

## Занятие семинарского типа № 4

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Технология рекомбинантных ДНК в производстве антибиотиков. Рекомбинантные продуценты антибиотиков. Культуры растительных клеток в производстве антибиотиков

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Совершенствование биологических объектов – продуцентов антибиотиков

Повышение продуктивности микроорганизма как продуцента биологически активных веществ (БАВ), в том числе и антибиотиков, в основном сводится к селекции и мутагенезу. Селекционная работа с микроорганизмом состоит в поиске природных форм, обладающих полезными для человека свойствами (синтез БАВ, высокая скорость роста, способность усваивать доступные субстраты и т.д.), в дальнейшем его совершенствовании, в создании на его основе промышленных штаммов.

Методы современной селекции состоят в генетическом конструировании, когда можно изменить генетическую программу микроорганизма.

Генетическое конструирование в живой клетке *in vivo* включает получение и выделение мутантов с использованием разных способов обмена наследственной информацией живых микробных клеток.

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, которая манипулирует выделенной из организма ДНК.

Каждый организм имеет свой генотип и фенотип. Биотехнолог для совершенствования биологического объекта использует:

- ✓ наследственные изменения фенотипа, которое передается по наследству;
- ✓ наследственное изменение генотипа.

В целом совершенствование биологического объекта заключается в получении биообъектов (продуцентов БАВ) с определенными мутациями в геноме, которые отличаются от исходного («дикого») штамма в сторону улучшения биотехнологических свойств, в частности, в плане увеличения образования целевого продукта.

В результате селекции производительность продуцентов удается увеличить в сотни или тысячи раз. В частности, в результате селекционной работы с *Penicillium* методами селекции выход пенициллина был увеличен в конечном итоге, примерно в 10 тыс. раз в сравнении с исходным диким штаммом.

Отбору высокопроизводительных штаммов предшествуют тонкие манипуляции селекционера с генетическим материалом исходных диких штаммов. При этом используют весь спектр естественных способов рекомбинации генов, известных у бактерий: конъюгацию, трансдукцию, трансформацию и другие генетические процессы. В частности, конъюгация была успешно ис-

пользована при создании штамма *Pseudomonas putida*, способного утилизировать углеводороды нефти. Часто прибегают к трансдукции (перенос гена из одной бактерии в другую посредством бактериофагов) и амплификации (увеличение числа копий нужного гена).

У многих микроорганизмов гены биосинтеза антибиотиков или их регуляторы находятся не в хромосоме, а в плазмидах. Путем амплификации удастся увеличить число данных плазмид в клетках и повысить выход антибиотиков.

Еще один подход в генетико-селекционной работе – получение генетических рекомбинантов путем слияния разных штаммов бактерий, лишенных клеточных стенок (протопластов). В частности, путем слияния протопластов двух штаммов *Streptomyces* был сконструирован новый высокоэффективный штамм – продуцент рифампицина С; мутанты *Nocardia mediterranei*, в которых не синтезировался рифампицин, после слияния их протопластов были получены штаммы, продуцирующие три новых рифампицина. Слияние протопластов позволяет объединять генетические материалы микроорганизмов, которые в естественных условиях не скрещиваются.

К основным целям, которые необходимо достигать биотехнологу при совершенствовании продуцента БАВ, в том числе и антибиотиков, относятся:

1. Увеличение продуктивности в достижении большого выхода лекарственных веществ на единицу биомассы.
2. Придание продуценту способности использовать менее дефицитные и более доступные в экономическом отношении питательные среды.
3. Продуцент не должен ретроингибировать биосинтез конечного продукта.
4. Устойчивость продуцента к вирусным инфекциям (бактериофагам).
5. Нетребовательность к оборудованию, т.е. биосинтез не должен снижаться при несовременной технологии оборудования (например, достижение меньшей вспениваемости культуральной жидкости).
6. Оптимизация свойств продуцента в аспекте медицинской промышленности (продуцент не должен иметь неприятного запаха и т.п.).

В этой связи, главным тезисом биотехнолога, прежде всего, является увеличение выхода целевого продукта на единицу биомассы продуцента.

## **2. Совершенствование биообъектов с помощью методов селекции**

Первоначально основу селекции составлял искусственный отбор: отбор человеком растения или животных с нужными (ценными) для него признаками. До XVI–XVII вв. отбор в основном осуществлялся бессознательно, например, человек отбирал для посева лучшие, наиболее крупные семена пшеницы, не задумываясь о том, что он изменяет растения в нужном ему направлении.

Только в последнее столетие человек, еще не зная законов генетики, стал использовать отбор сознательно или целенаправленно, скрещивая те растения, которые удовлетворяли его в наибольшей степени.

Однако, следует отметить, что используя только метод отбора человек не может получить принципиально новые свойства у селекционируемых организмов (растений, животных, микроорганизмов), т.к. в результате отбора можно выделить только генотипы, уже существующие в популяции. В этой связи, для получения новых пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов применяют гибридизацию, скрещивая растения с необходимыми признаками и в дальнейшем отбирая из полученного потомства особи, у которых полезные свойства выражены в большей степени. Так, например, один сорт пшеницы отличается прочным стеблем, устойчив к полеганию, а сорт с тонкой соломиной не подвержен заражению стеблевой ржавчиной. При скрещивании растений двух сортов в потомстве возникают различные комбинации признаков. Однако, отбирают те растения, которые имеют одновременно прочную соломинку и устойчивы к заражению стеблевой ржавчиной. Это один из классических путей создания нового сорта.

### **Характеристика методов селекции**

- СЕЛЕКЦИЯ**
1. наука о методах создания новых сортов и гибридов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с нужными для человека признаками;
  2. направленный отбор мутантов, т.е. организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК;
  3. отрасль сельскохозяйственного производства, занимающаяся выведением новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур, пород животных.

Генеральный путь селекции – это путь от слепого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов.

Теоретической основой селекции является генетика, т.к. именно знание законов генетики позволяет целенаправленно управлять появлением новых мутаций, прогнозировать результаты различных скрещиваний, правильно проводить отбор полученных гибридов. В результате применения знаний по генетике удалось создать более 10000 сортов пшеницы на основе нескольких исходных диких сортов, получить новые штаммы микроорганизмов, являющихся продуцентами ценных БАВ: пищевые белков, лекарственных веществ (антибиотиков, витаминов, ферментов, аминокислот и т.п.).

Предмет селекции состоит в изучении и претворении на практике специфических закономерностей эволюции культурных растений, сельскохозяйственных животных и искусственных штаммов.

К задачам современной селекции относятся:

1. Создание новых и совершенствование старых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с хозяйственно-полезными признаками.

2. Создание технологичных высокопродуктивных биологических систем, максимально использующих сырьевые и энергетические ресурсы планеты.

3. Повышение продуктивности пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов с единицы площади за единицу времени.

4. Повышение потребительских качеств продукции.

5. Уменьшение количества побочных продуктов и их комплексная переработка.

6. Уменьшение количества потерь от вредителей и болезней.

К традиционным методам селекции относят: отбор, гибридизацию и мутагенез.

Методы	Селекция
1.Подбор родительских форм	осуществляют по ценным признакам или по экстерьеру
2.Гибридизация	аутбридинг, инбридинг и др.
3.Отбор	единичный, индивидуальный, систематический (методический), массовый
4.Мутагенез	естественные и спонтанные мутации
5.Испытание производителей по потомству	метод искусственного осеменения

**Отбор.** Различают естественный и искусственный отбора.

Естественный отбор – основной движущий фактор эволюции. Учение о естественном отборе создано Ч. Дарвином (1858–1859 гг.).

Естественный отбор – результат борьбы за существование, выражающийся в преимущественном выживании и оставлении потомства наиболее приспособленными особями каждого вида организмов, и гибели менее приспособленных особей. Необходимой предпосылкой для его действия является наследственная изменчивость организмов, а его непосредственным результатом – формирование приспособлений организмов к конкретным условиям внешней среды. Следствиями естественного отбора являются увеличение разнообразия форм организмов, последовательное усложнение организации в ходе прогрессивной эволюции и вымирание менее приспособленных видов.

Искусственный отбор – отбор, проводимый человеком, состоящий в выбраковке особей, не представляющих ценности в хозяйственной деятельности и в оставлении для потомства особей с ценными признаками.

Бессознательный искусственный отбор – отбор, при котором человек, отбирая особей для потомства, не ставит перед собой задачи изменить данный организм в каком-либо направлении, а лишь учитывает определенные его качества, необходимые для улучшения хозяйственной деятельности.

Целевой (сознательный) отбор – отбор, проводимый селекционерами, состоящий в том, что он осуществляется в соответствии с определенной, заранее поставленной целью, когда свойства организмов корректируются в определенном направлении.

Различают следующие виды целевого отбора:

✓ **единичный отбор** – отбор, проводимый однократно из определенной группы особей;

✓ **методический (систематический) отбор** – отбор, проводимый в течение нескольких поколений с целью выведения форм организма, в наибольшей степени отвечающих нуждам человека;

✓ **индивидуальный отбор** – отбор на уровне конкретных особей данной породы животных или сортов растений. При данном виде отбора (по генотипу) получают и оценивают потомство каждого отдельного растения в ряду поколений при обязательном контроле наследования признаков, интересующих селекционера. В результате индивидуального отбора увеличивается число гомозигот, т.е. полученное поколение становится генетически однородным. Данный отбор обычно применяют среди самоопыляемых растений (пшеницы, ячменя и др.) для получения чистых линий, представляющих ценный исходный материал для селекции;

✓ **массовый отбор** – отбор потомства большого числа особей одновременно. В частности, из всей популяции злаковых культур того или иного сорта для дальнейшего размножения оставляют только растения, отличающиеся устойчивостью к возбудителям болезней и полеганию, имеют крупный колос с большим числом колосков и т.д. При их повторном посеве снова отбирают растения с необходимыми качествами. Сорт растения, полученный данным способом, генетически однороден, и отбор периодически повторяют. К основным достоинствам этого метода относятся: техническая простота, экономичность и возможность сравнительно быстро улучшить местные сорта. В тоже время, его основной недостаток состоит в невозможности индивидуальной оценки по потомству, в силу чего результаты отбора неустойчивы.

В селекции используют все перечисленные виды отбора. Однако, отбор сам по себе не дает результата, если у организмов не будут возникать определенные изменения. Изменения сами по себе возникают медленно, стихийно и не всегда в нужных направлениях, поэтому селекционеры используют воздействия на организм, инициируя возникновение целевых изменений.

**Гибридизация** (скрещивания) заключается в том, что получают потомство от особей, различающихся определенными признаками, которые можно использовать в дальнейшей селекционной работе. Гибридизация позволяет в некоторой степени нарушать консерватизм наследственности, что способствует селекционной работе.

Различают близкородственную, неродственную и отдаленную гибридизацию.

Близкородственной гибридизацией (инбридингом) называют скрещивание, в котором участвуют близкородственные организмы. Инбридинг используют для получения «чистых линий», в которых свойства, присущие данному сорту растений, породе животных или штамму микроорганизмов, выделяются в наиболее концентрированном виде. Подобное выделение целевого признака связано с тем, что генотип родственных организмов близок, а их скрещивание способствует возникновению гомозиготных форм. Следует отметить, что при инбридинге наблюдается гибридная депрессия – снижение жизнеспособности и продуктивности вследствие близкородственного скрещивания. Получение «чистых линий» находит широкое применение в селекции, т.к. позволяет выявить свойства организмов, важные для хозяйственной деятельности, а затем использовать полученные формы в дальнейшей селекционной работе.

Неродственной гибридизацией называют скрещивание особей данного вида, принадлежащих к разным семьям.

Отдаленная гибридизация – скрещивание организмов, принадлежащих не только к разным породам, но и к разным видам.

Реализация межвидовой гибридизации возможна за счет полиплоидии – явления, при котором в клетке возникает набор хромосом, в кратное число раз больший, чем это характерно для нормы.

**Мутагенез** – искусственное получение мутаций с помощью мутагенов.

Термин «мутагенез» предложен голландским ученым де Фризом в 1901 г.

В селекционной практике мутагенез используют для получения перспективных мутантов животных, растений и микроорганизмов.

Мутант – наследственно измененная в результате мутации форма организма. Мутанты могут возникать спонтанно или под действием мутагенов. Большинство мутантов отличаются от исходных организмов нарушением различных структур и функций и, как правило, отличаются пониженной жизнеспособностью. Гораздо реже возникают мутанты, обладающие преимуществами, которые широко используют для выведения новых сортов растений, пород животных и получения штаммов микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ (БАВ). В генетике мутанты используют для изучения закономерностей мутационного процесса: строения и функционирования генетического аппарата, путей биосинтеза и т.п. Мутанты играют важную роль в эволюции, т.к. представляют собой материал для естественного отбора.

