

## Занятие семинарского типа № 8

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Совершенствование биообъектов – продуцентов белковых препаратов традиционными методами селекции и с помощью методов генетической и клеточной инженерии

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Продуценты белка

Производство микробной биомассы представляет собой наиболее крупное микробиотехнологическое производство. Следует отметить, что микробная биомасса может быть хорошей белковой добавкой в корма для домашних животных, птиц и рыб. Производство микробной биомассы особенно важно для стран, не культивирующих в больших масштабах сою (соевую муку используют как традиционную белковую добавку к кормам сельскохозяйственных животных).

При выборе микроорганизма учитывают удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при поточном культивировании, размеры клеток. Клетки дрожжей крупнее, чем бактерий, и легче отделяются от культуральной жидкости при центрифугировании. В этой связи, можно выращивать полиплоидные мутанты дрожжей с крупными клетками.

В настоящее время известны только две группы микроорганизмов, которым присущи свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного биотехнологического производства:

- 1) дрожжи рода *Candida* на *n*-алканах (нормальных углеводородах);
- 2) бактерии *Methylophilus methylotrophus* на метаноле.

Микроорганизмы можно выращивать и на других питательных средах: на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, винно-водочной, деревообрабатывающей промышленности. В данном случае экономические преимущества их использования очевидны. Так, килограмм переработанной микроорганизмами нефти дает килограмм белка, а, скажем, килограмм углеводов (сахаров)– всего 500 граммов белка. При этом аминокислотный состав белка дрожжей практически не отличается от такового, полученного из микроорганизмов, выращенных на обычных углеводных средах.

Биологические испытания препаратов из дрожжей, выращенных на углеводородах, которые проведены в нашей стране и за рубежом, выявили полное отсутствие у них какого-либо вредного влияния на организм испытуемых животных. Опыты были проведены на многих поколениях десятков тысяч лабораторных и сельскохозяйственных животных.

В непереработанном виде дрожжи содержат неспецифические липиды и аминокислоты, биогенные амины, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Следует отметить, что их влияние на организм пока еще плохо изучено. В

этой связи, предлагается выделять из дрожжей белок в химически чистом виде. Его освобождение от нуклеиновых кислот не представляет сложности.

В современных биотехнологических процессах, основанных на использовании микроорганизмов, продуцентами белка служат дрожжи, микроскопические грибы, бактерии и микроскопические водоросли.

С технологической точки зрения наилучшим продуцентом белка являются дрожжи. Их преимущество заключается, прежде всего, в "технологичности": дрожжи легко выращивать в условиях промышленного производства. Кроме того, они характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания, легко отделяются, не загрязняют воздух спорами. При этом клетки дрожжей содержат до 25% сухих веществ.

Наиболее ценным компонентом дрожжевой биомассы является белок, который по составу аминокислот превосходит белок зерна злаковых культур и лишь немного уступает белкам молока и рыбной муки. Биологическая ценность дрожжевого белка определяется наличием в нем значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма, в том числе и рыбную муку. Кроме того, дрожжевые клетки содержат микроэлементы и большое количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты.

В этой связи, при скармливании кормовых дрожжей коровам повышаются удои и содержание жира в молоке, а у пушных зверей улучшается качество меха. Интерес представляют и дрожжи, обладающие гидролитическими ферментами и способные расти на полисахаридах без их предварительного гидролиза. Использование таких дрожжей позволит устранить дорогостоящую стадию гидролиза полисахаридсодержащих отходов.

В настоящее время известно более 100 видов дрожжей, которые хорошо растут на крахмале как на единственном источнике углерода. Среди них особенно выделяются два вида, которые образуют как глюкоамилазы, так и  $\beta$ -амилазы, растут на крахмале с высоким экономическим коэффициентом и могут не только ассимилировать, но и сбразивать крахмал – *Schwanniomyces occidentalis* и *Saccharomycopsis fibuliger*. Оба вида являются перспективными продуцентами белка и амилолитических ферментов на крахмалсодержащих отходах. В настоящее время проводятся поиски дрожжей, которые могут расщеплять нативную целлюлозу. Так, целлюлазы обнаружены у нескольких видов дрожжей, например, у *Trichosporon pullulans*. Хотя, следует отметить, что активность данных ферментов низкая и об их практическом использовании в промышленном биотехнологическом производстве говорить пока не приходится.

Дрожжи из рода *Kluyveromyces* хорошо растут на инулине – основном запасном веществе в клубнях топинамбура, являющихся важной кормовой культуры, которая может быть использована для получения дрожжевого белка.

В последнее время в качестве продуцентов белка стали использовать бактерии, которые отличаются высокой скоростью роста и содержат в био-

массе до 80% целевого продукта (белка). Бактерии хорошо поддаются селекции, что позволяет создать на их основе высокопродуктивные штаммы. Их основными недостатками являются трудная осаждаемость, обусловленная малыми размерами клеток, большая чувствительность к фаговым инфекциям и высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот. Последнее обстоятельство неблагоприятно только в том случае, если предусматривается пищевое использование целевого продукта. Снижать содержание нуклеиновых кислот в биомассе, употребляемой на корм сельскохозяйственным животным, нет необходимости, так как мочевиная кислота и ее соли, образующиеся при разрушении азотистых оснований, превращаются в организме животных в алантоин, который легко выделяется с мочой. У человека избыток солей мочевиной кислоты может способствовать развитию целого ряда серьезных заболеваний.

Следующую группу продуцентов белка составляют микроскопические грибы. Они привлекают внимание исследователей благодаря способности утилизировать самое разнообразное по составу органическое сырье: мелассу, молочную сыворотку, сок растений и корнеплодов, лигнин- и целлюлозосодержащие твердые отходы пищевого, деревообрабатывающего, гидролизного производств. Грибной мицелий богат белковыми веществами, которые по содержанию незаменимых аминокислот ближе всего к белкам сои. Вместе с тем, белок микроскопических грибов богат лизином, основной аминокислотой, недостающей в белке зерновых культур. Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные пищевые и кормовые смеси. Грибные белки имеют достаточно высокую биологическую ценность и хорошо усваиваются организмом.

Кроме того, положительным фактором является и волокнистое строение выращенной культуры продуцента, что, в свою очередь, позволяет имитировать текстуру мяса, а с помощью различных добавок – его цвет и запах. Хранят грибной мицелий обычно в замороженном виде.

В качестве субстрата микроскопическими грибами используются глюкоза и другие питательные вещества, а общим источником азота служат аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты, а затем отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования.

Источниками белковых веществ могут служить также водоросли. При фототрофном способе питания и образования биомассы они используют углекислый газ атмосферы. Выращивают водоросли, как правило, в поверхностном слое прудов, где с площади 0,1 га можно получить такое же количество белка, как и с 14 га посевов фасоли. Белок водорослей пригоден не только для кормовых, но и пищевых целей.

Кроме того, хорошими продуцентами белка являются рясковые, которые накапливают протеина до 45% от сухой массы, а также до 45% углеводов. Однако, несмотря на свои малые размеры, они не принадлежат к вышеперечисленным производителям белка (микроорганизмам), так как не только являются многоклеточными организмами, но и относятся к высшим растениям.

## **2. Совершенствование продуцентов БАВ методами селекции**

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

Селекция тесно связана с систематикой, анатомией, морфологией, физиологией, экологией растений и животных, биохимией, иммунологией, растениеводством, зоотехнией, фитопатологией, энтомологией, биологией опыления и оплодотворения, эмбриологией, гистологией, молекулярной биологией и другими науками, использует их приёмы и методы исследования.

Селекция реализуется в трех основных направлениях – селекция растений, животных и микроорганизмов.

