальной безвредности, а ведь они могут быть спонтанно модифицированы, ведь зачастую условия их получения не контролируются жестко, да и их особенности нам известны в меньшей степени, чем современных продуктов биотехнологии.

Этические и моральные аспекты в развитии молекулярной биотехнологии

Разработка технологии рекомбинантных ДНК, методов клонирования, культивирования и трансплантации эмбриональных клеток и, наконец, генная терапия перевели фундаментальные исследования в разряд наукоемких технологий. Этот переход фундаментальных разработок в новые технологии вызвал интерес широкой общественности к биотехнологии. И как всегда происходит в подобных революционных ситуациях, мнение общественности разделилось на несколько позиций.

Для большей части общественности новые технологии – это всегда опасно, всегда путь к катастрофе. Всякие новые разработки опасны, ведь они меняют наши взгляды, окружающую среду и таят в себе скрытую опасность. Эта часть людей в принципе против всего нового, это яркая консервативная позиция.

Другая часть людей, их, как правило, меньшинство смотрит на новые технологии, как на рог изобилия. Именно новые технологии могут обеспечить нам интенсивное развитие, решить старые проблемы, и все, кто тормозит развитие этих технологий – противники прогресса.

Есть и те, которые убеждены, что ничего нового эти технологии не несут.

Людам свойственно занимать крайние позиции в случае осознания существующих проблем, реальная же оценка всегда модифицируется неучтенными факторами. При оценке опасности или угрозы мы неизбежно сопоставляем потенциальные блага, или преимущества с затратами и возможной опасностью. Мы должны понимать, что эти оценки всегда условны и не обеспечивают точного прогноза.

Суть возникшей проблемы в том, что современная молекулярная биология открыла новые возможности изучения генетических систем, получения новых продуктов биологического происхождения и проведения генной терапии. А это может в будущем повлиять на все стороны жизни общества, и, прежде всего, на состояние окружающей среды, развитие медицины и сельского хозяйства.

Первые серьезные высказывания в отношении потенциальной опасности рекомбинантных ДНК прозвучали в 1973 г. Тогда был наложен мораторий на некоторые исследования до принятия официальных правил работы с рекомбинантными организмами. Эксперименты можно было проводить только с теми

В настоящее время генная терапия человека считается безопасной медицинской процедурой, хотя ее эффективность пока оценивается не очень высоко. Те опасения, которые высказывались ранее, во многом сняты и это пока единственный подход к лечению генетических заболеваний. В настоящее время во многих странах ведутся разработки правил проведения испытаний в области генной терапии.

Необходимо отметить, что никакая другая область медицины не подвергалась столь глубокой и всесторонней проверке как генная терапия.

микроорганизмами, которые неспособны размножаться в природных условиях (т.е. выживают только в лаборатории на специальных средах). При этом исследователи должны были быть защищены от какой бы то ни было опасности.

В 1974-1975 гг. были разработаны правила безопасной работы с рекомбинантными ДНК. Эти правила разрабатывались при их активном обсуждении с общественностью. Несколько позже развернулась открытая дискуссия по поводу этичности проведения генетических экспериментов на человеке.

К большому сожалению, нельзя дать однозначного ответа на все этические, правовые и социальные вопросы, которые возникают в связи с возможностью применения молекулярной биотехнологии. Учитывая то, что затронутые проблемы чрезвычайно важны, принятие решения необходимо.

Первые директивы, ограничивающие применение рекомбинантных ДНК, были очень жесткими. Опыт показал, что такие жесткие директивы необоснованны, микробиологи убедили биотехнологов, что те меры безопасности, которые уже приняты при работе с патогенными микроорганизмами, удовлетворяют самым высоким требованиям безопасности.

К началу 1980 года первоначальные требования были смягчены, и технология рекомбинантных ДНК стала интенсивно развиваться.

Сегодня принято положение, согласно которому лекарственные препараты, которые получены современными молекулярно-биотехнологическими методами, подвергаются таким же испытаниям, как и препараты, полученные традиционными методами, и этого достаточно для достижения безопасности и эффективности их применения.

Хотя существовавшие ранее опасения частично сняты, ряд важных вопросов остался без ответа и, прежде всего, как контролировать производство и потребление пищевых продуктов, содержащих генетически модифицированные организмы, и как не допустить преднамеренного высвобождения генетически модифицированных организмов в окружающую среду?

Необходимо осознать, что является необходимым, а что потенциально опасным. В связи с этим у науки появляется новая роль – составление научного прогноза. Можно полагать, что это станет одной из главных задач биоэтики, которая стала активно развиваться.