Мутации – внезапные, естественные или вызванные искусственно наследуемые изменения генетического материала, приводящие к изменению тех или иных признаков организма. Мутации могут быть обусловлены перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов) или изменениями внутри индивидуального гена.

## **Классификация мутаций**

Различают спонтанные мутации, возникающие с относительно низкими частотами, и индуцированные мутации, индуцируемые воздействием мутагенов.

Виды мутагенов:

К физическим мутагенам относят: нагревание, ионизирующие, ультрафиолетовое (УФ) и микроволновое излучения. Первичный эффект ионизирующих и УФ излучений заключается в образовании одиночных или двойных разрывов в молекуле ДНК.

Мутагенным действием обладают многие химические соединения (алкилирующие соединения, нитрозосоединения, противоопухолевые антибиотики и др.). Химические мутагены классифицируют на: мутагены прямого действия, непосредственно взаимодействующие с генетическим материалом клетки, и мутагены непрямого действия, влияние которых на генетический материал клетки опосредованно, реализуется через ряд метаболических превращений. Однако, в отличие от ионизирующих и УФ излучений, для химических мутагенов свойственна специфичность действия, зависящая от природы объекта и стадии развития клетки. При взаимодействии химических мутагенов с компонентами наследственных структур возникают их первичные повреждения, приводящие к возникновению мутаций.

К биологическим мутагенам относят ДНК- и РНК-содержащие вирусы, некоторые полипептиды, белки, ряд рестриктаз и т.п. Механизм образования мутации в результате воздействия разных биологических факторов не вполне ясен. Однако, агенты, содержащие нуклеиновые кислоты, могут вызывать нарушение рекомбинации, приводящие к возникновению мутаций.

## **Механизм действия некоторых мутагенов**

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.

Прямое действие ионизирующей радиации на хромосомы и содержащуюся в них ДНК обуславливает почти линейную зависимость между дозой облучения и частотой возникновения генных мутаций и нехваток (малых делеций). Для хромосомных перестроек (более крупные делеции, инверсии, транслокации и др.), возникающих в результате двух разрывов хромосомы, зависимость между дозой облучения и их частотой носит более сложный характер.

Мутагенное действие ионизирующих излучений может быть и косвенным, т.к. их прохождение через цитоплазму или питательную среду, в которой культивируются микроорганизмы, вызывает радиолиз воды, а, следовательно, образование свободных радикалов и перекисей, обладающих мутагенным действием.

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.

Однако, ультрафиолетовые лучи плохо проникают во внутренние ткани организма, поэтому их мутагенное действие проявляется только там, где они могут достигнуть генетического аппарата (при облучении вирусов, бактерий, спор растений и т.п.).

Алкилирующие соединения. К их числу относятся наиболее сильные из известных мутагенов (супермутагены) такие, как нитрозоэтилмочевина, этилметансульфонат и др., алкилируют фосфатные группы нуклеиновых кислот, приводя к разрывам углеводно-фосфатного остова молекулы, а также азотистые основания (гуанин), в результате чего нарушается точность репликации нуклеиновых кислот, и, возникают транзиции (мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на другое пуриновое основание (аденин на гуанин или наоборот) или пиримидиновое основание на другое пиримидиновое основание (тимин на цитозин или наоборот), и реже — трансверсии (мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на пиримидиновое основание или наоборот).

Аналоги азотистых оснований включаются в нуклеиновые кислоты, что при последующей репликации приводит к появлению транзиций и трансверсий.

Эти же типы изменений вызываются **азотистой кислотой**, дезаминирующей 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.

Аналогичные типы реакций с нуклеиновыми кислотами характеризуют и другие химические мутагены. Однако, для многих из них механизм мутагенеза изучен недостаточно.

Некоторые мутагены нарушают цитоплазматический аппарат митоза, а, следствием этого является нерасхождение всех разделившихся хромосом или неправильность их распределения между дочерними клетками. При этом в первом случае возникает полиплоидия, во втором – анеуплоидия.

На ход мутагенеза значительное влияние оказывают различные внешние факторы. Так, частота мутаций, индуцируемых ионизирующими излучениями, возрастает при поступлении в клетку кислорода и уменьшается при его недостатке (в том случае, если облучение происходит в атмосфере азота).

При действии некоторых химических мутагенов мутации могут возникать сразу или спустя некоторое время, а иногда через несколько клеточных поколений.

Мутации называют прямыми, если их проявление приводит к отклонению признаков от дикого типа, и обратными мутациями (реверсиями), если



их проявление приводит к полному или частичному восстановлению дикого типа.

Мутации бывают: генеративными (происходят в половых клетках и передаются следующим поколениям), соматическими (происходят в соматических клетках организма и наследуются только при вегетативном размножении), ядерными (затрагивают хромосомы ядра), цитоплазматическими (затрагивают генетический материал, заключенный в цитоплазматических органоидах клетки).

По характеру изменения генотипа различают следующие виды мутаций:

Генные мутации представляют наследственные, микроскопически не выявляемые изменения в хромосомах. Они сопряжены с заменой пары азотистых оснований в полинуклеотидной цепи ДНК или с вставкой или выпадением отдельных нуклеотидов.

Хромосомные мутации (хромосомные абберации) классифицируют на: внутривхромосомные и межхромосомные. К внутривхромосомным мутациям относят: делецию (утрата части хромосомы), дупликацию (удвоение части хромосомы) и инверсию (изменение последовательности расположения генов по длине хромосомы за счет перевертывания (инверсии) участка хромосомы на  $180^\circ$ ). К межхромосомным мутациям относят транслокацию (обмен участками между двумя и более хромосомами).

Геномные мутации заключаются в изменении числа хромосом. Увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору хромосом, называют полиплоидией. Отсутствие или избыточное количество отдельных хромосом объединяют понятием анеуплоидия, которую подразделяют на гиперплоидию (увеличение числа хромосом) и гипоплоидию (потеря отдельных хромосом). Данные мутации возникают за счет повреждений в процессе мейоза, ведущих к нерасхождению хромосом или хроматид по дочерним клеткам.

Мутационный процесс у микроорганизмов можно использовать более эффективно, чем у высших организмов, т.к. их геном является гаплоидным, что позволяет выделять любые мутации уже в первом поколении. Кроме того, к преимуществам микроорганизмов как объектов биотехнологии относятся: простота генетической организации в сравнении с эукариотами, простота генетической регуляции, отсутствие или не столь сложное взаимодействие генов. В той связи, используя методы генетической инженерии можно заставить бактерии или другие группы микроорганизмов продуцировать те соединения, синтез которых в дикой природе был им несвойственен.

С точки зрения совершенствования биообъектов – продуцентов антибиотиков с помощью традиционных методов селекции следует подчеркнуть перспективность использования так называемого мутационно-ступенчатого отбора, с помощью которого удалось добиться увеличения активности продуцента пенициллина в 100000 раз за счет амплификации (умножения) генов, кодирующих образование LLD-трипептида.

Мутосинтез и мутосинтоны представляют новое направление в создании новых лекарственных средств, базирующееся на использовании мутагенеза. Примером этого служит получение мутосинтонов на основе аминокликози-

дов, формула которых представлена аминокиклитолом (устойчивая часть молекулы аминогликозида) и различными углеводами (лабильная составляющая в структуре молекулы). Сущность данного метода заключается в том, что сначала генетики удаляют аминокиклитол из структуры антибиотика, получая блок-мутанты, затем химики преобразуют аминокиклитол и далее биотехнологии соединяют в новую структуру антибиотика новый аминокиклитол и углеводы в мультиферментных комплексах, в которых и происходит сборка новой молекулы антибиотика.

Выделяют три перспективных направления применения достижений селекции – селекция растений, животных и микроорганизмов. При этом третье направление – селекция микроорганизмов – способствует развитию такой сферы человеческой деятельности, как биотехнология.

Практическое значение селекции заключается в повышении продуктивности сельскохозяйственных животных, урожайности сельскохозяйственных растений и эффективности биотехнологических производств.

### **Направления селекционного процесса**

**Селекция растений** представляет собой совокупность методов создания новых сортов и гибридов растений с ценными для человека свойствами, повышающими урожайность и качество культур.

К основным направлениям селекции растений относят:

- 1) Повышение урожайности сортов растений.
- 2) Улучшение качества продукции (вкуса, лежкости, внешнего вида овощей и фруктов, увеличения в химическом составе зерна белка, крахмала, аминокислот и т.п.).
- 3) Приобретение растениями необходимых физиологических качеств (засухоустойчивости, холодостойкости, скороспелости, устойчивости к вредителям и болезням).
- 4) Интенсификация развития (хороший отклик на введение удобрений, полив).

Селекцию растений реализуют с учетом потребностей рынка сбыта сельскохозяйственной продукции. К примеру, с целью выпечки качественного хлеба с мягкой внутренней частью и хрустящей коркой необходимы сильные (стекловидные) сорта мягкой пшеницы с повышенным содержанием эластичной клейковины и белка, для приготовления высших сортов печенья – мучнистые сорта мягкой пшеницы, макаронных изделий – сорта твердой пшеницы.

Развитие селекции растений основывается на законах генетики, т.к. качества живых организмов зависят от их генотипа и могут изменяться вследствие наследственной и модификационной изменчивости. В связи с этим, основу селекции составляет, прежде всего, генетика, а также достижения дру-

гих научных дисциплин (цитологии, эмбриологии, систематики и географии растений, молекулярной биологии, биохимии и физиологии).

К основным методам селекции растений относятся: массовый и индивидуальный отбор, внутривидовая и отдаленная гибридизация, инбридинг, полиплоидия и мутагенез.

Для перекрестноопыляемых растений применяют массовый отбор особей с нужными свойствами. В противном случае невозможно получить материал для дальнейшего скрещивания. Таким путем получают, например, новые сорта ржи, не являющиеся генетически однородными. В случае, если необходимо получить чистые линии, т.е. генетически однородные сорта, то применяют индивидуальный отбор, при котором путем самоопыления получают потомство от одной единственной особи с необходимыми признаками. Данным методом были получены многие сорта пшеницы, капусты и т.д.

Для закрепления полезных наследственных свойств необходимо повысить гомозиготность нового сорта растения. В некоторых случаях для этого применяют самоопыление перекрестноопыляемых растений. При этом могут фенотипически проявиться неблагоприятные воздействия рецессивных генов. Основная причина этого – переход большинства генов в гомозиготное состояние. У любого организма в генотипе постепенно накапливаются неблагоприятные мутантные гены. Они чаще всего рецессивны и фенотипически не проявляются. Однако, в процессе самоопыления они переходят в гомозиготное состояние, приводя к возникновению неблагоприятного наследственного изменения. В природе у самоопыляемых растений рецессивные мутантные гены быстро переходят в гомозиготное состояние, и такие растения погибают, выбраковываясь естественным отбором.

Несмотря на неблагоприятные последствия самоопыления, его часто применяют у перекрестноопыляемых растений для получения гомозиготных («чистых») линий с нужными признаками. Это приводит к снижению урожайности. Однако, проводя впоследствии перекрестное опыление между разными самоопыляющимися линиями, в результате в ряде случаев получают высокоурожайные гибриды, обладающие ценными для селекционера свойствами. Данный метод получил название метода межлинейной гибридизации. При его реализации часто наблюдается эффект гетерозиса: гибриды первого поколения обладают высокой урожайностью и устойчивостью к неблагоприятным воздействиям. Гетерозис характерен для гибридов первого поколения, которые получают при скрещивании не только разных линий, но и разных сортов и даже видов. Эффект гетерозиготной (или гибридной) мощности бывает сильным только в первом гибридном поколении, а в последующих поколениях постепенно снижается. Основная причина гетерозиса заключается в устранении в гибридах вредного проявления накопившихся рецессивных генов. Другая причина состоит в объединении в гибридах доминантных генов родительских особей и взаимного усиления их эффектов.

Следует отметить, что кукуруза стала первым растением, у которого получение высокопродуктивных гетерозисных гибридов было поставлено на

промышленную основу. Валовые сборы зерна такого гибрида были на 20–30 % выше, чем у родительских форм.

В селекции растений широко применяется экспериментальная полиплоидия, т.к. полиплоиды отличаются быстрым ростом, крупными размерами и высокой урожайностью. Кроме того, избыток хромосом повышает их устойчивость к патогенным организмам (вирусам, грибам, бактериям) и ряду других неблагоприятных факторов, в том числе и к ионизирующим излучениям: при повреждении одной или даже двух гомологичных хромосом аналогичные остаются неповрежденными. Полиплоидные особи, как правило, жизнеспособнее диплоидных. Так, в сельскохозяйственной практике широко используются: триплоидная сахарная свекла, четырехплоидный клевер, рожь и твердая пшеница, а также шестиплоидная мягкая пшеница.