Предметом селекции является изучение и претворение на практике специфических закономерностей эволюции культурных растений, сельскохозяйственных животных и искусственных штаммов микроорганизмов.

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

### **2.1. Характеристика методов селекции**

#### **Отбор**

Различают два вида отбора: естественный и искусственный.

Естественный отбор – основной движущий фактор эволюции. Учение о естественном отборе разработано Ч. Дарвином.

В природных популяциях организмов, размножающихся половым путем, существует большое разнообразие генотипов, а, следовательно, и фенотипов. Благодаря индивидуальной изменчивости в условиях конкретной среды обитания приспособленность разных генотипов (фенотипов) различна.

В эволюционном контексте приспособленность определяют как произведение жизнеспособности в данной среде, обуславливающей большую или меньшую вероятность достижения репродуктивного возраста, на репродуктивную способность особи.

Различия между организмами по приспособленности, оцениваемой передачей аллелей следующему поколению, выявляется в природе с помощью естественного отбора.

Главный результат естественного отбора заключается не просто в выживании более жизнеспособных особей, а в их относительном вкладе в генофонд дочерней популяции.

Необходимой предпосылкой для естественного отбора является борьба за существование – конкуренция за пищу, жизненное пространство и партнера для спаривания.

Следствием естественного отбора является увеличение разнообразия форм организмов, последовательное усложнение организации в ходе прогрессивной эволюции и вымирание менее приспособленных видов.

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

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

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

При этом различают следующие виды целевого отбора:

Единичным отбором называют отбор, проведенный однократно из данной группы особей.

Методическим (или систематическим) отбором называют отбор, проводимый в течение нескольких поколений с целью выведения форм организма, в наибольшей степени отвечающим нуждам человека.

Индивидуальным отбором называется отбор, реализуемый на уровне конкретных особей данной породы животных или сортов растений. В данном случае потомство сохраняет признаки родительской формы, является гомозиготным и называется чистой линией.

Массовым отбором называют отбор потомства большого числа особей одновременно.

В селекции используют все вышеперечисленные виды отбора. При этом отбор сам по себе не дает результата, если у организмов не будут возникать какие-либо изменения. Однако изменения сами по себе возникают очень медленно, стихийно и не всегда в нужных направлениях, поэтому селекционеры используют различные способы воздействия на организм, при которых такие изменения возникают.

## **Гибридизация**

Закономерности независимого наследования и свободного комбинирования признаков в потомстве послужили теоретической основой гибридизации, являющейся вместе с отбором основным методом селекции.

Метод гибридизации (скрещивания) заключается в получении потомства от особей, различающихся определенными признаками, которые можно использовать в дальнейшей селекционной работе.

В некоторой степени скрещивание позволяет нарушить консерватизм наследственности, что также способствует селекционной работе.

Гибридизация позволяет:

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

Подбор пар для скрещивания определяет успех последующей селекционной работы. При этом в качестве исходного материала для гибридизации используют: естественные и гибридные популяции, самоопылённые линии, искусственные мутанты, полиплоидные формы и коллекции растений.

Эффективен подбор пар для гибридизации по: генетике селективируемых признаков, экотипам, хозяйственно-ценными свойствам и признакам, биологическими свойствами и признаками.

### **Виды гибридизации:**

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 микроорганизма выделяются в наиболее концентрированном виде. Подобное выделение признака связано с тем, что генотип родственных организмов близок, а скрещивание этих организмов способствует возникновению гомозиготных форм.

Следует отметить, что у гибридов при данном способе гибридизации многие рецессивные неблагоприятные гены переходят в гомозиготное состояние, что приводит к гибридной депрессии, т.е. снижению жизнеспособности и продуктивности.

Получение чистых линий находит широкое использование в селекционной практике, т.к. позволяет выявить свойства организмов, важные для хозяйственной деятельности, а затем полученные формы использовать в дальнейшей селекционной работе.

Неродственной гибридизацией (аутбридингом) называют скрещивание неродственных форм, в том числе и различных инбредных линий, а также межсортовое или межпородное скрещивание.

Для неродственного скрещивания подбирают инбредные линии, обеспечивающие максимальный эффект гетерозиса (жизненной силы), т.е. превосходство полученных гибридов над родительскими формами по определенным признакам и свойствам.

Под отдаленной гибридизацией понимают скрещивание организмов, принадлежащих не только к разным породам, но даже и к разным видам.

Следует отметить, что отдаленные гибриды, как правило, стерильны, т.к. у них нарушается мейоз и не образуются гаметы.

Генетическую основу межвидовой гибридизации составляет явление полиплоидии, при котором в клетке возникает набор хромосом, в кратное число раз больший, чем это характерно для нормы.

Ступенчатая (возвратная) гибридизация основана на системе повторных скрещиваний. Она позволяет добиться сочетания в гибридном потомстве тех ценных свойств, которые не удастся получить в результате однократного скрещивания.

## **Мутагенез**

Мутагенез – искусственное получение мутаций с помощью мутагенов.

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

Мутации могут быть обусловлены: перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов) и изменениями внутри индивидуального гена.

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

Мутант – наследственно измененная в результате мутации форма организма.

Большинство мутантов отличаются от исходных организмов нарушением различных структур и функций и, как правило, имеют пониженную жизнеспособность, гораздо реже возникают мутанты, обладающие преимуществами, их широко используют для выведения новых сортов растений и пород животных, а также для создания производственных штаммов микроорганизмов – суперпродуцентов аминокислот, витаминов, антибиотиков и других БАВ.

Способность давать мутации — мутировать — универсальное свойство всех форм жизни от вирусов и микроорганизмов до высших растений, животных и человека. Данное свойство лежит в основе наследственной изменчивости в живой природе.

В зависимости от механизма возникновения различают спонтанные (мутации, проявляющиеся в естественных условиях под влиянием факторов внешней и внутренней среды) и индуцированные (мутации, вызываемые воздействием мутагенов) мутации.

К появлению спонтанных мутаций, как правило, приводят ошибки репликации, неправильное формирование комплементарных пар оснований или структурные искажения ДНК под действием естественных мутагенов. Такие мутации могут вызывать благоприятные и неблагоприятные генетические изменения.

Примерный уровень спонтанного мутирования – одна мутация на каждые  $10^6$ – $10^7$  клеток. Численная доля мутантов в клеточной популяции для разных признаков различна и может варьировать от  $10^{-4}$ – $10^{-11}$ . Для конкрет-

ного гена частота мутирования составляет порядка  $10^{-5}$ , а для определенной пары нуклеотидов –  $10^{-8}$ .

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

### **Виды мутагенов:**

К физическим мутагенам относят нагревание, различные виды ионизирующих излучений, ультрафиолетовое и микроволновое излучение. Первичный эффект ионизирующих и ультрафиолетовых излучений заключается в образовании одиночных или двойных разрывов в молекуле ДНК (например, радиационный мутагенез обычно приводит к образованию пиримидиновых димеров; УФ-, рентгеновские и другие виды ионизирующих излучений могут оказывать на микроорганизмы летальное или мутагенное действие).

Химические мутагены. Мутагенным действием обладают многие химические соединения разного строения. К ним относят аналоги азотистых оснований (бромурацил и др.), алкилирующие агенты (этилметансульфонат и др.), азотистая кислота, интекалирующие агенты (акридиновые красители и т.п.).

Химические мутагены классифицируют на мутагены прямого действия, непосредственно взаимодействующие с генетическим материалом клетки и мутагены непрямого действия, влияние которых на генетический материал клетки опосредованно рядом метаболических превращений.

В отличие от ионизирующих и ультрафиолетовых излучений для химических мутагенов свойственна специфичность действия, зависящая от природы объекта и стадии его развития.