Биотехнологическое производство и охрана природной среды

Особенности биотехнологических производств как потенциального источника загрязнения среды

Поскольку продуцентами биотехнологического производства являются биологические системы (клетки бактерий, водорослей, растений и животных), а целевыми продуктами – разнообразные

Термин «биоэтика» был, вероятно, впервые использован в 1971 году в названии книги онколога В.Поттера («Биоэтика: мост в будущее»). В его трактовке биоэтика означает использование биологических наук для улучшения качества жизни.

В настоящее время биоэтика представляет собой стык биологии и медицины с одной стороны и гуманитарных наук (социологии, этической философии, права и теологии), а с другой – направлений на обоснование этической ответственности науки.

В сфере биоэтики находятся такие вопросы как: изменение наследственности, экспериментирование на человеке, пересадка органов и клеток, клонирование, лечение обреченных больных, эксперименты на животных.

Очень часто понятие «природная среда» заменяется понятием «экология», что неверно.

метаболиты или биомасса, то их попадание в окружающую среду крайне нежелательно. Попадая в среду, продукты биологического происхождения могут индуцировать разнообразные аллергические реакции, оказывать сильное влияние на развитие природной микрофлоры.

Недопустимым является попадание в среду живых клеток продуцентов и особенно генетически трансформированных организмов.

Рассматривая вопросы охраны природной среды, необходимо отметить особенности биотехнологического производства – это:

1 – отсутствие твердых отходов и использование большого количества воды;

2 – загрязнители могут быть низкомолекулярными, что затрудняет их выделение и может приводить к их летучести, т.е. они могут переноситься воздухом;

3 – на производственном и завершающем этапах биотехнологического процесса могут образовываться газообразные продукты, в которых также могут содержаться вредные для природной среды соединения.

4 – существующие методы выделения целевого продукта не позволяют выделить более 85-95 % продукта, т.е. часть продукта остается в побочных продуктах и, следовательно, может быть загрязнителем природной среды;

5 – образование целевого продукта сопровождается образованием большого количества веществ, которые могут оказывать негативное влияние на природную среду (рис. 212).

Исходя из этих особенностей и опираясь на накопленный «опыт» по загрязнению среды производственными отходами, к биотехнологическим производствам предъявляются достаточно жесткие требования по очистке и утилизации отходов производства.

И это совершенно необходимо, ведь биотехнологические производства оказывают сильное влияние на окружающую среду. Рассмотрим только два аспекта этой проблемы, количество потребляемой воды в процессе производства и выброс отработанной и в разной степени загрязненной воды в среду. Для сравнения на производство 1 т нефти необходимо всего 10 л воды, на производство 1 кг бумаги – 100 л воды, на 1 кг шерстяной ткани – 600 л воды, а на производство 1 кг сухих дрожжей – 100 л воды.

Сброс загрязненной воды в природные резервуары уже привел к тому, что крупнейшие реки, озера, моря и даже океаны стали сточными резервуарами Земли. Масштабное загрязнение водной среды неминуемо приведет к гибели биосферы.

Не менее актуальной является и недопущение загрязнения воздуха продуктами биотехнологического производства. Кроме летучих веществ большую опасность представляет и накопление углекислого газа в атмосфере в результате биотехнологических производств, так как эти производства сопровождаются интенсивным выделением углекислого газа.



Рис. 212. Особенности биотехнологических производств, которые могут приводить к загрязнению окружающей среды.

На различных производственных предприятиях применяются разные системы утилизации и переработки отходов, что связано с особенностями самого производства.

Мы остановимся только на общих подходах решения задач защиты природной среды от побочных продуктов биотехнологического производства.

Как уже отмечалось, одной из особенностей биотехнологического производства является использование большого количества воды. Вода расходуется на различные нужды: приготовление культуральных сред, очистку оборудования, охлаждение и подогрев реакторов.

Оптимальным является оборотное использование воды в замкнутых циклах. Формирование замкнутых циклов позволяет исключить попадание технологической воды в природную среду и сократить расходы воды. В зависимости от особенностей производственного цикла используют различные системы очистки воды: фильтрацию, биодegradацию и ультрафильтрацию.

Возможные пути очистки сточных вод

Вода, которая была использована в технологическом цикле и выводится из цикла, называется сточной водой. В сточных водах содержится сложная смесь твердых и растворенных веществ. Как правило, эта вода поступает на очистные станции, где содержание этих веществ доводится до приемлемого уровня или осуществляется химическая трансформация вредных веществ в безвредные продукты.