Ценные результаты позволяет получить и использование в селекционной практике явления аллополиплоидии, основу которого составляет метод отдаленной гибридизации. Так, выведены межвидовые полиплоидные гибриды капусты и редьки, ржи и пшеницы. Гибридизация пшеницы (*Triticum*) и ржи (*Secale*) позволила получить ряд форм, объединенных общим названием тритикале. Они обладают высокой урожайностью пшеницы и зимостойкостью и неприхотливостью ржи, устойчивостью ко многим болезням, в том числе и к линейной ржавчине, являющейся одним из главных факторов, ограничивающих урожайность пшеницы. На основе гибридизации пшеницы и пырея российским академиком Н.В. Цициным получены пшенично-пырейные гибриды, отличающиеся высокой урожайностью и устойчивостью к полеганию.

Однако, отдаленные гибриды, как правило, бесплодны. Это связано с содержанием в геноме различных хромосом, которые в мейозе не конъюгируют. Для восстановления плодовитости у межвидовых гибридов в 1924 г. советский генетик Г.Д. Карпеченко предложил использовать у отдаленных гибридов удвоение числа хромосом, которое приводит к образованию амфидиплоидов.

Г.Д. Карпеченко проводил скрещивание редьки и капусты. Число хромосом у этих растений одинаково ( $2n = 18$ ). Соответственно, их гаметы несут по 9 хромосом. Гибрид капусты и редьки имеет 18 хромосом, но он бесплоден, т.к. хромосомы этих растений в мейозе не конъюгируют, поэтому процесс образования гамет не может протекать нормально. В результате удвоения числа хромосом в бесплодном гибриде оказалось 36 хромосом, состоящих из двух полных диплоидных наборов редьки и капусты. Это создало нормальные возможности для мейоза: хромосомы капусты и хромосомы редьки конъюгировали между собой. Каждая гамета несла по одному гаплоидному набору редьки и капусты ( $9 + 9 = 18$ ). В зиготе вновь оказалось 36 хромосом; межвидовой гибрид стал плодовитым. По фенотипу новый растительный организм совмещал признаки редьки и капусты, например, в строении стручка.

Получают искусственные полиплоиды, как правило, с использованием химических веществ, разрушающих веретено деления, в результате чего

удвоившиеся хромосомы не могут разойтись, оставаясь в одном ядре. Одним из таких веществ является колхицин. Применение колхицина для получения искусственных полиплоидов является одним из примеров искусственного мутагенеза, применяемого в селекции растений.

В частности, в результате искусственного мутагенеза и последующего отбора мутантов были получены новые высокоурожайные сорта ячменя и пшеницы. Кроме того, данным путем удалось получить новые штаммы микроскопических грибов, синтезирующих в 20 раз больше антибиотиков, чем исходные «дикие» формы. В начале XXI в. в мире культивируют более 250 сортов сельскохозяйственных растений, созданных при помощи физического и химического мутагенеза. К ним относятся: сорта кукурузы, ячменя, сои, риса, томатов, подсолнечника, хлопчатника, декоративных растений и т.п.

При создании новых сортов растений с помощью искусственного мутагенеза исследователи используют закон гомологических рядов Н.И. Вавилова. Организм, получивший в результате мутации новые свойства, называют мутантом. Большинство мутантов имеют пониженную жизнеспособность и отсеиваются в процессе естественного отбора. Для эволюции или селекции новых пород животных и сортов растений необходимы те редкие особи, которые имеют благоприятные или нейтральные мутации.

В последние десятилетия во многих странах мира проводятся научные исследования по получению индуцированных мутантов. Так, например, индуцированные рентгеновыми лучами мутанты были выделены у многих злаковых культур (ячменя, пшеницы, ржи и др.). При этом они отличаются не только повышенной урожайностью, но и укороченным побегом. Такие растения устойчивы к полеганию и имеют заметные преимущества при машинной уборке. Кроме того, наличие короткой и прочной соломины позволяет осуществлять дальнейшую селекцию по увеличению размера колоса и массы семян без опасения, что повышение урожая зерна приведет к полеганию растений.

Выведение новых высокопродуктивных сортов растений имеет важное значение в повышении их урожайности и обеспечении населения продовольствием. За последние 100 лет усилиями селекционеров урожайность зерновых культур была повышена почти в 10 раз. В настоящее время в ряде стран получают рекордные урожаи (100 ц/га) риса, пшеницы, кукурузы и др.

Высококачественные сорта пшеницы созданы российскими селекционерами (Безостая-1, Аврора, Кавказ, Саратовская-29, Саратовская-36, Альбидум-43 и др.), отличающиеся высокой урожайностью, устойчивостью к полеганию, хорошими хлебопекарными и мукомольными качествами в разных климатических зонах.

В результате многолетних исследований российскому академику В.С. Пустовойту удалось добиться увеличения масличности разных сортов подсолнечника на 20 %. В частности, им созданы сорта, масличность которых составляет 54–59 %.

Значительные успехи достигнуты и селекционерами Беларуси. Учеными Белорусского научно-исследовательского института картофелеводства и

плодоовощеводства с 1925 г. по 1995 г. выведено 69 сортов картофеля, более 70 овощных, 124 плодовых и 23 сорта ягодных культур.

**Селекция животных.** Основные принципы селекции животных не отличаются от принципов селекции растений. Однако, селекция животных имеет некоторые особенности: для них характерно только половое размножение; в основном очень редкая смена поколений (у большинства животных через несколько лет); количество особей в потомстве невелико. В связи с этим, в селекционной работе с животными важное значение приобретает анализ совокупности внешних признаков или экстерьера, свойственного для той или иной породы.

Одним из важнейших достижений человека на заре его становления и развития (10–12 тыс. лет назад) было создание постоянного и достаточно надежного источника продуктов питания за счет одомашнивания диких животных. Основным фактором одомашнивания служит искусственный отбор организмов, отвечающих требованиям человека. У домашних животных весьма развиты отдельные признаки, часто бесполезные или даже вредные для их существования в естественных условиях, но полезные для человека. В частности, способность некоторых пород кур давать более 300 яиц в год лишена биологического смысла, поскольку такое количество яиц курица не сможет высидывать. Поэтому в естественных условиях одомашненные формы существовать не могут.

Одомашнивание привело к ослаблению действия стабилизирующего отбора, что резко повысило уровень изменчивости и расширило его спектр. При этом одомашнивание сопровождалось отбором, вначале бессознательным (отбор тех особей, которые лучше выглядели, имели более спокойный нрав, обладали другими ценными для человека качествами), затем осознанным или методическим. Широкое использование методического отбора направлено на формирование у животных определенных качеств, удовлетворяющих человека.

Процесс одомашнивания новых животных для удовлетворения потребностей человека продолжается и в настоящее время. Так, например, для получения высококачественной пушнины создана новая отрасль животноводства – пушное звероводство.

Отбор родительских форм и типы скрещивания животных проводятся с учетом цели, поставленной селекционером. Это может быть целенаправленное получение определенного экстерьера, повышение молочности, жирности молока, качества мяса и т.п. Разводимые животные оцениваются не только по внешним признакам, но и по происхождению и качеству потомства. В связи с этим, для реализации эффективного селекционного процесса необходимо хорошо знать их родословную. В племенных хозяйствах при подборе производителей всегда ведется учет родословных, в которых оцениваются экстерьерные особенности и продуктивность родительских форм в течение ряда поколений. По признакам предков, особенно по материнской линии, можно судить с известной долей вероятности о генотипе производителей.

В селекционной работе с животными в основном применяют два способа скрещивания: аутбридинг и инбридинг.

Аутбридинг или неродственное скрещивание между особями одной породы или разных пород животных, при дальнейшем строгом отборе приводит к поддержанию полезных качеств и к усилению их в ряду следующих поколений.

При инбридинге в качестве исходных форм используются братья и сестры или родители и потомство (отец – дочь, мать – сын, двоюродные братья – сестры и т.д.). Такое скрещивание в определенной степени аналогично самоопылению у растений, которое также приводит к повышению гомозиготности и, как следствие, к закреплению хозяйственно ценных признаков у потомков. При этом гомозиготизация по генам, контролирующим изучаемый признак, происходит тем быстрее, чем более близкородственное скрещивание используют при инбридинге. Однако, гомозиготизация при инбридинге, как и в случае растений, ведет к ослаблению животных, снижает их устойчивость к воздействию внешней среды, повышает заболеваемость. Во избежание этого необходимо проводить строгий отбор особей, обладающих ценными хозяйственными признаками.

В селекции инбридинг обычно является одним из этапов улучшения породы. За ним следует скрещивание разных межлинейных гибридов, в результате которого нежелательные рецессивные аллели переводятся в гетерозиготное состояние, а вредные последствия близкородственного скрещивания заметно снижаются.

У домашних животных, как и у растений, наблюдается явление гетерозиса: при межпородных или межвидовых скрещиваниях у гибридов первого поколения происходит особенно мощное развитие и повышение жизнеспособности. Классическим примером проявления гетерозиса является мул (гибрид кобылы и осла) – сильное, выносливое животное, которое может использоваться в более сложных условиях, в сравнении с родительскими формами.

Гетерозис широко применяют в промышленном птицеводстве (бройлерные цыплята) и свиноводстве, т.к. первое поколение гибридов непосредственно используют в хозяйственных целях.

Отдаленная гибридизация домашних животных менее эффективна, чем у растений. Межвидовые гибриды животных часто бесплодны. При этом восстановление плодовитости у животных представляет более сложную задачу, чем у растений, поскольку получение полиплоидов на основе умножения числа хромосом у них невозможно. Хотя, в некоторых случаях отдаленная гибридизация сопровождается нормальным слиянием гамет, обычным мейозом и дальнейшим развитием зародыша, что позволило получить некоторые породы, сочетающие ценные признаки обоих использованных в гибридизации видов. Так, в Казахстане на основе гибридизации тонкорунных овец с диким горным бараном архаром создана новая порода тонкорунных архаро-мериносов, которые, как и архары, пасутся на высокогорных пастбищах, не-

доступных для тонкорунных мериносов. Кроме того, таким путем были улучшены породы местного крупного рогатого скота.

Селекционерами России достигнуты значимые успехи в создании новых и улучшении существующих пород животных. Так, костромская порода крупного рогатого скота отличается высокой молочной продуктивностью (более 10 тыс. кг молока в год). Сибирский тип российской мясо-шерстной породы овец характеризуется высокой мясной и шерстной продуктивностью. Средняя масса племенных баранов составляет 110–130 кг, а средний настриг шерсти в чистом волокне – 6–8 кг. Значительны достижения и в селекции свиней, лошадей, кур и многих других животных.

В результате длительной и целенаправленной селекционно-племенной работы учеными Беларуси выведен черно-пестрый тип крупного рогатого скота. Коровы этой породы в условиях оптимального кормления и содержания обеспечивают удои по 4–5 тыс. кг молока жирностью 3,6–3,8 % в год. Генетический потенциал молочной продуктивности черно-пестрой породы составляет 6,0–7,5 тыс. кг молока за лактацию.

**Селекция микроорганизмов.** Предметом селекции микроорганизмов является выведение новых промышленных штаммов микроорганизмов.

Микроорганизмы значительно отличаются от других видов организмов, применяющихся в хозяйственной деятельности человека, поэтому и их селекция имеет свои отличительные особенности:

1. Малые размеры микроорганизмов обуславливают применение только массового отбора (исключая индивидуальный отбор).
2. Широкое применение находит мутагенез, т.к. микроорганизмы легко изменяются в результате воздействий различных мутагенов.
3. Важнейшим направлением совершенствования микроорганизмов является генетическая.
4. В селекции микроорганизмов, в большинстве случаев, нельзя использовать скрещивание.

Классическим примером работ в области селекции микроорганизмов являются труды С.И. Алиханяна с коллегами по выведению штаммов микроскопических грибов – продуцентов пенициллина.

Важность осуществления научных исследований в области селекции микроорганизмов обусловлена тем, что данные организмы служат основой для реализации большинства биотехнологических производств.

При этом биотехнологическое производство предъявляет к продуцентам разных БАВ жесткие требования, важные с технологической точки зрения: высокая скорость роста, использование для жизнедеятельности доступных и экономичных субстратов и устойчивость к заражению посторонней микрофлорой.

При этом научной основой биотехнологического производства является умение создавать микроорганизмы с новыми, заранее определенными гене-



тическими свойствами и умение использовать их в промышленных масштабах.

