

# 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 «Генетика») 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*

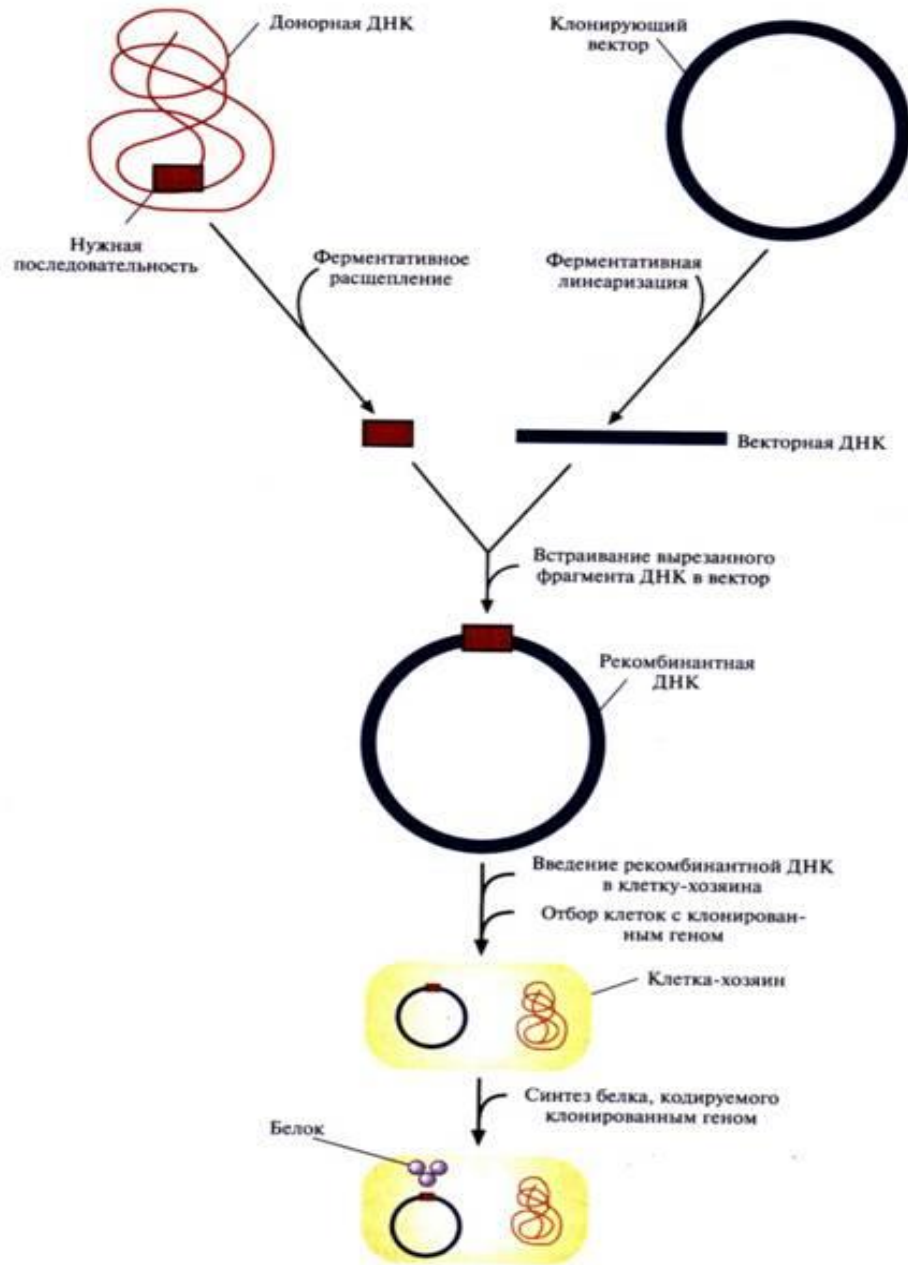
#### **ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ КАК НАУКИ:**

**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 комплементарными 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.**





**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  $\lambda$ -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  $\lambda$ , 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
<b>Медицина и ветеринария</b>	Производство инсулина, интерлейкинов, интерферонов, гормона роста, эритропоэтина, ДНК-азы, альгинат-лиазы, иммуноглобулинов, рекомбинантных вакцин
<b>Сельское хозяйство</b>	Микробные инсектициды, микробные удобрения, производство стимуляторов роста растений
<b>Биодеградация</b>	Утилизация целлюлозы, ароматических соединений, производство этанола
<b>Производство ферментов и малых биомолекул</b>	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:**