К биологическим мутагенам относят ДНК- и РНК-содержащие вирусы, некоторые полипептиды, белки, ряд ферментов рестриктаз и др. Механизмы возникновения мутации в результате воздействия биологических мутагенов не вполне ясны. Выдвинуто предположение о том, что агенты, содержащие нуклеиновые кислоты, могут вызывать нарушение процессов рекомбинации, приводящее к возникновению мутаций.

### **Виды мутаций:**

#### **По происхождению:**

- ✓ генеративные мутации – мутации, возникающие в половых клетках или спорах, передающиеся по наследству;
- ✓ соматические мутации – мутации, возникающие в клетках, не участвующих в половом размножении;
- ✓ прямые мутации – мутации, приводящие к отклонению признаков от дикого типа;
- ✓ обратные мутации (или реверсии) – мутации, приводящие к полному или частичному восстановлению дикого типа;
- ✓ ядерные мутации – мутации, затрагивающие хромосомы ядра;



✓ цитоплазматические мутации – мутации, затрагивающие генетический материал, заключенный в цитоплазматических органоидах клетки (митохондриях, пластидах и т.п.).

**По способу обнаружения фенотипического проявления:** морфологические, биохимические, летальные, полуметалельные и т.д.

**По степени доминирования мутантных признаков:** доминантные мутации и рецессивные мутации.

### **По характеру изменения генотипа:**

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

Генные мутации, составляющие основную долю всех мутаций, вызывают разнообразные изменения признаков организма. Причем изменение одного гена обычно приводит к изменению нескольких признаков. Генные мутации могут быть доминантными, полудоминантными и рецессивными.

В результате мутации ген может переходить в разные состояния, по-разному влияющие на контролируемые данным геном признаки организма. Мутантные гены могут отличаться от соответствующих нормальных генов тем, что специфический для данного гена продукт (чаще всего фермент) не образуется, образуется в меньшем или превышающем норму количестве, образуется продукт, инактивирующий или тормозящий продукт немутантного гена, и вместо нормального образуется иной, не взаимодействующий с ним продукт, отсутствующий у немутантных особей.

Претерпевший мутации ген обычно столь же стабилен, как немутантный, из которого он произошел. Вследствие новой мутации он может вернуться к исходному состоянию (обратные мутации).

На возникновение мутаций на генном уровне оказывают влияние факторы окружающей среды.

Генные мутации могут быть и причиной нарушения транспорта различных соединений через клеточные мембраны. Они связаны с нарушением функций мембранных механизмов или с дефектами в некоторых системах.

Хромосомные мутации (хромосомные абберации) разделяют на внутрихромосомные и межхромосомные.

К внутрихромосомным мутациям относят делецию (утрату 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, сопровождающуюся обменом участками между двумя 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 (потерю отдельных хромосом хромосомного набора).

Геномные мутации возникают за счет повреждений в процессе мейоза ведущих к нерасхождению хромосом или хроматид по дочерним клеткам.

По выраженности почти любого признака клетки в микробной популяции составляют вариационный ряд. Большинство клеток имеют среднюю выраженность признака. Отклонения «+» и «-» от среднего значения встречаются в популяции тем реже, чем больше величина отклонения в любую сторону.

Первоначально самый простой подход к совершенствованию биообъекта заключался в отборе отклонений «+» (предполагая, что эти отклонения соответствуют нуждам производства). В новом клоне, полученном из клетки с отклонениями «+» вновь проводился отбор по тому же принципу. Однако данная процедура при ее неоднократном повторении довольно быстро теряет эффективность, т.е. отклонения «+» становятся в новых клонах все по величине меньше и меньше.

Спонтанные мутации встречаются довольно редко. При этом разброс по степени выраженности признаков обычно невелик.

Совершенствование биообъектов путем предварительного мутагенеза и последующей селекции оказалось более действенным. В данном случае разброс мутантов по выраженности признаков («+» и «-») резко увеличивается. Среди них оказываются мутанты с сниженной способностью к реверсии, т.е. со стабильно измененным признаком, не приводящим к летальному исходу.

После обработки биообъекта мутагенами, их воздействие на ДНК приводит к частому наследственному изменению уже на уровне фенотипа.

Следующей задачей является отбор и оценка нужных исследователю мутаций, для выявления которых обработанную культуру высеивают на твердые питательные среды разных составов, предварительно разведя ее так, чтобы на среде формировались отдельные колонии, образующиеся при размножении отдельных клеток. Затем каждую колонию пересеивают и полученную культуру (клон) проверяют по тем или иным признакам в сравнении с исходной культурой. Эта селекционная часть работы трудоемка, хотя приемы, позволяющие повысить ее эффективность, постоянно совершенствуются.

Изменяя состав твердых сред, на которых вырастают колонии, можно сразу получить первоначальные сведения о свойствах клеток этой колонии в сравнении с клетками исходной культуры.

Для высевания клонов с разными особенностями метаболизма используют «метод отпечатков». Популяцию микробных клеток разводят так, чтобы на чашке Петри с питательной средой выросло около 100 колоний, и они были бы четко разделены. На металлический цилиндр диаметром, близким к диаметру чашки Петри, надевают бархат и стерилизуют, создавая «стерильное бархатное дно» цилиндра. Далее прикладывают данное дно к поверхности среды в чашке с выросшими колониями. При этом колонии как бы «отпе-

чатываются» на бархате, который затем прикладывают к поверхности питательных сред разного состава. Таким путем можно установить, какая из колоний в исходной чашке соответствует, например, мутанту, нуждающемуся в конкретном витамине и др.; или какая колония состоит из мутантных клеток, способных к образованию фермента, окисляющего определенный субстрат, и т.п.

В первую очередь биотехнолога интересуют мутантные культуры, обладающие повышенной способностью к образованию целевого продукта. Продуцент целевого продукта, наиболее перспективный в практическом отношении, может подвергаться многократной обработке с использованием различных мутагенов.

Потенциальные возможности мутагенеза (с последующей селекцией) обусловлены зависимостью биосинтеза целевого продукта от многих метаболических процессов в организме продуцента. Так, повышенную активность организма, образующего целевой продукт, можно ожидать, если мутация привела к дупликации или амплификации структурных генов, включенных в систему биосинтеза продукта.

Кроме того, активность можно повысить, если за счет разных типов мутаций будут подавлены функции репрессорных генов, регулирующих биосинтез продукта.

Весьма эффективным путем увеличения биосинтеза целевого продукта является нарушение функционирования системы ретроингибирования.

Помимо этого, повысить активность продуцента можно, изменив (за счет мутаций) систему транспорта предшественников целевого продукта в клетку.

В то же время следует учитывать, что в некоторых случаях продукт при резком увеличении его образования отрицательно влияет на жизнеспособность собственного продуцента (суицидный эффект).

Помимо дупликации и амплификации структурных генов мутации могут носить характер делеции. Мутации могут быть обусловлены транспозицией (вставкой участка хромосомы в новое место) или инверсией. При этом геном мутантного организма претерпевает изменения, ведущие в одних случаях к потере мутантом определенного признака, а в других – к возникновению у него нового признака. Гены на новых местах оказываются под контролем иных регуляторных систем. Кроме того, в клетках мутанта могут появиться несвойственные исходному организму гибридные белки за счет того, что под контролем одного промотора оказываются полинуклеотидные цепи двух (или более) структурных генов, ранее отдаленных один от другого.

Немалое значение для биотехнологического производства могут иметь и «точечные» мутации. В данном случае изменения происходят в пределах только одного гена. К таким мутациям относятся трансверсия и транзиция. Замены в одной паре нуклеотидов при передаче генетического кода на стадии трансляции ведут к появлению в кодируемом белке вместо одной аминокислоты другой. Это может резко изменить конформацию данного

белка и, соответственно, его функциональную активность, особенно в случае замены аминокислотного остатка в активном или аллостерическом центре.

