

ЛЕКЦИЯ № 3

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДАМИ МУТАГЕНЕЗА И СЕЛЕКЦИИ. СОЗДАНИЕ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология» (профиль «Биохимия») при изучении дисциплины «Введение в биотехнологию»

ПЛАН ЛЕКЦИИ

1. Селекция как наука
2. Характеристика методов селекции
3. Генетическая инженерия: понятие, методы, принципы технологии рекомбинантных ДНК
4. Сферы практического применения достижений генетической инженерии
5. Клеточная инженерия: понятие, перспективы и направления развития
6. Культура тканей: понятие, виды, техника получения
7. Сферы практического применения достижений клеточной инженерии

1. СЕЛЕКЦИЯ КАК НАУКА

СЕЛЕКЦИЯ – наука о методах создания новых сортов и гибридов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с нужными для человека признаками с применением отбора, гибридизации или мутагенеза.

Теоретической основой селекции является генетика.

СЕЛЕКЦИЯ ТЕСНО СВЯЗАНА С: систематикой, анатомией, морфологией, физиологией, экологией растений и животных, биохимией, иммунологией, растениеводством, зоотехнией, фитопатологией, энтомологией, биологией опыления и оплодотворения, эмбриологией, гистологией, молекулярной биологией.

НАПРАВЛЕНИЯ РЕАЛИЗАЦИИ СЕЛЕКЦИИ:

1. селекция растений
2. селекция животных
3. селекция микроорганизмы

ПРЕДМЕТ СЕЛЕКЦИИ – изучение и претворение на практике специфических закономерностей эволюции культурных растений, сельскохозяйственных животных и искусственных штаммов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СЕЛЕКЦИИ: повышение продуктивности и урожайности сельскохозяйственных животных и растений, а также эффективности биотехнологических производств.

1. СЕЛЕКЦИЯ КАК НАУКА

НАПРАВЛЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

1. Селекция на урожайность

2. Селекция на качество:

- высокое содержание действующих веществ
- низкое содержание нежелательных примесей
- хорошая пригодность для переработки
- лёжка плодов, овощей, картофеля, кормовых корнеплодов и т.п.

3. Селекция на содержание в белке зерновых культур незаменимых аминокислот

4. Селекция растений на химический состав масла

5. Селекция растений на длину волокна

6. Селекция растений на устойчивость к болезням и вредителям или их комплексу

7. Селекция растений на холодостойкость, зимостойкость и морозостойкость

8. Селекция растений на засухоустойчивость

9. Селекция растений на приспособленность к орошаемым условиям.

10. Селекция растений на приспособленность к высоким дозам удобрений.

11. Селекция растений на приспособленность к машинной уборке и др.

НАПРАВЛЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

- 1.** Селекция на продуктивность
- 2.** Селекция на качество продукции
- 3.** Селекция на плодовитость
- 4.** Селекция на приспособленность к местным условиям и др.

1. СЕЛЕКЦИЯ КАК НАУКА

СЕЛЕКЦИЯ

МИКРООРГАНИЗМОВ

для

биотехнологической промышленности и создание новых штаммов часто направлены на усиление их продукционной способности, т.е. образование того или иного продукта.

Изменения скорости биохимических реакций у бактерий может осуществляться двумя путями:

1. Быстрый способ (реализуется в течение секунд или минут) заключается в изменении каталитической активности индивидуальных молекул фермента.

2. Более медленный способ (реализуется в течение нескольких минут) состоит в изменении скоростей синтеза ферментов.

В обоих механизмах используется **единый принцип управления системами – принцип обратной связи.**

Самый простой способ регуляции любого метаболического пути основывается на доступности субстрата или наличии фермента.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ. ОТБОР

ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР – основной движущий фактор эволюции (Ч. Дарвин, А. Уоллес).

ГЛАВНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА заключается не просто в выживании более жизнеспособных особей, а в их относительном вкладе в генофонд дочерней популяции.

НЕОБХОДИМОЙ ПРЕДПОСЫЛКОЙ ДЛЯ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА является **БОРЬБА ЗА СУЩЕСТВОВАНИЕ** – конкуренция за пищу, жизненное пространство и партнёра для спаривания.

СЛЕДСТВИЕМ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА является увеличение разнообразия форм организмов, последовательное усложнение организации в ходе прогрессивной эволюции и вымирание менее приспособленных видов.

Естественный отбор происходит на всех стадиях онтогенеза организмов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ. ОТБОР

ОТБОР, проводимый человеком, состоящий в выбраковке особей, не представляющих ценности в хозяйственной деятельности человека и в оставлении для потомства особей с ценными для человека признаками, называется **ИСКУССТВЕННЫМ**.

БЕССОЗНАТЕЛЬНОМ ИСКУССТВЕННЫМ ОТБОРОМ называется отбор, при котором человек отбирая особей для потомства, не ставит перед собой задачи изменить данный организм в каком-либо направлении, а лишь учитывает определенные качества организма, необходимые ему для улучшения хозяйственной деятельности.

ЦЕЛЕВЫМ (СОЗНАТЕЛЬНОМ) ОТБОРОМ называют отбор, проводимый селекционерами, состоящий в том, что он осуществляется в соответствии с определенной, заранее поставленной целью, когда свойства организмов корректируются в определенном направлении.

ВИДЫ ЦЕЛЕВОГО ОТБОРА:

1. Единичный отбор
2. Индивидуальный отбор
3. Массовый отбор
4. Методический (или систематический) отбор

2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ. ГИБРИДИЗАЦИЯ

ГИБРИДИЗАЦИЯ (СКРЕЩИВАНИЕ) заключается в получении потомства от особей, различающихся определенными признаками, которые можно использовать в дальнейшей селекционной работе.