Очистка сточных вод состоит из трех последовательных этапов или уровней очистки (табл. 69). В процессе первичной обработки удаляют крупные, легко осаждаемые частицы, жировые пленки. На втором этапе очистки сточных вод удаляют суспендированные твердые частицы и водорастворимые компоненты. Последний этап – третичная обработка воды предусматривает полное, а в некоторых случаях, частичное удаление всех оставшихся примесей. На последней стадии используются такие тонкие методы как электролиз, обратный осмос, фильтрование и др. Какая глубина очистки сточных вод будет выбрана, определяется степенью загрязнения воды и ее дальнейшим использованием.

В ряде случаев для очистки воды применяют те же биологические методы очистки, используя смесь микроорганизмов, которая формирует так называемый активный ил. Для этого используют проточный аэрируемый биореактор (аэротенк). Основным представителем микроорганизмов, входящим в состав активного ила является бактерия *Zoogloea ramigera*. Эти бактерии синтезируют и экскретируют в среду полисахариды, которые формируют гель. Наличие геля в аэротенках обеспечивает агрегацию микроорганизмов – образование хлопьевидных скоплений (флокула). Именно эти флокулы и формируют активный ил. Для активного ила характерно высокое сродство к суспендированным веществам. После

Биодegradация – способность организмов (бактерий и др.) разрушать (минерализовать) органические вещества.

Размер частиц	Примеры	Уровни очистки
1 см 1 мм	Галька хлопья	Первичная очистка
100 мкм 10 мкм 1 мкм	Суспен. частицы Надкол. частицы Коллоид- ные частицы	Вторичная очистка
0,1 мкм 10 нм 1 пм	Субкол. частицы Раство- ренные вещества - >> -	Третичная очистка

Табл. 69. Степени очистки воды (первичная – третичная), характеристика частиц, встречающихся в жидких средах.

Флокула – скопления полисахаридов, формирующих гель в составе активного ила. Эти полисахариды выделяются (экскретируются) в водную среду бактериями активного ила. Активный ил может рассматриваться как микробиоценоз.

формирования флокул осуществляется биодегградация органических соединений.

В настоящее время практически невозможно использовать водоворот технологической воды, так как существующие системы не позволяют осуществлять полную очистку, т.е. удалить все низкомолекулярные компоненты среды, которые ингибируют рост культур клеток при повторном использовании. Поэтому очищенная технологическая вода в дальнейшем может быть использована в технических целях.

Чрезвычайно актуальным в промышленной биотехнологии является разработка методов выделения, очистки и использования побочных продуктов биотехнологического производства. Необходимо напомнить, что в составе культуральной жидкости содержится огромное количество ценных биологически активных веществ, которые не являются целевым продуктом, но могут быть использованы в различных отраслях. Они не используются только из-за трудностей выделения и необходимости дополнительных и достаточно дорогих исследований.

Комплексная переработка биомассы и других продуктов биотехнологии является важнейшим направлением в совершенствовании биотехнологических производств, так как это позволяет повысить рентабельность и устранить или уменьшить влияние производства на окружающую природу. Кроме того, развитие новых технологий полного извлечения биологических продуктов позволит обеспечить замкнутость биотехнологических производств.

Обезвреживание отходов биотехнологических производств

Отходы могут находиться не только в жидкой, но и в твердой и газообразной фазе.

Твердые отходы представляют собой биомассу клеток или тканей, растительную биомассу после экстракции биологически активных веществ.

Так, для производства лимонной кислоты (используется такой продуцент как гриб *Aspergillus niger*). При производстве 1 т лимонной кислоты образуется 150-200 кг сухой массы мицелия *Aspergillus* и 7 м³ фильтрата (жидкие отходы).

В настоящее время ежедневно мировой промышленностью производится не менее 30 000 т антибиотиков. В результате этого производства образуется огромное количество сухих и жидких отходов. Так, только один реактор объемом 50 м³ дает около 1 г сухого мицелия.

В пивоварении отходами являются остаточные дрожжевые клетки, на 1 галлон пива образуется 0,3-0,4 кг дрожжей, солодовая и хмелевая дробина, белки.

В зависимости от типов отходов используют различные системы обезвреживания. Часть безвредных отходов (дробину, барду, отходы спиртовой промышленности) скармливают скоту и включают их в производство комбикормов.

Удалить полностью содержащиеся низкомолекулярные биологически активные вещества в воде возможно, используя современные мембранные технологии, однако пока такая очистка слишком дорога и нерентабельна. Целесообразно разрабатывать относительно дешевые биологические методы очистки воды.

Aspergillus niger – не может быть использован в качестве кормовой добавки и ведутся разработки по утилизации его биомассы.