Селекция микроорганизмов (в отличие от селекции растений и животных) отличается рядом особенностей:

1) у селекционера имеется неограниченное количество материала для работы: за считанные дни в чашках Петри или пробирках на питательных средах можно вырастить миллиарды клеток;

2) более эффективное использование мутационного процесса, поскольку геном микроорганизмов гаплоидный, что позволяет выявить любые мутации уже в первом поколении;

3) простота генетической организации бактерий: значительно меньшее количество генов, их генетическая регуляция более простая, взаимодействия генов просты или отсутствуют.

Выше перечисленные особенности накладывают свой отпечаток на выбор методов селекции микроорганизмов, которые во многом существенно отличаются от методов селекции растений и животных. Так, в селекции микроорганизмов обычно учитываются их естественные способности синтезировать полезные для человека БАВ (аминокислоты, витамины, ферменты и др.). В случае использования методов генетической инженерии можно заставить бактерии и другие микроорганизмы продуцировать соединения, синтез которых в естественных природных условиях им никогда не был свойственен (гормоны человека и животных и т.п.).

### **Этапы селекции микроорганизмов**

**Выбор исходного микроорганизма для селекции.** Разнообразие природных форм позволяет выбрать микроорганизм, имеющий меньшее число ограничений для сверхсинтеза БАВ, хотя при этом и не продуцирует его.

В частности, оказалось очень сложным и на практике пока еще недостижимым получить промышленно значимый уровень продукции L-лизина у кишечной палочки или псевдомонад, и более простым – у представителей глутаматпродуцирующих коринебактерий: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* и др. Полученные данные позволяют это объяснить менее сложной регуляцией биосинтеза лизина у коринебактерий (в процессе биосинтеза лизина только один фермент контролируется по типу поливалентного ингибирования активности лизином и треонином, и этот контроль устраняется мутацией, блокирующей синтез гомосерина – предшественника треонина и метионина; при этом поток общих предшественников направляется только на синтез лизина), а также отсутствием деградации лизина по сравнению с регуляцией у кишечной палочки (три контролируемых фермента и более сложные формы регуляции) и выраженной способностью к деградации лизина у псевдомонад.

В ряде случаев природные штаммы с менее сложными системами ограничений сверхсинтеза выделяют в среду некоторое количество первичного

метаболита (штамм *Propionibacterium shermanii* – витамин В<sub>12</sub>). Такие микроорганизмы становятся объектами селекции с целью повышения уровня продукции целевого БАВ. Пригодность микроорганизма для использования в качестве объекта селекции для получения продуцента целевого БАВ можно проверить, введя ему одну или несколько определенных, легко тестируемых мутаций, которые теоретически должны обеспечить сверхсинтез данного БАВ. Это самый надежный способ выбора исходного штамма, даже если для данного вида микроорганизма отсутствуют сведения о регуляции синтеза целевого БАВ.

Для продуцентов вторичных метаболитов, а также ферментов или полисахаридов выбор исходного штамма определен способностью природного микроорганизма продуцировать определенное количество нужного БАВ. В тех случаях, когда одно и то же БАВ выделяют природные штаммы, относящиеся к разным таксономическим группам (например, грибы и бациллы), это позволяет выбрать более «технологичный» для производства или более поддающийся селекции штамм.

В этой связи, селекционер чаще всего не свободен в выборе исходного штамма для селекции и не может считать критерием такого выбора генетическую изученность микрообъекта и возможность применения в отношении него разных генетических методов. Природные свойства штаммов, определяющие такой выбор облегчают и ускоряют селекционную работу. Однако, отсутствие у многих промышленных микроорганизмов систем обмена генетической информацией не позволяет ни изучить генетический контроль синтеза целевого БАВ, ни облегчить насыщение генома продуцента необходимыми для сверхсинтеза БАВ мутациями.

**Подготовка исходного штамма к селекционной работе.** У микроорганизма, синтезирующего целевой продукт, отобранного в качестве объекта селекции, необходимо изучить естественную изменчивость по морфологическим признакам и по количественному признаку – уровню продукции целевого БАВ. После посева исходного штамма на чашки Петри, среди не менее 100 колоний выявляют типичную для данной культуры морфологическую форму и отклонения от нее. Затем изолированные на косяки колонии (клоны) как типичной формы (не менее 100 клонов), так и доступное число ее морфологических вариантов (при условии сохранения ими своих особенностей при пересевах) оценивают после культивирования по уровню продукции нужного БАВ, применяя надежный аналитический метод. Такая оценка позволяет выявить возможную корреляцию между способностью продуцировать данное БАВ и морфологией колоний.

Несколько клонов с наиболее высоким уровнем продукции по отношению к уровню контроля, которым является исходная культура, отбирают и проверяют на продукцию в нескольких повторных опытах, а затем отбирают один клон, характеризующийся высоким и воспроизводимым уровнем. Данная процедура («чистка» исходной культуры) часто приводит к отбору клона с повышенной продукцией, а в некоторых случаях – и с отклонением от типичной морфологии.

Уровень продукции БАВ (антибиотика и т.п.) обозначают в единицах массы на объем культуральной жидкости после определенного периода культивирования микроорганизма (мкг/л, г/л и т.д.). В случае, если продукт микробного синтеза – экзогенный фермент, то его характеризуют единицами активности.

Клон, отобранный из рассева исходной культуры, снова рассевают, отмечают морфологическую изменчивость, если она есть, и затем оценивают по уровню продукции не менее 100 типичных для данного клона изолированных на косяки колоний. Целесообразно значения уровней продукции таких субклонов, выраженные в процентах по отношению к продукции исходного для них (родительского) клона, распределить в вариационном ряду и вычислить статистические показатели: среднее арифметическое, квадратическое отклонение и коэффициент изменчивости. Субклоны, попавшие в крайнюю правую часть данного ряда, отбирают, повторно оценивают по уровню продукции и оставляют один из них. Этот субклон рассевают, как и в предыдущем случае, проверив не менее 100 колоний, строят вариационный ряд и вычисляют его показатели. Получив таким путем два вариационных ряда, сравнивают значения коэффициентов изменчивости этих рядов. В случае, если эти значения достоверно не различаются, можно подготовку исходного штамма для дальнейшей селекции закончить отбором субклона из первого вариационного ряда, а второй ряд считать контрольным для следующего этапа селекции с применением мутагенных факторов. При обнаружении у второго ряда явной тенденции к уменьшению коэффициента изменчивости целесообразно провести еще один этап клонирования, выбрав из правой части второго ряда «лучший» клон, построить третий вариационный ряд на основе его рассева и определить значение коэффициента изменчивости. После сравнения значений коэффициентов изменчивости второго и третьего рядов дальнейшее клонирование прекращают, если эти величины для обоих рядов не различаются, и продолжают, если коэффициент изменчивости третьего ряда снижается. Целью такого ступенчатого клонирования является необходимость «стабилизировать» исходную культуру по количественному признаку, получив на основе действия стабилизирующего отбора наиболее однородную по данному признаку популяцию как надежный контроль при оценке индуцируемой мутагенами изменчивости и последующем отборе мутантов.

Следует иметь в виду, что однородность отобранной культуры снижается при многократном пассировании и длительном хранении. В этой связи, исходную культуру, которая должна служить контролем при отборе мутантов, необходимо поддерживать периодическим клонированием, проводимым в установленные для нее промежутки времени. Увеличить уровень продукции таким клонированием, как правило, не удастся. Средний уровень продукции клонов, отбираемых из правой части вариационного ряда, построенного на основе естественной изменчивости культуры, обычно равен среднему уровню продукции родительской культуры.

В том случае, когда исходная культура целевое БАВ не продуцирует, следует выбрать из ее рассева колонию, которая по таксономической харак-

теристике полностью соответствует данному виду микроорганизма, и использовать этот клоп в дальнейшей работе с применением мутагенов.

**Получение мутантов.** Разные типы мутаций получают с помощью различных физических и химических мутагенов. Биоматериал (споры, вегетативные клетки, обрывки мицелия у неспорулирующих организмов), подвергающийся воздействию мутагенных факторов, должен быть дискретным и содержать минимальное количество ядер, что позволяет устранить или сократить стадию сегрегации.

Суспензия, содержащая клетки или споры, по возможности должна быть лишена комков – конгломератов, т.к. мутация в одной из клеток конгломерата при прорастании его на агаризованной среде будет утрачена или в лучшем случае проявится в виде сектора. Комки разбивают на качалке, фильтруют суспензию, но полностью избавиться от их присутствия в суспензии, обрабатываемой мутагеном, обычно не удается.

Физическими мутагенами (УФ излучение, ионизирующие излучения и др.) обрабатывают водную суспензию спор или клеток. При обработке химическими мутагенами (алкилирующие агенты: алкилметансульфонаты, алкилсульфаты, алкилнитрозомочевина, метилнитрозогуанидин и др.) следует соблюдать условия, способствующие максимальному проявлению их мутагенной активности. В данном случае большое значение имеет значение рН раствора, поэтому обработку проводят в буферных растворах при наиболее эффективных для данного мутагена значениях рН. При этом следует иметь в виду, что один и тот же мутаген для разных микроорганизмов может быть активен при разных значениях рН.

Доза воздействия физических мутагена выражается в единицах излучения, соответствующих типу радиации. Для химических мутагенов доза характеризуется концентрацией мутагена в обрабатываемой суспензии и экспозицией при определенной температуре. После истекшей экспозиции обработку химическим мутагеном прерывают отмыванием материала, помещением в буферную смесь с неоптимальным для мутагенного эффекта значением рН и (или) серией разведений в физиологическом растворе, предшествующей высеву на агаризованную среду. В случае, если при поиске определенных типов мутаций суспензия должна быть высеяна на агар без разведения, то отмывание от мутагена необходимо.

При выборе дозы мутагена ориентируются на выживаемость обрабатываемого микроорганизма, которая определяется отношением числа колоний, выросших на агаре после мутагенного воздействия, к числу колоний, выросших после высева той же, но не обработанной мутагеном (контрольной) суспензии клеток, выраженным в процентах. Выживаемость зависит как от дозы мутагена, так и от чувствительности данного микроорганизма к летальному эффекту мутагена. Причем чувствительность может существенно различаться у нескольких штаммов одного вида микроорганизма. В селекционной работе, как правило, используют дозы, обеспечивающие выживаемость клеток в диапазоне от 0,1 до 50–80 %.

**Отбор продуктивного стабильного мутантного штамма – продуцента целевого продукта.** В данном случае используют разные методы отбора полученного мутантного штамма с повышенным уровнем продукции.

Среди клеток исходного штамма микроорганизма, выживших после обработки мутагеном, производят отобрать мутанта с необходимыми свойствами. При этом возможны два альтернативных пути:

1) отбор случайных мутаций после оценки количественного признака, т.е. уровня продукции целевого БАВ у возможно большего числа клонов, полученных из выживших клеток;

2) отбор по количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом, например, ауксотрофных мутантов, резистентных к антиметаболиту и др., для выделения которых из числа выживших клонов в каждом случае применяют свой собственный метод отбора.

Отбор случайных (непредсказуемых) мутаций, контролирующих данный количественный признак, применяют в тех случаях, когда селекционер не располагает сведениями о пути синтеза целевого продукта, его регуляции и взаимосвязях с синтезом других метаболитов. Так, 40 лет назад при открытии пенициллина, а затем и других антибиотиков, это был единственно возможный метод. С высокой эффективностью он применялся в течение многих лет в селекции продуцентов антибиотиков и, в известном смысле, послужил основой для создания промышленного производства данных лекарственных средств.

Классическим примером такой селекции является Висконсинская серия продуцентов пенициллина, проведенная в США на основе исходного штамма *Penicillium chrysogenum* NRRL в 1951 г., с применением различных физических и химических мутагенов. Селекция штаммов этой серии, продолжавшаяся более 30 лет, позволила повысить уровень продукции пенициллина в несколько тысяч раз по сравнению с уровнем исходного штамма.

