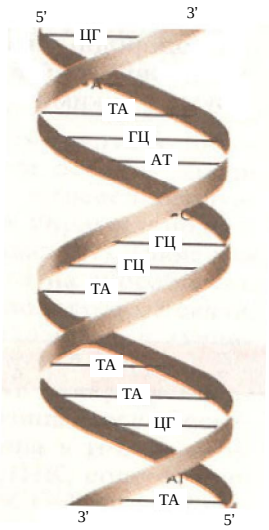
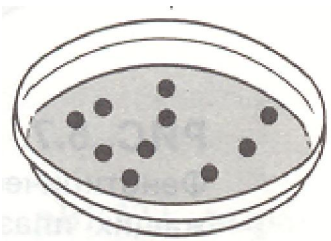
Г.Г. Гончаренко, А.В. Крук

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ





Гомель 2005

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования
"Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины"

Г.Г. Гончаренко, А.В. Крук

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Тексты лекций
для студентов специальности I – 31 01 01 –
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Гомель 2005

УДК 60 (075.8)
ББК 30. 16 Я 73
Г 657

Рецензенты: Л.И. Корочкин, член-корр. РАН, доктор медицинских наук
Б.А. Кузин, доктор биологических наук

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования "Гомельский государственный университет им. Ф.Скорины"

Гончаренко Г.Г.
Основы биотехнологии. Тексты лекций для студентов специ-
Г 657 альности I – 31 01 01 – «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / Г.Г. Гончаренко, А.В. Крук; Мин. обр. РБ, УО «ГГУ им. Ф. Скорины». – Гомель, 2005. - 178с.

Тексты лекций по курсу "Основы биотехнологии" адресованы студентам биологического факультета и направлены на более полное освоение ими современного материала.

УДК 60 (075.8)
ББК 30. 16 Я 73

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – стремительно развивающаяся и интегрирующая наука, пронизывающая все биологические науки и направления исследований.

Современная биотехнология – это междисциплинарная наука и отрасль производства, которая базируется на использовании биологических объектов и систем при получении пищевых продуктов, энергии, медицинских препаратов; при очистке сточных вод, переработке отходов и др. Междисциплинарная природа биотехнологии выражается в ее связи с такими науками, как генетика, микробиология, биохимическая и химическая технология и механика систем и аппаратов катализа.

На развитие биотехнологии существенное влияние оказывают открытия в области генетической инженерии, иммунологии, технологии ферментации, биоэлектрохимии. Первое место в современной биотехнологии принадлежит генетической инженерии. Она предоставила исследователям новую, исключительно ценную возможность – изменять генетическую программу бактериальных, растительных и животных клеток, и тем самым как бы завершила формирование биотехнологии. Особенность развития многих перспективных направлений биотехнологии в значительной степени определяется необходимостью тесного международного сотрудничества.

Использование биотехнологических принципов и биологических процессов в производстве может существенно изменить многие направления развития промышленности и сельского хозяйства. Интерес к этой науке и отрасли человеческой деятельности в последние годы растет очень быстро.

Курс "Основы в биотехнологии" имеет целью ознакомить студентов с биологическими объектами и их применением в народном хозяйстве, здравоохранении и науке, возможностями генетической и клеточной инженерии (получение высокоэффективных штаммов микроорганизмов, новых сортов растений и пород животных), устройством и принципами действия биореакторов, с основами технологической биоэнергетики.

Знания и навыки, приобретаемые студентами, могут использоваться для решения задач сельского хозяйства, медицины и различных отраслей народного хозяйства.

Тексты лекций по курсу "Основы биотехнологии" адресованы студентам биологического факультета.

Лекция 1

ПРЕДМЕТ БИОТЕХНОЛОГИИ, ЗАДАЧИ, МЕТОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

1 Предмет биотехнологии.
2 Развитие биотехнологии в СНГ.
3 Перспективы развития биотехнологии.
4 Использование биотехнологических процессов в различных отраслях народного хозяйства.

1.Предмет биотехнологии

Биотехнология – наука о способах создания продуцентов биологически активных веществ на основе живых организмов и использовании биологических объектов и биологических процессов в технике и промышленном производстве.

Даже сегодня химикам не удается создать катализаторы, превосходящие по своей эффективности и специфичности биологические катализаторы (ферменты).

Следует отметить, что человек использовал биотехнологию многие тысячи лет: пивоварение, выпечка хлеба, хранение и переработка продуктов путем ферментации (сыр, уксус, соус, мыло, простейшие лекарства, переработка отходов).

Разработка методов генной инженерии, основанных на создании рекомбинантных ДНК, привела к "биотехнологическому буму" и значительно ускорила развитие основных отраслей биотехнологии.

В 50-60-х годах XX века стали интенсивно развиваться многие направления биотехнологической промышленности: сельское хозяйство, производство химических веществ, энергетика, контроль за состоянием окружающей среды, пищевая промышленность, материаловедение, медицина.

Использование достижений науки в биотехнологии связано с фундаментальными исследованиями, которые осуществляются на самом высоком современном уровне. Можно перечислить важнейшие отрасли науки, которые внесли и вносят большой вклад в осуществление того или иного биотехнологического процесса: микробиология, генетика, биохимия, химическая технология, технология пищевой промышленности, электроника и др. Развитие отдельных перспективных разделов биотехнологии осуществляется при тесном международном сотрудничестве специалистов, ученых и технологов. Например: в области генной инженерии лишь немногие научные коллективы в мире обладают достаточным опытом работы, но их разработки

быстро становятся достоянием мировой научной общественности.

Возникновение современной биотехнологии было бы невозможно и без успехов в разработке инструментальных методов исследований, основанных на использовании современнейших приборов как отечественного, так и зарубежного производства.

В любом биотехнологическом процессе необходимо обязательное участие и взаимодействие между собой микроорганизмов (бактерии, грибы, дрожжи и т.д.) с субстратом (питательная среда или вещество, разлагаемое тем или иным микроорганизмом).

Современная промышленная биотехнология включает четыре основных стадии: 1 - выбор штамма микроорганизма, обладающего повышенной продуктивностью; 2 - подбор питательной среды, обеспечивающей оптимальный биосинтез целевого продукта; 3 - культивирование клеток-продуцентов (создание оптимальных условий с помощью автоматизированного управления процессом): 4 - выделение целевого продукта, его обработка, очистка, получение товарной формы этого продукта.

Сам термин "биотехнология" не сразу стал общепринятым. Слово "био"- в переводе с греческого "жизнь". "Технология"- способ, метод индустриального производства. Для использования наиболее тесно связанных с биологией разнообразных технологий применяли такие термины, как прикладная микробиология, прикладная биохимия, технология ферментов, биоинженерия, прикладная генетика и т.д.

Наши предки не имели научных представлений о процессах, лежащих в основе различных технологий, однако на протяжении тысячелетий успешно использовали метод микробиологической ферментации для сохранения пищи: получение сыра, уксуса, улучшение вкуса, выпечка хлеба и приготовление соевого соуса, производство спиртных напитков. Наиболее древняя и в настоящее время важная в денежном исчислении отрасль пищевой промышленности - пивоварение. Первый рецепт пива был обнаружен 6000 лет до нашей эры в древнем Вавилоне. А 3000 лет до н.э. было известно около 20 сортов пива. В настоящее время во всем мире ежегодно производится около 10^{11}-10^{12} литров пива различных сортов и наименований.

Благодаря трудам Л. Пастера в конце Х1Х века были созданы реальные предпосылки для дальнейшего развития прикладной микробиологии. Пастер установил, что микробы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют различные их виды. Его исследования послужили основой развития в начале ХХ века бродильного производства органических растворителей (ацетона, этанола, бутанола и изопропанола).

Во всех этих процессах микробы в бескислородной среде осуществляют превращение углеводов растений в ценные продукты. В качестве источника энергии для роста микробы в этих условиях используют изменения энтропии при превращении веществ.

Значительным этапом в развитии биотехнологии была организация промышленного производства антибиотиков. Основанием для этого послужило открытие в 1940 г. Флеммингом, Флори и Чейном химио-терапевтической активности пенициллина. Как известно, данный антибиотик и его производство занимают одно из ведущих мест в медицинской биотехнологии до настоящего времени.

Использование микроорганизмов при переработке отходов не требует создания стерильных условий, напротив, чем больше разных микроорганизмов участвует в данном процессе, тем лучше. Процесс минерализации органических отходов, основанный на использовании микроорганизмов активного ила, был разработан в 1914 году. С тех пор он существенно модернизирован, стал более сложным и производительным и используется во всем мире для переработки стоков. Переработка стоков в анаэробных условиях смешанной микрофлорой вызывает попутное образование биогаза (метан и CO_2), который используется как дешевая энергия. Одно из первых мест по производству биогаза занимает Китай (около 20 миллионов генераторов биогаза). В последние годы применяются небольшие установки, предназначенные для переработки отходов сельского хозяйства.

Наиболее интенсивно биотехнологическая промышленность стала развиваться после второй мировой войны. Толчком к ее развитию послужили следующие открытия:

Уотсон и Крик в 1953 году установили пространственную структуру ДНК.

Благодаря работам Сэнгера по структуре белков (структура инсулина), а также Эдмана и Бэгга (1967 г.) по деградации белков, появились приборы автоматического определения структуры белков (последовательности аминокислот, 1978 г.).

В 1980 году в Калифорнийском университете был сконструирован сиквенатор белков, который мог определять последовательность более 200 аминокислот в день.

По установленной структуре ДНК начали вести синтез биополимеров. В 1977 г. в медицинском национальном центре "Хоуп " (Калифорния) синтезирован ген соматостатина (Итакура); в 1979 г. – ген инсулина человека; в 1980 г. – Итакура создал синтезатор генов.

2. Развитие биотехнологии в СНГ

В 1986 году создано Министерство медицинской и микробиоло-

гической промышленности. СССР была единственной страной в мире, где налажено промышленное производство белка одноклеточных организмов (БОО), представлявшего собой сухую биомассу дрожжей Saecharomyces cerevisiae. Объем производства этого белка в год составлял 1 миллион тонн, причем 40% на основе использования в качестве субстрата гидролизатов древесины и 60% – нормальных парафинов нефти.

Появились новые направления, развивающиеся на основе биотехнологии, и продукты, получаемые с ее помощью.

За последние 30–40 лет получило широкое распространение производство аминокислот в аэробных микробиологических процессах. В наибольшем количестве вырабатывались такие аминокислоты, как глутамат натрия (ежегодное производство в мире составляло более 150 тысяч тонн), используемый как усилитель вкуса. Второй аминокислотой был лизин, который использовался как пищевая добавка. В 1985 году в СССР производилось примерно 20 тысяч тонн лизина. Использование 1 тонны лизина в составе комбикорма экономит 40 – 50 тонн фуражного зерна.

В СССР успешно развивалась биотехнология антибиотиков, и в 1988 году СССР занимала 2-е место в мире по их производству после США.

В настоящее время во многих странах мира, в том числе и странах СНГ, создана и быстро развивается микробиологическая промышленность. Продуктами этой промышленности являются антибиотики, аминокислоты и нуклеозиды, ферменты, биологические средства для борьбы с насекомыми (инсектициды), кормовой белок, витамины, этиловый и бутиловый спирты, ацетон, полисахариды, бактерии-азотфиксаторы, бактерии-биодеграданты вредных веществ и т. д. Большое распространение микробиологические процессы нашли при добыче металлов из бедных руд, для увеличения выхода нефти из пластов.

Разработка методов генной инженерии позволила наладить микробиологическое производство ценных белков человека и сельскохозяйственных животных (интерферон, гормон роста и т.д.). В СССР первые работы с рекомбинантными ДНК были начаты в 70-х годах прошлого столетия. Центром отечественной генной инженерии являлась Москва (институт молекулярной биологии, институт биоорганической химии, институт вирусологии). Под руководством академика Баева А.А. были созданы бактериальные штаммы продуценты интерферона, инсулина, гормона роста человека; проведены клинические испытания препаратов.

Большие исследования в области генной инженерии в первой половине 80-х годов были проведены в Новосибирске, Владимире и других регионах.

Как уже отмечалось, микробная клетка – это "совершенный биоагрегат". Однако для большинства промышленных задач генетическая программа клетки должна быть перестроена таким образом, чтобы направить биосинтетический потенциал клетки на производство необходимого продукта, а не на непрерывное самовоспроизводство. Даже в тех случаях, когда ставится цель простого получения биомассы (кормовой белок), могут потребоваться изменения свойств, улучшающие технологические параметры процесса, повышающие конверсию субстрата в продукт и так далее.

Вопросами совершенствования промышленных микроорганизмов традиционно занимаются микробиологи – селекционеры. Слово "селекция" (от лат. selectio) означает отбор.

Действительно, на протяжении длительного времени и в наши дни для малоизученных с точки зрения генетики микроорганизмов единственным способом их улучшения является индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор лучших вариантов (штаммов). Метод трудоемок, так как отбор, как правило, проводится без детального знания путей биосинтеза. Селекционные работы такого рода могут занимать длительное время (годы). Тем не менее, практика показывает, что многолетняя селекция штаммов – продуцентов пенициллина позволила поднять активность от 100 до 40 000 ед/мл и более.

Задача создания высокопродуктивных штаммов намного упрощается, если селекционер имеет достаточно знаний о путях биосинтеза того или иного метаболита и имеются способы генетического обмена у исследуемого микроорганизма, позволяющие собрать в одном штамме все полезные мутации и элиминировать все вредные.

Познание молекулярных механизмов репликации ДНК, транскрипции и трансляции, регуляции активности и экспрессии генов, дало возможность на современном этапе развития биотехнологии сознательно конструировать штаммы микроорганизмов с заданными свойствами. Применение названных подходов в сочетании с применением классической селекции и составляет суть современной селекции микроорганизмов, участвующих в том или ином биотехнологическом процессе.

3. Перспективы развития биотехнологии

Благодаря расширению сферы своего применения биотехнология делает весомый вклад в повышение уровня жизни человека.

Сфера применения методов биотехнологии широка и разнообраз-

на:

1. процессы биосинтеза и биодеградации;
2. углеродсодержащее сырье для химической промышленности;
3. химическая переработка (очистка продукта);
4. химические продукты, использующиеся в быту: клеи, красители, волокна, вкусовые добавки, загустители, душистые вещества, пигменты, пластики, смазки и т.д.;
5. источники энергии;
6. контроль за состоянием окружающей среды (воздух, вода, почва);
7. пища и напитки (сельскохозяйственное производство и переработка);
8. здравоохранение (диагностика, лечение), борьба с болезнями растений и животных;
9. добыча минерального сырья на суше и на море.

По анализу специалистов быстрее всего применение биотехнологии дает хорошие результаты в медицине, химической промышленности и сельском хозяйстве. В дальнейшем мы подробнее остановимся на отдельных биотехнологических процессах в выше перечисленных отраслях народного хозяйства.

4. Использование биотехнологических процессов в различных отраслях народного хозяйства

Пищевые продукты и напитки

Традиционные способы использования микроорганизмов при производстве различных сортов пива, вина и сброженных продуктов совершенствовались тысячелетиями, и все же до недавнего времени в них было больше искусства, чем технологии. Только с развитием микробиологии стало возможным контролировать качество продуктов, процессы ферментации стали более надежными и воспроизводимыми, появились новые типы продукции (например, БОО и вкусовые добавки).

Наиболее успешными представляются два взаимосвязанных направления развития этой отрасли биотехнологии:

Во- первых, на смену традиционным способам производства пищи постепенно придут биореакторы, в которых будут расти клетки животных и растений или же микроорганизмы. Дело в том, что выход продукции при использовании ферментов или биореакторов может быть существенно выше, чем в сельском хозяйстве: идущие в них процессы гораздо более интенсивны. Развитию этого направления способствует и все возрастающая конкуренция за имеющиеся земельные ресурсы.

Во-вторых, эта альтернативная технология будет становиться все

более производительной благодаря использованию методов генетической инженерии, которые позволяют получить улучшенные линии клеток и штаммы микроорганизмов.

Медицина

Благодаря применению технологии рекомбинантных ДНК были достигнуты крупные успехи в медицине. Разработаны эффективные методы промышленного производства интерферона человека (гены человека клонированы в микроорганизмах). Помимо гена интерферона были клонированы гены инсулина и гормона роста человека. В целях крупномасштабного производства были клонированы гены многих других белков человека и животных, необратимые для диагностики и лечения.

Большое значение имеет и разработка методов производства моноклональных антител. Моноклональные антитела используются в наборах для проведения радиоиммунологического анализа (РИА), диагностики, иммунодиагностики и терапии.

Многообразны связи биотехнологии с медициной в производстве антибиотиков. Антибиотики – это специфические продукты жизнедеятельности определенных групп микроорганизмов, обладающие высокой физиологической активностью и подавляющие развитие патогенных микроорганизмов. Они избирательно задерживают их рост или полностью подавляют развитие. Важнейшими из них являются пенициллин (продуценты гриба рода Penicillium); стрептомицин (продуценты актиномицеты рода Streptomyces); тетрациклин (продуценты актиномицеты рода Streptomyces) и др.

Постоянно осуществляется поиск новых антибиотиков, что в значительной степени связано с тем, что они могут вызывать аллергические реакции, и выработкой у патогенных микроорганизмов устойчивости к применяемым препаратам.