Дробина – остатки солода после приготовления сусла.

Часть органических твердых отходов, не содержащих токсических веществ и не поедаемых животными (хмелевая горечь и др.) может быть использована для анаэробного метанового брожения и получения метана. Образующаяся после метанового брожения биомасса богата гумусом и является естественным высококачественным органическим удобрением.

К сожалению, эти технологии используются мало из-за относительно высокой стоимости метантенков. В связи с этим нетоксичные органические отходы чаще используют в качестве органических удобрений без дополнительной обработки.

В том случае, если в остатках сухой биомассы содержатся патогенные микроорганизмы или генетически трансформированные бактерии, которые продуцируют токсические соединения, они должны полностью обезвреживаться. Наиболее эффективными методами обезвреживания является прямое сжигание или автоклавирование.

Если же отходами является биомасса клеток стрептомицетов, то их инактивируют (убивают) нагреванием, после чего она может быть использована на корм скоту, так как она богата белками и витаминами. В противном же случае, их используют в метанообразовании в качестве органических удобрений. Нельзя исключать и того, что сухие отходы биотехнологических производств могут быть подвергнуты дополнительной глубокой переработке для извлечения дополнительных активных соединений.

В отработанной воде, как уже отмечалось, содержится большое количество органических отходов (остатки продуцентов, метаболиты и экзометаболиты). Жидкие отходы подвергают микробиологической обработке. Растворенные органические вещества можно удалить с помощью активного ила в аэротенках или на биологических капельных фильтрах. Нитраты обезвреживают с помощью микробов-денитрификаторов (*Pseudomonas spp.*, *Paracoccus denitrificans* и др.) соли фосфорной кислоты осаждают после коагуляции. Формирующиеся твердые осадки концентрируют, обезвреживают и используют в качестве удобрения.

Промышленные стоки должны проходить обработку на предмет обезвреживания и очистки перед поступлением их в природные водные резервуары. В противном случае они ингибируют жизнедеятельность микрофлоры и это ведет к нарушению процесса их естественного обезвреживания. Среди токсических соединений промышленных стоков основными являются соли тяжелых металлов, поверхностно-активные вещества, фенольные соединения.

Обработка отходов может быть разделена на 4 основных стадии: 1) разрушение сложных белковых комплексов до простых растворимых веществ и отделение их от нерастворимых компонентов; 2) анаэробная обработка нерастворимого остатка с помощью микроорганизмов; 3) трансформация органического азота до NH_4 (аммонификация) с последующим окислением аммония до нитратов; 4) перевод органического углерода в CO_2 (рис. 213).

Гумус (от латинского земля, почва) – высокомолекулярные, темноокрашенные органические вещества почвы. Состоят из гуминовых кислот, фульвокислот, гумина и ульмина. Образуется в результате гумификации продуктов размножения органических остатков. Хорошо усваиваются растениями. Плодородие почв определяется наличием в них гумуса.

Поверхностно-активные вещества – вещества, способные накапливаться на поверхности соприкасающихся двух сред. Важнейшие ПАВ – водорастворимые органические соединения, молекулы которых состоят из гидрофобной (неполярной) и гидрофильной (полярной) частей.

Газообразные отходы

Газообразными отходами является так называемый «отработанный воздух». Такой «отработанный воздух» в биотехнологиях не должен поступать в атмосферу без очистки и обезвреживания. Отработанный воздух представляет собой высокодисперсный аэрозоль, в котором дисперсная фаза представлена капельками жидкости или клеток. Так как эти частицы очень мелкие, скорость седиментации очень низкая, а броуновское движение очень высокое, что и обеспечивает их быстрый перенос в пространстве на большие расстояния.

Как правило, отработанный воздух подвергается термической обработке, а потом фильтрации. В биотехнологических лабораториях постоянно должен осуществляться контроль качества отработанного воздуха.

Возможные пути утилизации отходов биотехнологических производств

Все отходы биотехнологических производств могут быть классифицированы как легко утилизируемые, трудно утилизируемые и не поддающиеся утилизации. В последнем случае они должны быть обезврежены.

К легко утилизируемым отходам можно отнести отходы традиционных производств пива, спирта, вина и других. Это объясняется тем, что пивная дробина, отработанные пивные дрожжи, белковый остаток могут быть легко переработаны в кормовые добавки животным. Пивные дрожжи богаты витаминами, ценными биологически активными веществами и могут использоваться в качестве сырья для медицинских препаратов и биологически активных добавок.

Сложнее вопрос утилизации бактериальной и мицелиальной биомассы, так как они наряду с полезными веществами могут содержать и незначительные количества токсических веществ, а их обеззараживание требует больших затрат, что делает такое производство нерентабельным.