Производственные штаммы, способные к сверхсинтезу целевого продукта, очень нестабильны вследствие того, что многочисленные искусственные изменения в геноме его клеток сами по себе положительного значения не имеют. В этой связи мутантные штаммы требуют постоянного контроля в процессе хранения. С этой целью популяцию клеток высевают на плотную среду, а полученные колонии оценивают по продуктивности. При этом ревертанты отбрасывают. Реверсия объясняется обратными спонтанными мутациями, ведущими к возврату участка генома в его первоначальное состояние. Специальные ферментные системы репарации участвуют в реверсии к норме – в эволюционном механизме поддержания постоянства вида.

Совершенствование биологических объектов применительно к биотехнологическому производству не исчерпывается только повышением их продуктивности. Данное направление является основным, но не единственным, т.к. успешная работа биотехнологического производства зависит от большого числа факторов. С экономической точки зрения важно получение мутантных штаммов, способных использовать более экономичные и менее дефицитные питательные среды (при работе в исследовательских лабораториях дорогие среды не создают особых финансовых проблем но, при организации крупнотоннажного биотехнологического производства снижение их стоимости является одним из важнейших факторов).

При культивировании некоторых биологических объектов культуральная жидкость после окончания процесса ферментации имеет реологические свойства, неблагоприятные в технологическом отношении. В этой связи, при работе с культуральной средой, характеризующуюся высокой вязкостью, сталкиваются с трудностями при использовании сепараторов, фильтров-прессов и другого соответствующего оборудования. Мутации, соответствующим образом изменяющие метаболизм биологического объекта, в значительной мере устраняют данные проблемы.

Большое значение в плане гарантии надежности и эффективности биотехнологического производства приобретает получение фагоустойчивых биообъектов. Соблюдение условий асептики при реализации процесса ферментации, прежде всего, касается предотвращения попадания клеток и спор посторонних бактерий и микроскопических грибов в посевной материал и ферментер. Предотвратить проникновение фагов в ферментер вместе с технологическим воздухом, стерилизуемым путем фильтрации, очень трудно, поэтому основной путь борьбы с бактериофагами, актинофагами и фагами, поражающими грибы, – получение устойчивых к ним мутантных форм биообъектов.

## **2.2. Селекция продуцентов белковых препаратов**

Повышение продуктивности микроорганизмов как продуцентов белковых препаратов сводится к селекции и мутагенезу. Селекционная работа с

микроорганизмами состоит в поиске новых природных форм, обладающих полезными для человека свойствами, например, способностью к биосинтезу белков, высокая скорость роста, способность развиваться на простых, доступных и экономичных питательных средах и т.д., в дальнейшем их совершенствовании, в создании на их основе высокоэффективных производственных штаммов.

Методы современной селекции основаны на генетическом конструировании, позволяющим изменить генетическую программу микроорганизма (продуцента белкового препарата).

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

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, методы которой базируются на манипулировании выделенной из организма ДНК.

Биотехнолог для совершенствования биологического объекта – продуцента БАВ использует:

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

При этом различают цитоплазматические (внехромосомные) и ядерные (хромосомные) мутации.

Наследственные изменения называются мутациями в геноме, но есть и внехромосомные изменения.

Таким образом, мутации проявляются на субклеточном и молекулярном уровне.

Различают три вида хромосомных мутаций:

1. изменение числа хромосом;
2. изменение числа и порядка расположения генов (перестройка хромосом ведет к структурным изменениям);
3. изменения индивидуальных генов (внутригенные изменения).

В селекции микроорганизмов основное значение имеют два последних типа мутаций.

Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии, т.е. возвращения к исходному фенотипу (обратное мутирование).

Мутанты, которые образуются в результате реверсии, называются ревертантами.

Современная селекция основана на выделении клоновых культур.

Клон – это генетически однородное потомство одной клетки (колония, выросшая из одной клетки).

Клоновая культура, имеющая наследственную однородность, называется штаммом.

Типы мутаций:

1. Делеция (стирание) – выпадение участков хромосомы или нескольких генов.

2. Дупликация – удвоение генов.

3. Амплификация – умножение отдельных генов или группы генов.

4. Транспозиция – вставка участка хромосомы в новые места на хромосоме.

5. Инверсия – изменение порядка расположения генов на хромосоме, при этом может быть утрата одних функций и приобретение новых.

6. Летальные мутации – мутации, захватывающие слишком большие участки генома, в результате чего организм погибает.

7. Внутригенные мутации:

- точечные – изменение последовательности нуклеотидов в пределах одного гена.

- транзиция или трансверсия – выпадение или вставка одного или нескольких оснований, например, транзиция – пурин замещается на пурин или пиримидин на пиримидин, трансверсия – пурин замещается на пиримидин.

Точечные мутации приводят к замене одной аминокислоты в белке на другую или к изменению конформации белковой молекулы, что может привести к потере активности фермента. В случае, если белок является регулятором или репрессором, то это может привести к повышению выработки целевого продукта продуцентом.

В этой связи, совершенствование биологического объекта представляет собой получение биообъектов – продуцентов (в том числе и продуцентов белковых препаратов) с мутациями в геноме, которые отличаются от исходного биологического объекта в сторону улучшения биотехнологических свойств, в частности, в сторону увеличения образования целевого продукта.

Цели, которые необходимо достигать биотехнологу при совершенствовании продуцентов БАВ (в том числе и продуцентов белковых препаратов):

1. Увеличение продуктивности в достижении большого выхода БАВ на единицу биомассы.

2. Придание производственному штамму продуценту способности использовать менее дефицитные, более доступные и экономичные питательные среды.

3. Продуцент не должен ретроингибировать биосинтез конечного продукта.

4. Повышение устойчивости продуцента к вирусным инфекциям (бактериофагам).

5. Нетребовательность к оборудованию, т.е. биосинтез не должен снижаться при несовременном реализуемой технологии получения БАВ оборудовании (например, достижение меньшей вспениваемости культуральной жидкости).

6. Оптимизация свойств продуцента БАВ в аспекте биотехнологического производства (продуцент не должен иметь неприятного запаха и т.д.).

Таким образом, главный тезис биотехнолога: увеличение выхода целевого продукта на единицу биомассы продуцента.

Биотехнология рекомбинантных белков охватывает производство многих ценных БАВ: гормонов (инсулина), вакцин, пептидных факторов роста тканей и рекомбинантных интерферонов.

На первом месте среди них по значению находится рекомбинантный инсулин, составляющий около 30% от всего рынка рекомбинантной продукции.

В проблеме производства рекомбинантных белков очень важно, чтобы используемые микроорганизмы, в которые вносят чужеродные гены, удовлетворяли бы следующим свойствам:

1. Метаболизм микроорганизма должен быть хорошо изучен, поэтому в качестве продуцентов рекомбинантных белков используют следующие виды микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Микроорганизмы должны быть не патогенными.

3. Микроорганизмы должны хорошо и интенсивно размножаться в условиях ферментера.

4. Желательно, чтобы микроорганизм был способен выделять секретиремый им чужеродный белок в культуральную среду. Данного свойства можно достичь, если ввести в клетку реципиента ген, который синтезирует рекомбинантный белок с дополнительной аминокислотной последовательностью, состоящий из гидрофобных аминокислот. При этом роль гидрофобных аминокислот состоит в том, что они «переносят» белок в липидную мембрану, в которой с помощью определенных ферментов (сигнальных протеаз), гидрофобная последовательность отщепляется и образуется нужный целевой продукт – рекомбинантный белок, экскретирующийся в культуральную среду.