Биотехнология открывает медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Особенно большие достижения произошли в направлении синтеза пептидных гормонов. Раньше гормоны получали из тканей и органов животных и человека (кровь доноров, органы и ткани). Требовалось много материала для получения небольшого количества гормонального продукта. Так, человеческий гормон роста (соматотропин) получали из гипофиза человека, а каждый гипофиз содержит не более 4 мл гормона.

В тоже время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется 7 мл гормона в неделю, а курс лечения может быть до нескольких лет.

С помощью генной инженерии, используя штамм Escherichia coli

в настоящее время получают до 100 мл гормона роста на 1 л среды культивирования. Кроме того, гормон саматотропин способствует заживлению ран и ожогов, а наряду с кальцитонином (гормон щитовидной железы) регулирует обмен Ca^{2+} в костной ткани.

Для лечения сахарного диабета применяется инсулин – пептидный гормон островков Лангерганса поджелудочной железы. Это заболевание вызвано дефицитом инсулина и проявляется повышением уровня глюкозы в крови. Ранее инсулин получали из поджелудочных желез домашних животных (крупный рогатый скот, свиньи). Однако препарат отличается от человеческого инсулина 1 – 3 аминокислотными заменами и мог вызывать у человека аллергические реакции.

С помощью генной инженерии стало возможным получать инсулин для человека с невысокой себестоимостью и высокой эффективностью терапевтического действия.

На повестке дня вопрос о промышленном синтезе гормонов нервной системы энкефалинов. Эти гормоны снимают болевые ощущения, создают хорошее настроение, повышают работоспособность, улучшают память, концентрируют внимание, регулируют режим сна.

Значительный вклад биотехнология вносит в промышленное производство пептидных гормонов и стероидов. Методы микробиологической трансформации позволили резко сократить число этапов химического синтеза кортизона – гормона надпочечников, применяемого для лечения ревматоидного артрита. Имеются разработки по получению гормона щитовидной железы тироксина из микроводорослей.

Важное значение имеют технологические процессы по производству интерферонов. Интерфероны обладают антивирусной активностью. В настоящее время интерферон успешно получают с применением генноинженерных штаммов микроорганизмов, культивируемых клеток насекомых и млекопитающих. Интерфероны используются для лечения болезней, вызываемых вирусами герпеса, бешенства, гепатита, а также профилактики вирусных инфекций, особенно респираторных.

Большой интерес вызывает биотехнологическое производство инерлейкинов. Это сравнительно короткие (около 150 аминокислотных остатков) полипептиды, участвующие в организации иммунного ответа.

Важное значение в медицине играет вакцинация против гриппа, гепатитов, кори, острых респираторных болезней. Важным является вопрос изготовления вакцин. Вакцинация – один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем поголовной

вакцинации ликвидировано натуральная оспа, резко ограничена распространение бешенства, сибирской язвы, полиомиелита, желтой лихорадки и др.

Современные биотехнологические процессы предусматривают выпуск рекомбинантных вакцин и вакцин антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генноинженерном подходе.

Для получения рекомбинантных вакцин обычно используют хорошо известный геном вируса коровьей оспы (осповакцины). В его ДНК встраивают чужеродные гены, кодирующие иммунногенные белки различных возбудителей (гриппа, гепатита, молярийного плазмодия и др.). Для получения рекомбинантных ДНК используют специальные векторы на основе плазмид с хорошо изученной последовательностью и рестрикционной картой. Появилась возможность создания поливалентных вакцинных препаратов на основе объединения участков ДНК различных патогенов под эгидой ДНК вируса осповакцины.

Современная биотехнология применяется в получении ферментов медицинского назначения. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний. Яркий пример спасения жизни больных с тромбозом конечностей, легких, сосудов сердца при помощи тромболитических ферментов (стрептокиназы и урокиназы).

Энергетика

В связи с тем, что запасы ископаемого топлива ограничены, а его потребление растет из года в год, возможен энергетический кризис во многих странах мира. Поэтому обсуждаются перспективы использования ядерной энергии.

Около 99,4 % в год доступной нам неядерной энергии мы получаем от Солнца, и часть ее аккумулируется в биомассе, хотя и с малой эффективностью, порядка 1-2 %.

По этой причине биомасса представляет собой постоянно возобновляемый источник энергии. Ее можно сжигать или довольно простыми способами превращать при помощи микроорганизмов в жидкое или газообразное топливо (метан, этиловый спирт, водород). Со временем биомасса будет все больше использоваться при производстве сырья для химической промышленности. В последнее время пробудился интерес к разработке биотопливных элементов, с помощью которых можно с высокой эффективностью получать из ряда видов топлива и биомассы электрическую энергию. Поскольку солнечный свет является мощным источником энергии, а количество имеющейся биомассы ограничено, некоторые биотехнологи, работающие над проблемами энергии, заняты разработкой двух проблем, решение которых позволило бы повысить эффективность использования солнеч-

ной энергии.

Во- первых, пытаются найти фактические способы повышения эффективности конверсии солнечного света в биомассу, например, путем выращивания водорослей при высокой концентрации CO_2 и ограниченной освещенности в биореакторах со строго контролируемыми условиями роста.

Во-вторых – изучается возможность получения водорода путем расщепления воды при участии фотосистемы фотосинтезирующих организмов, то есть путем биофотолиза. Технически проще всего получать водород, используя сине-зеленные водоросли или процессы ферментации (брожения).

Биотехнология стала играть все возрастающую роль при добыче нефти. Предполагается, например, вводить подходящие микроорганизмы непосредственно в нефтяной пласт, чтобы ускорить отток нефти из пористых пород и для добычи остаточной нефти.

Окружающая среда

По мере того, как увеличивается население Земли и развивается промышленность, все более серьезной становится проблема охраны окружающей среды. В решении такого рода задач биотехнология играет все возрастающую роль, в частности, в том, что касается разработки новых или усовершенствования существующих способов переработки отходов.

Новейшие процессы переработки необычных отходов основываются на использовании микроорганизмов, обладающих новыми, неизвестными ранее или искусственно созданными катаболическими способностями.

Окружающая среда является как бы общим знаменателем для всех видов деятельности. Например, расширение использования биотехнологии в химической промышленности должно привести к созданию новых ее отраслей, лучше совместимых с окружающей средой. Такие же надежды возлагаются и на биоинженерию.

Сельское хозяйство

Применение биотехнологии в сельском хозяйстве весьма многообразно. Продукция сельского хозяйства может использоваться в промышленности, например для производства этилового спирта из излишков низкокачественного вина. Такой подход получил дальнейшее развитие: для выработки спирта сельскохозяйственные культуры начали выращивать специально.

Большая часть продукции современного сельского хозяйства служит сырьем для развития пищевой промышленности. В качестве сырья могут быть использованы и отходы сельского хозяйства.

С помощью биотехнологии разрабатываются новые способы улучшения сельскохозяйственных культур как по урожайности, так и по качеству. Можно будет использовать полученные с ее помощью заменители дорогостоящих химических удобрений или пестицидов, или же добавки к ним. Так, потребности в азоте удастся удовлетворить путем внедрения биологической фиксации азота, основанной на симбиозе, а в фосфоре – путем вмешательства в процессы, происходящие в микоризах. Задачей отдаленного будущего является передача способности к фиксации азота непосредственно отдельным сельскохозяйственным культурам путем введения в них гена нитрогеназы; в результате такие растения приобретут способность к синтезу фермента, катализирующего реакцию фиксации азота. Это позволит сэкономить энергию, затрачиваемую сегодня при химическом синтезе аммиака.

По общему мнению, наибольший вклад биотехнологии в сельское хозяйство следует ожидать за счет улучшения свойств самих растений путем использования методов рекомбинативных ДНК и протопластов растений.

Химические соединения

применение биологических систем для производства химических соединений в принципе дает ряд преимуществ, однако сегодня лишь малое их число получают с помощью биотехнологических процессов. К ним относится сравнительно дешевые, но широко используемые в больших количествах как топливо этиловый спирт и метан, а также ряд ценных и довольно дорогих веществ, применяющихся в медицине и для пищевых целей (лимонная кислота, аминокислоты, стероиды и антибиотики).

Производство химических веществ на основе биокатализа имеет следующие преимущества: специфичность, легкость контроля, работа при низких температурах, совместимость с окружающей средой и простота. Так, химическая промышленность органических соединений базируется, в основном, на нефти, а большинство продуктов переработки нефти получают путем частичного окисления сырья. Достичь специфического контролируемого и частичного окисления при помощи существующих катализаторов довольно сложно, а микроорганизмы осуществляют эти типы реакций без труда.

Существуют три главных способа синтеза химических соединений на основе биокатализа:

1. путем использования культур клеток растений или животных, образующих дорогостоящие вещества.
2. Путем использования микроорганизмов, при необходимости изме-

ненных методами генетической инженерии, для биосинтеза или модификации химических веществ;

3. Путем использования измененных методами генетической инженерии микроорганизмов в качестве "устройств" для экспрессии генов растений и животных, что позволяет синтезировать в больших количествах особые, присущие только высшим организмам химические соединения.

Материаловедение

Биотехнология может оказать влияние на получение и использование различных материалов по меньшей мере тремя способами. Во-первых, она будет способствовать развитию добычи промышленного сырья, например нефти и других полезных ископаемых. Во-вторых, все более широко станут использоваться продукты микробного происхождения, например для производства разлагаемых с помощью микроорганизмов пластмасс, эмульгаторов и загущающих веществ. В-третьих, будут усовершенствованы способы защиты различных веществ от разрушения их микроорганизмами.

Наиболее многообещающим сырьем для производства биопластмасс является одно из резервных веществ клеток, полигидроксибутират (ПГБ). В настоящее время в промышленности ведутся активные исследования, как самого этого вещества, так и способов его получения.

Весьма актуальной и сложной с технической точки зрения является проблема биоповреждений. Биоповреждения являются неизбежным следствием важнейшей роли микроорганизмов в круговороте элементов в биосфере. Проявления биоповреждений весьма многообразны: от порчи пищевых продуктов до загрязнения смазочных масел и топливных систем, разрушения бетона и развития электрохимических процессов коррозии под влиянием микроорганизмов. Биотехнология поможет создать новые методы борьбы с биоповреждениями благодаря более глубокому пониманию лежащих в их основе процессов. На этой базе могут быть созданы новые биотехнологические процессы. Примером такого рода служит использование ферментов в пищевой промышленности.

Ключевые слова и понятия

активный ил	биомасса
аминокислоты	биотехнология
антибиотики	биохимия
белок одноклеточных организмов	брожение
биогаз	клонирование
биоинженерия	микробиология
	органические растворители

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое биотехнология?
2. С какими отраслями науки тесно связана биотехнология?
3. Роль Пастера в дальнейшем развитии прикладной микробиологии?
4. Открытие химиотерапевтической активности пенициллина.
5. Получение белка одноклеточных организмов.
6. Технология получения ферментов.
7. Перспективы развития биотехнологии.
8. Применение достижений биотехнологии в медицине (ферменты, гормоны, катализаторы).
9. Основные пути превращения энергии в живых системах.
10. Использование биомассы для получения энергии.
11. Основные направления развития пищевой промышленности с помощью биотехнологии.
12. Особенности производства химических веществ на основе биокатализа.
13. Влияние биотехнологии на получение и использование материалов.
14. Роль биотехнологии в переработке отходов.
15. Вклад биотехнологии в развитие сельского хозяйства.

Часть 1
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Лекция 2
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

1 Роль биотехнологии в получении пищевых продуктов.
2 Производство молочных продуктов.
3 Производство хлебопродуктов.
4 Бродильные производства, получение белковых продуктов, пищевых добавок и ингредиентов.

1. Роль биотехнологии в получении пищевых продуктов

Производство пищевых продуктов и напитков основано на переработке сырья, в основном поставляемого сельским хозяйством.

Все органические вещества, применяемые в пищевой промышленности, могут использоваться микроорганизмами. Это говорит о ключевой роли микробиологии при производстве продуктов питания: здесь микроорганизмы могут играть и положительную, и отрицательную роль. Последняя более выражена: не случайно меры предосторожности против нежелательной деятельности микробов занимают такое важное место при производстве пищи и ее потреблении.

Размножение микробов может вызвать нежелательные изменения качества пищевых продуктов или их внешнего вида. При этом нередко образуются вещества, обладающие токсическим действием. Порча пищи и связанные с этим экономические убытки весьма нежелательны, однако наиболее опасным следствием размножения микробов в пищевых продуктах является образование токсинов.

Некоторые микроорганизмы при подходящих условиях образуют токсины, вызывающие серьезные заболевания или даже смерть.

Существует две разновидности биотехнологии, различающиеся по ценности получаемых продуктов и по масштабу их производства:
1. Биотехнология маломасштабного производства;
2. Биотехнология крупномасштабного производства (табл.1).

При производстве пищевых продуктов нужен большой выход продукта и простая технология. По этим причинам главными в биотехнологии пищевой промышленности являются методы крупномасштабного производства продуктов.

Спектр продуктов питания, получаемых при помощи микроорга-

низмов, обширен: от вырабатываемых с древних времен за счет брожения хлеба, сыра, йогурта, вина и пива до новейшего вида пищевого продукта – грибного белка микопротеина. Микроорганизмы при этом играют важную роль: используются продуцируемые ими ферменты или другие метаболиты, с их помощью сбраживается пищевое сырье, а некоторые из них выращиваются для непосредственного потребления. В пищевой промышленности для осуществления процессов применяют как чистые культуры микроорганизмов, так и дикие формы, содержащиеся в значительном количестве в сырье, которые размножаются при создании надлежащих условий. Последний способ особенно характерен для традиционных бродильных производств, зародившихся во времена, когда о микробах еще ничего не знали. В промышленном производстве такие процессы обычно ведутся под гораздо более строгим контролем. Особенно это относится к выбору штамма и чистоте культур используемых микроорганизмов.

Таблица 1. Способы биотехнологического производства

	Маломасштабное производство	Крупномасштабное производство
Объем установки	100-1000 л	10 000 л
Стоимость продукции	Высокая	Невысокая
Тип продукции	Для медицины, фармацевтической промышленности, высокоспециализированная	Предметы потребления, малоспециализированная
Основные направления биотехнологических исследований и разработок	Генетические манипуляции	Технология ферментации
Стоимость научных исследований и развития	Повышенная	Пониженная

До недавнего времени биотехнология использовалась в пищевой промышленности с целью усовершенствования освоенных процессов и более умелого использования микроорганизмов, но будущее здесь принадлежит генетическим исследованиям по созданию более продуктивных штаммов для конкретных нужд, внедрению новых методов в технологии брожения.

Таким путем можно повысить выход и качество выпускаемой продукции и освоить производство новых ее разновидностей.

2. Производство молочных продуктов

В пищевой промышленности ферментацию применяют главным образом для получения молочных продуктов. В сквашивании молока обычно принимают участие стрептококки и молочнокислые бактерии; лактоза при этом превращается в молочную кислоту. Путем использования иных реакций, которые сопутствуют главному процессу или идут при последующей обработке, получают и другие продукты переработки молока: сметану, йогурт, сыр и др. Свойства конечного продукта зависят при этом от характера и интенсивности реакций ферментации.

В молоке при ферментации могут протекать шесть основных реакций, и в результате образуются молочная, пропионовая или лимонная кислота, спирт, масляная кислота или же происходит газообразование. Главная цель этих реакций – образование молочной кислоты. На ней основаны все способы ферментации молока. Лактоза молока гидролизуется при этом с образованием галактозы и глюкозы. Обычно галактоза превращается в глюкозу еще до сквашивания. Имеющиеся в молоке бактерии преобразуют глюкозу в молочную кислоту.

Различные процессы ферментации молока проводятся в контролируемых условиях. В течение многих тысячелетий они осуществлялись при участии бактерий, исходно присутствующих в молоке. В наше время для этого используют разнообразные закваски, позволяющие получать молочные продукты нужного качества и типа. Применяющиеся при этом культуры бактерий могут представлять либо один какой-то штамм определенного вида, либо несколько штаммов или видов.

Коммерческие культуры-закваски состоят из бактерий, образующих молочную кислоту и пахучие вещества (табл.2).

Один из древнейших способов, основанных на ферментации молока – сыроварение. При производстве сыра сохраняется питательная ценность молока. Известны самые разнообразные сыры – от очень мягких до твердых. Различия между ними определяются тем, что все натуральные мягкие сыры содержат много воды (50-60%), а твердые – всего лишь 13-34%. Хотя свойства сыров разнообразны, в процессе выработки всех их есть много общего. Первый этап – это подготовка культуры молочнокислых бактерий и засев ею молока. Затем молоко створаживают, для чего обычно применяют фермент ренин. После отделения водянистой жидкости (сыворотки) полученную творожную массу подвергают термообработке и прессуют в формах. Далее сгусток солят и ставят на созревание.