Продукты, содержащие токсические для животных и человека вещества, могут быть использованы в других технологиях: производстве полимеров, материаловедении и др., однако это требует проведения научных разработок или захоронения в специальных хранилищах.

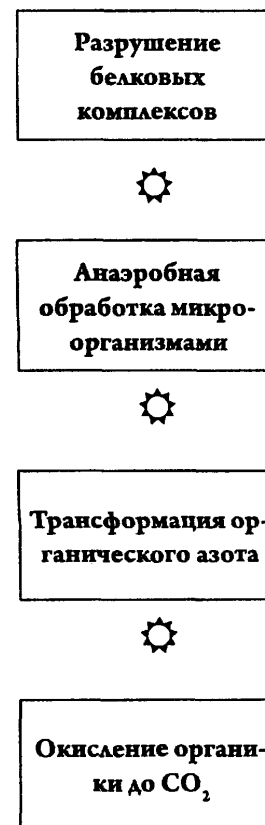


Рис. 213. Основные стадии обработки отходов.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
ЧАСТЬ I. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	5
ГЛАВА I. БИОТЕХНОЛОГИЯ, ЭТАПЫ СТАНОВЛЕНИЯ, ЗАДАЧИ И ПЕРСПЕКТИВЫ	6
Этапы становления биотехнологии	6
Формирование микробиологии, биохимии и бродильных производств как фундаментальной основы биотехнологии	9
Разработка технологии рекомбинантных ДНК и рождение молекулярной биотехнологии	12
Современный этап развития биотехнологии	12
Основные задачи и перспективы биотехнологии	13
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	16
Общие характеристики объектов биотехнологии	16
Характеристики объектов	16
Вирусы и вирионы	16
Прокариотические организмы	19
Бактерии	19
Царство грибов (<i>Fungi</i>)	33
Особенности строения и метаболизм	33
Цианобактерии или сине-зеленые водоросли	37
Водоросли (<i>Algae</i>)	39
Характеристика водорослей, их роль и использование	39
Характеристика, выделение и использование клеток растений в биотехнологии	41
Выделение и культивирование растительных клеток	44
ГЛАВА III. ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ	47
О биологических теориях, концепциях и принципах функционирования	47
Свойства биологических систем или критерии живого	50
Клеточная теория	54
Основные этапы формирования клеточной теории	54
Клетка – структурированная система биополимеров	59
Концепция межмолекулярных взаимодействий	61
Основные понятия	61
Характеристика слабых связей	63
Силы Ван-Дер-Ваальса	64
Электростатические силы	65
Водородные связи и структура воды	66
Гидрофобные взаимодействия	67
Слабые связи обеспечивают динамичность биологических структур	68
Принцип комплементарности	69
Основные понятия	69
Факторы, определяющие молекулярное узнавание	72
Принцип самосборки биологических структур	74
Силы, обеспечивающие самосборку молекул в структурах	74
Некоторые особенности самосборки биологических структур	75
Принцип структурно-функциональной взаимосвязи	76

Принцип кооперативности	80
Кооперативность белковых молекул	80
Проявление кооперативных свойств на уровне клеточных органелл	81
Проявление кооперативных свойств на клеточном уровне	83
Принцип иерархичности организации биологических систем	85
Иерархия структурной организации белков	85
Иерархия структурной организации генетического аппарата эукариотических клеток	87
Нуклеосомная организация хроматина	88
30-нм хроматиновые фибриллы формируют петельную структуру хроматина	90
Концепция метаболизма	91
Основные понятия	91
Функциональные блоки метаболизма и способы их сопряжения	92
Принцип общего предшественника (ацетатное правило)	93
Принцип разветвленных метаболических путей	95
Принцип альтернативных метаболических путей	96
Принцип многоуровневости регуляции метаболизма	97
Ферментативная система регуляции	97
Регуляция биосинтеза L-изолейцина в клетках бактерий	98
Регуляция транскрипции в клетках бактерий	99
Регуляция экспрессии генов в клетках эукариот	101
Регуляция процессинга ядерной РНК	104
Механизм регуляции транспорта РНК из ядра в цитоплазму	106
Принцип циклической организации метаболизма	107
ГЛАВА IV. МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	109
Классификация методов биотехнологии	109
Стерилизующие агенты и способы стерилизации	110
Что такое стерилизация?	110
Требования к асептике в биотехнологических процессах	111
Агенты, обеспечивающие стерильность	111
Методы стерилизации	113
Стерилизация паром под давлением	113
Стерилизация горячим воздухом	114
Стерилизация химическими веществами	114
Стерилизация воздуха	115
Стерилизация воздуха ультрафиолетовым излучением	115
Стерилизация воздуха тепловой обработкой	115
Фильтрационная очистка воздуха	116
Очистка отработанного воздуха	117
Стерилизация питательных сред	117
Особенности стерилизации питательных сред	117
Использование ультрафильтрации для стерилизации питательных сред	119
Контроль стерильности	119
Общая характеристика кинетики роста клеточных культур в биореакторах	120
Кинетика сбалансированного роста, уравнение Моно	122
Влияние некоторых физико-химических параметров среды на кинетику клеточного роста	124
Основные фазы роста клеток в реакторах периодического действия	125
Методы оценки газообмена и массопереноса в биореакторах	128
Особенности массообмена между газовой и жидкой фазами	128
Скорость утилизации кислорода и клеточный метаболизм	129