ГИБРИДИЗАЦИЯ ПОЗВОЛЯЕТ:

- искусственно создавать исходный материал;
- объединять в одном организме свойства и признаки родительских форм;
- исправлять отдельные недостатки сорта или породы;
- получать новые формы, не похожие на исходные.

ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ГИБРИДИЗАЦИИ:

- естественные и гибридные популяции;
- самоопылённые линии;
- искусственные мутанты;
- полиплоидные формы;
- коллекции растений.

ПОДБОР ПАР ДЛЯ ГИБРИДИЗАЦИИ:

- по генетике селективируемых признаков;
- по экотипам (эколого-географический метод подбора пар);
- по хозяйственно-ценными свойствам и признакам;
- по биологическими свойствами и признаками.

ВИДЫ ГИБРИДИЗАЦИИ:

1. Близкородственная гибридизация (инбридинг)
2. Неродственная гибридизация (аутбридинг)
3. Отдаленная гибридизация
4. Ступенчатая (возвратная) гибридизация

2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ

МУТАГЕНЕЗ – искусственное получение мутаций с помощью мутагенов.

МУТАЦИИ – внезапно возникающее наследуемое изменение в генетическом материале клетки (спонтанное или индуцированное изменение структуры гена).

Термин «МУТАЦИЯ» введен в употребление голл. ученым де Фризом в 1901 г. как понятие «скачкообразного изменения наследственного признака» при изучении наследственности у растений, а позднее Бейеринк распространил данное понятие и на бактерии.

МУТАНТ – наследственно измененная в результате мутации форма организма.

МУТАГЕНЫ – факторы, вызывающие стойкие наследственные изменения (мутации).

ВИДЫ МУТАГЕНОВ:

1. ФИЗИЧЕСКИЕ МУТАГЕНЫ: нагревание, различные виды ионизирующих излучений, ультрафиолетовое и микроволновое излучение и т.п.

2. ХИМИЧЕСКИЕ МУТАГЕНЫ: аналоги азотистых оснований (бромурацил), алкилирующие агенты (этилметансульфонат), азотистая кислота, дезаминирующая азотистые основания, интелекалирующие агенты (акридиновые красители) и др.

3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МУТАГЕНЫ: ДНК- и РНК-содержащие вирусы, некоторые полипептиды, белки, ряд ферментов рестриктаз и т.п.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ

МЕХАНИЗМЫ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Вид мутагена	Механизм мутагенного действия
Ионизирующие излучения	действуют на нуклеиновые кислоты непосредственно, ионизируя и активируя их атомы, приводя к разрывам углеводно-фосфатного остова молекулы и водородных связей между комплементарными нитями ДНК, образованию «сшивок» между этими нитями, разрушению азотистых оснований, особенно пиримидиновых
Ультрафиолетовое излучение	возбуждает электронные оболочки атомов, что вызывает разные химические реакции в нуклеиновых кислотах, приводящие к мутациям, из которых наибольшее значение имеют гидратация цитозина и образование димеров тимина, а также разрыв водородных связей между нитями ДНК и образование «сшивок» между этими нитями
Лучи видимого спектра	подавляют мутагенный эффект ультрафиолетовых лучей
Алкилирующие соединения	алкилируют фосфатные группы нуклеиновых кислот, приводя к разрывам углеводно-фосфатного остова молекулы, а также азотистые основания, в результате чего нарушается точность репликации нуклеиновых кислот
Аналоги азотистых оснований	включаются в нуклеиновые кислоты, что при последующей репликации приводит к появлению транзиций и трансверсий
Азотистая кислота	дезаминирует азотистые основания
Акридиновые красители	образуют комплекс с ДНК, мешающий её репликации, в результате выпадают или добавочно вставляются одна или несколько пар нуклеотидов, что приводит к сдвигу рамки считывания

ВИДЫ МУТАЦИЙ

1. Спонтанные и индуцированные мутации.
2. Генеративные и соматические мутации.
3. Прямые и обратные (реверсии) мутации.
4. Ядерные, цитоплазматические и др. мутации.
5. Морфологические, биохимические, летальные, полулетальные и др. мутации.
6. Доминантные и рецессивные мутации.
7. Генные, хромосомные и геномные мутации.

3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ПОНЯТИЕ, МЕТОДЫ, ПРИНЦИПЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ — это область современной биотехнологии, использующая методы целенаправленного изменения наследственности путем манипуляций на генном уровне и позволяющая конструировать функционально активные генетические структуры *in vitro* в форме рекомбинантных ДНК.

ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ, ОБУСЛОВИВШИЕ РАЗВИТИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ:

1. Установление универсальности генетического кода: у всех живых организмов включение одних и тех же аминокислот в белковую молекулу кодируются одними и теми же последовательностями нуклеотидов в цепи ДНК.

2. Достижение успехов в области генетической энзимологии, предоставившей в распоряжение исследователей набор ферментов (рестриктаз и лигаз), позволяющих получить в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот и объединить в единое целое полученные фрагменты.