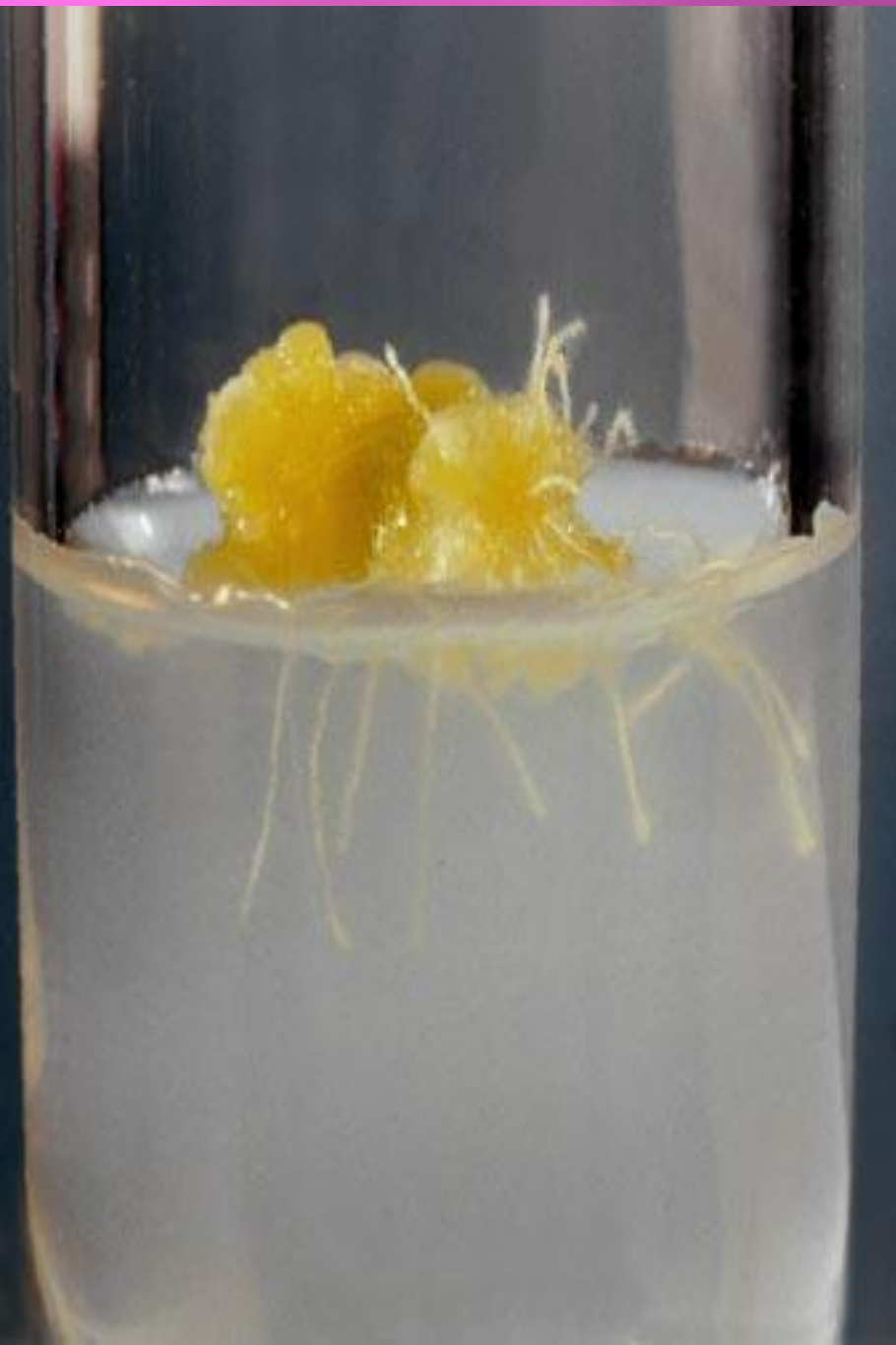
- ✓ Независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода, почвенные условия, вредители и т.п.).
- ✓ Высокий выход и качество продукта благодаря оптимизации и стандартизации условий выращивания.
- ✓ Экономия посевных площадей.
- ✓ Растения – источник многих экономически 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.