Массообмен с участием свободно поднимающихся частиц	130
Массообмен путем принудительной конвекции	130
Теплообмен в биореакторах	131
Типы биореакторов	132
Требования к биореакторам	132
Биореакторы барботажные с механическим перемешиванием	133
Биореактор с самовсасывающей системой аэрации	133
Биореакторы с подводом энергии в газовую фазу	134
Биореактор со струящейся пленкой	135
Биореакторы для культивирования клеток животных	135
ГЛАВА V. КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ	137
Применение культивируемых растительных тканей и клеток	137
Становление метода культивирования растительных клеток и тканей	138
Техника культивирования растительных клеток	140
Методы стерилизации растительных объектов	140
Характеристика питательных сред	140
Условия культивирования клеток	141
Культура клеточных суспензий	142
Источники получения клеток для культивирования	143
Особенности культивирования клеточных суспензий	143
Особенности культивирования одиночных клеток	144
Культура каллусных тканей	146
Культура протопластов	151
Клональное микроразмножение растений	152
Методы клонального размножения растений	154
Основные этапы клонального микроразмножения растений	154
Метод активации развития уже существующих в растениях меристем	154
Индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями эксплантата	155
Соматический эмбриогенез	156
Метод клонального микроразмножения на основе дифференциации адвентивных почек	156
Техника культивирования при клональном микроразмножении	157
Способ получения безвирусного посадочного материала	158
ГЛАВА VI. КУЛЬТУРА ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК	161
История развития метода культивирования клеток животных	161
Основные понятия и этапы культивирования клеток	162
Биология клетки в культуре	164
Рост клеток в культуре	164
Механизмы, регулирующие пролиферацию клеток	165
Характеристика сред для культивирования клеток животных	167
Сбалансированные солевые растворы	167
Ростовые среды	169
Получение и культивирование первичных культур клеток	173
Культивирование клеток в виде монослоя	173
Суспензионные культуры	175
Области применения культур клеток животных	175
Продукты, получаемые из клеток животных	175
Получение вирусных вакцин	176
Получение антител в культуре клеток	177
Получение инсектицидов в культуре клеток	177

Получение интерферонов в культуре клеток животных	178
Получение ферментов из клеток животных	178
Получение гормонов из клеток животных	179
Другие области применения культур клеток животных	179

ГЛАВА VII. ЛИМФОИДНЫЕ ГИБРИДОМЫ ИЛИ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ	181
Основные понятия	181
Основные этапы получения моноклональных антител	182
Характеристика этапов	182
Иммунизация животных	183
Слияние клеточных партнеров (гибридизация клеток)	184
Культивирование гибридомных клеток	187
Скрининг клонов, продуцирующих моноклональные антитела	188
Продуцирование моноклональных антител гибридомными клонами	188
Области применения моноклональных антител	189
Использование в диагностике	189
Использование моноклональных антител в медицине	190
Использование моноклональных антител в научных исследованиях	191

ГЛАВА VIII. ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК	193
Основные понятия	193
Этапы становления технологии рекомбинантных ДНК	195
Выделение индивидуальных генов или фрагментов ДНК	197
Химико-ферментативный синтез генов	197
Выделение генов из природных ДНК	198
Синтез индивидуальных генов на соответствующих мРНК	200
Получение фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции	203
Векторы, принципы конструирования и характеристика	203
Векторы клонирования крупных фрагментов ДНК	206
Перенос вектора в реципиентную клетку	207
Трансформация клеток бактерий с использованием солей кальция	207
Трансформация клеток с помощью полиэтиленгликоля	207
Трансформация клеток бактерий электропорацией	207
Трансформация клеток бактерий методом тройного скрещивания	208
Селекция клонов, несущих трансген	208
Скрининг методом гибридизации нуклеиновых кислот	208
Иммунологический скрининг	209
Скрининг по активности белков	209
Регуляция экспрессии трансгена	209