5. Должна быть возможность сделать клетки микроорганизмов компетентными для того, чтобы их клеточная стенка была бы проницаема для плазмид.

#### Правила безопасности при работе с рекомбинантными продуцентами:

1. Системы выброса оснащаются фильтрами, задерживающими микробные клетки.

2. После завершения процесса производится стерилизация оборудования, при этом не должно быть разъедания (коррозии) материалов, из которых изготовлено оборудование.

3. В ферментере понижается давление на несколько миллиметров ртутного столба.

4. В клетку продуцента встраивают генетический дефект, заключающийся в том, что стираются несколько генов путем делеции, т.е. избирательно удаляют гены, продуцирующие какую либо аминокислоту или фермент, катализирующий биосинтез белка. При этом микроорганизм становится более чувствительным и уязвимым в случае изменения среды и соответственно не жизнеспособным. В среде должна обязательно присутствовать для обес-

печения нормального функционирования микроорганизма именно данная аминокислота или витамин, в противном случае микроорганизм размножаться не будет, и, следовательно, не будет получен целевой продукт.

### **Создание продуцентов белковых препаратов методами клеточной и генетической инженерии**

#### **Создание продуцентов белковых препаратов методами генетической инженерии**

При оптимизации любого биотехнологического процесса, протекающего с участием живых организмов, основные усилия обычно направлены на улучшение их генетических свойств. Традиционно для этих целей применяются методы селекции, в том числе мутагенез с последующим скринингом и отбором наиболее подходящих вариантов.

В настоящее время в данной области произошли громадные изменения: разрабатываются и применяются принципиально новые методы, основанные на технологии рекомбинантных ДНК (рДНК).

Генетическая инженерия – это область современной биотехнологии, использующая методы целенаправленного изменения наследственности путем манипуляций на генном уровне и позволяющая конструировать функционально активные генетические структуры *in vitro* в форме рекомбинантных ДНК (рДНК);

В основе методов генетической инженерии лежит возможность целенаправленного манипулирования с фрагментами нуклеиновых кислот. В этой связи, изменение наследственных свойств организма с помощью методов генетической инженерии сводится к конструированию из различных фрагментов нового генетического материала, его введение в реципиентный организм, создание условий для его функционирования и стабильного наследования.

Генетическая инженерия способствует путем операций в пробирке переносу генетическую информацию из одного организма в другой, что позволяет преодолевать межвидовые барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим.

Одним из наиболее распространенных методов генетической инженерии является метод рДНК.

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

Этапы получения рекомбинантных белков:

1. Рестриктазное расщепление из организма-донора нужных генов нативной ДНК.
2. Быстрая расшифровка всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющая определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую геном.



3. Обработка рестрикционными эндонуклеазами вектора для клонирования, который может реплицироваться в клетке хозяина.

4. Сшивание ДНК-лигазой двух фрагментов ДНК с образованием новой рекомбинантной молекулы (конструкции «клонировующий вектор – встроенная ДНК»).

5. Введение полученной конструкции в клетку хозяина (реципиента), в которой она реплицируется и передается по наследству следующим поколениям. После трансформации бактериальная клетка воспроизводит фрагмент клонируемой ДНК миллионами идентичных клеток.

6. Идентификация и отбор клеток, несущих рДНК (трансформированные клетки).

7. Получение специфического белкового продукта, синтезированного клетками-хозяевами.

Получение чужеродной ДНК. Чужеродную ДНК можно получить с помощью химического или ферментативного синтеза, из любого организма или вирусов, с последующим определением ее первичной структуры. В случае, если ДНК выделяют из клеток эукариот, то для клонирования, амплификации и экспрессии интроны (последовательности внутри структурного гена, не участвующие в кодировании белкового продукта гена; после транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам удаляются из мРНК (матричная РНК, служащая матрицей при синтезе белков на рибосомах) в процессе сплайсинга) не нужны. В таких случаях используют мРНК, образующуюся в процессе сплайсинга (ферментативное удаление интронов и соединение экзонов при синтезе мРНК; экзоны – участки структурного гена, кодирующие аминокислотную последовательность белкового продукта; они разделены интронами и объединяются в мРНК в непрерывную последовательность при сплайсинге).

Выделение генов из ДНК с помощью рестриктаз. Расщепление может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, при этом обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют двухнитевые (тупые) концы. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со смещением (сдвигом), так, что образуется «ступенька», т.е. одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов, образуя одонитиевые (липкие) концы. При необходимости тупые концы могут быть превращены в липкие, для чего к ним присоединяют двухцепочечные последовательности (линкеры) с участками узнавания рестриктазы, способствующей образованию липких концов.

Данный метод выделения генов из ДНК с помощью рестриктаз имеет существенные недостатки: трудно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, который соответствует нужному гену. Наряду с интересующим геном, фрагменты ДНК, как правило, включают лишние нуклеотидные последовательности, создающие трудности для использования гена. Рестриктаза может отщепить часть нуклеотидной

последовательности гена, в результате чего он теряет функциональную полноценность.

Химико-ферментативный синтез генов является важной альтернативой «вырезанию» генов из нативной ДНК с помощью рестриктаз. Данный метод включает химический синтез коротких (8–16-тизвенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов и избежать проблем, связанных с элиминированием лишних нуклеотидных последовательностей в фрагментах ДНК, в том числе интронов. Кроме того, появляется возможность введения в гены участков узнавания различных рестриктаз, регуляторных последовательностей и т.п. Для данного метода необходима полная информация о нуклеотидной последовательности синтезируемого гена, поэтому его применимость ограничена возможностями получения такой информации. Последовательность нуклеотидов в гене может быть воссоздана на основе первичной структуры соответствующего белка. Триумфом в анализе структуры гена является параллельное воссоздание нуклеотидной последовательности ДНК и цепочки аминокислотных остатков в кодируемом белке.

С помощью химико-ферментативного метода получены гены соматостатина, А- и В-цепей инсулина, проинсулина.

Ферментативный синтез генов на основе мРНК, выделенной из клетки, является наиболее популярным и эффективным методом. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК, называемую комплементарной ДНК (кДНК), используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы.

Преимущество данного метода состоит в том, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Кроме того, в данном случае легче создать условия, при которых клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК.

На данном методе основано получение в 1979 г. гормона роста человека (соматотропина).

Фрагменты ДНК, полученные тем или иным способом, разделяют с помощью электрофореза на геле (агарозном, полиакриламидном и т.п.), из которого их экстрагируют, вырезая соответствующие участки геля. Эти участки, например, агарозного геля, расплавляют в пробирках при температуре 68 °С, а ДНК экстрагируют фенолом, концентрируют изобутанолом, переосаждают этанолом и проводят анализ выделенных и очищенных фрагментов.

Включение фрагмента чужеродной ДНК в вектор. Следующим этапом является включение фрагмента чужеродной ДНК в вектор (молекулу ДНК,

обеспечивающую амплификацию фрагмента в растущей популяции соответствующего вида).

Для клонирования ДНК, например, в клетках *E. coli*, можно использовать векторы двух классов – плазмиды и фаги. Преимущество плазмид перед фагами заключается в отсутствии лизиса клетки, возможного при работе с умеренными фагами.

В 1978 г. Дж. Коллинс и Б. Хон впервые ввели в практику космидный вектор (*cos*-вектор), т.е. комбинированную векторную систему «плазида – ДНК фага  $\lambda$ », которой присущи свойства и фагов, и плазмид, обладающую большей емкостью (до 40 кб), в сравнении с ДНК фага  $\lambda$ . В таких комбинированных векторных системах *cos*-фрагмент генома фага  $\lambda$  участвует в упаковке ДНК в фаговую частицу на конечной стадии развития. Для упаковки ДНК необходимо, чтобы она содержала *cos*-участок и ее размер был примерно равным размеру генома фага  $\lambda$ .