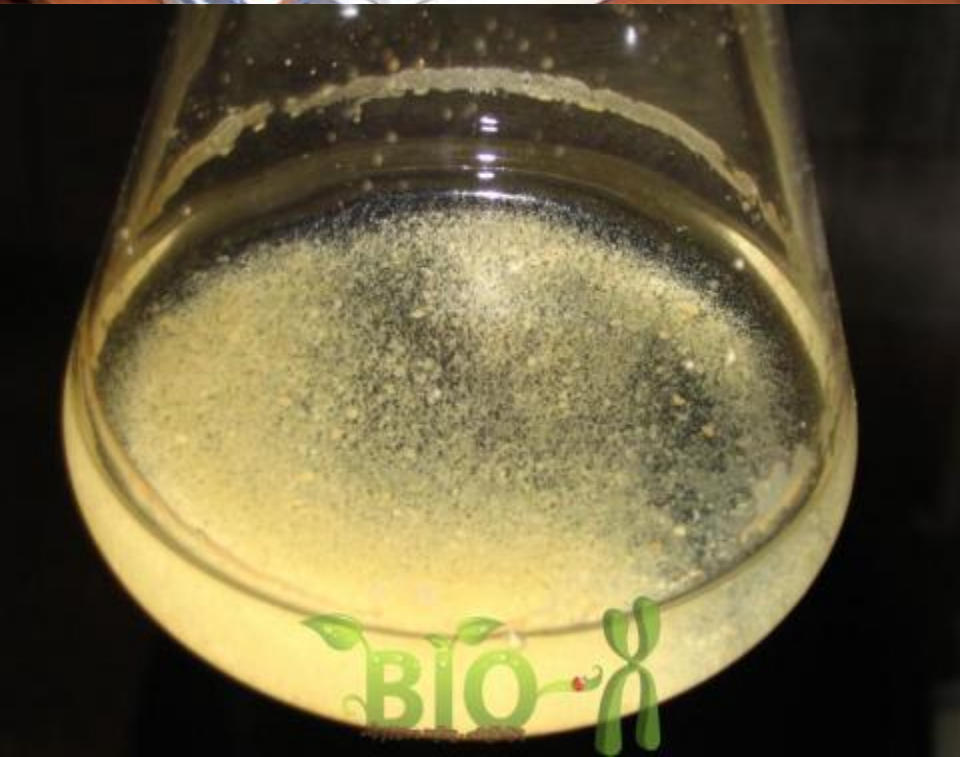
**2. Логарифмическая фаза (фаза экспоненциального роста)** связана с высокой митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры. В данной фазе рост культуры происходит с ускорением.