3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ПОНЯТИЕ, МЕТОДЫ, ПРИНЦИПЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

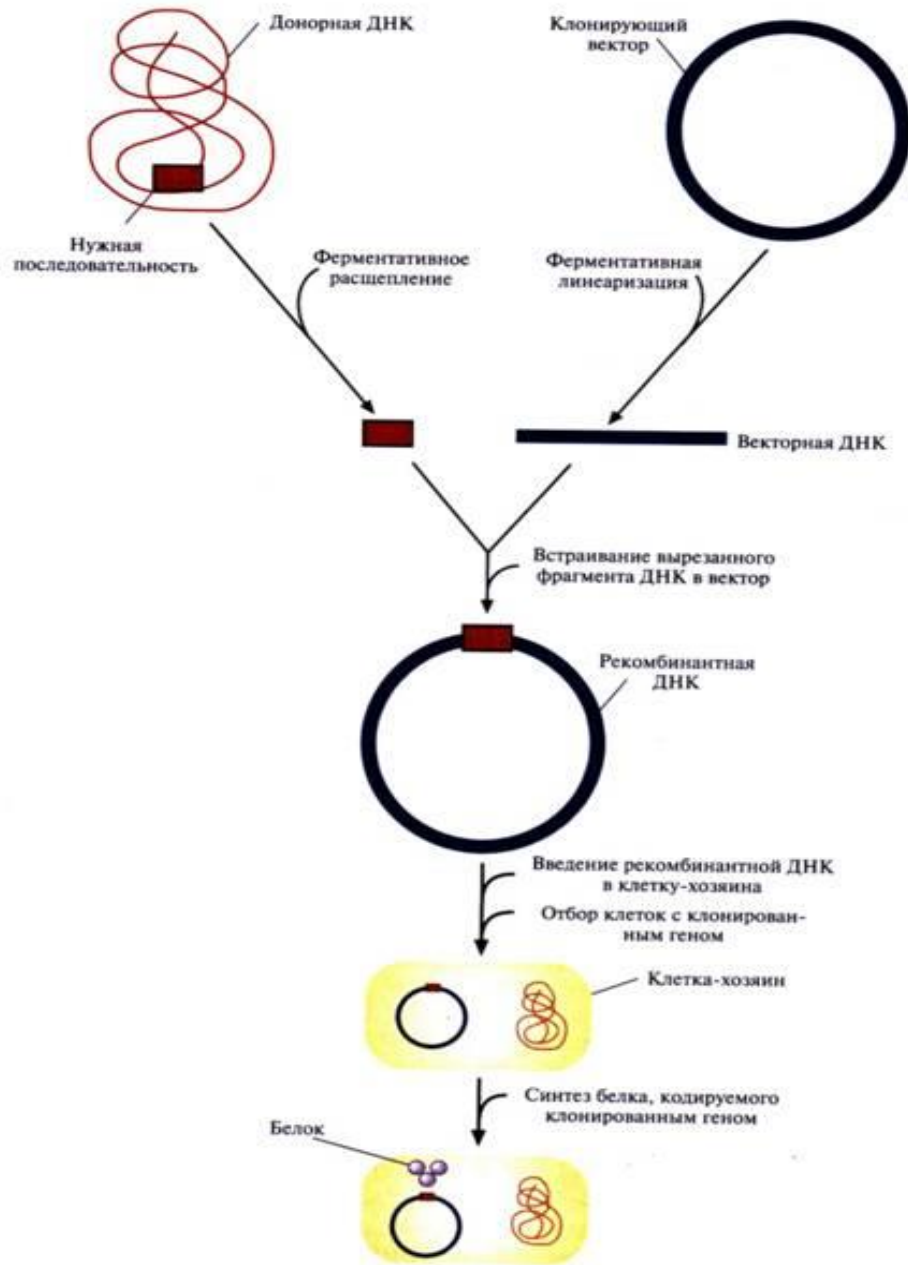
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ КАК НАУКИ:

1. Открытие двойной структуры ДНК и матричного синтеза: в клетке перед делением находятся две совершенно одинаковые молекулы ДНК, одна из которых после деления клетки попадает в дочернюю клетку, т.е. дочерняя клетка несет ту же самую информацию, что и материнская, а, следовательно, выполняет те же самые функции.

2. Появлению нового экспериментального инструмента – рестриктазных эндонуклеаз (рестриктаз). Первые из открытых эндонуклеаз не были специфическими, поэтому действовали случайным образом. П. Берг установил особое свойство двухцепочной ДНК формировать при обработке рестриктазами «липкие концы»: после разрезания одна из цепей оказывается длиннее другой на несколько нуклеотидов, которые могут свободно спариваться с комплиментарными нуклеотидами другого фрагмента ДНК, благодаря этому, ДНК из разных источников может объединяться, образуя рекомбинантные молекулы.

3. Широкомасштабное получение генных продуктов (физиологически значимых белков) и генетическое манипулирование с различными организмами.

3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ПОНЯТИЕ, МЕТОДЫ, ПРИНЦИПЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК



ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК – совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществить перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.

ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ:

1. Рестриктазное расщепление из организма-донора нужных генов нативной ДНК.
2. Быстрая расшифровка всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющая определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую геном.
3. Обработка рестрикционными эндонуклеазами вектора для клонирования, который может реплицироваться в клетке хозяина.
4. Сшивание ДНК-лигазой двух фрагментов ДНК с образованием новой рекомбинантной молекулы (конструкции «клонировующий вектор – встроенная ДНК»).
5. Введение полученной конструкции в клетку хозяина (реципиента), где она реплицируется и передается потомкам. После трансформации бактериальная клетка воспроизводит фрагмент клонируемой ДНК миллионами идентичных клеток.
6. Идентификация и отбор клеток, несущих рДНК (трансформированные клетки).
7. Получение специфического белкового продукта, синтезированного клетками-хозяевами.