Схему конструирования рДНК в опытах *in vitro* можно представить следующим образом: кольцевая молекула вектора размыкается рестриктазой. При этом необходимо, чтобы полученная линейная молекула ДНК содержала липкие концы, комплементарные концам вводимой ДНК. Комплементарные липкие концы вектора и вводимого гена сшиваются, полученную рДНК, с помощью той же ДНК-лигазы вновь замыкают с образованием единой кольцевой молекулы.

Важной проблемой, возникающей при использовании вирусов в качестве генетических векторов, является аттенюация (ослабление патогенности для хозяина). Большое значение для биотехнологии имеет способность вирусов быстро транспортироваться из клетки в клетку, распространяясь по растительной или животной ткани так, что в короткие сроки развивается генерализованная инфекция по всему организму. Такое свойство вирусов открывает возможность генетической модификации соматических клеток взрослого организма.

Плазмиды представляют собой автономные самореплицирующиеся генетические единицы, обнаруженные у бактерий, грибов, растений и животных. Наиболее широкое применение в генетической инженерии нашли бактериальные плазмиды, особенно плазмиды *E. coli*, а также сконструированные на основе плазмиды *ColE1*.

Бактериальные плазмиды подразделяются на конъюгативные, способные к переносу генетической информации от клетки к клетке путем конъюгации бактерий, и неконъюгативные, передающиеся от одной клетки к другой путем бактериальной трансформации. При этом перенос неконъюгативных плазмид возможен только в том случае, если имеется плазида-помощник, способная к самостоятельному транспорту.

При конструировании векторов исследователь вводит в него участки узнавания рестриктаз, а также гены-маркеры, кодирующие легко распознаваемые признаки, по которым можно отобрать клетки, являющиеся носителем вектора.

Перенос генов в клетки организма-реципиента. Перенос рДНК осуществляется путем трансформации или конъюгации.

Трансформация – это процесс изменения генетических свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые она была обнаружена у пневмококков Ф. Гриффитом, показавшим, что некоторые клетки невирулентных штаммов бактерий при заражении ими мышей совместно с вирулентными штаммами приобретают патогенные свойства.

В дальнейшем трансформация была продемонстрирована и изучена у разных видов бактерий. Установлено, что к ней способны лишь некоторые, так называемые «компетентные» клетки (способные включать чужеродную ДНК и синтезирующие особый трансформирующий белок). Компетентность клетки определяется факторами внешней среды. Этому может способствовать обработка клеток полиэтиленгликолем или кальция хлоридом. После проникновения в клетку одна из нитей рДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком реципиентной ДНК может включиться в хромосому или внехромосомную единицу.

Трансформация является наиболее универсальным способом передачи генетической информации и имеет наибольшее значение для генетических технологий.

Конъюгация – это один из способов обмена генетическим материалом, при котором происходит однонаправленный перенос генетической информации от донора к реципиенту. Такой перенос находится под контролем особых конъюгативных плазмид (факторов фертильности).

При этом перенос информации от донорской клетки в реципиентную осуществляется через специальные половые ворсинки (пили). Кроме того, возможна передача информации и с помощью неконъюгативных плазмид при участии плазмид-помощниц.

Передача всего набора генов вируса или фага, приводящая к развитию в клетке фаговых частиц, называется трансфекцией.

Методика трансфекции, применительно к бактериальным клеткам, включает получение сферопластов, очистку инкубационной среды от нуклеаз и добавление очищенной фаговой ДНК. Следует отметить, что присутствие протаминсульфата повышает эффективность трансфекции. Кроме того, данная методика применима к животным и растительным клеткам с участием челночных вирусных векторов.

Для клонирования ДНК используют пермиссивные клетки, к которым предъявляются следующие основные требования:

- ✓ не разрушаются чужеродные ДНК или РНК собственными ферментами;
- ✓ срабатывает механизм репликации вектора;
- ✓ проявляется выраженная активность промотора (специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции полимеразой) и/или терминатора (терминация – окончание синтеза ДНК, происходящее благодаря выключению реакции с помощью специфического «стоп-сигнала» от специального терминатора в матричной цепи) транскрипции

рДНК (матричный синтез РНК или ДНК, осуществляемый РНК-полимеразами);

- ✓ отмечается полный сплайсинг мРНК;
- ✓ наблюдается активная трансляция мРНК (перевод закодированной в мРНК информации в полипептидную цепь);
- ✓ отсутствует выраженная активность пептидогидролаз, катализирующих реакции гидролиза экспрессируемых чужеродных белков.

Скрининг и отбор рекомбинантных клеток: после переноса сконструированных рДНК, как правило, лишь небольшая часть реципиентных клеток приобретает необходимый ген, поэтому важным этапом является идентификация клеток, несущих ген-мишень.

На первой стадии идентифицируют и отбирают клетки, несущие вектор, на основе которого осуществлен перенос ДНК. Отбор проводят по генетическим маркерам, которыми помечен вектор. Маркерами, как правило, являются гены устойчивости к антибиотикам. В этой связи, отбор проводят высевом клеток на питательные среды, содержащие конкретный антибиотик. После высева на этих средах вырастают только клетки, в составе которых находится вектор с генами устойчивости к антибиотикам.

На второй стадии отбирают клетки, несущие вектор в ген-мишень. С этой целью используют две группы методов:

- 1) основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов;
- 2) основанные на идентификации признака, кодируемого геном-мишенью.

При использовании первой группы методов из клеток, предположительно содержащих нужный ген, выделяют векторную ДНК, и в ней проводится поиск участков, несущих данный ген. Затем проводят секвенирование части нуклеотидной последовательности гена.

Возможен и другой метод – гибридизация ДНК, выделенной из клеток, с зондом (искомый ген или соответствующая ему мРНК). При этом выделенную ДНК переводят в одноцепочечное состояние и вводят во взаимодействие с зондом. Затем определяют наличие двуцепочечных гибридных молекул ДНК.

При этом во втором варианте возможен непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок, являющийся продуктом транскрипции и трансляции гена-мишени.

Кроме того, применяются селективные среды, поддерживающие рост клеток, приобретших ген-мишень.

С помощью методов генетической инженерии возможно конструирование новых форм микроорганизмов по заданному плану, способных синтезировать разнообразные продукты, в том числе и эукариотических организмов.

Рекомбинантные микробные клетки быстро размножаются в контролируемых условиях и способны утилизировать разнообразные, в том числе и недорогие субстраты.

## **Создание продуцентов белковых препаратов методами клеточной**

В настоящее время с помощью методов клеточной инженерии осуществляют слияние клеток разных растений друг с другом, получая на их основе новые гибридные растения. Данные методы значительно расширили границы спектра скрещиваемых растений, куда вошли и нескрещивающиеся в природных условиях виды. Однако техническая возможность соединения клеток отдаленных видов растений не всегда означает преодоление их биологической несовместимости, поэтому не все гибриды могут сохраняться.

Клеточная инженерия базируется на использовании культур клеток, тканей и протопластов.

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

По сравнению с традиционным растительным сырьем клеточные культуры обладают следующими основными преимуществами:

- ✓ независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода, почвенные условия, вредители и т.п.);
- ✓ высокий выход и качество продукта благодаря оптимизации и стандартизации условий выращивания;
- ✓ экономия посевных площадей;
- ✓ растения являются источником получения многих экономически важных БАВ, однако запасы растительного сырья в природе постепенно истощаются, а, следовательно, нетрудно оценить место клеточной технологии в будущем.