Древним продуктом, получаемым путем ферментации является

Таблица 2. Функциональная роль некоторых бактерий, используемых при переработке молока

Культура	Функция	Использование
1	2	3
Propionlbacterium P. shermanii P. petersonii	Формирование вкуса, образование глазков	Производство швейцарского сыра
Lactobacillus L. easel L. helveticus L. bulgaricus L. lactis	Образование молочной кислоты	Созревание, закваска, для швейцарского сыра, производство сыров типа швейцарского
Leuconostoc L. dextranicum L. citrouorum	Образование вкусовых веществ из лимонной кислоты (главным образом диацетила)	Производство сметаны, сливочного масла, заквасок
Streptococcus S. thermophilus S. lactis S. cremoris	Образование молочной кислоты	Производство йогурта и швейцарского сыра; закваски для сыров

йогурт. После термообработки молоко заквашивают добавлением 2-3% закваски йогурта. Главную роль здесь играют бактерии Streptococcus thermophillus и Lactobacillus bulgaricus. Для получения желаемой консистенции продукта , вкуса и запаха эти организмы должны содержаться в культуре приблизительно в равных количествах.

Кислоту в начале заквашивания образует в основном Streptococcus thermophillus. Смешанные закваски нужно часто обновлять, поскольку повторные пересевы неблагоприятно сказываются на соотношении видов и штаммов бактерий.

Из молочных продуктов проще всего получать масло. В зависимости от сорта производимого масла используют сливки с концентрацией от 30 до 40 %. При их сбивании образуется масло.

При производстве масла для улучшения вкуса и лучшей сохранности используют особые культуры бактерий. Улучшение вкуса было достигнуто путем создания специальных штаммов бактерий, отобранных по способности синтезировать нужные вещества, влияющие на вкус. Первыми для этой цели были использованы штаммы Streptococcus lactis и близких видов, а затем – смешанные культуры.

3. Производство хлебопродуктов

Для производства хлеба применяют в основном дрожжи Saecharomyces cerevisiae. Обычно их растят в ферментерах периодического действия.

В простейшем случае готовят тесто, смешивая при комнатной температуре муку, воду, дрожжи и соль. При замесе слои теста перемещаются, создаются условия для образования пузырьков газа и подъема теста. Замешанному тесту дают возможность «подойти», а затем режут на куски нужного веса, формуют и выдерживают во влажной атмосфере. При выдержке образовавшиеся газовые пузырьки заполняются углекислым газом. Он выделяется в ходе анаэробного сбраживания глюкозы и мальтозы муки. Помимо углекислого газа при анаэробном брожении образуются разнообразные органические кислоты, спирты и эфиры. Все они влияют на формирование вкуса хлеба. Поднявшееся тесто выпекают. В ходе этого термического процесса крахмал желатинизируется, дрожжи погибают и тесто частично обезвоживается.

При выпечке некоторых сортов хлеба из пшеничной муки к тесту добавляют предварительно сброженную смесь ржаной муки и воды, заквашенную смешанной культурой лактобактерий. Содержащаяся в этой закваске кислота придает хлебу особый вкус.

4. Бродильные производства, получение белковах продуктов, пищевых добавок и ингредиентов

Одно из древнейших бродильных производств – получение напитков путем спиртового брожения. Первыми из таких напитков были вино и пиво.

Алкогольные напитки получают путем сбраживания сахарсодержащего сырья, в результате которого образуются спирт и углекислый газ. Сбраживание осуществляется дрожжами рода Saecharomyces. В одних случаях используется природный сахар (например, содержащийся в винограде, из которого делают вино), в других сахара получают из крахмала (например, при переработке зерновых культур в пивоварении). Наличие свободных сахаров обязательно для спиртового брожения при участии Saecharomyces, так как эти виды дрожжей не могут гидролизовать полисахариды.

Пиво. Для осуществления спиртового брожения прежде всего необходимо, чтобы в пивоваренном сырье образовался сахар. Традиционным источником нужных для этого полисахаридов всегда был ячмень, но в качестве дополнительных используются и другие виды углеводсодержащего сырья. И сегодня ячменный солод составляет основу пива. Ячменный солод и другие компоненты измельчают и сме-

шивают с водой при температуре 67 ^{0}С. В ходе перемешивания природные ферменты ячменного солода разрушают углеводы зерна. Краткая схема процесса пивоварения представлена на рисунке 1.

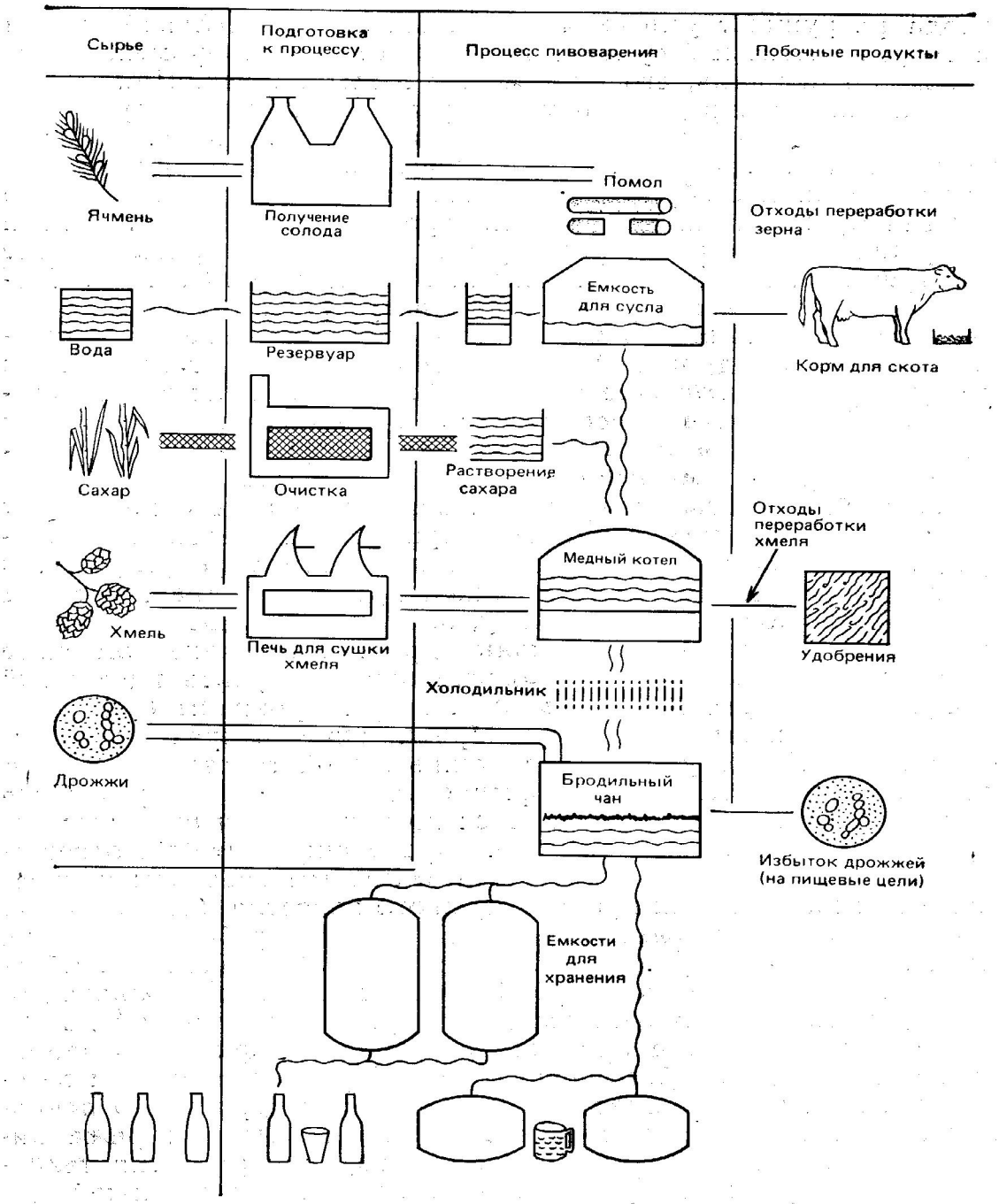


Рис. 1. Операции, лежащие в основе пивоварения

На заключительной стадии раствор, называемый суслом, отделяют от нерастворимых остатков. Добавив хмель, его кипятят в медных котлах. Для производства пива с определенным содержанием алкоголя сусло после кипячения доводят до нужной плотности. Удельная плотность сусла определяется содержанием экстрагированных сахаров, подлежащих сбраживанию. По истечении определенного времени брожение заканчивается, дрожжи отделяют от пива и выдержива-

ют его некоторое время для созревания. После фильтрации и других необходимых процедур пиво готово.

Вина

В производстве вина используется сахар виноградного сока. Почти все вино в мире делают из винограда одного вида, Vitis vinifera. Сок этого винограда – прекрасное сырье для производства вина. Он богат питательными веществами, служит источником образования приятных запаха и вкуса, содержит много сахара; его природная кислотность подавляет рост нежелательных микроорганизмов.

Виноделие в отличие от пивоварения до самого последнего времени было основано на использовании диких местных дрожжей. Единственная обработка, которой подвергали виноград до отжима – окуривание его сернистым газом, чтобы сок не темнел. Кроме того, сернистый газ подавляет деятельность невинных дрожжей, это позволяет винным дрожжам осуществлять брожение без помех.

При изготовлении красного вина гребни, косточки и кожица до конца брожения находятся в виноградном сусле, а белое вино делают из чистого сока.

Различные вкусовые оттенки появляются при выдержке вина; хорошо известно, что свой вклад вносит взаимодействие с древесиной и воздухом при хранении в деревянных бочках.

После завершения спиртового брожения молодое вино хранят в особых условиях, чтобы оно не испортилось. Если вино не предполагается подвергать яблочно-молочнокислому дображиванию, его обрабатывают сернистым газом, что подавляет окислительные процессы, вызывающие его потемнение. До этого из вина удаляют дрожжи, чтобы прекратить брожение.

Первосортные вина подвергают выдержке разного рода в зависимости от типа вина, а более дешевые разливают, как правило, в тот же год, когда они получены. Трудности при выработке дешевых вин обычно связаны с их склонностью к вторичному, яблочно-молочнокислому брожению, которое развивается ко времени разлива. Если вино склонно к такому брожению, его искусственно вызывают до разлива, а если нет, то подавляют. При производстве первосортных красных вин такое брожение даже желательно. Оно составляет естественную часть процесса и происходит при хранении. Этот тип брожения осуществляется молочнокислыми бактериями.

Некоторые особые сорта вин получают при участии гриба Botrytis cinerea. Его развитие на ягодах приводит к их обезвоживанию и повышению содержания сахара, что определяет сладкий вкус вина. При этом заражение должно происходить только перед сбором винограда.

Белковые продукты

Микроорганизмы начали использовать в производстве белковых продуктов задолго до возникновения микробиологии. Это всевозможные разновидности сыра, а также продукты, получаемые путем ферментации соевых бобов. И в первом, и во втором случае питательной основой является белок. При выработке данных продуктов с помощью микробов происходит глубокое изменение свойств белоксодержащего сырья. В результате получают пищевые продукты, которые можно дольше хранить (сыр). Микробы играют роль и в производстве некоторых мясных продуктов, предназначенных для хранения. Например, при изготовлении некоторых сортов колбасы (salami) используется кислотное брожение, обычно при участии молочнокислых бактерий. Образовавшаяся кислота способствует сохранению продукта и вносит вклад в формирование его особого вкуса. Кислотообразующие бактерии используются и при засоле мяса. Ряд блюд восточной кухни получают путем ферментации рыбы. Для этого применяют плесневые грибы и дрожжи.

В целом использование микроорганизмов в переработке белков ограничено. Исключением является сыроделие и выращивание микробной массы, перерабатываемой в пищевые продукты.

По многим важным показателям биомасса микроорганизмов может обладать весьма высокой питательной ценностью. В немалой степени эта ценность определяется белками: у большинства видов он составляет значительную долю сухой массы клеток.

Для микробного белка придумано специальное название – белок одноклеточных организмов (БОО). Производство его связано с крупномасштабным выращиванием определенных микроорганизмов, котрые собирают и перерабатывают в пищевые продукты. В основе лежит технология ферментации – ветвь бродильной промышленности и производства антибиотиков. Чтобы осуществить возможно более полное превращение субстрата в биомассу микробов, требуется многосторонний подход.

Выращивание микробов в пищевых целях представляет интерес по двум причинам:

1. Они растут гораздо быстрее, чем растения или животные: время удвоения их численности измеряется часами. Это сокращает сроки, нужные для производства определенного количества пищи.
2. В зависимости от выращиваемых микроорганизмов в качестве субстратов могут использоваться разнообразные виды сырья. Что касается субстратов, то здесь можно идти по двум главным направлениям: перерабатывать низкокачественные бросовые продукты или ориенти-

роваться на легкодоступные углеводы и получать за их счет микробную биомассу, содержащую высококачественный белок. И в том, и в другом случае технология ферментации играет ключевую роль.

Особенность БОО заключается в том, что этот продукт, во-первых, практически целиком состоит из микробной биомассы, и, во-вторых, в его производстве нередко принимают участие микробы, опыт использования которых мал и которые ранее в пище отсутствовали.

Государственные учреждения, контролирующие качество пищевых продуктов, требуют, чтобы выходу на рынок БОО предшествовали испытания на безопасность нового продукта. Такие испытания всегда дорогостоящи, и это сдерживает развитие производства, в частности производства продуктов на основе БОО, особенно предназначенных в пищу. По этой причине уклон в развитии производства БОО был сделан в сторону выработки кормов для животных, а не белков, непосредственно идущих в пищу.

Единственный официально разрешенный вид белковой пищи микробного происхождения – это микопротеин.

Микопротеин – это пищевой продукт, состоящий в основном из мицелия гриба. При его производстве используется штамм Fusarium graminearum, выделенный из почвы (рис.2).

5. Пищевые добавки и ингредиенты

Подкислители. Применяются в основном как вкусовые добавки для придания продуктам «острого» вкуса. В практику они вошли скорее всего в результате широкого использования органических кислот для сохранения пищи.

Самым популярным подкислителем в пищевой промышленности является лимонная кислота. Сначала этот продукт получали отжимая сок из лимонов, сегодня лимонную кислоту получают сбраживая содержащие глюкозу гидролизаты.

Аминокислоты. В мире производится примерно 200 тыс. тонн аминокислот в год; их используют главным образом как добавки к кормам и пищевым продуктам. Главными продуктами, получаемыми по технологии ферментации является глутаминовая кислота и лизин.

Витамины и пигменты. Основные потребности промышленности в этих соединениях удовлетворяются за счет природных источников и химического синтеза, но два из них β-каротин и рибофлавин, получают методами биотехнологии.

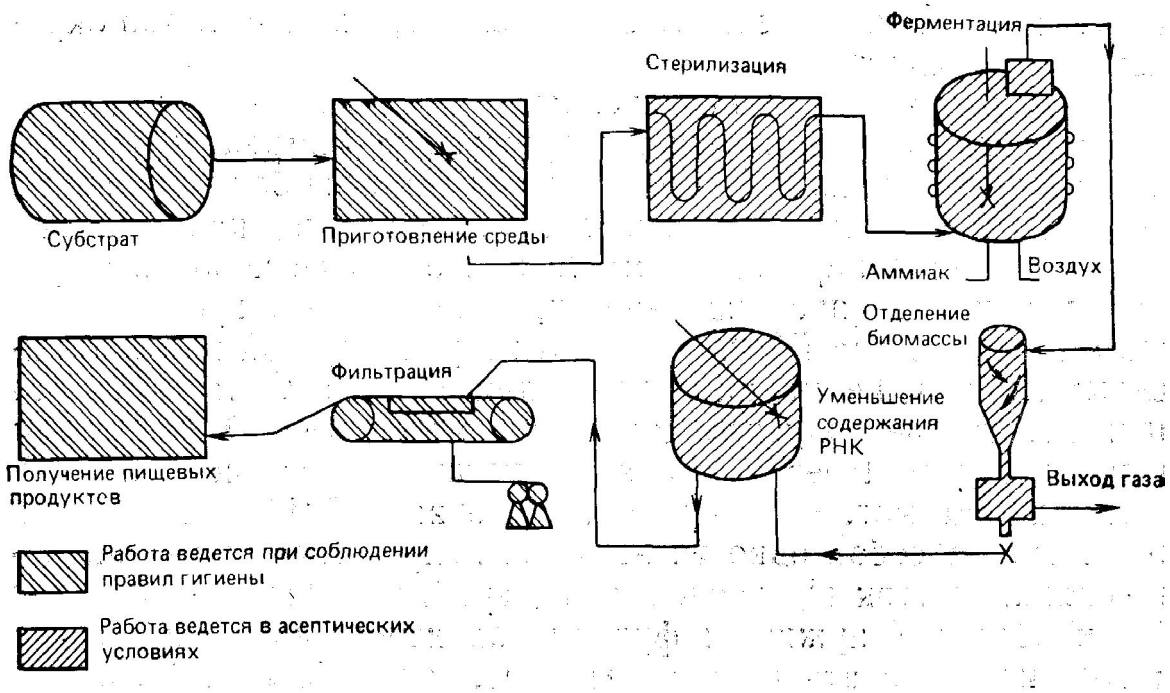


Рис. 2. Схематическое изображение производства микопротеина

Усилители вкуса. Главным усилителем вкуса считается натриевая соль глутаминовой кислоты: ее можно получить при помощи Micrococcus glutamicus. Пионером использования усилителей вкуса является Япония, но сам принцип применялся при создании рецептов многих блюд во всем мире.