**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.

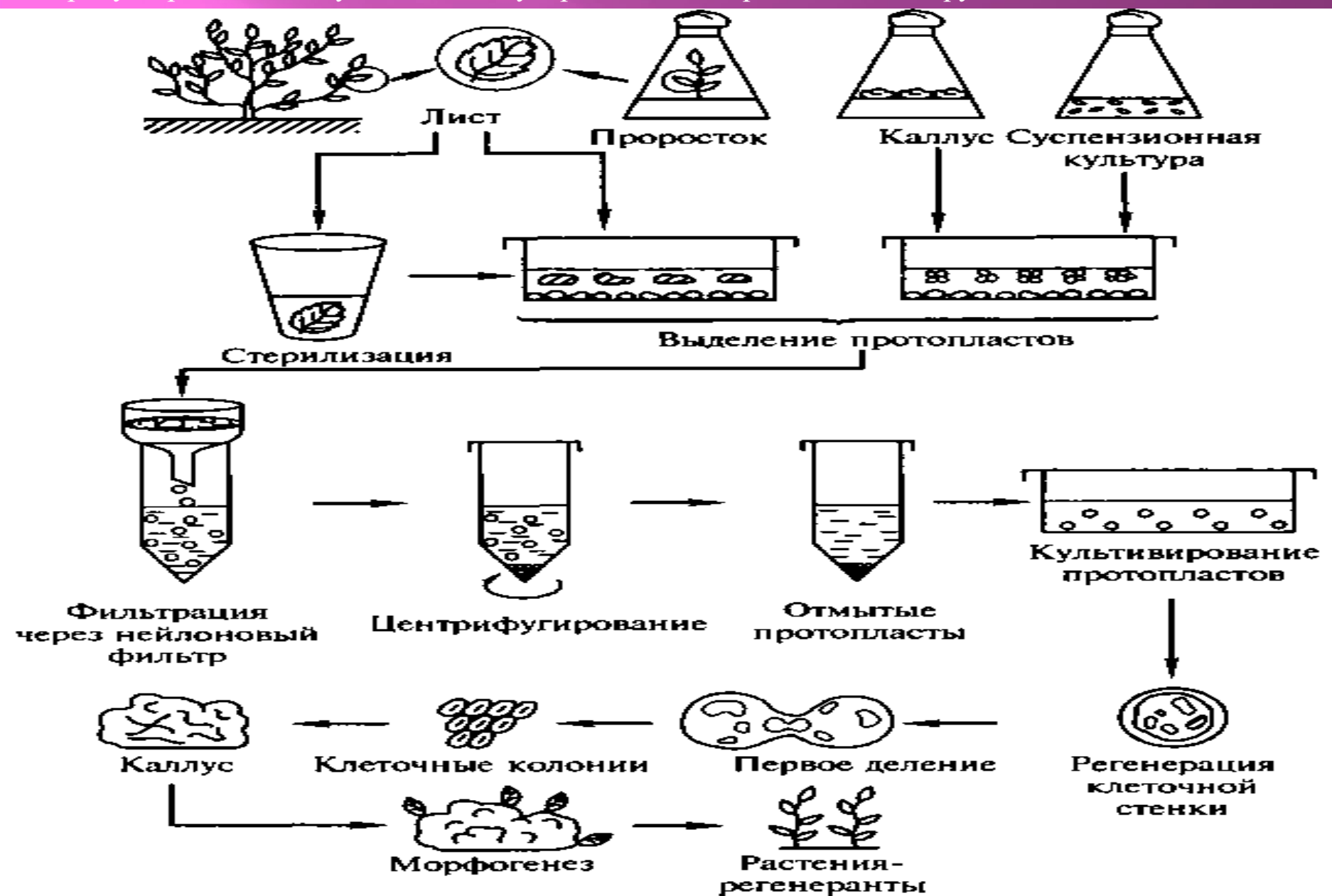
**ПЛОТНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ:** число клеток суспензии определяется микроскопическим методом с помощью счетной камеры Фукса-Розенталя после предварительной мацерации клеток. В качестве мацерирующего вещества применяют 10–20 % хромовую кислоту.

**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 лишённая 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.

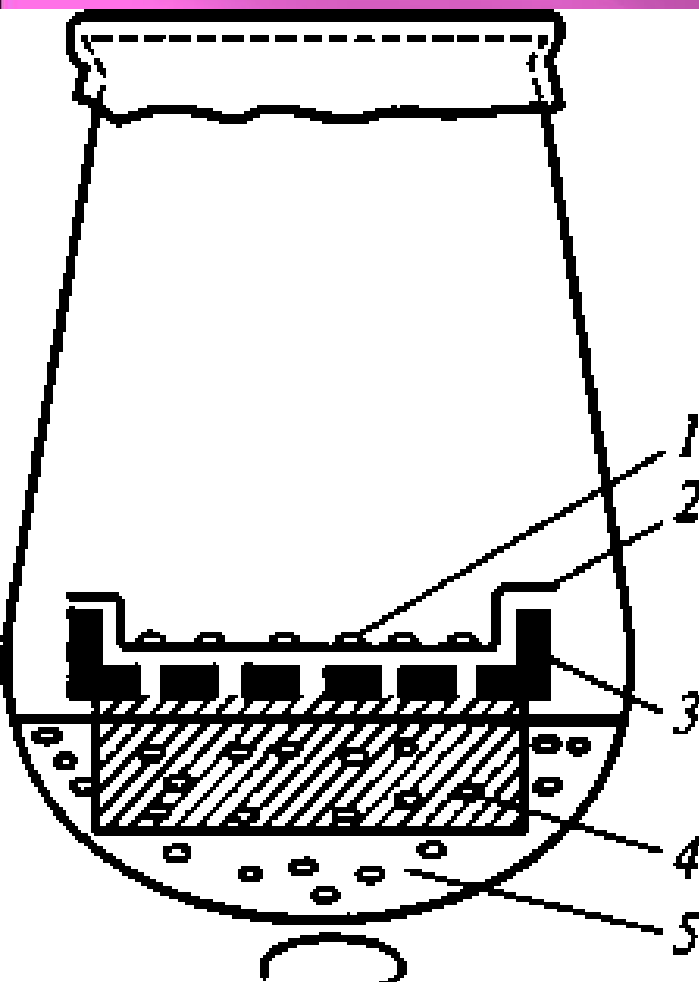
**ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ФРАКЦИИ** суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15–30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно колбы, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. Если при отстаивании не удастся получить одноклеточную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