3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ПОНЯТИЕ, МЕТОДЫ, ПРИНЦИПЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

РЕСТРИКТАЗЫ – составная часть системы рестрикции, связанная с защитой клеток от проникновения чужеродной ДНК.

КЛАССЫ РЕСТРИКТАЗ

Рестриктазы класса I разрезают молекулу ДНК в произвольных точках, рестриктазы I и III классов обладают метилирующей и эндонуклеазной активностью. Рестриктазы II класса чаще применяют в генетической инженерии. Они состоят из двух отдельных белков: рестрикционной эндонуклеазы и модифицирующей метилазы.

Рестриктазы узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК. Каждая рестриктаза «опознает» в ДНК специфическую последовательность, состоящую из 4–6 нуклеотидов. Многие рестриктазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов, располагаясь наискось друг от друга. При этом образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом – «липкие концы», а также существуют рестриктазы, вносящие разрывы в цепи строго друг против друга с образованием ДНК с «тупыми концами».

Для устранения разрыва в углевод-фосфатном остове молекуле служит **ДНК-ЛИГАЗА**, катализирующая образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые удерживаются вместе при спаривании липких концов. Кроме того, ДНК-лигаза может сшивать и тупые концы.

ВЕКТОР (лат. *vehere* – нести) – молекула ДНК, автономно реплицирующаяся в клетке-хозяине.

ПЛАЗМИДЫ – внехромосомный генетический элемент в виде кольцевых молекул ДНК, содержащих 1–3 % генома бактериальной клетки.

СВОЙСТВА ПЛАЗМИД КАК ВЕКТОРОВ

1. Небольшой размер (эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* снижается при длине плазмиды более 15 тыс. пар нуклеотидов).
2. Наличие сайта рестрикции, в который осуществляют вставку.
3. Наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рДНК.

ПУТИ ВВЕДЕНИЯ ПЛАЗМИД В СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

1. химическая обработка, повышающая проницаемость клеточной оболочки;
2. электропорация;
3. микроинъекция;
4. микроукалывания;
5. слияния с клеткой нагруженных ДНК мембранных везикул (липосом).

БАКТЕРИОФАГИ используют в качестве носителей генетической информации. При этом рекомбинантный ген встраивается в геном вируса, а затем реплицируется с его генами при размножении в инфицированной клетке хозяина.

На практике чаще всего применяют **бактериофаг λ -вирус** с двухцепочечной ДНК, которая после проникновения в клетку смыкается в кольцо.

БАКТЕРИОФАГ M-13 – вирус нитевидной формы с кольцевой замкнутой ДНК, которая в клетке превращается в двухцепочечную и реплицируется в клетках-потомках.

БАКМИДЫ – экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов для *E. coli* и клеток насекомых (**эукариотические системы экспрессии**).

КОСМИДЫ – плазмиды, несущие *cos*-участок (комплементарные липкие концы) ДНК фага λ , наличие которого позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*, обеспечивающую возможность их введения в клетку путем инфекции, а не трансформации.

ФАЗМИДЫ – гибриды между фагами и плазмидами, способные развиваться и как фаг, и как плазида. Уступая космидам по клонирующей емкости, позволяют отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы.

После переноса сконструированных ДНК лишь небольшая часть реципиентных клеток приобретает необходимый ген, поэтому важным этапом является **идентификация клеток, несущих ген-мишень**.

На первой стадии идентифицируют и отбирают клетки, несущие вектор, на основе которого осуществлен перенос ДНК. Отбор проводят по генетическим маркерам, которыми помечен вектор (например, гены устойчивости к антибиотикам).

На второй стадии **отбирают клетки, несущие вектор и ген-мишень**, для чего используют две группы методов, основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов, и на идентификации признака, кодируемого геном-мишенью.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Область применения	Примеры
Медицина и ветеринария	Производство инсулина, интерлейкинов, интерферонов, гормона роста, эритропоэтина, ДНК-азы, альгинат-лиазы, иммуноглобулинов, рекомбинантных вакцин
Сельское хозяйство	Микробные инсектициды, микробные удобрения, производство стимуляторов роста растений
Биодеградация	Утилизация целлюлозы, ароматических соединений, производство этанола
Производство ферментов и малых биомолекул	Эндонуклеазы рестрикции и других ферменты для исследовательских целей, химозин, аминокислоты (лизин, триптофан и др.), индиго, L-аскорбиновая кислота, антибиотики

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРОДУКТОВ В МЕДИЦИНЕ

Продукт	Природные продукты и сфера применения генно-инженерных продуктов
Антикоагулянты	Активатор тканевого плазминогена, активирует плазмин. Фермент, вовлечённый в рассасывание тромбов; эффективен при лечении больных инфарктом миокарда
Факторы крови	Фактор VIII ускоряет образование сгустков; дефицитен у больных гемофилией. Применение фактора VIII, полученного генно-инженерными методами, устраняет риск, связанный с переливанием крови
Факторы, стимулирующие образование колоний	Ростовые факторы иммунной системы, стимулирующие образование лейкоцитов; применяют для лечения иммунодефицита и борьбе с инфекциями
Эритропоэтин	Стимулирует образование эритроцитов; применяют для лечения анемии у больных с почечной недостаточностью.
Ростовые факторы	Стимулируют дифференциацию и рост различных типов клеток; применяют для ускорения лечения ран
Человеческий инсулин	Используется для лечения диабета
Интерферон	Препятствует размножению вирусов; используется для лечения некоторых форм онкологических заболеваний
Лейксины	Активируют и стимулируют работу различных типов лейкоцитов; возможно применение при лечении ран, при заражении ВИЧ, онкологических заболеваниях, иммунодефиците
Моноклональные антитела	Высочайшая специфичность связанная с антителами используется в диагностических целях; применяют для адресной доставки лекарственных средств, токсинов, радиоактивных и изотопных соединений к злокачественным опухолям при терапии онкологических заболеваний и др.
Супероксиддисмутаза	Предотвращает поражение тканей реактивными оксипроизводными в условиях кратковременной нехватки кислорода, особенно в ходе хирургических операций, когда необходимо быстро восстановить ток крови
Вакцины	Искусственно полученные вакцины по многим показателям лучше обычных вакцин

Метод культивирования изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях *in vitro* получил название **КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ**.