Метод отбора случайных мутаций осуществляется в несколько этапов, поэтому называется ступенчатым отбором с применением мутагенов. Каждый этап заключается в следующем: исходная, подготовленная к селекции культура обрабатывается мутагеном, взятым в нескольких дозах, обеспечивающих разную выживаемость. В некоторых случаях используют и несколько разных мутагенов. Из числа колоний, выросших после воздействия каждой отдельной дозой мутагена, отсевают не менее 100 колоний для дальнейшей оценки у них уровня продукции целевого БАВ. Отсев колоний производят тотально (без выбора), но стремясь сохранить в пределах взятой выборки процентное соотношение морфологически измененных вариантов, характерное для данной дозы мутагена. Значения уровней продукции вариантов, полученных после обработки отдельной дозой мутагена, выражают в процентах по отношению к уровню продукции исходной культуры и распределяют в вариационном ряду. Полученные вариационные ряды, число которых соответствует числу использованных доз одного или нескольких мутагенов, сравнивают с контрольным рядом, построенным на основе рассева исходной куль-

туры. В результате сравнения выявляют «+» и «-»-варианты. «+»-варианты являются материалом для дальнейшей оценки и выбора мутанта с повышенной продуктивностью. Дозы мутагена, обеспечившие наибольшее число «+»-вариантов, целесообразно еще раз использовать для обработки исходной культуры, с тем чтобы увеличить объем материала для оценки и повысить вероятность отбора мутанта. Затем «+»-варианты отбирают, оценивают в нескольких повторных опытах на способность продуцировать целевое БАВ, выбирают лучшие и проверяют их уровень продукции после 2–3 пересевов на агаризованной среде. Все опыты по проверке лучших вариантов суммируют, результаты обрабатывают статистически и на их основании выбирают вариант, уровень продукции которого достоверно превышает уровень продукции исходного штамма. Для получения такого мутанта, даже если превышение и не очень высоко, требуется проверка нескольких сотен клонов. Нередко повышенный уровень продукции является единственным отличием отобранного мутанта от исходной культуры. Однако, в ряде случаев, особенно когда превышение по количественному признаку значительно, мутант может иметь и измененную морфологию колоний, например, сниженную споруляцию, утрату или приобретение пигмента и др., или новые культуральные признаки: иную продолжительность культивирования, устойчивость к токсичным предшественникам, чувствительность к определенным компонентам среды и т.п. Некоторые из этих сопутствующих признаков могут являться результатом нарушения физиологического и метаболического баланса, вызванного не известными исследователю мутациями, приведшими к резкому повышению уровня продукции БАВ, а другие, например, устойчивость к фенилуксусной кислоте у продуцента пенициллина, могут сами по себе быть причиной повышения продуктивности мутанта.

Мутант, отобранный на одном этапе селекции, служит исходным материалом для следующего этапа после аналогичной процедуры подготовки. Известны случаи, когда субклонирование вновь полученного мутанта позволяло отобрать штамм с более высокой продуктивностью.

Последовательные этапы отбора, проводимого непосредственно по количественному признаку, требующего оценки многих тысяч клонов, позволяют «собрать» в геноме продуцента группу мутаций, сочетание которых обеспечивает высокий уровень продукции. Наиболее эффективными обычно являются первые этапы отбора, затем его темп падает; последнее в определенной степени преодолевается сменой мутагенного фактора, переходом на другую селекционную линию, введением некоторых мутаций.

Модификация метода отбора случайных мутаций. В работе со случайными мутациями используются приемы, предусматривающие оценку количественного признака после культивирования клонов, выделенных в результате мутагенного воздействия в условиях, специфически ограничивающих уровень продукции данного БАВ у исходной культуры. Такие условия создают за счет повышенного или недостаточного содержания определенного компонента среды, влияющего на синтез продукта, неоптимальной температурой, продолжительностью культивирования, степенью аэрации и т.д.

Оценка уровня продукции в таких условиях позволяет выявить мутанты, преодолевающие созданное ограничение и сохраняющие высокую продуктивность. Так, исходный штамм *Corynebacterium glutamicum* был способен продуцировать большие количества глутаминовой кислоты (до 50 г/л) только в присутствии 2–3 мкг/л биотина. Это не позволяло использовать в питательной среде в качестве источника углерода доступное сырье – свекловичную мелассу, содержащую большое количество биотина. Оценка порядка 8000 клонов на средах с повышающимся от этапа к этапу содержанием биотина позволила получить штамм, продуцирующий глутаминовую кислоту (50 г/л) на мелассных средах. При этом на одном из этапов селекции были обнаружены две «сопутствующие» повышению продуктивности мутации: ауксотрофность по триптофану и чувствительность роста колоний к высокой температуре. Роль ауксотрофной мутации осталась неясной, однако, мутацию удалось устранить (путем реверсии) без ущерба для уровня продукции аминокислоты через несколько этапов селекции. Чувствительность к повышенной температуре сохранилась у всех продуктивных штаммов и, очевидно, явилась следствием структурных изменений в мембране. Такие изменения были необходимы клетке для выделения глутаминовой кислоты в присутствии избытка биотина, способствующего формированию «непроницаемой» для этой аминокислоты мембраны.

Таким образом, ступенчатый отбор с оценкой по количественному признаку, который осуществляется фактически «вслепую» по отношению к мутациям, вызывающим сверхсинтез, в ряде случаев выявляет эти мутации и «подсказывает» правильное направление селекции.

Отбор по количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом. Данный метод применяют, используя имеющиеся представления о пути, регуляции и взаимосвязях синтеза целевого продукта у данного микроорганизма или у других организмов, изученных в этом отношении. В настоящее время такие представления в большей степени развиты для первичных метаболитов и в меньшей – для вторичных метаболитов и ферментов.

Ауксотрофные мутации. Использование ауксотрофных мутаций позволяет блокировать образование ингибитора или корепрессора синтеза целевого продукта, перераспределить поток общих предшественников в разветвленных путях биосинтеза, уменьшить или остановить дальнейшее превращение данного продукта. Ауксотрофные мутанты получают с помощью мутагенов: метод обогащения, основанный на действии антибиотиков, в частности пенициллина, на растущие в минимальной среде, т.е. прототрофные клетки, а также метод реплик. У полученных ауксотрофных мутантов определяют питательные потребности, отбирают мутанты с той потребностью, которую хотели получить, и у последних оценивают способность продуцировать целевое БАВ. При этом необходимо помнить, что питательная среда для ауксотрофа должна содержать необходимый для роста метаболит в ограниченном количестве, т.к. в большинстве случаев он подавляет синтез целевого продукта. Количество оцениваемых по продуктивности ауксотрофных мутантов с одинаковой питательной потребностью не должно быть сведено к 1–2 мутантам,

хотя иногда и этого количества достаточно для достижения ожидаемого эффекта. В случае, если потребность в метаболите может быть обусловлена блокированием разных этапов его биосинтеза, то не на каждом этапе мутация обеспечит эффект. Кроме того, ауксотрофность не всегда вызывается блоком в пути биосинтеза. Так, для аминокислот она может быть вызвана мутацией, нарушающей включение их в белки. В этой связи, целесообразно получить и оценить продуктивность нескольких десятков мутантов с качественно одинаковой потребностью для того, чтобы выбрать наиболее продуктивный, если расчет на ауксотрофность оказался верным, и составить обоснованное представление о влиянии данной мутации на продукцию целевого БАВ.

Отбор среди ревертантов ауксотрофных мутантов, у которых ауксотрофность вызвана дефектом определенного фермента в пути биосинтеза метаболита, позволяет получить мутанты с восстановленной каталитической, но утраченной регуляторной функцией фермента, катализирующего синтез данного продукта, а также мутанты с неполным восстановлением каталитической функции, т.е. снижением активности фермента по отношению к активности фермента прототрофного штамма или, напротив, с усилением его активности. Перечисленные типы реверсий затрагивают один и тот же дефектный ген у ауксотрофа – они относятся к истинным реверсиям и имеют характер внутригеновых супрессорных реверсий. В случае, если ауксотрофность вызвана нарушением включения аминокислоты в белки, то у супрессорных ревертантов такого ауксотрофа восстановление способности к прототрофному питанию может быть связано с мутацией другого гена, например, кодирующего регуляторный фермент в биосинтезе данной аминокислоты. Такая мутация, нарушая регуляцию биосинтеза аминокислоты, вызывает ее сверхсинтез, чем и преодолевается (супрессируется) ауксотрофность мутанта. Супрессорная мутация в другом гене может включить в особых случаях дополнительный, обходной путь биосинтеза, продукты которого не препятствуют синтезу нужного метаболита. Межгенные супрессорные реверсии в некоторых случаях затрагивают и регуляторные гены синтеза метаболита, например, у ауксотрофа по гистидину *Bacillus subtilis*, дефектный ген которого сцеплен с генами триптофанового оперона, реверсия к прототрофности может быть вызвана мутацией в регуляторном гене этого оперона, одновременно приводящей к сверхсинтезу триптофана.

Получить ревертанты к прототрофности несложно. После обработки мутагеном клетки ауксотрофа в большой концентрации высевают на чашки с агаризованной минимальной средой или со средой, в которой отсутствует фактор, компенсирующий данную ауксотрофность. В течение инкубации целесообразно отмечать колонии, появляющиеся в ранние и поздние сроки. Это связано с тем, что искомые ревертанты чаще всего находятся среди позднее появляющихся и медленно растущих колоний, т.к. нужная реверсия может не полностью восстановить прототрофный фенотип. Выросшие колонии отсеивают на минимальную среду с рассевом до отдельных колоний, чтобы освободиться от ауксотрофных клеток, составлявших «фон» на чашках при появлении колоний ревертантов. Выросшие на минимальной среде колонии пере-



севают на полноценную среду, а полученные клоны оценивают на способность продуцировать целевое БАВ. В случае, если исходный ауксотрофный штамм это БАВ не продуцировал, то удобно первичную оценку осуществить с помощью тест-культуры. Для продуцентов первичных метаболитов тест-культурой служат ауксотрофные мутанты с потребностью в данном метаболите, для продуцентов антибиотиков – штаммы, чувствительные к их бактерицидному действию. Высев с помощью репликатора проверяемых ревертантов на агаризованную среду, содержащую клетки тест-культуры, позволяет очень быстро среди большого числа клонов выявить те, вокруг которых образуются зоны роста или зоны подавления тест-культуры. Только у таких клонов затем количественно оценивают уровень продукции в соответствующих условиях культивирования. Обычно для выделения искомой мутации среди ревертантов ауксотрофного штамма необходима проверка нескольких сотен прототрофных клонов, тогда как поиск среди прямых мутаций может потребовать проверки многих тысяч клонов.

Отбор среди мутантов, резистентных к структурным аналогам аминокислот или азотистых оснований является одним из наиболее эффективных методов получения и улучшения штаммов продуцентов первичных метаболитов. Из числа различных структурных аналогов этих БАВ наиболее пригодны для селекционных целей те, которые действуют на регуляторные системы биосинтеза подобно природному метаболиту, но не могут выполнить основной функциональной роли этого метаболита в клетке. Так, аналог аминокислоты, добавленный к клеткам, находящимся в минимальной среде, имитирует избыток этой аминокислоты на уровне систем, контролирующих ее биосинтез (регуляторных ферментов и/или регуляторных генов). Однако, при этом не может заменить аминокислоту в белках: не способен включиться в белок или, включаясь, приводит к образованию дефектных белков, вызывая в обоих случаях голодание клетки по природной аминокислоте и останавливая рост. Добавление природной аминокислоты вместе с ее аналогом устраняет этот голод. В таких условиях клетка, прекратив биосинтез аминокислоты вследствие ее избытка и присутствия аналога, использует «внешнюю» аминокислоту для жизнедеятельности.

Способность аналога подавлять рост клеток и утрата этой способности в присутствии добавленного природного метаболита являются основными «приметами» пригодности аналога для селекционной работы. Эти свойства необходимо установить при его выборе среди других аналогов, т.к. многочисленные структурные аналоги природных метаболитов имеют и другие способы взаимодействия с микробной клеткой.

Для получения аналогорезистентных мутантов суспензию клеток исходной культуры после обработки мутагеном высевают в большой концентрации (газоном) на чашки Петри с агаризованной минимальной средой, содержащей аналог в заранее подобранной концентрации, ингибирующей рост исходной культуры. На таких чашках через несколько суток инкубации появляются колонии мутантов, преодолевающих действие аналога. Часть таких мутантов несут мутации, нарушающие регуляцию синтеза целевого метаболита.

лита и вызывающие его сверхсинтез, другая часть – мутации, нарушающие транспорт аналога в клетку, возможны и другие мутации.

После отсева колоний, выросших на среде с аналогом, и выделения у них отдельных клонов из каждой первичной колонии проверяют по 1–2 клон на способность продуцировать целевое БАВ. В случае, если исходный штамм не продуцировал этот метаболит, то первичную оценку мутантов проводят с помощью ауксотрофной по данному метаболиту тест-культуры, отбирая для оценки те клоны, которые обеспечивают зоны роста или «кормление» ауксотрофных клеток. В тех случаях, когда исходная культура уже являлась продуцентом, необходима тотальная проверка всех выделенных клонов на способность продуцировать метаболит в соответствующих условиях культивирования. Из их числа отбирают те, у которых при последующих проверках средний уровень продукции достоверно превышает средний уровень продукции исходного штамма. При правильно выбранном аналоге для получения продуктивного мутанта обычно требуется проверить несколько сотен аналогорезистентных клонов. У отобранного продуктивного штамма часто определяют чувствительность к более высоким, чем ранее использованная, концентрациям аналога. В случае, если такая чувствительность имеется, проводят еще один, а иногда и несколько этапов отбора на постепенно повышающихся концентрациях аналога. Нередко используют другие аналоги того же метаболита на следующих этапах отбора.