Основой клеточной инженерии служит слияние неполовых клеток с образованием единого целого. При этом слияние клеток может быть полным, или клетка-реципиент может приобрести отдельные части донорской клетки (митохондрии, цитоплазму, ядерный геном, хлоропласты и др.), т.е. ассиметричным.

### **Направления развития клеточной инженерии:**

Первое направление связано со способностью изолированных растительных клеток, продуцировать первичные и вторичные метаболиты (алкалоиды, стероиды, гликозиды, эфирные масла и др.) для медицины, парфюмерии, косметологии и других отраслей человеческой деятельности. Растительные клетки способны синтезировать значительно большее количество метаболитов в сравнении с микробными клетками.

Среди первичных метаболитов, получаемых на основе растительных культур, наибольшее значение имеют ферменты, т.к. они менее токсичны в сравнении с их микробными аналогами и, следовательно, не требуют высокой степени очистки.

В ряде случаев продукты вторичного обмена веществ растительных культур не имеют аналогов и не могут быть получены с помощью органического синтеза.

Второе направление связано с использованием культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала от вирусов и других патогенов. Данный метод называется клональным микроразмножением растений и позволяет получать от одной меристемы до сотни тысяч растений в год.

Третье направление связано с использованием изолированных клеток в селекции растений. Развитие данного направления позволяет получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам окружающей среды. Кроме того, это направление предусматривает создание новых сортов растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов с помощью методов генетической инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами.

Изначально метод культуры растительных тканей возник как экспериментальная биологическая модель, позволяющая изучать физиологические, биохимические и другие процессы на уровне автономных клеток, освобожденных от регулирующего влияния целого растения.

Под «культурой тканей растения» понимают способность растительных клеток размножаться на искусственных питательных средах. Их получают путем выращивания в длительной пересадочной культуре тканей растения в виде недифференцированных каллусной массы в асептических условиях.

В настоящее время термин «культура клеток растений» превратился в широкое удобное понятие, охватывающее все виды работы *in vitro* с культурами изолированных клеток, тканей, органов, зародышей и целых растений-регенератов.

В сравнении с клетками животных и человека растительные клетки обладают целым рядом преимуществ. Так, они способны в определенных условиях на соответствующих питательных средах регенерировать целое растение. При этом решающую роль во вторичном образовании органов из изолированных клеток и тканей играет соотношение фитогормонов и их концентрация в питательной среде.

Перевод клеток в культуру приводит к перестройкам генома и модификациям биосинтетической способности клеток. Так, в культуре клеток обнаруживают БАВ, не синтезирующиеся интактным растением. Несмотря на некоторое снижение биосинтетической способности, культуры клеток растений синтезируют большее количество метаболитов в сравнении с микробными клетками.

Культура тканей растения служит источником значительной генетической изменчивости, которую называют соматклональной. Благодаря данной

особенности культуру ткани стали интенсивно использовать в генетико-селекционных исследованиях для улучшения свойств растений.

Соматоклональная изменчивость составляет основу для получения клеточных линий и штаммов с высокой биосинтетической способностью. Для увеличения спектра изменчивости используют мутагенез и селекцию на клеточном уровне наиболее продуктивных клеточных линий.

Культуры растений выращивают в основном двумя способами: на твердых агаризованных средах (каллусная культура) и в жидких средах (суспензионная культура).

Важным фактором создания эффективной биотехнологической системы является правильный выбор питательной среды, обеспечивающей потребности культуры в химических компонентах, необходимых для обеспечения оптимального биосинтеза целевого продукта. При этом обязательными компонентами питательных сред являются: источники углерода, азота, фосфора, серы, минеральные соли, витамины и фитогормоны.

**Каллусные культуры.** В природе каллусообразование встречается как ответная реакция на повреждение растения, когда на месте раны образуется нарост, а в культуре ткани все растительные клетки превращаются в каллусные.

Каллусы растений легко образуются на эксплантах из разных органов растений. При помещении эксплантов на питательную среду паренхимальные клетки дедифференцируются, переходят к делению, образуя однородную недифференцированную биомассу – каллус. В асептических условиях каллус отделяют и помещают на поверхность агаризованной среды для дальнейшего роста. При этом получают каллусную культуру, которую можно поддерживать в состоянии роста неограниченно долго, периодически разделяя ее на трансплантаты, и пересаживая их на свежую среду.

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

Клетка в пробирке, оторванная от коллектива себе подобных, сохраняет «память», т.е. генетическую информацию, заложенную родителями, но утрачивает специализацию, поэтому при делении образует нечто аморфное, напоминающее по форме морскую губку (каллус). Клетка в «клетке» может резко изменить соотношение ферментных и структурных белков. В ней увеличивается число молекул РНК, синтезирующих в обилии белки, ранее не свойственные клетке.

В основном каллусная ткань бывает белого или желтоватого, редко светло-зеленого цвета, еще реже может иметь интенсивно зеленую окраску. При этом темно-коричневая окраска свидетельствует о старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов, окисляющихся в хиноны.

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



быть разной консистенции: *рыхлой*, состоящей из сильно оводненных клеток, легко распадающихся на отдельные мелкие агрегаты; *средней плотности*, с хорошо выраженными меристематическими очагами и *плотной* с дифференцированными элементами камбия.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и ее превращения в каллусную является присутствие фитогормонов: ауксинов, вызывающих процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, и цитокининов, вызывающих пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

В случае, если в питательную среду, не содержащую фитогормоны, поместить растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это обстоятельство связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению.

Каждая клетка в процессе своего развития проходит три фазы: деление, растяжение и дифференцировку. При этом характерной чертой заключительной фазы развития является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению.

Для того, чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому (неорганизованному) росту, приводящему к образованию каллусной культуры.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития, повторяющий развитие любой клетки: деление, растяжение и дедифференцировку, старение и отмирание клетки. Для того, чтобы не происходило старения, утраты способности к делению и отмиранию каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через каждые 4–6 недель переносят на свежую питательную среду. Данная операция получила название «пассирование». При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет.

Ростовая кривая каллусных клеток имеет s-образную форму. Такой же характер роста свойственен и суспензионным культурам. При этом кривая роста включает пять фаз:

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

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

3) Линейная фаза характеризуется постоянной скоростью роста клеток.

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

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

После стационарной фазы наступает отмирание (деградация) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшается.

Отличительные особенности каллусных клеток. Каллусные клетки в условиях *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические черты, свойственные нормальным клеткам целого растения. Так, каллусные клетки сохраняют способность к биосинтезу первичных и вторичных метаболитов.

Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным от морозостойких растений, т.е. устойчивость к низким температурам сохраняется при переходе клетки к каллусному росту.

Каллусным тканям свойственна фитопериодическая реакция, связанная с сохранением активности фитохрома.

К общим признакам каллусных и нормальных клеток относятся: устойчивость к воздействию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению и т.п.

Вместе с тем, каллусные клетки обладают свойствами, отличающими их от нормальных клеток. В них появляются специфические белки, уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток или они полностью исчезают.

Каллусные ткани отличаются значительной генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

В результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно и является неограниченным. Клеточный цикл у каллусных клеток более длительный, чем у растений, произрастающих в открытом грунте.

Значительные отличия наблюдаются и в энергетическом обмене каллусных клеток: они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными клетками.