ГЛАВА IX. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ	211
Задачи технологии рекомбинантных ДНК растений	211
Некоторые проблемы технологии рекомбинантных ДНК растений	212
Общая схема переноса генов в клетки растений	213
Организация и экспрессия генов растений	215
Структурная организация генов растений	215
Экспрессия генов и процессинг мРНК	217
Векторы на основе T _i -плазмид	217

Векторы на основе Ri-плазмиды	219
Механизмы переноса T-ДНК	219
Цис-векторы Ti-плазмид	219
Транс-векторы Ti-плазмид	220
Трансформация клеток двудольных растений с помощью Ti-плазмид	221
Индукция трансформации векторами на основе агробактерий	222
Селекция трансформированных клеток	222
Прямая регенерация трансформированных растений на примере табака	223
Укоренение трансформированных побегов	223
Размножение трансформированных побегов	224
Генетическая трансформация растений на стадии каллуса	224
Генетическая трансформация протопластов и гомогенных эксплантатов	226
Трансформация протопластов агробактериями	227
Ограничения методов трансформации с помощью агробактерий	229
Методы прямого переноса генов в растительные клетки	230
Трансформация протопластов с использованием полиэтиленгликолей	230
Трансформация протопластов методом электропорации	232
Трансформация методом микроинъекций	233
Введение ДНК в протопласты с помощью липосом	234
Трансформация методом биологической баллистики	235
Перспективы, проблемы и направления исследований технологии рекомбинантных ДНК растительных клеток	235
ГЛАВА X. ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОВ И ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ	238
Характеристика предзародышевого развития млекопитающих	238
Оплодотворение яйцеклеток вне организма	239
Созревание ооцитов <i>in vitro</i>	240
Капацитация сперматозоидов	240
Оплодотворение <i>in vitro</i> и ранние стадии развития эмбрионов	241
Методы получения и культивирования предимплантационных зародышей мышей	241
Способ получения зародышей мыши	242
Технология трансплантации эмбрионов	243
Стимуляция суперовуляции	243
Извлечение эмбрионов	244
Хранение эмбрионов	244
Пересадка эмбрионов	245
Применение клеточной инженерии в животноводстве	245
Исследование тотипотентности клеток и клеточных ядер	245
Доказательства тотипотентности клеток на ранних стадиях развития	246
Пересадка клеточных ядер	247
Клонирование эмбрионов	248
Получение однояйцовых близнецов	248
Получение химерных животных	250
Определение химеризма	250
Использование химер	251
Получение химер	251
Получение трансгенных животных	252
Общая схема трансгенеза	252
Приготовление раствора ДНК для микроинъекций	253
Подготовка доноров и извлечение эмбрионов	254
Визуализация пронуклеусов и микроинъекция ДНК	254

Пересадка инъектированных эмбрионов	255
Изучение трансгенного потомства	255
Скрининг трансгенного потомства	256
Получение трансгенных животных с помощью ретровирусов	256
Получение трансгенных животных с применением микрочастиц золота	257
Использование трансгенных животных	257
Трансгенные животные с устойчивостью к заболеваниям	257
Трансгенные животные с новыми хозяйственно-полезными свойствами	258
Трансгенные животные как продуценты биологически активных веществ	258
Использование трансгенных животных в научных исследованиях	259
Генотерапия	262
ГЛАВА XI. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ	265
Предмет и задачи инженерной энзимологии	265
Основы методологии иммобилизации ферментов	265
Характеристика матриц для иммобилизации	266
Природные носители для иммобилизации ферментов	266
Липидные носители	269
Синтетические полимерные носители	271
Активация полимерных носителей	272
Формирование имидокарбонатных групп на матрице	272
Активация матриц оксирановыми (эпоксидными) группами	273
Способы иммобилизации ферментов	274
Иммобилизация ферментов ковалентным соединением с матрицей	274
Основные принципы конструирования ферментных препаратов при ковалентном связывании их с матрицей	274
Примеры ковалентной иммобилизации ферментов	275
Недостатки и преимущества иммобилизации ферментов путем ковалентного связывания с носителем	275
Иммобилизация ферментов путем адсорбции на нерастворимых носителях	276
Методы адсорбционной иммобилизации	276
Преимущества и недостатки адсорбционной иммобилизации	277
Иммобилизация ферментов путем включения его в гели	277
Иммобилизация ферментов в не спитых полимерных гелях	278
Иммобилизация ферментов в спитые полимерные гели	279
Преимущества и недостатки иммобилизации ферментов путем включения в гель	279
Иммобилизация ферментов с использованием полупроницаемых оболочек	280
Включение ферментов в липосомы	281
Включение ферментов в волокна	281
Двойное эмульгирование	282
Преимущества и недостатки иммобилизации с использованием полупроницаемых оболочек	282
Иммобилизация клеток	282
Методы иммобилизации клеток и области их применения	282
Использование иммобилизованных клеток бактерий для трансформации стероидов	283
Иммобилизация растительных клеток	284
Использование иммобилизованных клеток млекопитающих для определения гормонов. ...	285
Иммобилизация клеток млекопитающих	286
Выбор ответной реакции клеток при биотестировании	286
Основные принципы проведения биотестирования	287
Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток ...	288