У отобранных аналогорезистентных штаммов важно исследовать природу того регуляторного нарушения, которое привело к сверхсинтезу или повысило его уровень. Для этого у исходного штамма и мутанта определяют удельную активность регуляторного фермента (или ферментов) в пути биосинтеза данного метаболита, изучают *in vitro* действие этого метаболита и других ингибиторов на активность фермента.

Для выяснения вопроса о регуляции биосинтеза метаболита по типу репрессии конечным продуктом удельную активность регуляторных ферментов исходного штамма и мутанта определяют после выращивания в средах, содержащих метаболит (конечный продукт), и без него. Сведения о природе полученных на отдельных этапах селекции регуляторных и других изменений позволяют правильно выбрать метод селекции для последующего этапа. Следует отметить, что у одноступенчатых аналогорезистентных продуктивных мутантов может быть обнаружено одновременно несколько мутаций.

Типичным мутационным нарушением, приводящим к сверхсинтезу у отбираемых по продуктивности аналогорезистентных мутантов, признается утрата чувствительности регуляторного фермента (десенсбилизация) к ингибированию конечным продуктом, которым обычно и является целевой метаболит, а также нарушение механизма репрессии биосинтеза ферментов, что обеспечивает их неконтролируемый (конститутивный) синтез. Получены данные о том, что регуляторным мутациям у аналогорезистентных продуктивных мутантов сопутствуют и транспортные мутации, нарушающие поступление аналога и природного метаболита в клетку.

Отбор среди мутантов, резистентных к антибиотикам. Этот метод отбора чаще всего применяют в селекции продуцентов антибиотиков. Различные антибиотики имеют разный механизм действия на микробную клетку: некоторые являются ингибиторами белкового синтеза, другие – мембранотропными или ДНК-тропными агентами. Многие антибиотики токсичны только для молодых культур продуцентов.

Получают мутанты, резистентные к антибиотикам, обычно без предварительной мутагенной обработки исходной культуры, а просто высевом суспензии спор или клеток на чашки с агаризованной средой, содержащей различные концентрации антибиотиков. Показано, что антибиотики могут индуцировать у выживших колоний появление морфологических мутантов, а также большую изменчивость по признаку антибиотикообразования. Эффективность действия антибиотика в указанном отношении сильно зависит от особенностей штамма, подвергаемого такому воздействию. В ряде случаев значительный эффект в селекции на повышение продуктивности получают с помощью собственного (выделяемого исходной культурой) антибиотика, в других – эффективно применение другого антибиотика. Селекцию с применением антибиотиков проводят в несколько этапов, постепенно повышая его концентрацию.

Отбор среди морфологических мутантов. Данный отбор базируется на выявлении морфологических изменений у высокопродуктивных штаммов, отобранных только по количественному признаку. При таком отборе рассчитывают не столько на корреляцию между количественным и морфологическим признаками, сколько на плейотропный эффект мутаций, вызывающих резкое повышение уровня продукции, и как следствие нарушения метаболического баланса, морфологическое изменение. Продуктивные штаммы часто оказываются малоспорулирующими или, наоборот, имеют повышенную споруляцию, они могут потерять пигмент или приобрести новый, могут изменить величину или форму колоний.

Среди колоний, выживших после мутагенного воздействия, отбирают морфологически измененные и проверяют их на продуктивность.

Выше были рассмотрены наиболее часто применяющиеся в практической селекции методы отбора штаммов с повышенной продуктивностью среди разных фенотипических классов мутантов. Основная цель использования данных методов состоит в сужении диапазона поиска «нужной» мутации для снижения его трудоемкости.

Следует отметить, что метод отбора случайных мутаций с успехом заменяется на отдельных этапах селекции продуцентов антибиотиков, ферментов, витаминов другими приемами, которые обычно применяют в селекции продуцентов аминокислот и пуриновых производных. Это вызвано обнаружением прямых взаимосвязей между биосинтезом определенных аминокислот и антибиотиков и т.д. В селекции продуцентов некоторых антибиотиков положительный эффект обеспечивает введение продуценту определенных ауксотрофных мутаций, а затем отбор прототрофных ревертантов. Известны

попытки использовать аналоги аминокислот в селекции продуцентов антибиотиков. Наиболее показателен пример с продуцентом фунгицида пирролнитрина *Pseudomonas fluorescens*. В связи с тем, что предшественником в биосинтезе этого антибиотика являлся D-триптофан, и его добавление в среду повышало выход антибиотика, у продуцента последовательно получили мутанты, резистентные к двум аналогам триптофана. Среди этих мутантов был отобран штамм, уровень продукции антибиотика у которого был повышен почти в 3 раза по сравнению с родительским, чувствительным к аналогам штаммом.

### **Селекция продуцентов антибиотиков**

Известно, что микроорганизмы, выделенные из природных источников, обладают очень низкой антибиотической активностью. В частности, разные штаммы *Penicillium*, изолированные из почвы и других естественных субстратов, образуют пенициллин в пределах 10–30 ед./мл. Продуцент стрептомицина (*Str. griseus*), выделенный из хорошо унавоженной почвы, образует не более 100 мкг/мл антибиотика.

Современное промышленное производство антибиотиков невозможно при использовании таких низкоактивных продуцентов. В данном случае стоимость антибиотиков была бы очень высокой, что резко ограничило их использование в медицинской практике и в сельском хозяйстве. В этой связи, перед учеными встала задача получения высокопродуктивных штаммов антибиотиков. Данная задача с течением времени была успешно решена.

В настоящее время в промышленности используются штаммы, образующие антибиотики на 2–3 порядка выше в сравнении с исходными «дикими» продуцентами. Так, по данным Polinson, получены штаммы *Penicillium chrysogenum*, образующие до 25000 ед./мл пенициллина.

К основным способам, позволяющим повысить биосинтетическую активность продуцентов антибиотиков, относятся:

- 1) получение из исходных штаммов новых генотипов микроорганизмов, обладающих повышенной активностью в отношении биосинтеза антибиотика;
- 2) подбор наиболее благоприятных для максимального образования антибиотиков условий культивирования отобранных мутантов.

Как известно, существуют два процесса, способные вызывать образование новых генотипов микроорганизмов: мутационный процесс и рекомбинация.

При этом мутация в сочетании с селекцией используется в качестве основного приема в улучшении штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотиков. В большинстве случаев применяют комбинацию процесса мутации и селекцию, процесса рекомбинации и селекцию или того и другого совместно (мутации, рекомбинации и селекцию), т.к. одной селекцией невозможно решить данную проблему.

Экспериментальное получение мутаций открывает почти неограниченные перспективы для создания высокопродуктивных штаммов микроорганизмов. Вероятность возникновения мутаций у микроорганизмов ( $1 \times 10^{-10}$  –  $1 \times 10^{-6}$ ) ниже, чем у всех других организмов ( $1 \times 10^{-6}$  –  $1 \times 10^{-4}$ ). Однако, вероятность выделения мутаций по данному гену у бактерий значительно выше, чем у растений и животных, поскольку получить многомиллионное потомство у микроорганизмов довольно просто в сравнительно ограниченные сроки.

Итак, основным приемом, обеспечивающим успех селекции большинства продуцентов антибиотиков, является метод индуцированного мутагенеза, реализующийся с использованием физических (рентгеновское излучение, ультрафиолетовое облучение, быстрые нейтроны), химических (азотистая форма иприта, этиленмин, аминопурин, нитрозогуанидин, гидроксилламин и др.) и биологических (гены-мутаторы, транспозоны и др.) мутагенов.

Воздействие физических и химических мутагенов в течение определенного периода времени, как правило, приводит к гибели микроорганизмов. Однако, возможно экспериментально подобрать экспозицию (концентрацию) и силу воздействия так, чтобы часть клеток или спор изучаемой популяции выживала. При этом среди таких выживших видов могут появиться формы с измененным характером отдельных звеньев обмена веществ, с другими свойствами и признаками, т.е. мутанты с измененной генетической программой развития.

При этом, наряду с формами, потерявшими способность образовывать антибиотик (их обычно большинство), возникают такие, у которых обнаруживается значительное повышение продукции антибиотика. Такой индуцированный мутагенез с последующим отбором нужных мутантов до настоящего времени остается одним из наиболее распространенных методов получения высокоактивных продуцентов антибиотиков.

Для выявления мутаций используют селективные среды, на которых способны расти мутантные формы, а родительские клетки дикого типа погибают. Проводится отбор и по окраске и форме колоний, скорости роста мутантов и диких форм и т.д.

Отбор по продуктивности, например, продуцентов антибиотиков, осуществляется по степени антагонизма и угнетения роста чувствительного штамма. Для этого штамм продуцент антибиотика высевается на «газон» чувствительной культуры. По размеру пятна, где отсутствует рост чувствительного штамма вокруг колонии штамма продуцента, судят о степени его активности (в данном случае антибиотической). Для размножения отбирают наиболее продуктивные колонии. В результате селекции производительность продуцентов антибиотиков удается увеличить в сотни и тысячи раз. Так, например, путем комбинирования мутагенеза и отбора в работе с микроскопическим грибом рода *Penicillium* был увеличен выход пенициллина примерно в 10 тыс. раз в сравнении с исходным диким штаммом.

В промышленном биотехнологическом производстве используют три вида отбора:

1) отбор, основанный на различной скорости роста микроорганизмов (мутантные формы растут быстрее);

2) отбор, при котором предусматривается различная способность к выживанию родительских и мутантных форм (при определенных условиях выживают только мутанты, после их изолируют из питательной среды);

3) отбор, проводимый на основе визуальных различий между мутантами (окраска, форма колоний ит. д.).

Рассмотрим методы отбора наиболее активных мутантных форм микроорганизмов, полученных в результате естественной изменчивости.

Популяцию клеток продуцента высевают на пластинку питательного агара в чашке Петри с таким расчетом, чтобы на ней образовалось не более 40–50 изолированных колоний. После проверяют способность колоний к образованию антибиотика (в основном двумя способами).

Первый способ заключается в том, что выросшие колонии заливают расплавленным и охлажденным до температуры 50–55 °С питательным агаром, содержащим тест-штамм, чувствительный к изучаемому антибиотику. Затем чашки на 20–24 ч помещают в термостат при температуре, оптимальной для развития тест-культуры. За это время вокруг колоний образуются зоны задержки роста тест-штамма. Размеры диаметра зон задержки роста вокруг колоний микроорганизма различны. При этом, чем интенсивнее колония образует антибиотик, тем больше зона задержки роста тест-штамма. Такие активные колонии легко обнаружить.

Для выявления изменчивости, связанной с биосинтезом антибиотиков у споровых бактерий, на колонии перед заливкой расплавленного агара можно помещать стерильные диски фильтровальной бумаги, диаметр которых равен внутреннему диаметру чашки Петри. Таким диском фильтровальной бумаги прикрываются выросшие колонии бактерий, а расплавленный и охлажденный агар наливается на поверхность бумажного диска. Данная процедура облегчает в дальнейшем выделение наиболее активной колонии в чистом виде.

Второй способ выявления антибиотикообразующих колоний мутантных штаммов заключается в следующем: подготавливают чашки Петри с питательным агаром. Поверхность агаровой пластинки засевают тест-штаммов. Затем в толще агаровой пластинки с помощью пробочного сверла или другого сходного приспособления формируют лунки диаметром 6–8 мм. Из центра колонии изучаемого микроорганизма вырезают с помощью пробочного сверла агаровый блочок с внутренним диаметром, равным диаметру лунок. Агаровый блочок вставляют в лунку. На каждой чашке может быть сформировано 6–7 лунок и, следовательно, испытано 6–7 разных колоний. Чашки с блочками, помещенными в лунки, переносят в термостат на 20–24 ч, после инкубации измеряют диаметры зон задержки роста вокруг блочков. При этом, чем больше диаметр зоны задержки роста тест-штамма, тем активнее колония изучаемого организма.

При селекции наиболее активных штаммов продуцентов ряда антибиотиков, выделенных из естественных мест их обитания, используют среды, содержащие те же антибиотические вещества.

В частности, для выделения из почвы наиболее активных штаммов продуцента стрептомицина в агаровую среду, используемую для их посева, добавляют определенную концентрацию стрептомицина. Штаммы *S. griseus*, образующие в больших количествах антибиотик, способны выдерживать такую концентрацию стрептомицина и нормально развиваться в его присутствии. При этом менее активные штаммы *S. griseus* не приспособлены к высоким концентрациям стрептомицина и в его присутствии не развиваются.