Ключевые слова и понятия

аминокислоты	культура-закваска
белок одноклеточных организмов	микопротеин
брожение	пигменты
витамины	ферментация
	ферментеры

Вопросы для самоконтроля:

1. Роль микроорганизмов в получении продуктов питания.
2. Производство сыра.
3. Производство йогурта.
4. Производство масла.
5. Производство хлебопродуктов.
6. Производство пива.
7. Изготовление вина.
8. Получение белковых продуктов.
9. Получение пищевых добавок и ингредиентов (подкислители, аминокислоты, витамины, пигменты, усилители вкуса).

Лекция 3
МЕДИЦИНА И БИОТЕХНОЛОГИЯ

1 Производство и применение антибиотиков.
2 Иммунологический анализ.
3 Производство и применение гормонов.
4 Ферменты.

1. Производство и применение антибиотиков

Можно считать, что клиническая биотехнология зародилась с начала промышленного производства пенициллина в 40-х годах XX века и его использования в терапии. Применение этого первого природного пенициллина повлияло на снижение заболеваемости и смертности больше, чем какого-либо другого препарата, но, с другой стороны, поставило ряд новых проблем, которые удалось решить опять таки с помощью биотехнологии.

Во-первых, успешное применение пенициллина вызвало большую потребность в этом лекарственном препарате, и для ее удовлетворения нужно было резко повысить выход пенициллина при его производстве.

Во-вторых, первый пенициллин действовал главным образом на грамположительные бактерии, а нужно было получить антибиотики с более широким спектром действия, поражающие и грамотрицательные бактерии.

В-третьих, поскольку антибиотики вызывают аллергические реакции, необходимо было иметь целый набор антибактериальных средств, с тем чтобы можно было выбрать из равноэффективных препаратов такой, который не вызывал бы у больных аллергию.

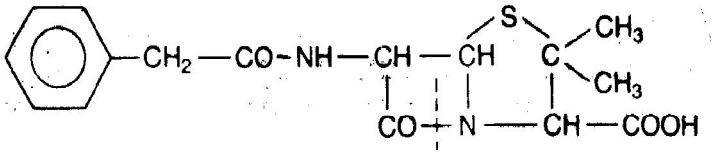
В-четвертых, пенициллин нестабилен в кислой среде желудка и его нельзя назначать для приема внутрь.

Наконец, многие бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам. Классический пример тому – образование стафилококками фермента пенициллиназы, который образует фармакологически неактивную пенициллоиновую кислоту.

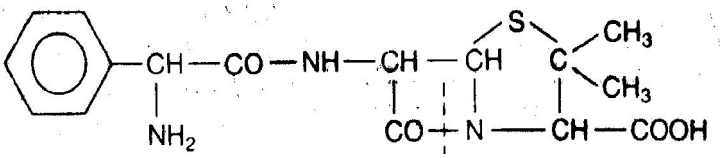
Увеличить выход пенициллина при его производстве удалось в основном благодаря последовательному использованию серии мутантов исходного штамма Penicillium chrysogenum а также путем изменения условий выращивания. Были выделены новые антибиотики, эффективные в случае грамотрицательных бактерий: стрептомицин, цефалоспорин.

Получено также множество полусинтетических антибиотиков с

новыми свойствами: с другим спектром действия, чувствительностью к пенициллиназе и содержимому желудочно-кишечного тракта. Так, ампициллин является полусинтетическим производным бензилпенициллина, отличающимся от него всего лишь наличием добавочной аминогруппы в боковой цепи (рис. 3). Тем не менее, он активен при пероральном введении и действует на широкий круг бактерий, в том числе на некоторые грамотрицательные, вызывающие заболевания органов дыхания, пищеварения и выделения.



Бензилпенициллин



Ампициллин

Рис. 3. Структурные формулы антибиотиков.

Устойчив к кислоте и клоксациллин, и к тому же он не разрушается β-лактамазами. Его часто назначают вместе с ампициллином тем больным, у которых обнаружены стафилококки, синтезирующие пенициллиназу.

2. Иммунологический анализ

Разработка метода радиоиммунологического анализа (РИА) оказало глубочайшее влияние на многие области клинической медицины и науку вообще. Он позволяет определить очень небольшие количества вещества путем вытеснения меченного радиоактивным изотопом антигена при добавлении все возрастающего количества немеченного испытуемого или стандартного антигена. Особенно ярко достоинства метода проявились в эндокринологии, так как концентрация гормонов обычно невелика, а определение их при помощи биологических методов анализа – долгая, а иногда неосуществимая процедура. Анализируемые вещества бывают нестабильны даже вне условий анализа, а при анализе их нередко приходится концентрировать, кроме того, они содержат примеси, которые могут обладать биологической активностью, сходной с таковой у изучаемого гормона. Так, инсулиноподобные факторы роста, соматомедины, можно определять биологическими методами, но они не активируются антисыворотками против инсулина.

Диагностика злокачественных новообразований. Известны

несколько специфических опухолевых маркеров, которые с успехом используются в диагностике, прогнозировании и выявлении распространения опухолей. Некоторые из них обнаруживаются в крови, а другие находят в препаратах опухолей. Так, α-фетопротеин является главным белком сыворотки плода, его содержание уменьшается в течение первого года жизни. Определяя содержание α-фетопротеина в плазме при помощи метода РИА, удалось установить, что оно повышается у многих больных с гепатомой (рак печени) и при раке семенников (тератоме).

Были выделены гомогенные антитела к клеткам злокачественной меланомы человека (рак кожи), которые не давали перекрестной реакции с нормальными клетками кожи.

Введение радиоактивных и флуоресцентных меток в опухолеспецифичные антитела облегчает выявление метастазов и оценку первичных реакций опухолей в ходе лечения.

Развитию новых способов лечения может способствовать направленное введение лекарственных препаратов, присоединенных к антителам против данных опухолей.

3. Производство и применение гормонов

Примером использования клеток с измененным геномом для производства лекарственных препаратов может быть синтез интерферона культивируемыми клетками лимфобластомы и вирусных антигенов для выработки вакцин при выращивании клеточных культур на инертных микроносителях.

Микроорганизмы используются и на отдельных стадиях синтеза лекарственных веществ, который ранее осуществлялся путем многоступенчатых и дорогостоящих химических реакций. Так, один из штаммов хлебной плесени, Rhizopus arrhizus, на начальном этапе синтеза производного стероида, кортизона, может гидроксилировать прогестерон.

Применяемые методы биоконверсии наряду с традиционными химическими превращениями позволили получить многие стероиды более простыми и дешевыми способами. Именно благодаря этому такие стероиды, как дексаметазон, тестостерон, эстрадиол могут сегодня широко применяться в клинике.

Инсулин

1-2% населения Европы страдает диабетом, и около 20% этих больных не могут существовать без иньекций инсулина. Со времени проведения первых опытов по использованию инсулина для лечения диабета в 1922 г. этот гормон выделяли из поджелудочной железы животных (коров и свиней). Инсулин животных немного отличается

по аминокислотной последовательности от инсулина человека. Особенно близки инсулины человека и свиньи: у инсулина свиньи С-концевой треонин В-цепи заменен на аланин. Инсулины коровы и человека отличаются по трем аминокислотным остаткам. Именно этими различиями определялась повышенная иммуногенная активность инсулина коровы по сравнению с инсулином свиньи.

Почти у всех больных, которых лечили введением инсулина коровы, в крови появлялись антитела к инсулину. Антигенные свойства инсулина частично определялись и примесями в его препаратах. Скорее всего, именно образованием антител к инсулину объяснялись некоторые незначительные побочные эффекты при иньекциях инсулина коровы, например атрофия подкожной жировой прослойки в месте повторного введения. В случае высокоочищенного инсулина эти эффекты отсутствовали.

Впоследствии благодаря генной инженерии и с помощью E. coli был получен человеческий инсулин.

Инсулин человека, полученный с помощью E. coli, оказался первым “генно-инженерным” белком, испытанным на людях. В опытах со здоровыми добровольцами было установлено, что он безопасен (не вызывает аллергических и других нежелательных реакций) и обладает способностью снижать уровень глюкозы в крови при введении под кожу или внутривенно.

В настоящее время такой инсулин человека получают множество диабетиков во всем мире. Этому предшествовали клинические испытания, в ходе которых изучались изменения метаболизма и иммунологические эффекты.

Интерферон

Интерфероны – это группа белков, открытых в ходе изучения веществ, вырабатываемых клетками, зараженными вирусами. Они индуцируют как локальные, так и системные противовирусные реакции в других клетках. Кроме того, интерфероны обладают двумя важными свойствами: подавляют пролиферацию клеток (являются противоопухолевым средством) и модулируют иммунную систему.

Интерфероны делят на несколько групп: α (лейкоцитарные интерфероны), β (интерфероны фибробластов), γ (иммунные интерфероны)

До недавнего времени интерфероны были доступны лишь в небольшом количестве. Частично очищенные препараты получали главным образом из лейкоцитов человека. В настоящее время синтезирован ген лейкоцитарного интерферона человека длиной 514 пар нуклеотидов; его включали в плазмиду и клонировали затем в E. coli,

таким же способом был получен ген фибробластного интерферона. Удалось достичь экспрессии гена интерферона человека в клетках дрожжей.

Интерфероном можно лечить гепатит В, некоторые формы герпеса. Среди онкологических больных были проведены испытания на пациентах с метастазирующим раком молочной железы, и у 12 из 43 диаметр опухоли уменьшился на 50%. Однако действие интерферона на онкологические опухоли до конца не выяснено.

Неоднократно сообщалось о побочных эффектах при применении интерферона (лихорадка, общее недомогание, потеря веса).

Гормон роста

Гормон роста человека (соматотропин) – это белок, состоящий из 191 аминокислотного остатка, и имеющий молекулярную массу 22000. Он образуется и секретируется передней долей гипофиза и необходим для роста костей. Выяснено, что у 7-10 людей на 1 млн. этот гормон образуется в недостаточном количестве, что приводит к задержке роста (карликовости). Хотя это заболевание обычно врожденное, задержка роста становится заметной лишь в более позднем, детском возрасте, так как гормон не нужен для внутриутробного развития.

Строение гормона роста видоспецифично, и в клинике можно применять лишь гормон роста человека. До недавнего времени его получали из гипофиза людей, но этот способ имеет свои ограничения.

В настоящее время производство гормона роста налажено на основе технологии рекомбинантных ДНК с использованием E. coli. Очищенный препарат гормона из бактерий по биологической активности подобен гормону из гипофиза.

4. Ферменты

Ферменты составляют основу многих тестов, используемых в клинической медицине. Они применяются при автоматизированном анализе и биохимическом исследовании жидкостей организма, которые ведутся в биохимических лабораториях современных клиник. Примером таких ферментов могут быть глюкозооксидаза, гексокиназа, эстераза, алкогольдегидрогеназа. Иногда ферменты применяют в терапии (например, стрептокиназу или урокиназу, которые оказывают мощное фибринолитическое действие при тяжелом тромбозе сосудов).

По видимому, основные усилия в ближайшие несколько лет будут направлены на развитие технологии биодатчиков. Ферменты могут оказаться весьма полезными для контроля за концентрацией разнообразных веществ, интересующих клиницистов: промежуточных

метаболитов, лекарственных препаратов и гормонов. Свою роль сыграет здесь биотехнология: она предоставит и обычные и редкие ферменты микробов, полученные как путем крупномасштабного их выращивания, так и с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

В заключение следует отметить, что последние достижения биотехнологии оказывают и будут оказывать революционизирующее воздействие на диагностику, лечение и понимание основ патологии многих тяжелых заболеваний.

Ключевые слова и понятия

антибиотики гормоны гормон роста иммунологический анализ	инсулин интерферон ферменты

Вопросы для самоконтроля:

1. Производство и применение антибиотиков.
2. Иммунологический анализ.
3. Производство и применение инсулина.
4. Производство и применение интерферона.
5. Производство и применение гормона роста.
6. Применение ферментов.

Лекция 4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЭНЕРГИИ

1 Роль биотехнологии в производстве энергии.
2 Производство спирта.
3 Получение метана.

1. Роль биотехнологии в производстве энергии

Неиссякаемым источником энергии является солнце. Каждый год на поверхность Земли поступает $3 \cdot 10^{24}$ Дж энергии, в то время как запасы нефти, природного газа, угля, урана по оценкам эквивалентны $2{,}5 \cdot 10^{22}$ Дж. Т.е. менее чем за неделю Земля получает от Солнца такое же количество энергии, какое содержится во всех невозобновляемых ее запасах.

Если бы только 0,1% поверхности Земли занимали коллекторы, использующие солнечную энергию с коэффициентом полезного действия около 10%, то были бы удовлетворены все текущие потребности в энергии в мире за год ($3 \cdot 10^{20}$ Дж).

Однако у солнечной энергии есть два недостатка: она поступает неравномерно и диффузно. Поэтому необходимо, во-первых, разработать какие-то системы накопления, так чтобы энергия была доступна по потребности, а во-вторых, создать коллекторы большой площади. Оба этих фактора накладывают определенные ограничения на использование систем на основе солнечной энергии.

Обе эти проблемы решает производство биомассы путем фотосинтеза:

Во-первых, коллекторы могут быть выращены из семян, и во-вторых, получаемый продукт стабилен и может храниться.

Впрочем, при получении и использовании биомассы для выработки энергии возникают свои проблемы, которые, однако, уравновешиваются преимуществами: ее можно получать во всем мире, она возобновляется и производится в согласии с окружающей средой.

Преимущество использования солнечной энергии, заключенной в биомассе, в том, что она запасается в форме органических веществ и поэтому ее можно хранить и перемещать во времени и пространстве.

К недостаткам относится малая эффективность (обычно менее 1% и редко более 2%) использования солнечной энергии при фотосинтезе; при образовании продукции растениеводства диффузный, а часто и сезонный характер продукции и высокое весовое содержание влаги. По этим причинам для получения высококачественного, бога-

того энергией сырья необходимо осуществить его сбор, перевозку, удаление воды, концентрирование или же химическую или биологическую переработку и упаковку. Если же задачей является превращение биомассы в ценные виды топлива, то думать приходится не только об удалении воды и увеличении удельного содержания энергии, но и о том, как получить продукт, совместимый с технологией, для которой он предназначен.

Ранее основным путем использования растительного сырья в качестве топлива во всем мире было прямое сжигание главным образом древесины и в меньших масштабах – остатков урожая и навоза. В настоящее время на разных стадиях разработки находится ряд систем термической модификации такого сырья. Среди них – установки на основе пиролиза, газификации и гидрогенизации.

Для этой цели применяют главным образом сахарный тростник, кукурузу, древесину, навоз, бытовой мусор, а также отходы сельского хозяйства и промышленности.

Основным поставщиком биомассы, идущей на топливо, служит сельское и лесное хозяйство. Оценивая нынешние возможности, следует исходить из наличных земельных площадей, урожайности современных культур, продуцирующих сахар и крахмал, и числа работников, занятых в сельском хозяйстве.

Ежегодный прирост биомассы во всем мире составляет около $2 \cdot 10^{11}$ т. Из них приблизительно $1{,}2 \cdot 10^{11}$ т составляет древесина (в пересчете на сухое вещество). Примерно 60% вырубаемой древесины используется как топливо.

Как сырье для производства биотоплива, древесина обладает рядом достоинств: выход продукции в пересчете на гектар очень высок; из древесины получают значительно больше биомассы, чем из любого другого источника; разведение лесов требует гораздо меньших вложений, чем выращивание других культур. К числу недостатков нужно отнести длительность роста до зрелости, а также тот факт, что главный компонент древесины, лигноцеллюлоза, очень сложна для переработки. В ближайшем будущем наиболее удобным и доступным источником сырья будут отходы деревообрабатывающей промышленности, но впоследствии все возрастающее значение будет приобретать «выращивание» топлива.

Поскольку основные затраты связаны с очисткой земли и посадкой, основное внимание уделяется сегодня выращиванию твердодревесного быстрорастущего порослевого леса.

Большим потенциалом биомассы отличаются пресноводные и морские растения, но чрезвычайно большое содержание воды во мно-

гих этих растениях при сборе и сложность сушки на солнце препятствуют использованию их как топлива путем прямого сжигания.

Наиболее подходящей технологией переработки водных растений и сырых отходов земледелия в топливо, корма и удобрения является анаэробная ферментация. Эти растения просто процветают в сточных водах. Они успешно очищают воду и хорошо при этом растут. Таким образом, они могут играть двойную роль: улучшать состояние окружающей среды и служить важным источником энергии. В ряде стран из водных растений получают биогаз. Их стали использовать для этой цели, поскольку растения исключительно быстро растут, причем на поверхности воды, и их легко собирать. Можно использовать и водоросли, растущие в прудах, в которых перерабатываются сточные воды, содержащие органические вещества. Такая технология особенно пригодна для стран, где много солнца, и к тому же нередко возникают проблемы переработки жидких отходов.

Многие жидкие и полутвердые отходы – идеальная среда для роста фотосинтезирующих водорослей и бактерий. При хороших условиях они быстро наращивают биомассу и осуществляют эффективное превращение солнечной энергии (3,5%); выход продукции составляет 50-80 т с гектара в год. Собранные водоросли можно прямо скармливать животным, получать из них метан или сжигать для получения электроэнергии. При этом одновременно происходит переработка отходов и очистка воды. По существующим оценкам затраты на такие системы в условиях Калифорнии составляют около 50% от затрат на обычные системы переработки сточных вод. Главная хозяйственная проблема здесь – затраты на сбор продукции. Ее можно решить, используя иные виды водорослей, которые легче собирать, и новые технические приемы сбора.