ПРЕИМУЩЕСТВА КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ:

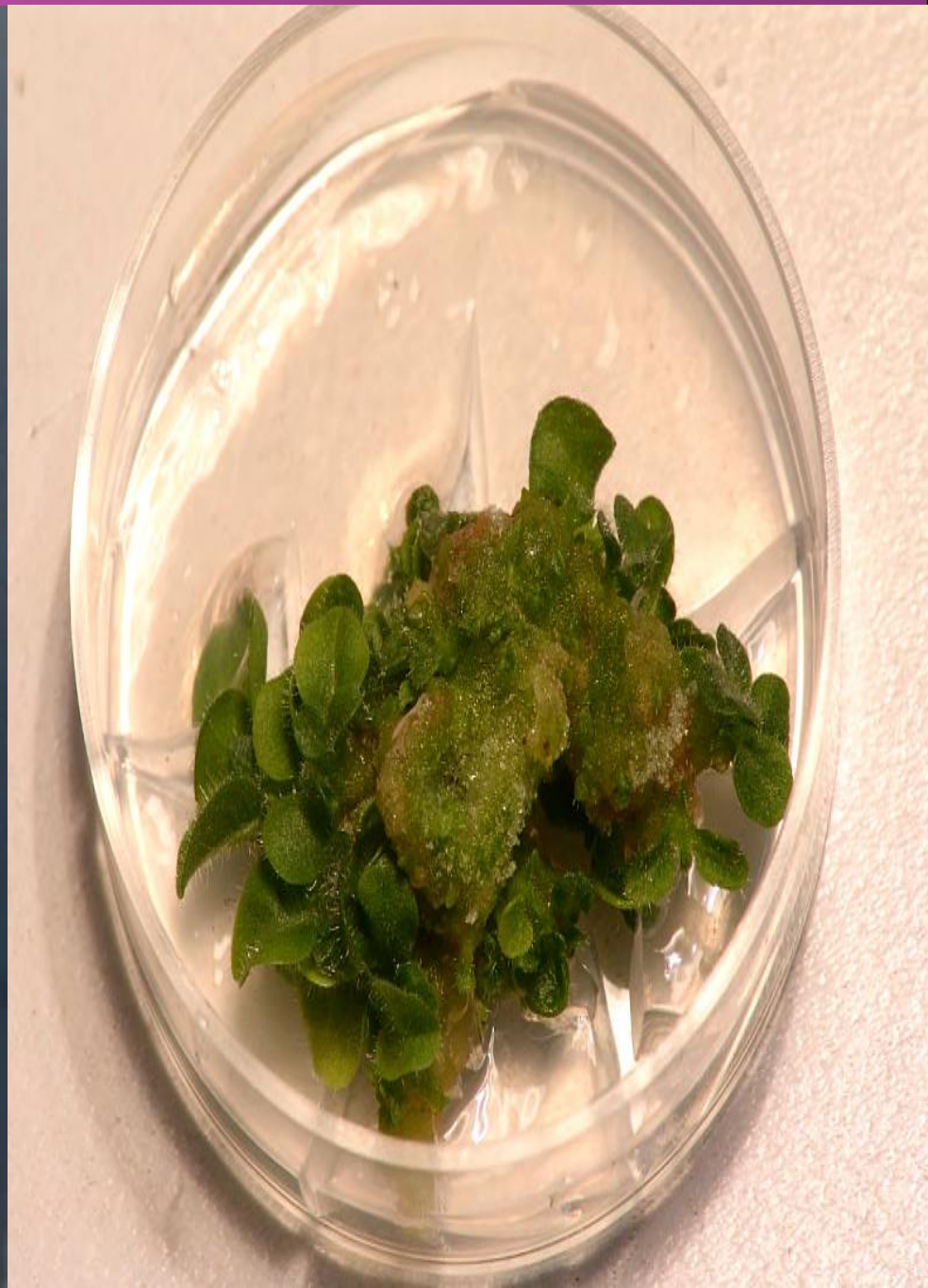
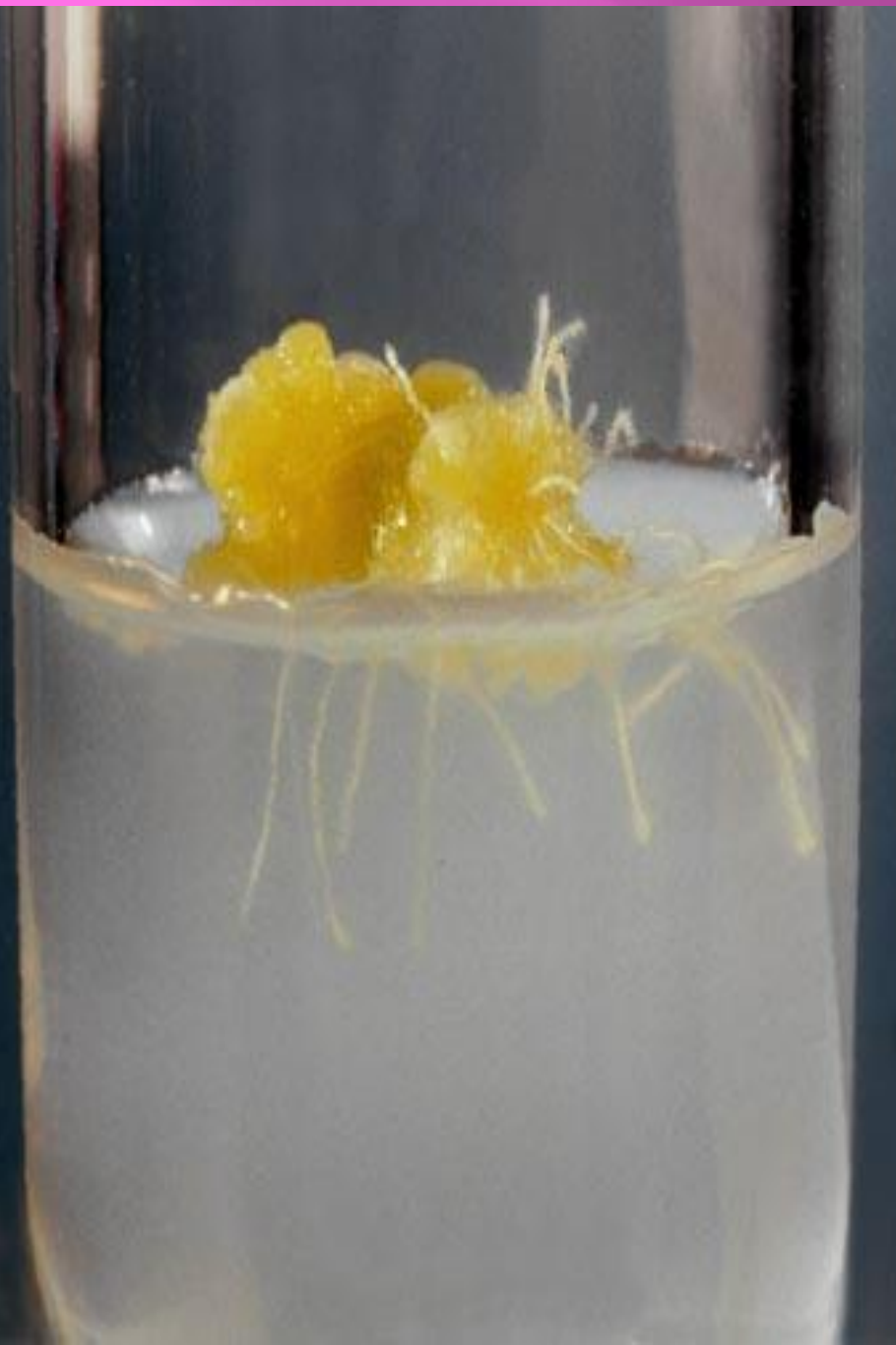
- ✓ Независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода, почвенные условия, вредители и т.п.).
- ✓ Высокий выход и качество продукта благодаря оптимизации и стандартизации условий выращивания.
- ✓ Экономия посевных площадей.
- ✓ Растения – источник многих экономически важных БАВ, но запасы растительного сырья в природе постепенно истощаются.

НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

I. Связано со способностью изолированных растительных клеток, продуцировать первичные и вторичные метаболиты (ферменты, алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.) для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей производства.

II. Связано с использованием культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала от вирусов и других патогенов (метод клонального микроразмножения растений).

III. Связано с использованием изолированных клеток в селекции растений.



КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА – неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток, которые в дальнейшем специализируются как каллусные, т.е. становятся особым образом дифференцированными.

Каллусная ткань аморфна, не имеет конкретной анатомической структуры, в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции:

- 1) **рыхлой**, состоящей из сильно оводненных клеток, легко распадающихся на отдельные мелкие агрегаты;
- 2) **средней плотности**, с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- 3) **плотной**, в ней дифференцированы элементы камбия.

ХАРАКТЕР РОСТОВОЙ КРИВОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ

1. Латентная (лаг-фаза) фаза не связана с увеличением числа и массы клеток. В этот период происходит подготовка клеток к делению.

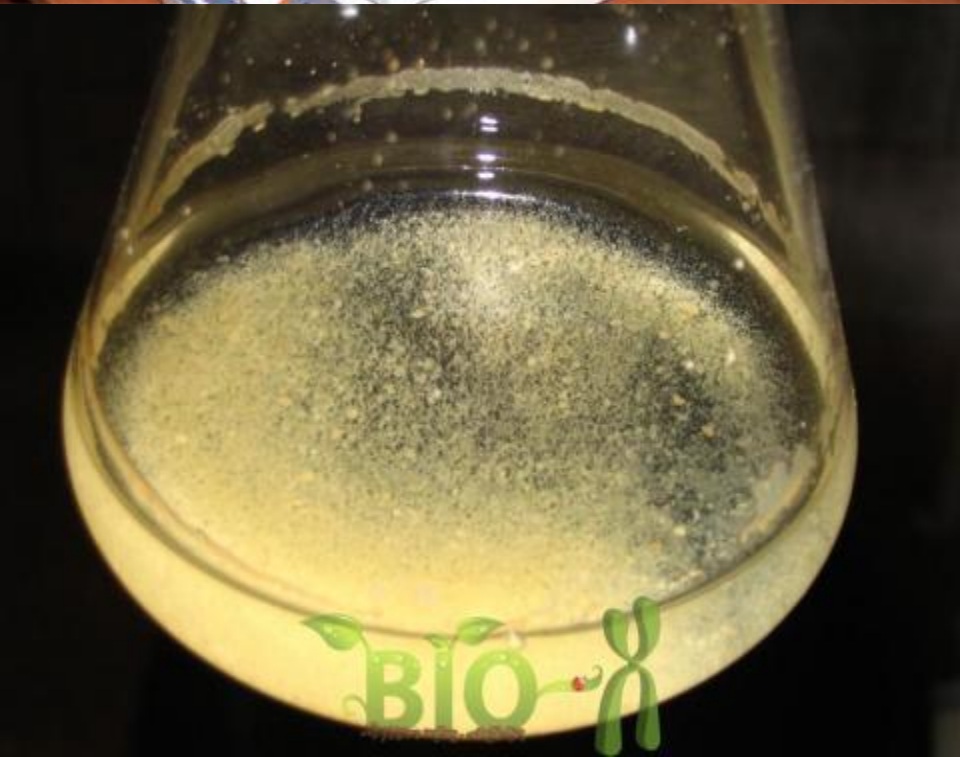
2. Логарифмическая фаза (фаза экспоненциального роста) связана с высокой митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры. В данной фазе рост культуры происходит с ускорением.

3. Линейная фаза характеризуется постоянной скоростью роста клеток.

4. Фаза замедленного роста связана с резким снижением митотической активности клеток.

5. Стационарная фаза связана с выходом ростовой кривой на плато. В этот период начинается деградация клеток, но она еще уравнивается возрастом числом клеток за счет их деления. В целом скорость нарастания клеточной массы равна нулю.

6. КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ: ПОНЯТИЕ, ВИДЫ, ТЕХНИКА ПОЛУЧЕНИЯ



6. КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ: ПОНЯТИЕ, ВИДЫ, ТЕХНИКА ПОЛУЧЕНИЯ

Исходным материалом для суспензионных культур могут быть: изолированные целые клетки органа растения и измельченный каллус.

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР

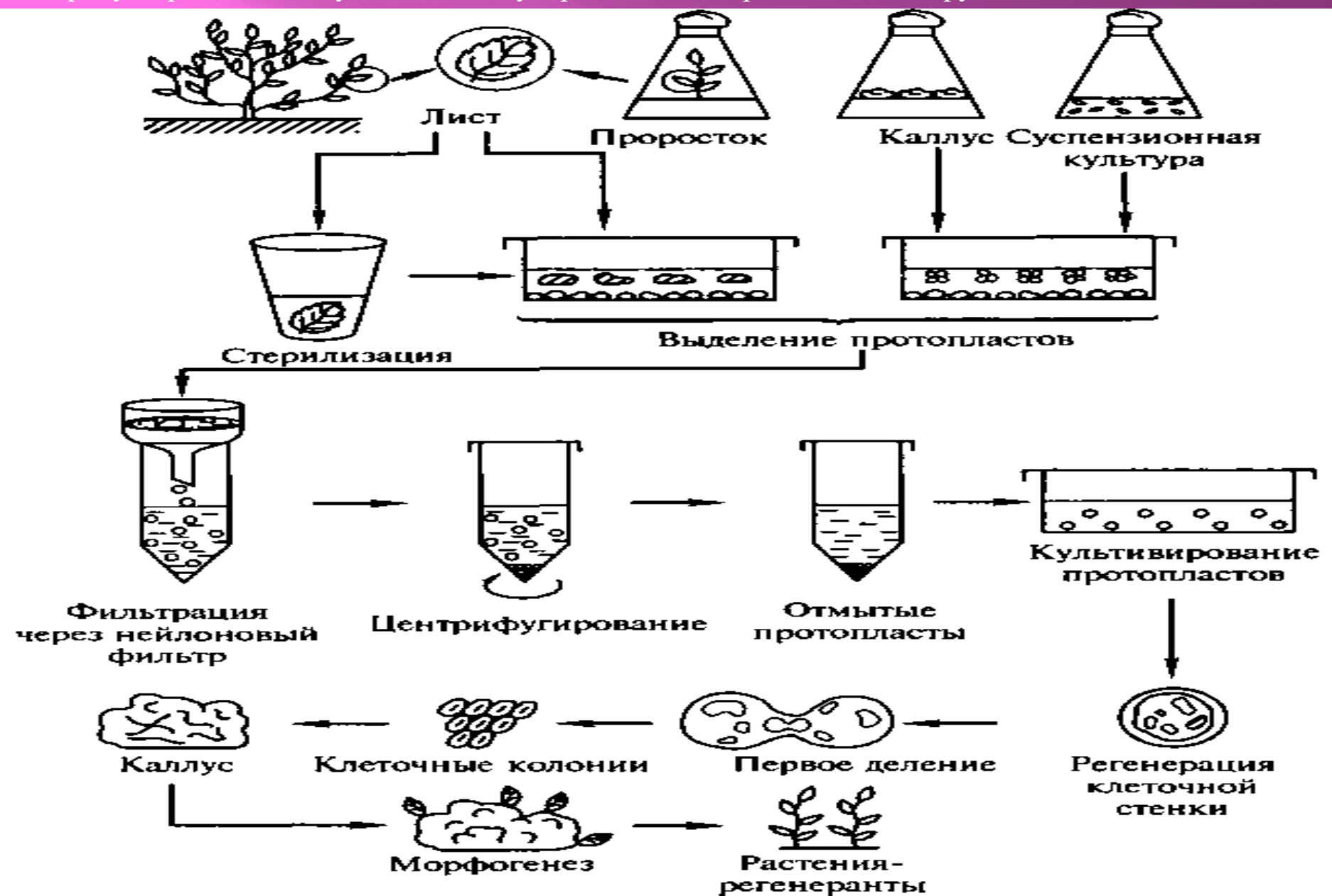
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК определяют по их окрашиванию красителями (метиленовой синью или синью Эванса): живые клетки не окрашиваются вследствие непроницаемости клеточных мембран для красителя, тогда как в мертвые клетки краситель легко проникает и они окрашиваются в синий цвет.

ПЛОТНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ: число клеток суспензии определяется микроскопическим методом с помощью счетной камеры Фукса-Розенталя после предварительной мацерации клеток. В качестве мацерирующего вещества применяют 10–20 % хромовую кислоту.

РОСТОВАЯ КРИВАЯ: хорошо растущая суспензия имеет s-образный характер ростовой кривой. Длительность каждого пассажа составляет 14–16 сут.

СТЕПЕНЬ АГРЕГАТИВНОСТИ КЛЕТОК: агрегаты должны содержать не более 10–12 клеток, для того чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры, что позволяет освободиться и от остатков экспланта или плотных кусков каллусной ткани.

ПРОТОПЛАСТ – клетка, полностью лишенная клеточной стенки и имеющая только клеточную мембрану, ограничивающую цитоплазму с различными органоидами и другими включениями.



ОДИНОЧНЫЕ КЛЕТКИ ВЫДЕЛЯЮТ из клеточных суспензий, из тканей растений, из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

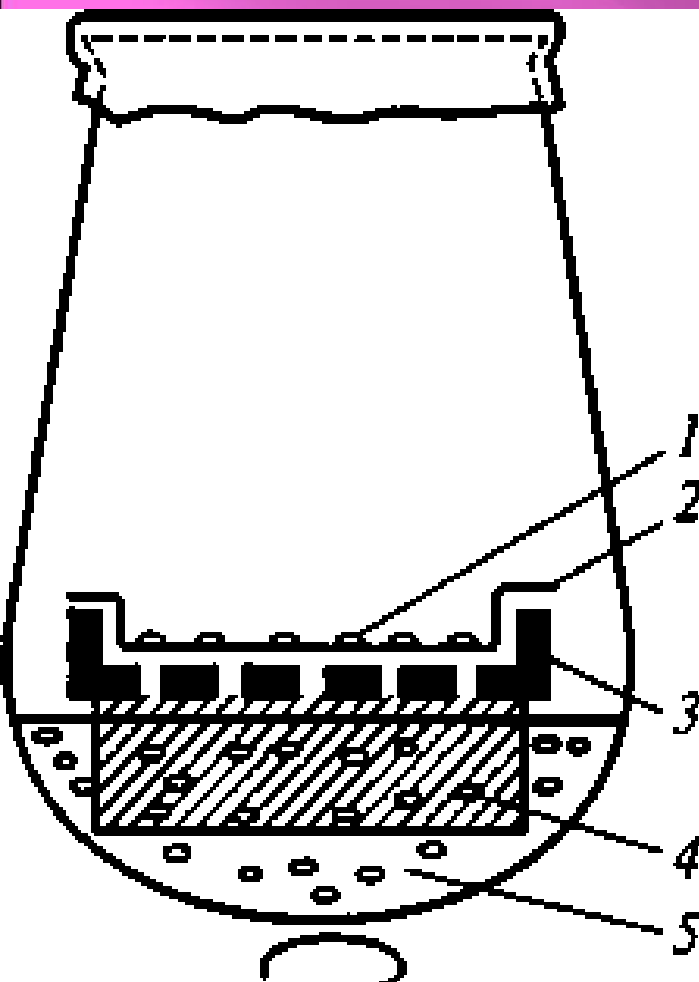
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ФРАКЦИИ суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15–30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно колбы, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. Если при отстаивании не удастся получить одноклеточную фракцию, то применяют мацерирующие ферменты, центрифугирование или фильтрование через сита.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК

1. Метод Джонсона (метод «няньки»): функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки каллусной ткани, отделенные от нее фильтровальной бумагой. В присутствии «няньки» одиночная клетка делится и дает индивидуальную колонию клеток.

2. Культивирование одиночных клеток в микрокапле в чашке Купрака ($V=20$ мкл) – метод разработан акад. Ю.Ю. Глебой. Его преимущество заключается в том, что в микрокаплях удобно наблюдать за делением клеток при соматической гибридизации.

3. Метод «кормящего слоя» основан на том, что индукция клеточных делений у одиночной клетки может быть связана с применением «кормящего слоя» (активно делящихся клеток суспензионной культуры того же вида растения, что и одиночная клетка).



- 1 — колонии клеток;
- 2 — фильтровальная бумага;
- 3 — алюминиевая сетка;
- 4 — пенополиуретан;
- 5 — суспензия клеток

Использование в качестве «няньки» культуры суспензионных клеток при выращивании изолированных протопластов и одиночных клеток

ПРОДУКТЫ БИОСИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Растение	Соединение	Область применения
<i>Rauwolfia serp.</i>	Индольные алкалоиды	Фармация
<i>Panas ginseng</i>	Панаксазиды	
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Стероидные сапонины	
<i>Lithospermum erythrorh Izon</i>	Шиконин	Пищевое производство
<i>Nicotiana tabacum</i>	Аминокислоты, ферменты, витамины	Сельское хозяйство, пищевое производство