При проведении данного исследования в питательную агаровую среду вносили стрептомицин в количестве 100 мкг/мл субстрата, а затем высевали выделенные штаммы стрептомицетов, относящиеся к роду *S. griseus*. В результате бактерии, чувствительные к такой концентрации стрептомицина, не развивались примерно в 80 % случаев. Остальные – 20 % штаммов, среди которых были и довольно активные, хорошо росли на данной среде.

Следует отметить, что данный метод оказался эффективным при первичном изучении почвенных культур стрептомицетов.

### **3. Совершенствование биообъектов с помощью методов генетической инженерии**

До появления технологии рекомбинантных ДНК (рДНК) многие лекарственные препараты удавалось получать только в небольших количествах, их производство обходилось очень дорого, а механизм биологического действия иногда был недостаточно изучен. В настоящее время с помощью новой технологии получают весь спектр таких лекарственных препаратов в количествах, достаточных как для их эффективного тестирования, так и для применения в клинической практике.

К антибиотикам относятся низкомолекулярные вещества, отличающиеся по химической структуре. Общим для этих соединений является то, что, представляя собой продукты жизнедеятельности микроорганизмов, они в низких концентрациях специфически нарушают рост других микроорганизмов.

Из известных 5000–6000 природных антибиотиков для реализации потребителям производится около 1000. В то время, когда установили антибактериальное действие пенициллина и возможность его использования в качестве лекарственного препарата (Х.У. Флори, Э.Б. Чейн и др., 1941), продуктивность лабораторного штамма плесени составляла 2 мг лекарственного препарата на 1 л культуральной жидкости, что было недостаточно для его промышленного производства. Многократными систематическими воздействиями на исходный штамм *Penicillium chrisogenum* с помощью таких мутагенов, как рентгеновское и ультрафиолетовое облучение, азотистый иприт в сочетании со спонтанными мутациями и отбором лучших форм, удалось увеличить продуктивность плесневого гриба в 10000 раз и довести концентрацию пенициллина в культуральной жидкости до 2%.

Путь повышения эффективности штаммов – продуцентов антибиотиков, основанный на беспорядочных мутациях, ставший классическим, несмотря на колоссальные затраты труда, используется до настоящего времени. Со-

здавшееся положение является следствием того, что антибиотик, в отличие от белка, не является продуктом конкретного гена. Его биосинтез происходит в результате совместного действия 10–30 разных ферментов, кодируемых соответствующим количеством разных генов. Кроме того, для многих антибиотиков, микробиологическое производство которых налажено, молекулярные механизмы их биосинтеза до сих пор не изучены. Полигенный механизм, лежащий в основе биосинтеза антибиотиков, является причиной того, что изменения отдельных генов не приводят к успеху. Автоматизация рутинных приемов анализа продуктивности мутантов позволяет изучить десятки тысяч функционирующих штаммов и, тем самым, ускоряет процедуру отбора при использовании классического генетического приема.

Новая биотехнология, основанная на использовании штаммов – суперпродуцентов антибиотиков, предполагает совершенствование механизмов защиты продуцента от синтезируемого им антибиотика.

Высокую продуктивность проявляют штаммы, устойчивые к воздействию высоких концентраций антибиотиков в культурной среде. Это свойство учитывается и при конструировании клеток – суперпродуцентов. Со времени открытия пенициллина в конце 20-х гг. XX в. с помощью различных микроорганизмов были получены более 6000 антибиотиков, отличающихся специфичностью и механизмом действия. Их широкое применение в терапии инфекционных заболеваний помогло сохранить миллионы жизней. Подавляющее большинство антибиотиков было выделено из грамположительной почвенной бактерии *Streptomyces*, хотя их продуцируют также грибы и другие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Ежегодно во всем мире производится 100000 т антибиотиков на сумму примерно 19 млрд. долларов, в том числе более 100 млн. долларов приходится на долю антибиотиков, добавляемых в корм скоту в качестве добавок или ускорителей роста.

По оценкам, каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков, прежде всего в рамках обширных исследовательских программ по поиску среди тысяч различных микроорганизмов таких, которые синтезируют уникальные антибиотики. Получение и клинические испытания новых препаратов антибиотиков обходятся очень дорого, и в продажу поступают только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и представляют экономический интерес. На их долю приходится 1–2 % всех обнаруживаемых антибиотиков. В данном случае наилучший результат обеспечивает технология рДНК. Во-первых, с ее помощью можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более сильное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Во-вторых, генно-инженерные подходы могут использоваться для увеличения выхода антибиотиков и соответственно для снижения стоимости их производства.

Большинство ученых полагают, что клиническая биотехнология зародилась с началом промышленного производства пенициллина в 40-х гг. XX в. и его использования в терапии. По-видимому, применение этого первого природного пенициллина повлияло на снижение заболеваемости и смертности в



большой степени, чем использование какого-либо другого лекарственного препарата, но и привело к возникновению ряда новых проблем, которые удалось решить с помощью биотехнологии.

Во-первых, успешное применение пенициллина вызвало большую потребность в этом лекарственном препарате. Для ее удовлетворения нужно было резко увеличить выход пенициллина при его производстве. Во-вторых, первый пенициллин – С (бензилпенициллин) – в основном действовал на грамположительные бактерии (стрептококки, стафилококки), а необходимо было получить антибиотики с более широким спектром действия и/или активностью, поражающие грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *Pseudomonas* и др.). В-третьих, поскольку антибиотики вызывали аллергические реакции, необходимо было иметь набор антибактериальных средств, с тем чтобы выбрать из равноэффективных лекарственных препаратов такой, который не вызывал бы у больного аллергию. В-четвертых, пенициллин нестабилен в кислой среде желудка, поэтому его нельзя назначать для приема внутрь. Кроме того, многие бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам. Классическим примером является образование стафилококками фермента пенициллиназы (точнее,  $\beta$ -лактамазы), гидролизующего амидную связь в  $\beta$ -лактаманном кольце пенициллина с образованием фармакологически неактивной пенициллоиновой кислоты. При производстве пенициллина удалось увеличить его выход в основном благодаря последовательному использованию серии мутантов исходного штамма *Penicillium chrysogenum*, а также путем изменения условий выращивания.

Процесс биосинтеза антибиотика может состоять из десятков ферментативных реакций. В этой связи, клонирование всех генов его биосинтеза является очень сложной задачей. Один из подходов к выделению полного набора таких генов основан на трансформации одного или нескольких мутантных штаммов, не способных синтезировать данный антибиотик, банком клонов, созданным из хромосомной ДНК штамма дикого типа. После введения банка клонов в мутантные клетки проводят отбор трансформантов, способных синтезировать антибиотик. Затем выделяют плазмидную ДНК клона, содержащего функциональный экспримирующийся ген антибиотика, т.е. ген, восстанавливающий утраченную мутантным штаммом функцию, и используют ее в качестве зонда для скрининга другого банка клонов хромосомной ДНК штамма дикого типа, из которого отбирают клоны, содержащие нуклеотидные последовательности, перекрывающиеся с последовательностью зонда. Таким путем идентифицируют, а затем клонируют элементы ДНК, примыкающие к комплементирующей последовательности, и воссоздают полный кластер генов биосинтеза антибиотика. Данная процедура относится к случаю, когда нужные гены сгруппированы в одном сайте хромосомной ДНК. В случае, если гены биосинтеза разбросаны в виде небольших кластеров по разным сайтам, то необходимо иметь, по крайней мере, по одному мутанту на кластер, чтобы получить клоны ДНК, с помощью которых можно идентифицировать остальные гены кластеров.

С помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, а затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и, исходя из полученных данных, синтезировать олигонуклеотидные зонды. Этот подход использовался для выделения из *Penicillium chrysogenum* гена синтетазы изопенициллина N. Этот фермент катализирует окислительную конденсацию 5-(1- $\alpha$ -аминоадипил-N)-цистеинил-P-валина в изопенициллин N, являющийся ключевым промежуточным звеном в биосинтезе пенициллинов, цефалоспоринов и цефамицинов.

Новые антибиотики с уникальными свойствами и специфичностью действия можно получить, проводя генно-инженерные манипуляции с генами, участвующими в биосинтезе известных антибиотиков. Один из первых опытов, в ходе которого был получен новый антибиотик, состоял в объединении в одном микроорганизме двух незначительно отличающихся путей его биосинтеза.

Одна из плазмид *Streptomyces* (*pIJ2303*), несущая фрагмент хромосомной ДНК *S. coelicolor* длиной 32,5 т.п.н., содержит все гены ферментов, ответственных за биосинтез из ацетата актинородина, относящегося к семейству изохроманхиноновых антибиотиков. Плазмиду и различные субклоны, несущие части 32,5 т.п.н.-фрагмента (например, *pIJ2315*), вводили в штамм AM-7161 *Streptomyces* sp., синтезирующий родственный антибиотик медеpmицин, или в штамм B1140 или Tu22 *S. violaceoruber*, синтезирующие родственные антибиотики гранатицин и дигидрогранатицин.

Все указанные антибиотики являются кислотно-щелочными индикаторами, придающие растущей культуре характерный цвет, зависящий от значения pH среды. В свою очередь, значение pH (и цвет) среды зависят от того, какое соединение синтезируется. Мутанты родительского штамма *S. coelicolor*, не способные синтезировать актинородин, бесцветные. Появление окраски после трансформации штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. или штаммов B1140 или Tu22 *S. violaceoruber* плазмидой, несущей все или несколько генов, кодирующих ферменты биосинтеза актинородина, свидетельствует о синтезе нового антибиотика. Трансформанты штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. и штамма B1140 *S. violaceoruber*, содержащие плазмиду *pM2303*, синтезируют антибиотики, кодируемые плазмидой и хромосомной ДНК.

Однако, при трансформации штамма Tu22 *S. violaceoruber* плазмидой *pIJ2303*, наряду с актинородином, синтезируется новый антибиотик – дигидрогранатицин, а при трансформации штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. плазмидой *pIJ2315* синтезируется еще один антибиотик – медеpродин A.

В структурном отношении эти новые антибиотики мало отличаются от актинородина, медеpmицина, гранатицина и гидрогранатицина и, вероятно, образуются в том случае, когда промежуточный продукт одного пути биосинтеза служит субстратом для фермента другого пути. После детального изучения биохимических свойств различных путей биосинтеза антибиотиков, появится возможность создавать новые уникальные высокоспецифичные антибиотики, манипулируя генами, кодирующими соответствующие ферменты.

**Разработка новых методов получения современных поликетидных антибиотиков.** Термин «поликетидные» относится к классу антибиотиков, которые образуются в результате последовательной ферментативной конденсации карбоновых кислот типа ацетата, пропионата и бутирата. Некоторые поликетидные антибиотики синтезируются растениями и грибами. Однако, большая их часть образуется актиномицетами в виде вторичных метаболитов.

При этом прежде, чем проводить манипуляции с генами, кодирующими ферменты биосинтеза поликетидных антибиотиков, необходимо было выяснить механизм действия этих ферментов.

Детально изучив генетические и биохимические составляющие биосинтеза эритромицина в клетках *Saccharopolyspora erythraea*, удалось внести специфические изменения в гены, ассоциированные с биосинтезом данного антибиотика, и синтезировать производные эритромицина с новыми свойствами. Вначале была определена первичная структура фрагмента ДНК *S. erythraea* длиной 56 т.п.н., содержащего кластер генов *ery*, затем двумя разными способами модифицирована эритромицинполикетидсинтаза. Для этого удаляли участок ДНК, кодирующий  $\beta$ -кеторедуктазу или вносили изменение в участок ДНК, кодирующий еноилредуктазу. Данные исследования позволили экспериментально показать, что если идентифицировать и охарактеризовать кластер генов, кодирующих ферменты биосинтеза определенного поликетидного антибиотика, то, внося в них специфические изменения, можно будет направленно изменять структуру антибиотика.

Кроме того, вырезая и соединяя те или иные участки молекулы ДНК, можно перемещать домены поликетидсинтазы и получать новые поликетидные антибиотики.

**ДНК-технология в совершенствование производства антибиотиков.** С помощью генной инженерии можно не только создавать новые антибиотики, но и увеличивать эффективность синтеза уже известных препаратов. Лимитирующим фактором в производстве антибиотиков с помощью *Streptomyces spp.* часто является количество доступного клеткам кислорода. Вследствие плохой растворимости кислорода в воде и высокой плотности культуры *Streptomyces*, его часто оказывается недостаточно. При этом рост клеток замедляется, а выход антибиотика снижается. Для того, чтобы решить эту проблему, можно изменить конструкцию биореакторов, в которых выращивается культура *Streptomyces*, или, используя методы генной инженерии, создать штаммы *Streptomyces*, более эффективно использующие имеющийся кислород. Эти два подхода не взаимно исключают друг друга.