2. Производство спирта

Что касается этилового спирта как топлива, то почти все существующие способы его производства основаны на переработке сока сахарного тростника, сахарной свеклы, кукурузного крахмала. Процесс состоит из множества стадий: выращивание растений, их уборка, перевозка на заводы, приготовление сусла, сбраживание, перегонка, обезвоживание, денатурация, приготовление смесей и реализация продукции. Кроме того, приходится решать вопрос об удалении и переработке отходов.

При получении этилового спирта из сахарсодержащих культур отжим содержащего сахар сока ведется стандартными способами. Простые сахара из сахарного тростника можно получить механическим отжимом сока, а в случае сахарной свеклы – диффузионным ме-

тодом.

Крахмальное сырье нужно механически измельчить до консистенции жидкого теста, а затем нагревать до разрушения крахмальных зерен. Далее можно применить различные варианты гидролиза, основанного на использовании разных сочетаний кислот или применении ферментов. Весовой выход продукта зависит от природы используемого сырья: из 1 кг сахарозы можно получить до 0,65 л спирта, а из 1 кг крахмала - 0,68 л спирта.

В настоящее время главные сложности, связанные с производством спирта как горючего, связаны с тем, что сырье для этого процесса является одновременно и сырьем для производства пищевых продуктов и кормов. Из-за этой конкуренции стоимость сырья весьма высока. В зависимости от типа сырья 60-85% конечной продажной цены получаемого сегодня спирта составляет стоимость сырья.

Производство этилового спирта при помощи дрожжей основано на давно устоявшейся технологии. Для получения топливного спирта необходимо осуществить ряд процессов: подготовить сырье, провести брожение, отгонку и очистку, обезвоживание, денатурацию и организовать хранение.

Объем производства крупных спиртовых заводов может быть очень большим: они ежегодно потребляют тысячи тонн сырья и выпускают миллионы литров продукции. Наибольший вклад в энергобаланс страны производство этилового спирта дает в Бразилии. В 1982 г. там было получено $5 \cdot 10^9$ литров спирта. Схема процесса производства этанола представлена на рисунке 4.

Технический спирт применяют главным образом как горючее для двигателей внутреннего сгорания. Чаще всего его используют в смесях, но при наличии подходящих машин и в чистом виде.

Хотя этиловый спирт можно использовать для приготовления пищи, обогрева, освещения или производства пара и электричества, особой выгоды получить здесь не удается. Дело в том, что в процессе превращения биомассы в этанол происходит значительная потеря энергии. Энергия потребляется на всех стадиях переработки спирта. Больше всего тратится ее на концентрирование и обезвоживание при перегонке. Энергию эту можно получить из отходов сырья (соломы и т.д.), сжигая древесину или ископаемое топливо: газ, нефть или уголь. В целом энергозатраты на переработку спирта близки к количеству энергии, получаемой в форме спирта. По этой причине энергообеспечение всего процесса должно идти либо за счет переработки отходов, либо за счет использования самого дешевого топлива.

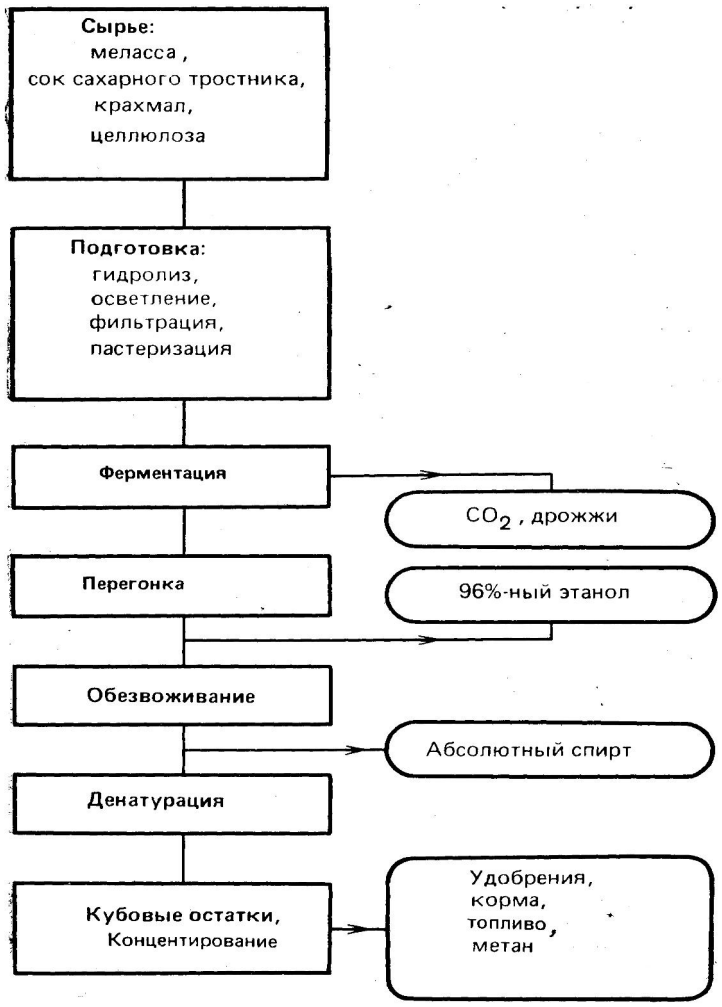


Рис. 4. Схема производства этанола

Основную массу вырабатываемого на крупных предприятиях спирта получают сегодня при помощи дрожжей. Существует три основных способа сбраживания сахарсодержащего сырья: периодический, периодический с повторным использованием клеток и непрерывный.

По завершении сбраживания концентрация спирта составляет 6-12%. Она зависит от штамма дрожжей и начальной концентрации сахара. Важно достичь наивысшей концентрации спирта, так как от этого зависит расход пара на перегонку.

Дополнительный пар нужен для получения безводного спирта из смеси вода – этиловый спирт, кипящей при постоянной температуре. Обычно для этого используют десятикратный по отношению к количеству удаляемой воды объем бензола. Сначала при 64-84 ^{0}C отгоняется смесь бензола, воды, спирта, а после удаления всей воды, при 68,25 ^{0}C – другая смесь бензола и спирта. После отгонки всего бензола остается лишь абсолютный спирт, который собирают, а бензол используют повторно.

Главным побочным продуктом производства являются: CO_2,

дрожжи, сивушные масла и остатки сырья. Каждый из них обладает определенной ценностью, но переработка жидких остатков может быть затруднена. В большинстве случаев, так как за пищевой спирт нужно платить большой налог, его денатурируют. Для этого добавляют вещества, придающие ему горький вкус, или смешивают его с бензином.

3. Получение метана

При переработке сырья в анаэробных условиях получается смесь газов – метана и углекислоты, которые образуются в результате разложения сложных субстратов при участии смешанной популяции микроорганизмов разных видов. Поскольку искомый продукт – это газ, сбор его не составляет труда: он просто выделяется в виде пузырьков. Иногда при более сложных способах его использования или распределения по трубам возникает необходимость в его очистке от примесей или компрессии.

В анаэробном реакторе можно перерабатывать самое разнообразное сырье: отходы сельского хозяйства, стоки перерабатывающих предприятий, содержащие сахар; жидкие отходы, образующиеся на сахарных заводах; бытовые отходы; сточные воды городов и спиртзаводов.

Весьма важно, что сырье с высоким содержанием целлюлозы не так просто использовать для иных целей: оно дешево или вообще не имеет коммерческой ценности. Обычно масштабы переработки невелики (в пределах одной фермы или деревни), хотя были разработаны и проекты более крупных установок для переработки стоков или же промышленных отходов.

Неочищенный биогаз обычно используют для приготовления пищи и освещения. Его можно применять как топливо в стационарных установках, вырабатывающих электроэнергию. Сжатый газ в баллонах пригоден как горючее для машин и тракторов. Очищенный биогаз ничем не отличается от метана из других источников, т.е. природного газа.

Нередко, особенно в развитых странах, биореакторы используют главным образом для переработки отходов. Установки для производства биогаза по принципу возрастания объема можно сгруппировать следующим образом:

1. Реакторы в сельской местности в развивающихся странах (обычно имеют объем 1-20 $м^3$);
2. Реакторы на фермах развитых стран (50-500 $м^3$);
3. Реакторы, перерабатывающие отходы промышленности (например, сахарных, спиртовых заводов и т.п., объем 500-10000 $м^3$);

4. Свалки бытовых и промышленных отходов (объем 1-20•10^6 $м^3$).

Детали технического устройства таких систем могут сильно различаться. Так, существует несколько конструкций небольших реакторов – от простейшей бродильной ямы в грунте с фиксированным объемом газа до подземных или полуподземных баков с металлическим или резиновым накопителем газа с изменяющимся объемом.

Конструкция таких устройств определяется типом перерабатываемого сырья. Задача заключается в том, чтобы не допустить потери микроорганизмов при работе систем. Это достигается либо путем повторного их использования, либо помещением в реактор поддерживающего субстрата, на котором и растут клетки.

Переработка сырья в метан происходит в ходе сложных взаимодействий в смешанных популяциях микроорганизмов. По особенностям обмена веществ их можно подразделить на три основные группы: первая осуществляет первичный распад полимерных веществ, вторая образует летучие жирные кислоты, а третья – метан.

В осуществлении первой стадии процесса принимают участие разнообразные анаэробные бактерии, превращающие в растворимые вещества множество соединений, включая целлюлозу, жиры и белки. Ключевую роль при этом играют процессы разложения целлюлозы, так как большинство видов сырья или сточных вод обогащены лигноцеллюлозой. По оптимальной температуре жизнедеятельности эти бактерии можно отнести к одной из трех групп: термофильным организмам, живущим при 50-60 ^{0}C; мезофильным (30-40 ^{0}C); психрофильным, предпочитающим комнатную температуру (около 20 ^{0}C).

Большая часть исследований была выполнена для реакторов, работающих на основе мезофилов. При повышенной температуре скорость распада исходного сырья, особенно целлюлозы, увеличивается, а это – важное преимущество. Скорость образования метана лимитируется интенсивностью процессов разложения сырья. Поэтому время удержания при работе с некоторыми субстратами бывает значительным.

Время удержания можно уменьшить, если повысить температуру, но это требует энергозатрат. Для получения тепла можно сжигать часть получаемого метана. Можно использовать и тепловые отбросы сопутствующих производств (например воду, использованную для охлаждения). Горячую воду можно получать и с помощью солнечных батарей. Бактерии, работающие на первом этапе, лучше всего растут при pH от 6 до 7. В культуре рост многих разлагающих целлюлозу бактерий подавляется по механизму обратной связи при накоплении конечных продуктов гидролиза, однако в смешанной популяции бак-

терий, существующей в анаэробном реакторе, происходит быстрое усвоение этих продуктов и подавление не так выражено. В результате скорость разрушения полимеров оказывается выше, чем можно было бы ожидать. Конечные продукты, обладающие свойствами ингибитора, удаляются с помощью бактерий второй группы, которые превращают различные сахара, аминокислоты и жирные кислоты в летучие жирные кислоты, CO_2 и водород.

В ходе этого процесса образуется ряд летучих кислот (молочная, уксусная, пропионовая и др.), но главным субстратом при синтезе метана является уксусная кислота. Метанобразующие бактерии могут также синтезировать метан из CO_2 и H_2. Оптимум pH для них тот же (6-7), что и для бактерий первой группы, и это важно, поскольку нарушение баланса образования и потребления кислот приведет к падению pH, если система не обладает достаточными буферными свойствами. Всякое падение pH по этой причине преимущественно сказывается на активности метанобразующих бактерий, что вызывает дальнейшее закисление среды и прекращение образования метана.

С этим можно бороться, добавляя известняк и аммиачную воду, но при внесении ионов аммония следует соблюдать осторожность. Метанобразующие бактерии могут использовать аммонийные ионы как источник азота, но при высоких концентрациях азот ингибирует рост бактерий.

При образовании метана, когда субстратом является глюкоза, весовой выход газа составляет около 27%, а выход энергии (теоретически) – более 90%. Однако на практике из-за сложного состава сырья, перерабатываемого в анаэробных реакторах и низкой эффективности его переработки валовый выход энергии составляет от 20 до 50%. Состав газа существенно изменяется в зависимости от условий в реакторе, а также от природы подаваемого в него сырья. Теоретически при переработке углеводов на CO_2 и метан эти газы должны образовываться в равных количествах. На самом деле не весь CO_2 выделяется в виде газа, так как он растворяется в воде и может взаимодействовать с гидроксилионами с образованием бикарбонатов. Концентрация образующегося бикарбоната будет зависеть от скорости потока жидкости, pH, температуры и содержания в жидкой фазе ионов металлов и других веществ.

Количество образующегося бикарбоната сильно зависит от содержания белка в сырье: чем оно больше, тем богаче биогаз метаном. Обычно биогаз содержит 60-70% метана. Он образуется со скоростью 0,5 $м^3$ на килограмм сухой массы летучих компонентов; время удержания составляет около 15 суток.

В последних сообщениях об установках, перерабатывающих биомассу разного качества, приводятся выходы от 0,17 до 0,4 $м^3$ метана на килограмм сухой массы сырья. Скорость загрузки при этом составляет от 1 до 10 кг сырья на кубометр реактора в сутки, время удержания 10-40 суток, а глубина переработки субстрата от 20% до более чем 70%.

Повышение выхода за счет увеличения содержания энергии в продукте будет способствовать повышению валового производства энергии реактором. К сожалению, это не говорит о чистом выходе энергии, который будет существенно ниже, так как возрастут энергозатраты.

Ключевые слова и понятия

анаэробная ферментация биогаз биореакторы биотопливоколлекторы газификация гидролиз денатурация	лигноцеллюлоза мезофиллы пиролиз психрофилы термофилы фотосинтез

Вопросы для самоконтроля:

1. Какое количество энергии содержится в невозобновляемых запасах Земли?
2. Какова эффективность использования солнечной энергии при фотосинтезе?
3. Способы использования растительного сырья в качестве топлива.
4. Основные поставщики биомассы, идущей на топливо?
5. Каков ежегодный прирост биомассы в мире?
6. Основная технология переработки водных растений?
7. Как осуществляется производство этилового спирта?
8. Основное сырье для получения спирта?
9. Получение метана.
10. Типы установок для получения биогаза?
11. Эффективность биореакторов при получении биогаза?
12. Скорость превращения субстрата в биореакторах?

Лекция 5

СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ

1 Перспективы использования биотехнологии в сельском хозяйстве.
2 Улучшение сортов растений.
3 Биологическая фиксация азота бобовыми культурами при симбиозе.
4 Биологический контроль.

1. Перспективы использования биотехнологии в сельском хозяйстве

Прогресс в сельскохозяйственном производстве и производство продуктов питания в целом зависит от почвенных, водных и энергетических ресурсов, которые в принципе могут быть увеличены, но обычно рассматриваются как ограниченные.

Достижения в этих областях зависят также от возобновляемых биологических ресурсов, таких, как культурные растения, домашние животные и микроорганизмы. Повышение биологической продуктивности организмов является предметом активных исследований естественных наук.

Удельный вес биотехнологических методов в этих исследованиях постоянно возрастает. Методы биотехнологии применяются при использовании микроорганизмов для получения полезных веществ, приготовлении продовольственных продуктов, их консервировании и улучшении питательных свойств.

В этой области усилия ученых направлены на увеличение выхода продукции, повышение ее питательности, увеличение устойчивости растений к неблагоприятным погодным условиям, патогенам и вредителям наряду с поддержанием достаточного разнообразия среди культурных видов и сохранением генетических ресурсов, которые заложены в близких к ним диких видах. Концепции и методы генетики растений быстро развиваются благодаря новейшим открытиям молекулярной биологии и особым присущим растениям свойствам. Поэтому она вносит весомый вклад в проводимые исследования.

Увеличение объема сельскохозяйственной продукции должно осуществляться экономически приемлемыми способами, а также с учетом влияния на окружающую среду.

Развитые страны могут позволить себе в больших масштабах применять химические удобрения, но многим другим странам это недоступно, и они вынуждены искать другие пути. Основным необходимым для роста элементом является азот. Он не принадлежит к чис-

лу редких, но чтобы перевести азот в доступную растениям форму, его надо фиксировать. В ходе эволюции выработался эффективный процесс биологической фиксации азота при симбиозе. Сейчас интенсивно изучается процесс несимбиотической фиксации азота, но на практике он применяется пока в ограниченном масштабе.

Большое внимание привлекают к себе биологические способы снабжения растений фосфором, а также контроля за вредителями и болезнями растений. Разрабатываются способы выращивания ценных культур в контролируемых условиях.

Пожалуй, самый большой вклад, который может внести биотехнология в сельское хозяйство, - это улучшение сортов растений; существенный прогресс здесь будет достигнут благодаря использованию методов генетической инженерии и технологий слияния протопластов.