Получение глюкозо-фруктозных сиропов	288
Получение L-аминокислот	289
Получение безлактозного молока.....	290
Получение б-аминопенициллановой кислоты.....	291
Получение сахаров из молочной сыворотки	291
ГЛАВА XII. БИОСЕНСОРИКА	292
Характеристика биосенсоров.....	292
Биосенсоры на основе иммунных реакций	293
Биосенсоры на основе нуклеиновых кислот.....	294
Биодатчики на основе жидких кристаллов, суперспиральных кольцевых двухцепочечных молекул ДНК.....	295
Биосенсоры на основе светочувствительных мембран.....	295
Принципы функционирования преобразователей, использующихся в биосенсорах	298
Потенциометрические полупроводниковые преобразователи.....	298
Иммобилизация биоматериала на транзисторах	300
Светоадресуемый потенциометрический сенсор.....	300
Амперометрические преобразователи	301
Оптические преобразователи внутреннего отражения	302
Преимущества биосенсоров перед другими аналитическими устройствами и области их применения	303
ЧАСТЬ II. ПРОМЫШЛЕННЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	305
ГЛАВА I. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ.....	306
Задачи подготовительного этапа.....	306
Постановка задачи и выбор стратегии ее решения.....	306
Оценка критериев продуктивности биотехнологического процесса.....	306
Удельные энергозатраты.....	308
Патентование в биотехнологии.....	309
Подбор, получение или приобретение продуцентов	310
Подбор, производство или приобретение биореакторов или промышленных установок ...	310
Приготовление питательных сред и подготовка условий культивирования	311
Требования к растворимости.....	311
Контроль токсичности питательных сред.....	312
Стабильность питательных сред и их особенности	312
Контроль стерильности питательных сред	313
Наращивание маточных культур.....	313
ГЛАВА II. ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЭТАП БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА.....	315
Общие требования к производственному этапу биотехнологического процесса	315
Основные задачи, которые необходимо решать на производственном этапе биотехнологического процесса	316
Поддержание и контроль асептических условий	316
Обеспечение и контроль условий роста культур	316
Обеспечение газообмена и массообмена в процессе культивирования.....	318
Состав и качество питательной среды в процессе производства	318
Контроль состояния биообъекта в процессе производства	320
Управление биотехнологическими процессами	322

ГЛАВА III. ЗАВЕРШАЮЩИЙ ЭТАП БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА	324
Общая характеристика завершающего этапа	324
Концентрирование и выделение целевого продукта	324
Характеристика целевых продуктов	324
Центрифугирование (сепарирование) и упаривание	325
Фильтрация и флотация	327
Методы экстракции	329
Сорбция	330
Хроматографические методы выделения	331
Очистка целевого продукта	334
Стабилизация и фасовка целевого продукта	336

ГЛАВА IV. ЭТАПЫ ИСПЫТАНИЯ НОВЫХ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА И ОХРАНА ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ	339
Требования к биотехнологическому производству и характеристика продуктов биотехнологии	339
Испытание целевого продукта	340
Оценка продуктов на отсутствие контаминантов	340
Оценка идентичности или подлинности биотехнологических продуктов	342
Оценка безвредности продуктов биотехнологии	344
Особенности контроля безвредности пищевых продуктов и пищевых добавок	344
Оценка пирогенности	346
Испытания продуктов на канцерогенность	348
Этические и моральные аспекты в развитии молекулярной биотехнологии	349
Биотехнологическое производство и охрана природной среды	350
Особенности биотехнологических производств как потенциального источника загрязнения среды	350
Возможные пути очистки сточных вод	352
Обезвреживание отходов биотехнологических производств	353
Газообразные отходы	355
Возможные пути утилизации отходов биотехнологических производств	355