Одна из стратегий, используемых некоторыми аэробными микроорганизмами для выживания в условиях недостатка кислорода, состоит в синтезе гемоглобинподобного продукта, способного аккумулировать кислород и доставлять его в клетки. Так, аэробная бактерия *Vitreoscilla sp.* синтезирует гомодимерный гемсодержащий белок, функционально подобный эукариотиче-

скому гемоглобину. Ген гемоглобина *Vitreoscilla* был выделен, встроен в плазмидный вектор *Streptomyces* и введен в клетки этого микроорганизма. После его экспрессии на долю гемоглобина *Vitreoscilla* приходилось примерно 0,1% всех клеточных белков *S. coelicolor* даже в том случае, когда экспрессия осуществлялась под контролем собственного промотора гена гемоглобина *Vitreoscilla*, а не промотора *Streptomyces*. Трансформированные клетки *S. coelicolor*, растущие при низком содержании растворенного кислорода (около 5% от насыщающей концентрации), синтезировали в 10 раз больше актинородина на 1 г сухой клеточной массы и имели большую скорость роста, чем нетрансформированные. Данный подход можно использовать и для обеспечения кислородом других микроорганизмов, растущих в условиях недостатка кислорода.

Исходным материалом при химическом синтезе некоторых цефалоспоринов – антибиотиков, обладающих незначительным побочным эффектом, активных в отношении широкого спектра бактерий, – является 7-аминоцефалоспороновая кислота (7-АЦК), которая синтезируется из антибиотика цефалоспорина С. К сожалению, природных микроорганизмов, способных синтезировать 7-АЦК, до сих пор не выявлено.

Новый путь биосинтеза 7-АЦК был сконструирован включением специфических генов в плазмиду гриба *Acremonium chrysogenum*, который обычно синтезирует только цефалоспорин С. Один из этих генов был представлен кДНК гриба *Fusarium solani*, кодирующей оксидазу D-аминокислот, а другой происходил из геномной ДНК *Pseudomonas diminuta* и кодировал цефалоспорициназу. В плазмиде гены находились под контролем промотора *A. chrysogenum*. На первом этапе нового биосинтетического пути цефалоспорин С превращается в 7- $\rho$ -(5-карбокسي-5-оксопентанамид)-цефалоспороновую кислоту (кето-КО-7-АЦК) при помощи оксидазы аминокислот. Часть этого продукта, вступая в реакцию с пероксидом водорода, одним из побочных продуктов, превращается в 7- $\beta$ -(4-карбоксібутанамид)-цефалоспороновую кислоту (КБ-7-АЦК). Цефалоспорин С, кето-КО-7-АЦК и КБ-7-АЦК могут подвергаться гидролизу цефалоспорициназой с образованием 7-АЦК. Однако, только 5% цефалоспорина С напрямую гидролизуются до 7-АЦК. В этой связи, для образования 7-АЦК с высоким выходом необходимы оба фермента.

**Гибридные антибиотики.** Антибиотики вырабатываются микроорганизмами в результате совместного действия продуктов 10–30 генов, что усложняет использование генно-инженерных подходов для управления их биосинтезом. Однако, данная проблема разрешима в тех случаях, когда синтез антибиотиков определяется мультиферментными комплексами, кодируемыми одним опероном (в случае антибиотиков пептидной природы). Это открывает новые перспективы в биотехническом получении антибиотиков. Внедрение соответствующих генов из одного микроорганизма в клетки другого близкородственного может приводить к получению “гибридного” антибиотика, обладающего новыми свойствами. Этот подход был успешно при-

менен в 1988 г. биохимиком Михаэлем Хопвудом (США). При объединении генов биосинтеза актинородина и медеермицина был получен новый антибиотик, получивший название “медеерродин”. В другом случае М. Хопвуд создал штамм, продуцирующий “гибридный” антибиотик дигидрогранатиродив.

Высокая продуктивность штаммов микроорганизмов иногда достигалась за счет увеличения в клетках количества копий генов биосинтеза антибиотика. Таким путем удалось существенно увеличить выход актинородина.

#### **4. Совершенствование биообъектов с помощью методов клеточной инженерии**

Несмотря на огромное разнообразие существующих в настоящее время антибиотиков, потребность в них не уменьшается. Это обусловлено приобретением патогенными микроорганизмами и опухолевыми клетками устойчивости к применяющимся антибиотикам, их побочным действием на макроорганизм и появлением новых инфекционных заболеваний. Для создания новых антибиотиков существует несколько способов. Однако, наиболее результативными являются скрининг продуцентов новых природных антибиотиков и химическая трансформация известных антибиотиков.

Самым богатым биосинтетическим потенциалом среди известных продуцентов антибиотиков обладают актиномицеты. Методы клеточной инженерии, разработанные для актиномицетов в 70-х гг. XX в. японскими (Okanishi, 1974), английскими (Hopwood, 1977) и американскими (Salta, 1978) учеными, значительно расширили методические возможности изучения этих микроорганизмов, которые ранее ограничивались мутагенезом и конъюгацией. Так, слияние протопластов обеспечивает высокую частоту генетической рекомбинации, что позволяет использовать немаркированные штаммы. Регенерация протопластов может вызывать разнообразные изменения генома.

Клеточная инженерия – это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и любыми хромосомами у эукариот, независимо от удаленности организмов в эволюционном плане.

В результате создаются неприродные биообъекты, среди которых могут быть отобраны продуценты новых БАВ или организмы с ценными в практическом отношении свойствами.

С помощью клеточной инженерии возможно получение межвидовых и межродовых гибридных культур микроорганизмов, а также гибридных клеток между отдаленными в эволюционном отношении многоклеточными организмами.

В данном случае осуществляют обмен генетическим материалом между организмами, которые в обычных условиях не вступают в половой процесс, что открывает большие возможности в создании новых биообъектов. В случае с клеточной инженерией исследователь оперирует целыми клетками.

Одним из методов клеточной инженерии является протопластирование.

Протопласт – это клетка лишенная клеточной стенки, окруженная цитоплазматической мембраной. Протопласт получают, обрабатывая клетку ферментами, гидролизующими полимеры клеточной стенки.

## Техника клеточной инженерии

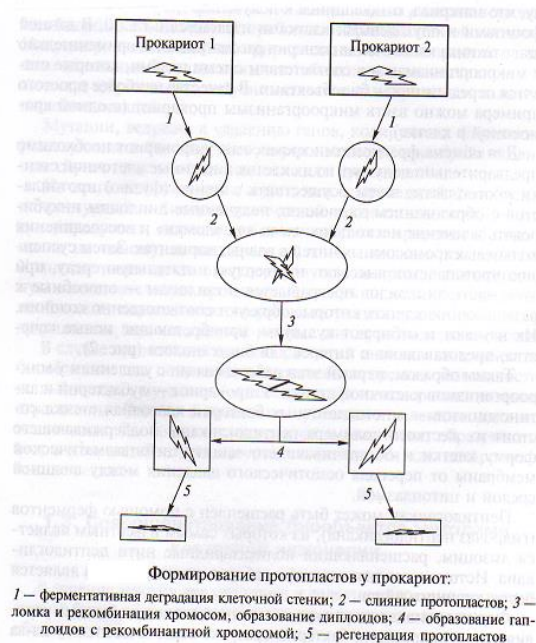
1. Получение протопластов. У прокариот – эубактерий и актиномицетов – клеточная стенка состоит из пептидогликана (поддерживает форму клетки и защищает цитоплазматическую мембрану от перепада осмотического давления между внешней средой и цитоплазмой). При этом лизоцим расщепляет полисахаридные нити пептидогликана, а пенициллин подавляет синтез клеточной стенки грамотрицательных бактерий, нарушая баланс между синтетазами и гидролазами. Удалить клеточную стенку и сохранить целостность мембраны можно, путем выравнивания осмотического давления внутри клетки и в среде.

Для получения протопластов клетки обрабатывают ферментом в «гипертонической» среде с 20% сахарозы или маннита, или с 10% натрия хлорида в зависимости от особенностей биообъекта и преследуемых целей.

Превращение клеток в протопласты контролируют путем фазово-контрастной микроскопии.

У плесневых и дрожжевых грибов, клеточная стенка состоит из хитина, глюканов, маннопротеинов (каждому необходим свой деградирующий фермент) – их обрабатывают комплексным ферментным препаратом – улиточным ферментом, который выделяют из пищеварительного тракта виноградной улитки *Helix pomatia*.

2. Слияние (фузия) протопластов с образованием диплоидов. Данный этап включает в себя объединение суспензий двух образцов протопластов, принадлежащих разным штаммам (видам, родам). При этом частота слияния двух протопластов разного происхождения, повышается при добавлении к ним полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве детергента. У прокариот образующиеся протопласты имеют двойной набор хромосом. При этом протопласты сохраняют целостность в гипертонической среде.



3. Полученные диплоиды инкубируют в течение нескольких часов для «ломки» и воссоединения кольцевых хромосомных нитей в разных вариантах.

4. Суспензию протопластов высеивают на твердую питательную среду. При этом часть диплоидов превращается в гаплоиды – клетки, способные к размножению, образующие колонии. Их изучают и отбирают культуры, с новыми свойствами, интересными для биотехнолога. Примером может служить получение «гибридных» антибиотиков. С помощью клеточной инженерии были получены продуценты таких антибиотиков, у которых макролидный агликон эритромицина был связан с углеводной частью, соответствующей антрациклинам, и наоборот, антрациклиновый агликон с сахарами, свойственными эритромицину.

Ключевой проблемой, возникающей при протопластировании, является реверсия полученных изменений. Для предотвращения реверсии нужных мутаций к исходным показателям:

1. обработка «плюс»-вариантов мутагенами и отбор мутантов с пониженной способностью к возвращению измененных фрагментов ДНК к норме;
2. инженерная энзимология: иммобилизация клеток «плюс»-вариантов, т.е. связывать их с нерастворимыми носителями и использование в производстве, не прибегая к пересевам в течение определенного времени (от нескольких недель до нескольких месяцев).

### **Техника клеточной инженерии**

1. Метод перегруппировки генов. Каждая клетка содержит определенный набор и последовательность генов. При протопластировании происходит перегруппировка генов, а также активация молчащих генов.

2. Слияние или фузия генов. Прокариот сливают с эукариотом, образуется рекомбинант, содержащий фрагменты разных ДНК.

3. Трансформация:

а) клетка с определенным набором генов в ДНК → живой протопласт без перегруппировки генов → протопласт гибрид-рекомбинант → клетка

↑

б) выделение изолированной ДНК в пробирке - вектор (фаг, плаزمид).

При наличии клетки и изолированной ДНК с нужным геном (вектор), можно включить вектор в изолированный протопласт (трансформация).

При этом образуются «+» продуценты с новыми свойствами. Однако, в клетке существуют системы репарации (восстановления) молекулы ДНК, поэтому постепенно эти рекомбинанты возвращаются к исходному (дикому) типу. Репарацию преодолевают следующим образом:

1. «+»-варианты дополнительно обрабатывают мутагенами для преодоления действия системы репарации;
2. иммобилизация клеток «+» вариантов.

Для того, чтобы прошла трансформация, необходимо «сделать» клетку компетентной, т.е. увеличить ее проницаемость. Это достигается следующим образом:

1. воздействием на клетку ионами тяжелых металлов (цинк, кобальт, литий, магний);
2. воздействием на клетку ферментами (лизозим, комплексный фермент виноградной улитки);
3. быстрым замораживанием и оттаиванием клеток.

Компетентные клетки легче поглощают вектор, т.к. у них «обнажена» цитоплазматическая мембрана, которая в некоторых местах выходит на поверхность, и в образующиеся в этих местах окошечки, легко проникает вектор.

При слиянии протопластов может происходить явление амплификации (увеличение) генов. При этом продукция целевого назначения (витаминов, гормонов, антибиотиков) увеличивается. Клетки с амплификацией генов – это «+» вариант.

По предположению исследователей, одним из многочисленных приложений методов клеточной инженерии должно было стать получение новых антибиотиков путем создания их рекомбинантных продуцентов. Возможны две категории новых антибиотиков – гибридные и антибиотики молчащих генов. В случае, если рекомбинация произойдет в области структурных биосинтетических генов, то могут образоваться БАВ, в молекулах которых сочетаются фрагменты молекул исходных антибиотиков. Для создания таких химических "гибридов" необходимо, чтобы в молекулах исходных антибиотиков присутствовали общие структурные фрагменты, например, сахара. В случае, если рекомбинация произойдет в области регуляторных генов биосинтеза антибиотиков, чья продукция в норме подавлена у родительских штаммов, то эти гены могут экспрессироваться. Химическая природа антибиотиков молчащих генов и исходных антибиотиков может быть совершенно разной. Для получения антибиотиков молчащих генов сочетание структур исходных антибиотиков не имеет значения.