2. Улучшение сортов растений

Исследовательская работа по селекции новых высокоурожайных сортов хлебных злаков, в первую очередь пшеницы, была начата после второй мировой войны. Новые сорта пшеницы были выведены в Мексике, риса – на Филиппинах. За 10 лет (1960-1970) они распространились по всему миру и способствовали значительному повышению урожаев. Стал применяться целый комплекс мер, направленных на увеличение сельскохозяйственного производства в развивающихся странах на основе использования новых сортов, особенно пшеницы и риса. Эти сорта имеют короткий и жесткий стебель, хорошо реагируют на внесение удобрений и обладают устойчивостью ко многим распространенным заболеваниям. Для культивирования данных сортов помимо удобрений и качественной сельскохозяйственной обработки требовались различные пестициды, а также орошение. Скрещивание новых сортов с местными выносливыми линиями позволило получить сорта, еще более приспособленные к условиям района их возделывания и дающие более высокие урожаи.

Достигнутые результаты можно отнести к числу исследований по генетике и усовершенствованию растений. Использованная для их получения техника заключалась в переносе методом скрещивания целых групп хромосомных детерминант. Поскольку большинство растений, потребляемых в пищу, содержит по несколько наборов хромосом (три-, тетра- или даже гексаплоидные виды), у потомства при таких скрещиваниях может проявляться весьма широкий спектр признаков, а роль селекционера состоит в отборе среди этого потомства особей с нужными признаками.

Вторая зеленая революция, о которой начали говорить с середи-

ны 1970-х годов, хотя она и не произошла до сих пор, станет результатом исследований, направленных на селекцию и культивирование новых растений, устойчивых к болезням, вредителям и засухе, и которые можно будет выращивать без применения удобрений и пестицидов.

Такого рода исследования базируются уже не на методах скрещивания, перекрестной гибридизации и перекрестного опыления. Новые разработки, в которых используются культуры клеток, протопластов и тканей, а также методы генной инженерии нацелены на создание культурных сортов направленным воздействием на наследственные структуры и клеточные механизмы, которые обеспечивают биологическое разнообразие. Новые методы значительно сокращают затраты времени и труда, но им свойственна и некоторая непредсказуемость результатов. Техника рекомбинантных ДНК и ее последовательная адаптация к миру растений способствуют преодолению барьеров, препятствующих межвидовому скрещиванию. Она позволяет также увеличить генетическое разнообразие, которому нанесло значительный ущерб разрушение среды обитания диких видов, что в свою очередь сделало многие культивируемые виды и сорта чрезвычайно уязвимыми для патогенных микроорганизмов и паразитов.

Наряду с коллекциями семян, которые до сих пор далеки от предъявляемых к ним требований, все большую роль в обеспечении генетической изменчивости и разнообразия станут играть культуры клеток и тканей, а также анализ миллионов клеточных линий.

3. Биологическая фиксация азота бобовыми культурами при симбиозе

Семена многих видов бобовых богаты белком. Они являются ценным сырьем для производства кормов и пищевых продуктов. Из растений умеренного климата можно назвать горох и фасоль. В тропических и субтропических зонах возделываются самые разнообразные культуры, включая сою, чечевицу, арахис. Многие бобовые – ценные пастбищные культуры, например, различные виды клевера. Они могут служить зеленым удобрением (люцерна), дают нам лесоматериалы, клеящие вещества, волокна, лекарства и пряности. Роль бобовых определяется еще и тем, что они способны фиксировать азот атмосферы в корневых клубеньках, которые формируются при участии почвенных бактерий рода Rhizobium. Образующиеся в них азотистые вещества необходимы для роста растений.

Об участии клубеньковых бактерий в симбиогенной фиксации атмосферного азота стало известно сравнительно недавно (примерно 100 лет назад).

Культура, из которой можно получать богатые белком пищевые продукты и которая не требует (или требует очень мало) азотных удобрений, несомненно выгодна, и бобовые стали важной сельскохозяйственной культурой в Европе, в Северной Америке и на других континентах. Установлено, что среди бобовых, играющих важную роль в сельском хозяйстве, примерно 98% видов могут образовывать клубеньки. У диких видов они чаще всего формируются при участии особых разновидностей бактерий-ризобиумов, существующих в природном местообитании.

Если какой-то вид бобовых долго растет на одном месте, это приводит к постепенному накоплению в почве сожительствующей с ним разновидности ризобиумов.

Урожай нередко зависит от того, образовалась ли в данном месте эффективная ассоциация из растения и соответствующей разновидности Rhizobium. Нужный штамм не всегда присутствует в том месте, где предполагается выращивать данную культуру, и в таком случае его приходится вносить в почву.

Как только стала ясна роль симбиоза бактерий рода Rhizobium и бобовых, были разработаны способы внесения этих бактерий в почву для улучшения условий культивирования. Их стали добавлять также и к семенам. Затраты на внедрение этого способа инокуляции невелики, транспортные расходы незначительны, а сами методы достаточно несложны, чтобы их можно было внедрить в сельское хозяйство развивающихся стран, где высока стоимость удобрений.

Выращивание бобовых с применением метода инокуляции семян нередко благоприятно сказывается на состоянии окружающей среды: оно помогает бороться с наступающей пустыней, облегчает борьбу с эрозией почв, уменьшает перенос почвы ветром и позволяет с большим успехом восстанавливать истощенные земли. Большинство образующих клубеньки бобовых способны полностью удовлетворить свои потребности в азоте. Однако это бывает только тогда, когда и прочие условия благоприятствуют росту растений, т.е. растения получают достаточно воды и других питательных веществ.

Наиболее простой способ инокуляции основан на использовании почвы, взятой с полей, где выбранная для выращивания культура бобовых растет хорошо. Этот способ широко применялся еще в конце XIX века. Недостаток его заключался в том, что при этом приходится перемещать много почвы, так как Rhizobium составляют лишь малую часть микрофлоры и ничтожную часть самой почвы. В Америке обычно вносили 100-1000 кг почвы на 1 га. Брали эту почву с расположенного неподалеку поля, где был получен хороший урожай нуж-

ной бобовой культуры. Еще один недостаток этого метода – возможность распространения с почвой болезней растений.

Гораздо меньше почвы необходимо вносить при помощи сеялок, когда бактерии попадают прямо к семенам, где они нужнее всего. На основе этого простого способа был разработан метод прямой инокуляции семян. Сначала применяли измельченную почву (всего примерно 0,5 кг почвы на 1 кг семян), а затем стали использовать методы, основанные на введении чистых культур бактерий.

Первая разновидность коммерческой культуры для инокуляции была запатентована в 1896г. Она поступала на рынок под названием «Nitragin». Для разных бобовых выпускалось 17 ее вариантов. Уже в 20-х гг. XX века на рынок поступало много других разновидностей инокулятов. Некоторые из них представляли собой чистые культуры бактерий, смешанные с почвой, песком, торфом, навозом или измельченной породой, другие – культуры, выращенные на агаре или в жидкой среде.

Суть метода инокуляции семян заключается в том, что на семена наносят большое число клеток Rhizobium, соответствующих определенному виду растения-хозяина, что увеличивает вероятность быстрого образования клубеньков у проростков при участии данных микроорганизмов. Для этого нужно достаточно много бактерий, которые должны сохранять жизнеспособность до тех пор, пока в почве они не проникнут в корневые волоски. Для прямой инокуляции семян пригодны культуры Rhizobium, выращенные в пробирках или колбах на среде с агаром.

Rhizobium, выращенные на агаре или в жидкой среде, после высушивания на поверхности семян быстро погибают, да и сами культуры их нежизнестойки. Этих недостатков лишены инокуляты на торфяной основе, которые были созданы в США, и сейчас применяются повсеместно.

При получении культуры нужного штамма Rhizobium выращивают обычным способом в ферментере объемом несколько литров в жидкой среде. К моменту смешивания с торфом (носителем) – плотность культуры должна быть достаточно высокой, $5 \cdot 10^8$-10^9 клеток/мл. В случае медленно растущих штаммов, со средним временем удвоения числа клеток около 10 часов, обычно бывает сложно получить культуру с высокой плотностью, и нередко даже размножение более быстро растущих штаммов подавляется видами-загрязнителями. Для обеспечения быстрого роста культуры на жидкой среде полезно вносить сразу много бактерий.

При приготовлении носителя для Rhizobium торф высушивают

либо при обычной температуре, либо при осторожном нагревании до влажности ~10%, затем измельчают при помощи мельницы и доводят до pH 6,5-7, добавляя $CaCO_3$. Рост и выживание бактерий в торфе зависят от многих факторов. Поэтому на каждой партии торфа для получения инокулятов проводят пробные выращивания именно тех штаммов, которые предполагается использовать.

Твердый инокулят состоит из бактерий и носителя, роль которых заключается в поддержании жизнеспособности клеток, поскольку он частично защищает их от пересыхания. Кроме того, носитель способствует более равномерному распределению бактерий в массе семян и помогает им прикрепиться к поверхности семян. Хотя в случае бактериальных суспензий нередко получают хорошие результаты, считается, что применение торфа как носителя более эффективно: т.к. при использовании жидких культур или же суспензий клетки Rhizobium после инокуляции и прикрепления их к поверхности семян оказываются практически беззащитными. Поэтому при производстве коммерческих инокулятов вначале чаще всего использовали именно торф. Однако торф есть далеко не везде, а если он имеется, то сказать заранее, пригоден ли он как носитель, невозможно. В связи с этим были предприняты поиски альтернативных носителей с такими же защитными свойствами, как у торфа.

С неодинаковым успехом для этой цели были испробованы всевозможные композиции: разнообразные смеси почвы и торфа, измельченная солома, нильский ил с добавками питательных веществ, кокосовые хлопья, древесный уголь. Сегодня для поддержания жизнеспособности Rhizobium получают носители из самых разнообразных веществ, но лучшим носителем все же является торф. В некоторых регионах, например в развивающихся странах, определенную ценность могут представлять дешевые местные заменители торфа.

Самый простой но наиболее эффективный метод инокуляции – смешивание сухого инокулята и семян перед посевом. При этом к семенам прикрепляется мало бактериальных клеток, большая часть их теряется, и необходимое условие нанесения достаточного числа клеток Rhizobium на семена не выполняется. Поэтому лучше вносить инокулят в виде водной кашицы. Хорошо прилипает к семенам инокулят на торфе, особенно если добавить к нему водорастворимый клей (карбоксиметилцеллюлозу). При этом повышается выживаемость бактерий после высушивания семян.

Симбиотические отношения, приводящие к фиксации азота, - это наиболее эффективный способ биологического образования аммиака, потребляемого сельскохозяйственными культурами. Влияя на них

можно достичь значительного прогресса в использовании биологической фиксации азота для производства пищевых продуктов. Для расширения масштабов и эффективности систем фиксации азота необходимо глубже понять генетику бактерий Rhizobium, чтобы не зависеть столь сильно от природных ситем симбиоза, а формировать их с участием любого желаемого вида растений, употребляемых в пищу.

4. Биологический контроль

Уже в самом начале развития микробиологии стало известно, что одни микроорганизмы могут подавлять рост других (биологический контроль). Наиболее важным результатом интенсивных исследований в этой области было открытие антибиотиков и разработка способов их применения в клинике. Большое внимание привлекла к себе возможность использования одних микроорганизмов для регуляции численности популяций других благодаря действию антагонистических или конкурентных механизмов.

Биологический контроль осуществляется в природе и помогает предотвратить болезни растений, но мы далеко не всегда понимаем, каков его механизм и как им можно управлять с пользой для сельского хозяйства. Успехи в этой практической области исследований весьма незначительны, потому что слишком мало усилий предпринималось для изучения поведения смешанных популяций микроорганизмов в почве и на поверхности растений.

Есть и примеры систем биологического контроля, которые можно считать биотехнологическими. Например: известна антагонистическая активность гриба Trichoderma. Если внести во влажную почву значительное количество Trichoderma lignorum, то он подавит выпревание проростков (болезнь «черная ножка»), главным образом благодаря действию токсина, который можно выделить из фильтратов культур гриба. Известно, что другие виды Trichoderma вступают в антагонизм или прямо паразитируют на многих грибах и способны существенно снижать заболеваемость, вызываемую рядом почвенных патогенов растений.

В Европе базидиомицет Fomes annosus является основным возбудителем сердцевинной гнили хвойных, особенно елей. Он паражает также лиственные породы и лесоматериалы. Заражение этим грибом сосновых пней тоже нежелательно, так как инфекция распространяется на их корни, а затем и на корни соседних здоровых деревьев. Заселение пней этим грибом можно предотвратить, засеяв их спорами другого гриба-базидиомицета, Peniophora gigantea. Гриб разрастается на пнях, и, контактируя с Fomes annosus, подавляет развитие сердцевинной гнили.

Скорее всего любой организм, избранный в будущем для осуществления биологического контроля, будет действовать на патогены двояким способом: либо образуя вещества-ингибиторы, либо конкурируя за питательные вещества.

Ключевые слова и понятия

биологическая продуктивность биологический контроль инокуляция патогены	протопласты симбиоз сорт

Вопросы для самоконтроля:

1. Перспективы использования биотехнологии в сельском хозяйстве
2. Улучшение сортов растений
3. Роль бобовых культур в сельском хозяйстве.
4. Методы повышения содержания азота в почве.
5. Методы инокуляции семян азотфиксирующими бактериями.
6. Биологический контроль.

Лекция 6
ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА И БИОТЕХНОЛОГИЯ

1 Роль биотехнологии в охране окружающей среды.
2 Биотехнологическая переработка отходов.
3 Извлечение полезных веществ из отходов.

1. Роль биотехнологии в охране окружающей среды

С момента возникновения цивилизованного общества перед ним все время стояла проблема охраны окружающей среды. Из-за промышленной, сельскохозяйственной и бытовой деятельности человека постоянно происходили изменения физических, химических и биологических свойств окружающей среды, причем многие из этих изменений были весьма неблагоприятны. Ожидается, что биотехнология будет оказывать многообразное и все возрастающее влияние на способы контроля за окружающей средой и на ее состояние. Хорошим примером такого рода служит внедрение новых, более совершенных методов переработки отходов, однако этим применение биотехнологии в данной сфере отнюдь не ограничивается. Она будет играть все большую роль в химической промышленности и сельском хозяйстве и поможет хотя бы отчасти решить многие из существующих проблем.

Сегодня быстро развиваются многообразные отрасли промышленности, в которых процессы жизнедеятельности микробов используются для создания замкнутых систем, для контроля за загрязнением сточных вод, для использования альтернативных энергоресурсов и химического сырья в промышленности; эти процессы широко используются в сельском хозяйстве.

Для переработки отходов уже построены огромные биореакторы емкостью 4000-5000 м^3. Поскольку потенциал бактерий в таком реакторе может быть порядка 10^8-10^9 клеток в 1 мл, биотехнологи получают в свое распоряжение достаточно мощный источник «биологической энергии».

Биотехнологическая переработка отходов опирается на целый ряд дисциплин – биохимию, генетику, химию, микробиологию, химическую технологию и вычислительную технику. Усилия всех этих дисциплин концентрируются на трех основных направлениях:

1. деградация органических и неорганических токсичных отходов;
2. возобновление ресурсов для возврата в круговорот веществ углерода, азота, фосфора и серы;
3. получение ценных видов органического топлива.

2. Биотехнологическая переработка отходов

Тысячелетиями отходы деятельности человека перерабатывались естественным путем, при участии соответствующих микроорганизмов. В наиболее широко распространенных установках для очистки сточных вод выполняются четыре основные операции:

1. При первичной обработке удаляются твердые частицы, которые либо отбрасываются, либо направляются в биореактор.
2. На втором этапе происходит разрушение растворенных органических веществ при участии природных аэробных микроорганизмов. Образующийся ил, состоящий главным образом из микробных клеток, либо удаляется, либо перекачивается в реактор.
3. На третьем этапе (необязательном) производится химическое осаждение и разделение фосфора и азота.
4. Для переработки ила, образующегося на первом и втором этапах, обычно используется процесс анаэробного разложения. При этом уменьшается объем осадка и количество патогенов, устраняется запах, а кроме того, образуется ценное органическое топливо – метан.

Сходные процессы применяются при переработке промышленных сточных вод, особенно в химической, пищевой, целлюлозно-бумажной промышленности. Поэтому любые биотехнологические усовершенствования этих процессов находят немедленное применение в промышленности.

Такие усовершенствования могут быть направлены на увеличение мощности перерабатывающих установок, повышение выхода полезных побочных продуктов, на замену обычно применяемых синтетических химических добавок, устранение запаха и удаление металлов, а также не поддающихся переработке соединений.

Аэробная переработка стоков – это самая обширная область контролируемого использования микроорганизмов в биотехнологии. Отличительной особенностью аэробной биологической системы является свободный доступ воздуха к аэробным микроорганизмам, участвующим в превращении различных веществ, содержащихся в отходах, в относительно стабильные продукты. Аэробная переработка отходов включает следующие стадии:

1. Адсорбция субстрата на клеточной поверхности;
2. Расщепление адсорбированного субстрата внеклеточными ферментами;
3. Поглощение растворенных веществ клетками;
4. Рост и эндогенное дыхание;
5. Высвобождение экскретируемых продуктов;

6. «выедание» первичной популяции организмов вторичными потребителями.

В идеале это должно приводить к полной минерализации отходов до простых солей, газов и воды. Эффективность переработки пропорциональна количеству биомассы и времени контактирования ее с отходами.