Генетические особенности каллусных клеток. Длительное время считали, что каллусные клетки генетически однородны. Однако в 60-х гг. XX в. было установлено, что клетки каллусной ткани обладают значительной генетической гетерогенностью, выражающейся в различной ploидности. В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки, имеющие диплоидный набор хромосом, свойственный исходному растению, а также полиплоидные клетки. Наряду с полиплоидией, в каллусной культуре нередко можно наблюдать и анеуплоидию. Причем, чем дольше культивировать каллусные клетки, тем больше они различаются по ploидности. Изменение ploидности происходит под влиянием условий культивирования. Хотя возможна и иная интерпретация причин ее возникновения. Полиплоидные клетки имеют меньшее время лаг-фазы а, следовательно, быстрее переходят к делениям, чем диплоидные клетки, поэтому полиплоидные клетки получают преимущество в дальнейших пассажах. Вероятнее всего, что влияние на изменение ploидности оказывают обе причины.

Кроме изменения ploидности, культивирование клеток растений в условиях *in vitro* приводит к появлению хромосомных aberrаций, что сопряжено с изменением их внешнего вида, обмена веществ и скорости роста.

Наряду с хромосомными мутациями, в культивируемых клетках могут возникать изменения, не выявляемые микроскопически, т.е. генные мутации, которые выявляются по изменению морфологии и физиолого-биохимических свойств клеток.

К причинам генетической нестабильности культивируемых клеток относятся:

- ✓ генетическая неоднородность исходного материала (гетерогенность экспланта);

- ✓ длительное пассивирование клеточных культур, приводящее к накоплению в них генетических изменений, в том числе к неравномерному изменению ploидности;

- ✓ нарушение коррелятивных связей при изолировании участков ткани растений и последующем их помещении на питательную среду приводит к генетической нестабильности клеток;

- ✓ влияние на генетический аппарат клетки может быть связано с действием фитогормонов, входящих в состав сред (о мутагенном действии этих веществ известно из целого ряда научных работ; при этом наиболее активным мутагенным препаратом является 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, а цитокинины способствуют полиploидизации клеток).

Такое генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет их использовать в клеточной селекции. Генетическая гетерогенность клеточной популяции играет положительную роль, позволяя отбирать линии клеток с сильно измененными свойствами, в частности с повышенным биосинтезом искомого продукта или синтезирующие совершенно новые соединения.

**Культура клеточных суспензий.** Исходным материалом для суспензионных культур могут быть как изолированные целые клетки органа растения, так и измельченный каллус. Данный материал помещают в жидкую среду и культивируют при постоянном перемешивании.

Рост суспензионной культуры происходит быстрее, чем каллусной культуры, т.к. скопления клеток поглощают питательные вещества всей поверхностью, тогда как у каллуса это происходит лишь в той его части, которая прилегает к субстрату. При этом происходит деление клеток, новые клетки не отделяются и их скопление увеличивается.

С помощью особых приемов суспензионную культуру можно перенести на твердую среду, на которой из клеток или комплексов клеток может образовываться способный к жизни каллус. В суспензии могут возникнуть и зародыши, которые после их переноса на агаризованную среду образуют новое растение.

При получении суспензионной культуры непосредственно из ткани экспланта используют пектиназу. Исключение из питательной среды ионов

кальция облегчает суспендирование, с этой целью в среду вводят пектиназу, разрушающую пектат кальция, склеивающий отдельные клетки.

Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии в среде фитогормонов. В этой связи, суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками, с присущими им свойствами.

Суспензии лучше образуются из рыхлого каллуса.

Направления использования клеточных суспензий. Клеточные суспензии используют для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами, для промышленного выращивания клеточной биомассы, в клеточной селекции, для получения изолированных протопластов, а также новых необычных БАВ.

При использовании суспензионных культур в качестве продуцентов вторичных метаболитов применяют открытые или закрытые системы ферментеров периодического и непрерывного действия, работающих в хеостатном режиме.

В закрытой системе клеточная суспензия лишена притока свежей среды до окончания процесса выращивания.

В случае открытых систем, работающих в режиме непрерывного культивирования, среда непрерывно заменяется на свежую.

При периодическом и непрерывном режимах культивирования в открытых системах клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при ее замене. Однако в таких системах при замене среды на свежую, вместе со старой средой отбирается и часть суспензионной культуры.

Аэрацию культуральной биомассы осуществляют стерильным воздухом с помощью барботера. Воздух стерилизуют методом фильтрации.

Процесс культивирования осуществляют до тех пор, пока идет интенсивный биосинтез целевого продукта и в среде не будут исчерпаны питательные вещества. При определении окончания процесса ферментации необходимо учитывать данные микроскопического контроля состояния культуры, отсутствие посторонней микрофлоры, концентрацию питательных веществ, биомассы, целевого продукта и значение рН.

Культивирование растительных клеток сопряжено с высокими требованиями к обеспечению асептических условий.

К основным характеристикам суспензионных культур относятся:

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

2. Плотность клеточных суспензий: число клеток суспензии определяется микроскопическим методом с помощью счетной камеры Фукса-Розенталя после предварительной мацерации клеток. В качестве мацерирующего вещества применяют 10–20% хромовую кислоту, гидролизующую средние пластинки, соединяющие клетки.

3. Ростовая кривая: хорошо растущая суспензия имеет s-образный характер ростовой кривой. Длительность каждого пассажа составляет 14–16 суток. При этом основными критериями роста суспензионной культуры является увеличение числа клеток, а также их сухой и сырой массы.

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

**Культура протопластов.** Поскольку растительные клетки окружены жесткими целлюлозными оболочками, то для их слияния необходимо ее предварительно растворить, сохранив находящуюся под ней нежную белково-липидную плазматическую мембрану.

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

Техника слияния протопластов. В пробирке удастся слить воедино соматические клетки разных видов. С этой целью их приходится освобождать от оболочки механическим путем или с помощью специальных ферментов. В результате проведения данной процедуры образуется протопласт.

Протопласты двух видов сливают в один протопласт-гетерокариот, который через некоторое время обзаводится новой оболочкой. Способность протопластов к слиянию называется парасексуальной гибридизацией. Индуктором слияния служит полиэтиленгликоль, а полученные гибриды обрабатывают сильным щелочным раствором или диметилсульфоксидом.

Техника слияния растительных протопластов напоминает образование гибридов животными клетками, хотя имеет существенное отличие. Слияние животных клеток позволяет получить лишь новую клетку, а слияние растительных протопластов – основа для получения нового гибридного растения. Парасексуальная гибридизация при слиянии протопластов позволяет скрещивать филогенетически отдаленные виды растений, которые невозможно скрестить обычным способом, а также комбинировать родительские гены растений в разных вариантах.

Культуры протопластов получают из суспензии, приготовленной на основе мезофила, обрабатывая ее ферментами, разрушающими клеточные стенки. В результате возможно присоединение чужих органелл, а также чужой ДНК, которая встраивается в генетический материал ядра. Вследствие того, что поверхности протопластов имеют отрицательный заряд, необходимо нейтрализовать их отталкивание друг от друга, и после происходит их присоединение друг к другу. После слияния протопластов происходит регенерация клеточной стенки, которая образуется менее, чем за сутки. Затем клетки начинают делиться и регенерировать новые растения.

Слияние двух типов протопластов происходит при их смешивании в присутствии полиэтиленгликоля. Смесь переносят на стекло и через 15 мин.

отбирают продукты слияния, затем их культивируют на питательной среде, в результате происходит регенерация клеточной стенки и образуется гибридная клетка, а после и соматический гибрид.

Кроме того, таким путем удастся объединить животные клетки с растительными клетками (клетку табака с клеткой дрозофилы). Однако такие клетки, хотя и пытаются делиться, но впустую. К делению способны лишь слитые клетки видов в пределах одного рода, изредка разных родов и семейств. Возможно, что со временем будет преодолена и эта несовместимость, и селекционеры получат гибриды, которые им и во сне не снились.