Системы аэробной переработки можно разделить на системы с перколяционными фильтрами и системы с использованием активного ила.

Перколяционный фильтр был самой первой системой, примененной для биологической переработки отходов, причем его конструкция фактически не изменилась со времени создания в 1890 г. Эта система используется в 70% очистных сооружений Европы и Америки и обладает рядом преимуществ, которые состоят в простоте, надежности, малых эксплуатационных расходах, образовании небольших излишков биомассы и возможности длительного использования установки (в течение 30-50 лет).

Фильтрующими элементами в фильтрах являются гравий или пластмассы. Использование пластмасс позволяет применять такие системы для переработки некоторых промышленных стоков высокой концентрации. Другим важным преимуществом является то, что пластмассы – легкий материал, и это позволяет строить высокие, не занимающие много места очистные сооружения. Для создания оптимальной поверхностной площади, вентиляции и пористости пластмассы размалывают.

Основное изменение в конструкцию очистных сооружений было внесено в 1973 году (в Англии), когда был создан вращающийся биологический реактор. Он представляет собой вращающиеся «соты» из пластиковых полос, попеременно погружаемые в сточные воды и поднимаемые на поверхность. При таком способе увеличивается площадь поверхности, с которой может контактировать биомасса, и улучшается аэрация.

Основной недостаток перколяционного фильтра – избыточный рост на нем микроорганизмов; это ухудшает вентиляцию, ограничивает протекание жидкости и приводит в конечном счете к засорению фильтра и выходу его из строя.

Активный ил. Переработка отходов с помощью активного ила, осуществляемая сложной смесью микроорганизмов, была предложена в 1914 г. Этот процесс более эффективен, чем фильтрация, и позволяет перерабатывать сточные воды в количестве, в десять раз превышающем объем реактора. Однако он обладает рядом недостатков: бо-

лее высокими эксплуатационными расходами из-за необходимости перемешивания и аэрации; большими трудностями в осуществлении и поддержании процесса; образованием большого избытка биомассы. Несмотря на все это, процесс, использующий активный ил, остается наиболее распространенным методом переработки сточных вод в густонаселенных районах, поскольку требует меньших площадей, чем эквивалентная фильтрационная система.

Эффективность данного процесса можно повысить, изучив механизмы регуляции метаболизма в микрофлоре систем с активным илом. Регуляция биодеградации – это сложная задача. Однако, зная биохимию соответствующих процессов, можно вмешиваться в их регуляцию. Например, добавление к илу промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот в низких концентрациях (2-5 мг/л), глюкозы, аминокислот и витаминов (в частности, аланина и никотиновой кислоты) приводит к ускорению окисления ряда соединений.

Все возрастающая стоимость переработки отходов с помощью аэробного разложения и энергетический кризис, с одной стороны, и новые достижения микробиологии и технологии – с другой, возродили интерес к анаэробной переработке. При переработке органических отходов в анаэробных условиях образуется горючий газ и твердый остаток, содержащий азот и другие питательные вещества, содержащиеся в исходном растительном материале. В природе такой процесс развивается при недостатке кислорода в местах скопления веществ растительного или животного происхождения. Он может протекать и в закрытой емкости, наполненной подходящим органическим веществом, куда не поступает воздух. Метанообразующие бактерии и некоторые другие микроорганизмы, продуцирующие нужные этим бактериям субстраты, формируют в таких условиях систему прочных симбиотических отношений, которая может функционировать неопределенно долгое время, если в нее в подходящем количестве поступают все новые порции отходов. Самая распространенная технология анаэробной переработки – разложение ила сточных вод. Эта хорошо разработанная технология с успехом используется с 1901 г. Однако здесь существует ряд проблем, обусловленных малой скоростью роста облигатных анаэробных метанообразующих бактерий, которые используются в данной системе. К ним относятся также чувствительность к различным воздействиям и неприспособленность к изменениям нагрузки. Конверсия субстрата также происходит довольно медленно и поэтому обходится дорого.

Тем не менее, этот подход представляется перспективным с точки зрения биотехнологии; например, можно добавить к отходам фер-

менты для повышения эффективности процесса или попытаться усилить контроль за переработкой путем изменения тех или иных биологических параметров.

Анаэробная ферментация отходов или растительных культур, специально выращиваемых для получения энергии, очень перспективна для экономичного получения газообразного топлива при умеренных температурах (30-35 ^{0}C).

Для получения энергии и полезных побочных продуктов можно использовать самые разнообразные отходы и сырье. Некоторые страны, например Бразилия, Австралия и Новая Зеландия используют специально выращиваемые культуры в качестве источника топлива.

Сходные проекты обсуждаются и в некоторых европейских странах, например в Финляндии, Швеции и Ирландии.

В Англии работа по биоконверсии энергии проводится в рамках Программы по использованию солнечной энергии; за счет этой программы финансируются и проекты ЕЭС по получению энергии биологическими способами.

Множество подходов используется в США; например, одно очистное сооружение за счет биологической конверсии бытового мусора позволяет получать газ в количестве, достаточном для обеспечения им 12 тыс. домов.

Анаэробные ферментеры могут применяться также в целях получения промежуточных продуктов для химической промышленности (например, уксусной, молочной и акриловой кислот в качестве химического сырья, идущего на переработку).

3. Извлечение полезных веществ из отходов

Одна из главных задач технологии, связанной с окружающей средой, - это сохранение природных ресурсов путем повторного использования полезных веществ, содержащихся в отходах.

Некоторые разработки в этой сфере получили финансовую поддержку со стороны правительств и это принесло свои плоды, но все же пока выход конечных продуктов и стоимость повторного использования биомассы в широких масштабах таковы, что эта технология оказывается экономически невыгодной. Тем не менее, она находит применение при получении таких ценных продуктов, как масла, металлы, витамины и пептиды.

Получение полезных материалов из отходов имеет два аспекта: извлечение или концентрирование полезных веществ из отходов; превращение отходов в полезные материалы.

Вода. Воду можно рассматривать как возобновляемый ресурс. Однако, сравнивая стоимость необходимого для очистки оборудова-

ния со стоимостью водопроводной воды, очистку загрязненной органическими веществами воды обычно считают неэкономичной.

Повторное использование промышленных сточных вод экономично только в тяжелей промышленности: энергетика, сталелитейное производство, угледобывающая промышленность. Здесь можно применять не такую чистую воду, как питьевая, и поэтому свести к минимуму обработку сточных вод.

Основные трудности связаны с наличием соединений, не поддающихся переработке. Возможно, эту проблему удастся решить, используя микроорганизмы, которые приобрели способность разрушать такие соединения.

Удобрения. Потребность в более дешевых высококачественных белках животного происхождения непрерывно возрастает, а число работников сельского хозяйства все время уменьшается. Для разрешения этого противоречия нужно применять более интенсивные методы землепользования, и тогда можно получить все больше концентрированных отходов, которые применяются как удобрения.

Однако за последние 100 лет масштабы использования отходов животноводства в качестве удобрений уменьшились; на смену им пришли фосфорные и азотные удобрения, при получении которых используется ископаемое топливо. В странах Западной Европы значительную часть сельскохозяйственной продукции (до 40% от общей стоимости) получают именно за счет применения химических удобрений. Однако цены на такие удобрения все время растут, и становится экономически выгодным использование отходов животноводства в качестве органических удобрений.

Корма для животных. В результате человеческой деятельности и интенсивного животноводства образуется огромное количество отходов. При их переработке можно получить многие тонны активного ила.В процессе переработки отходов при участии микроорганизмов образуется много микробного белка, который можно повторно использовать как корм для скота, поскольку 30-40% сухой массы выросших клеток – это неочищенный белок. Однако бытовые и сельскохозяйственные отходы, по-видимому, непригодны для промышленного получения белка. Это связано с их низкой пищевой ценностью и с необходимостью получения продукта, свободного от токсичных веществ и патогенных микроорганизмов.

Идеальным результатом повышения качества ила сточных вод путем экстракции белка должен быть безвредный, чистый, экономичный корм для животных. Кроме того, в иле образуются и другие ценные биологические соединения, например аминокислоты и витамины.

Ключевые слова и понятия

активный ил аэробная переработка биодеградация отходов	биореактор микробный белок сточные воды

Вопросы для самоконтроля:

1. Роль биотехнологии в охране окружающей среды.
2. Основные направления биотехнологической переработки отходов.
3. Основные этапы очистки сточных вод.
4. Стадии аэробной переработки отходов.
5. Пепереработка отходов с помощью активного ила.
6. Очистка воды.
7. Получение удобрений.
8. Получение кормовых добавок для животных.

Лекция 7
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

1 Проблемы переработки промышленных отходов.
2 Отходы молочной промышленности.
3 Отходы целлюлозно-бумажной промышленности и производства красителей.
4 Биодеградация нефтяных загрязнений, пестицидов и поверхностно-активных веществ.

1. Проблемы переработки промышленных отходов

Промышленные отходы условно можно разделить на две категории:

1. Отходы производств, основанных на использовании биологических процессов (производство пищевых продуктов, напитков, ферментация).
2. Отходы химической промышленности.

В первом случае отходы имеют различный состав и обычно перерабатываются путем биологического окисления, как это делалось традиционно в случае бытового мусора. Однако такой способ экономически невыгоден, и в настоящее время широко обсуждается вопрос о возможности уменьшения объема разбавленных сточных вод либо их непосредственного использования – трансформации (для получения биомассы или других ценных продуктов).

В многочисленных и разнообразных отраслях химической промышленности образуется большое количество отходов, причем многие из них с трудом поддаются разрушению и длительное время присутствуют в среде. Поэтому часто перед обычной биологической переработкой отходов бывает необходимо провести их предварительную химическую или физическую обработку. Использование специфических микроорганизмов для расщепления ксенобиотиков при переработке отходов еще не нашло широкого применения в промышленности, однако такой подход представляется эффективным.

Рассмотрим методы биологической переработки промышленных отходов на примерах молочной, бумажной промышленности и производства красителей.

2. Отходы молочной промышленности

Сыворотка – является побочным продуктом сыроварения. Ее состав зависит от типа используемого молока и вырабатываемого сыра. В высушенном или концентрированном виде сыворотка применяется

в качестве корма для животных; однако ее недостатком является то, что она не сбалансирована с точки зрения содержания питательных веществ: в сыворотке слишком велика концентрация минеральных веществ и лактозы. Разработаны способы извлечения из сыворотки белков путем ультрафильтрации, осаждения или выделения с помощью ионного обмена. Из таких белков можно получать белковые гидролизаты, используя для этого ферментеры. После извлечения белков получают большие объемы фильтратов с высокими концентрациями лактозы (35-50 г/л), минеральных веществ, витаминов и молочной кислоты, и встает проблема дальнейшего их использования. Если превратить лактозу в молочную кислоту при участии молочнокислых бактерий, то получится источник углерода, который может сбраживаться дрожжами. После сбраживания не обязательно отделять микроорганизмы от среды, объем которой можно уменьшить и получить обогащенную белком сыворотку.

Из сыворотки получают не только белковые продукты, но и сырье для химической промышленности (например, этанол). Путем химического гидролиза лактозы с последующим удалением глюкозы из раствора с помощью ферментации можно получить галактозу. В результате гидролиза лактозы фильтрат становится более сладким; на опытных установках такой гидролиз осуществляется с помощью β-галактозидазы. Гидролизованный фильтрат не только находит применение в пищевой промышленности, но и может оказаться полезным при решении проблем, связанных с недостатком ферментов у некоторых животных и при непереносимости лактозы у человека. Из сыворотки получают и другие химические соединения: лактозу, лактулозу и лактобионовую кислоту.

3. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности и производства красителей

Волокнистый материал, применяющийся при производстве бумаги и других продуктов, получают как из древесных, так и из травянистых растений после химического расщепления лигнина. Однако этот процесс сопровождается большой потерей древесины и образованием огромного количества отходов.

В настоящее время применяют два процесса получения целлюлозной массы: щелочная и сульфатная варка целлюлозы.

Основной из них – щелочная варка, в результате которой образуется темная варочная жидкость. Эти отходы содержат трудно перерабатываемые ароматические продукты расщепления лигнина и низкомолекулярные органические кислоты (молочную, уксусную и муравьиную). Варочную жидкость не удается перерабатывать биологи-

ческими способами, которые могли бы применяться в промышленном масштабе; гораздо экономичнее упаривать эту жидкость и сжигать ее, получая таким образом энергию из отходов.

Сульфатная варка целлюлозы применяется реже; она дает отходы следующего состава: лигносульфаты с ароматическими элементами (60%), сахара (36%), уксусная кислота и метанол. Эти жидкие отходы – хорошее сырье для ферментации благодаря высокому содержанию в них углеводов.

Их ферментация в широких масштабах начата в 1909г. В настоящее время традиционным методом удаления сахаров и уксусной кислоты из таких отходов служит их ферментация при участии дрожжей.

Неподдающиеся переработке соединения можно концентрировать и сжигать. Лигносульфонаты применяют в качестве связывающих веществ и вспомогательных средств при бурении; щелочным окислением при повышенном давлении их можно превращать в ванилин.

Главное в переработке отходов целлюлозно-бумажной промышленности – это понижение энергозатрат, а какой химический принцип при этом используется – менее существенно. Основная экологическая проблема, порождаемая целлюлозно-бумажной промышленностью – это очистка сточных вод, а также обработка конденсатов, образующихся в испарителях и реакторах. Сточные воды осветляют путем нейтрализации и отстаивания, окисления в одно- или двухстадийных установках с активным илом, в аэрируемых отстойниках путем сочетания биологических и химических способов окисления. Эти методы пригодны для эффективного удаления соединений, подверженных биодеградации, а также токсичных производных фенола, однако они оказываются дорогими и неэффективными в случае производных лигнина, с трудом поддающихся переработке.

Отходы от производства красителей

Текстильная промышленность и производство красителей отправляют в отходы огромное количество красителей и пигментов. Они поступают в окружающую среду со сточными водами. С количественной точки зрения эти соединения не относятся к числу основных загрязнителей воды. Кроме того, эти отходы обычно не рассматриваются как токсичные или канцерогенные для рыб или млекопитающих (за исключением бензидина и катионных красителей).

Для очистки окрашенных сточных вод применяют химические методы. Удаление красителей и пигментов с помощью микробов весьма ограничено. Устранение этих продуктов из отходов с помо-

щью активного ила заключается в основном в адсорбции, а не в деградации. Степень их разложения микроорганизмами определяется растворимостью, ионными свойствами, а также природой заместителей и их числом. Оказалось, что микроорганизмы способны разлагать красители, но только после адаптации к значительно более высоким концентрациям, чем те, которые обычно обнаруживаются в сточных водах.

4. Биодеградация нефтяных загрязнений, пестицидов и поверхностно-активных веществ

Рассмотрим процессы биодеградации сложных смесей углеводов и их производных в средах, загрязненных нефтью. Источники таких загрязнений могут быть самыми разнообразными: промывка карабельных бункеров для горючего, аварии на танкерах в открытом море (основная причина нефтяных загрязнений окружающей среды), утечки в нефтехранилищах и сброс отработанных нефтепродуктов.

Сточные воды нефтяной промышленности обычно очищают биологическим способом после удаления большей части нефти физическими способами или с помощью коагулянтов. Токсическое воздействие компонентов таких сточных вод на системы активного ила можно свести к минимуму путем постепенной «акклиматизации» очистной системы к повышенной скорости поступления стоков и последующего поддержания скорости потока и его состава на одном уровне.

Самые большие утечки нефти в окружающую среду происходят в море, где она затем подвергается различным физическим превращениям, известным как выветривание. В ходе этих абиотических процессов, включающих растворение, испарение и фотоокисление, разлагается – в зависимости от качества нефти и от метеорологических условий – 25-40% нефти. На этой стадии разрушаются многие низкомолекулярные алканы. Степень микробиологической деградации выветрившихся нефтяных разливов определяется рядом факторов. Весьма важен состав нефти: относительное содержание насыщенных, ароматических, содержащих азот, серу и кислород соединений в различных типах нефти различно. Определенную устойчивость нефти придают разветвленные алканы и серусодержащие ароматические соединения.

Кроме того, скорость роста бактерий, а следовательно, и скорость биодеградации определяются доступностью питательных веществ, в частности азота и фосфора. Оказалось, что добавление этих веществ увеличивает скорость биодеградации. Количество разных организмов, способных расти на компонентах нефти, зависит от степени загрязненности углеводородами. Например, больше всего их находят поблизости крупных портов или нефтяных платформ, где среда посто-

янно загрязнена нефтью. Полная деградация нефти зачастую не происходит даже при участии богатых по видовому составу микробных сообществ. Основные физические факторы, влияющие на скорость разложения нефти - это температура, концентрация кислорода, гидростатическое давление и степень дисперсности нефти. Наиболее эффективная биодеградация осуществляется тогда, когда нефть эмульгирована в воде.

Особую проблему представляют выбросы или случайные разливы нефти на поверхности почвы, поскольку они могут привести к загрязнению почвенных вод и источников питьевой воды. В почве содержится очень много микроорганизмов, способных разрушать углеводороды. Однако даже их активность не всегда достаточна, если образуются растворимые производные или поверхностно-активные соединения, увеличивающие распространение остаточной нефти.

Биодеградация пестицидов

Выбросы отходов производства пестицидов сегодня строго контролируются; технология очистки сточных вод или их детоксикации хорошо разработана, хотя остается сложной и многообразной. Она включает сначала экстракцию пестицидов растворителями, а затем обычную биологическую обработку. Для ликвидации непредусмотренных выбросов, происходящих при утечках или промывке и замене контейнеров с пестицидами, подходящая технология пока отсутствует. Пестициды попадают в окружающую среду и в результате использования их для обработки сельскохозяйственных культур. Большинство пестицидов расщепляются бактериями и грибами. Превращение исходного пестицида в менее сложные соединения нередко осуществляется при участии сообществ микроорганизмов. Были описаны различные стадии и промежуточные продукты процессов деградации ДДТ, идущей, например, в ходе сопряженного метаболизма и приводящей к полной минерализации этого стойкого пестицида.

Часто из среды, содержащей ксенобиотик, можно выделить сообщества такого рода, в которых он служит не основным источником углерода, а источником фосфора, серы или азота. Чрезвычайно высокая токсичность пестицидов зачастую утрачивается на первой же стадии их модификации. Это позволяет разработать относительно несложные микробиологические способы их детоксикации. Например, в результате гидролиза может значительно уменьшиться токсичность пестицида или увеличиться вероятность биодеградации. Для этого хорошо было бы использовать внеклеточные ферменты, способные функционировать в отсутствие коферментов или специфических факторов и осуществлять детоксикацию разнообразных пестицидов.

Биодеградация поверхностно-активных веществ

По чувствительности к биодеградации синтетические поверхностно-активные соединения, применяемые в быту и в промышленности как моющие средства, можно разделить на «жесткие» и «мягкие». Анионные соединения этой группы, такие как алкилбензолсульфонаты, в конце 50-х гг. привлекли к себе внимание тем, что они загрязняют окружающую среду: это проявляется в образовании пены в водоемах.

Сначала в продажу поступали «жесткие» детергенты, усойчивость которым придавали их разветвленные алкильные боковые цепи. Чтобы предотвратить их накопление в природе, промышленность добровольно перешла к производству подверженных биодеградации, линейных неразветвленных алкилбензолсульфонатов. Разрушение этих поверхностно-активных соединений начинается с окисления концевых метильных групп, после чего за счет β-окисления идет расщепление линейных боковых цепей. Кольцевые структуры молекул обычно разрушаются только после полной биодеградации боковой цепи. Данный процесс осуществляется только в аэробных условиях, поскольку для начального окислительного этапа требуется кислород. Разветвленные молекулы не всегда оказываются устойчивыми, хотя процесс их β-окисления и затруднен. Механизм разрушения разветвленной цепи до конца не установлен. Связь углерод-сера является очень прочной, и это увеличивает биологическую инертность молекулы детергента. Реакции десульфирования детально не изучены, но скорее всего в них участвуют гидроксилазы или монооксигеназы.

Алкилсульфаты все еще используются как моющие средства на фабриках-прачечных и в косметической промышленности; основную их массу составляют первичные алкилсульфаты. Линейные сульфаты легко разрушаются, но этот процесс замедляется из-за наличия разветвленных участков. В первичной атаке этих молекул участвуют сульфатазы, образующие соответствующие спирты, которые подвергаются затем дальнейшему метаболизму. Для этого процесса кислород не нужен, и он может идти в анаэробных условиях.

Некоторые детергенты применяются в быту; поскольку они облегчают смачивание и способствуют образованию эмульсий, их с успехом используют при производстве аэрозолейдля сельского хозяйства и в косметической промышленности. Линейные первичные алкогольэтоксилаты минерализуются быстро и до конца, но более весокомолекулярные гомологи более устойчивы. Деградация осуществляется путем окисления концевых метильных групп и последующего β-окисления с образованием низкомолекулярных алканоатэтоксилатов,

лишенных поверхностно-активных свойств.

Имеющиеся в продаже детергенты редко содержат по весу более 30% поверхностно-активного соединения. К числу остальных компонентов относятся оптические отбеливатели, отбеливатели-окислители, вспомогательные пенообразователи, антикоррозийные добавки и ферменты. Основную массу составляет носитель (наполнитель). Наполнители нужны для:

1. Уменьшения концентрации свободного кальция и магния с целью предотвращения образования неорганических осадков; в противном случае выпадут в осадок соли щелочноземельных металлов и аниона детергента;
2. Диспергирования агрегатов почвенных частиц и стабилизации почвенных суспензий.

Наполнители должны иметь хорошую буферную емкость и не вступать в нежелательные реакции с другими компонентами смеси.

Ключевые слова и понятия

биодеградация	ксенобиотики
гидролизаты	органические пигменты
детергенты	пестициды
красители	сбраживание

Вопросы для контроля знаний:

1. Категории промышленных отходов.
2. Проблемы переработки промышленных отходов.
3. Технология переработки отходов молочной промышленности.
4. Продукты, получаемые из молочной сыворотки.
5. Технология переработки отходов целлюлозно-бумажной промышленности.
6. Переработка отходов от производства красителей.
7. Биодеградация нефтяных загрязнений.
8. Биодеградация пестицидов.
9. Биодеградация поверхностно-активных веществ.

Лекция 8
ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

1 Бродильное производство растворителей.
2 Производство органических кислот.
3 Производство аминокислот.
4 Получение ферментов.

Корни современной прикладной микробиологии и биотехнологии уходят в химическую промышленность начала XX века: именно тогда были разработаны основы промышленного производства ряда химических веществ (например, ацетона, этилового спирта, бутанола) из углеводов растений. На смену этой важной отрасли промышленности пришла быстро развивающаяся нефтехимическая промышленность. Однако сейчас запасы ископаемого сырья стали предметом конкуренции, так как оно требуется для производства химических веществ, энергии и даже пищевых продуктов; все это усугубляется повышением цен на нефть и уголь.

В таких условиях применение процессов нового типа при производстве химических веществ из возобновляемой биомассы становится все более перспективным.

Многообещающей областью дальнейшего развития представляется производство ценных веществ из растений путем массового культивирования клеток растений.

1. Бродильное производство растворителей

К числу важных бродильных производств относится получение ацетона и бутанола. Впервые в промышленном масштабе они были осуществлены в Манчестере Вейсманом в ходе первой мировой войны. Ацетон был необходим как метательное взрывчатое вещество в тяжелой артиллерии. До начала военных действий его экспортировали из Германии. Ацетон низкого качества получали путем сухой перегонки древесины.

Бродильный процесс (ферментация) был основан на переработке крахмала, концентрация которого составляла до 3,8%, анаэробными спорообразующими бактериями Clostridium acetobutylicum. Превращению подвергалось до 30% субстрата, в результате чего получалась смесь растворителей (60% бутанола, 30% ацетона, 5-10% этанола, изопропанола и мезитилоксида). Остальная часть субстрата превращалась в водород и углекислый газ.

Поскольку образовывались большие объемы газов, при крупно-

масштабном производстве перемешивания не требовалось, а главная сложность заключалась в гашении пены. В зависимости от штаммов отношение ацетон-спирт несколько варьировало. Многие микробы, разрушающие крахмал и способные образовывать растворители, могут также сбраживать мелассу при содержании сахара в среде до 6%.

Растворители отделяют от среды отгонкой. В конце первой мировой войны главную роль стало играть производство бутанола: он нашел применение при получении широкого круга веществ, включая мочевиноформальдегидные пластмассы, пластификаторы и тормозные жидкости. Побочный продукт, водород, стал использоваться в производстве синтетического метанола и для гидрогенизации пищевых масел; углекислый газ либо сжижали, либо превращали в сухой лед. Твердые вещества отходов содержали большое количество рибофлавина (витамина B_2), и их можно было использовать как богатую белком добавку к кормам.

После второй мировой войны бродильное производство растворителей сильно сократилось, так как уменьшилась относительная стоимость нефтехимических продуктов по сравнению с полимерами сахаров. Производство н-бутанола путем ферментации продолжалось только в ЮАР. Однако в настоящее время получение бутанола путем ферментации становится все более выгодным. Главный недостаток существующего метода – низкая устойчивость штаммов микроорганизмов к конечным продуктам и относительно низкий выход растворителей.

2. Производство органических кислот

Среди органических кислот самая важная – уксусная. На рынок США ее ежегодно поступает около 1,4 млн.т. общей стоимостью до 500 млн. долл. В прошлом основную часть уксусной кислоты получали путем микробиологического окисления этанола, но сегодня, за исключением производства уксуса, этот процесс по экономическим соображениям не применяется.

Техническая уксусная кислота используется при выработке многих химических веществ, включая каучук, пластмассы, волокна и инсектициды. При обычном способе производства микробиологическая конверсия этанола в уксусную кислоту при участии штаммов Acetobakter и Cluconobakter идет в аэробных условиях и поэтому, строго говоря, не является процессом брожения. Уксус по праву считается важнейшим продуктом микробиологической промышленности.

В конце XIX в. началось промышленное производство молочной кислоты при участии молочнокислых бактерий Lactobacillus

delbrueckii, L. leichmannii, L. bulgaricus. Это был один из первых процессов, где применялась частичная стерилизация среды нагреванием. Этот микроаэрофильный процесс осуществляется при высокой температуре (45-50 ^{0}C). в нем используют содержащее крахмал сырье, которое предварительно обрабатывают ферментами или подвергают кислотному гидролизу.

Lactobacillus bulgaricus активно сбраживает лактозу и может поэтому использовать молочную сыворотку в качестве субстрата. В других случаях конверсии подвергается сахароза.

Молочную кислоту используют в качестве добавки к безалкогольным напиткам, эссенциям, фруктовым сокам, джемам и сиропам, для декальцификации кож в дубильной промышленности, а также при производстве пластмасс. Соли молочной кислоты используются в медицине.

Производство лимонной кислоты методом ферментации также принадлежит к числу давних биотехнологических процессов: оно было налажено в 1893г. Его развитие шло в тесной связи с разработкой многих фундаментальных аспектов микробиологии. Вначале основные проблемы были связаны с микробным загрязнением. В поисках их решения было найдено, что процесс можно вести при очень низких pH, и это почти не сказывается на образовании кислоты грибами.

В промышленном производстве лимонной кислоты в основном используется Aspergillus niger, но применяется также и A. wentii.

Лимонную кислоту широко используют в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Эфиры лимонной кислоты применяются в производстве пластмасс. Поскольку лимонная кислота связывает металлы, ее используют для их очистки.

Схема получения некоторых органических кислот представлена на рисунке 5.

3. Производство аминокислот

Все аминокислоты, из которых состоят белки, являются L-α-аминокислотами. Они находят применение как пищевые добавки, приправы, усилители вкуса, как сырье в парфюмерной и фармацевтической промышленности и при производстве других веществ. Их можно получать как из природных продуктов (главным образом при гидролизе белков растений), так и путем химического, микробиологического или ферментативного синтеза.

Производство таких аминокислот, как L-глутамат, L-валин, DL-аланин, L-глутамин и L-пролин, при участии диких штаммов бактерий основано либо на использовании присущих этим бактериям осо-

бенностей метаболизма, либо на стимуляции образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды. Образовывать аминокислоты способны бактерии многих родов (Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Aerobacter, Microbacterium, Escherichia), причем они настолько продуктивны, что производство становится рентабельным. Так, виды Corynebacterium или Brevibacterium, выращиваемые на углеводном сырье, на этаноле при наличии достаточного количества биотина в среде способны синтезировать до 30 г/л глутамата.

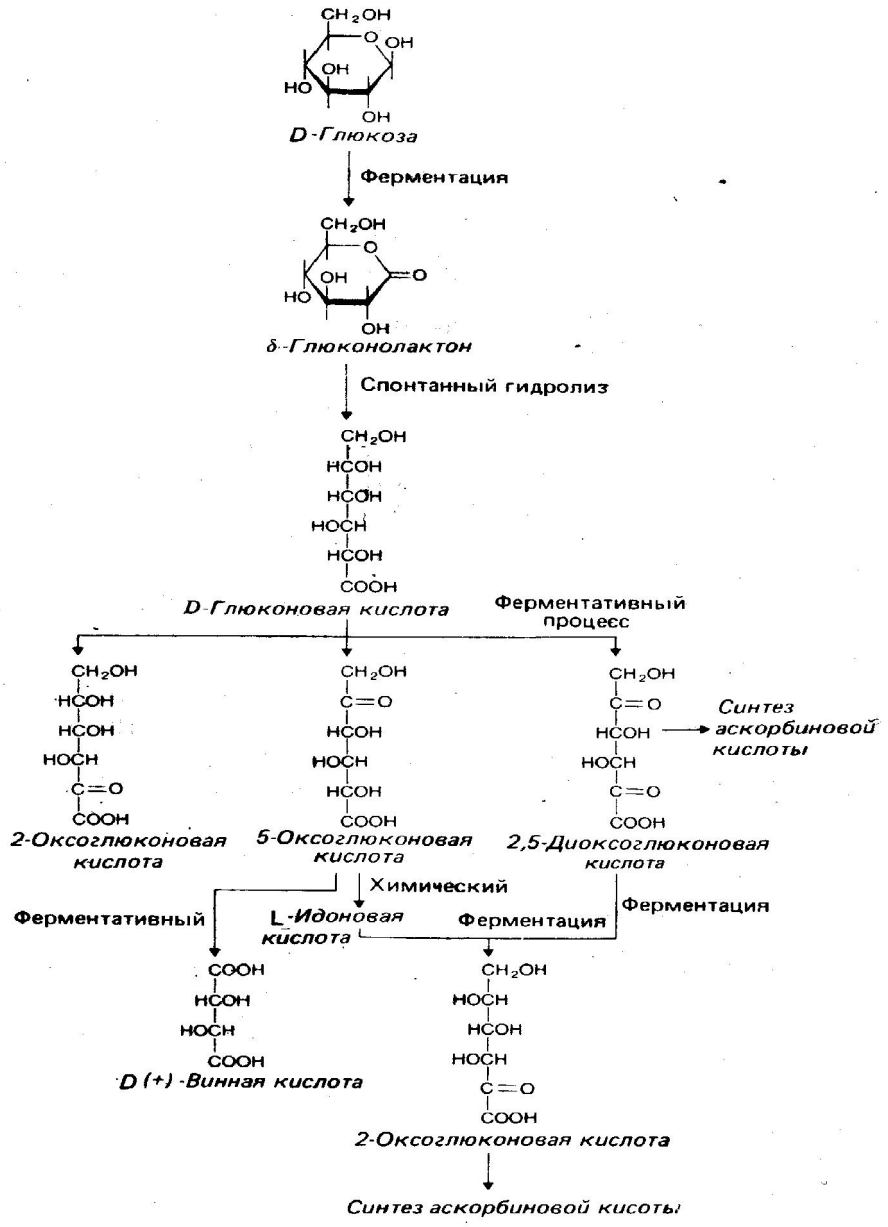


Рис. 5. Производство органических кислот из глюкозы

Применение аминокислот Аминокислоты находят применение во многих сферах:

1. Их используют в качестве пищевых добавок. Так, лизином, триптофаном и треонином обогащают растительные белки, а метионин включают в блюда из сои.
2. При выработке пищевых продуктов аминокислоты находят применение в поли усилителей вкуса и добавок. Благодаря выраженному мясному вкусу широко используется мононатриваевая соль глутаминовой кислоты. Глицин добавляют как подсластитель, бактериостатическое вещество и антиоксидант.
3. Аминокислоты применяются в медицине, а некоторые их аналоги используются для лечения психических заболеваний.
4. В химической и фармацевтической промышленности аминокислоты широко используются как предшественники в производстве детергентов, полиаминокислот (из них делают синтетические волокна и пленки), полиуретана и химикатов для сельского хозяйства.

4. Получение ферментов

Применение ферментов в химической технологии обычно бывает обусловлено их высокой избирательностью и стереоспецифичностью.

Протеиназы давно применяются в пищевой промышленности. Ранее ферменты для этих целей выделяли из животных и растений, сегодня их частично замещают протеазы микробов.

Первым ферментом, нашедшим применение в промышленности, была α-амилаза из Aspergillus oryzae, производство которой началось в 1890г. Эти препараты содержали значительную примесь протеазы, их рекомендовали использовать как средство, способствующее пищеварению.

Необходимо отметить, что производство и поступление на рынок такого рода продуктов было весьма ограниченным вплоть до начала 60-х годов, когда их стали использовать в составе детергентов. Однако, о такой возможности было известно за пятьдесят лет до этого; средства для замачивания белья, содержащие соду и панкреатические ферменты, продавались еще в 1913г. В конце 60-х годов приблизительно 50% всех деитергентов, выпускавшихся в Европе и США, уже содержали протеазы. Постоянно ведется работа по увеличению активности ферментов и стабильности их в моющих растворах.

Для выработки протеаз в промышленном масштабе нужны штаммы микроорганизмов, синтезирующие внеклеточные протеазы с высоким выходом. Эти ферменты подразделяют сегодня на три группы: сериновые, кислые и металлопротеазы.

Среди сериновых протеаз на первом месте стоит субтилизин Carlsberg. При участии Bacillus licheniformis ежегодно производится

около 500 тонн очищенного фермента. Сериновые протеазы гидролизуют белки до аминокислот. В стиральные порошки обычно добавляют 0,5% препарата, содержащего 3% активного фермента. Хотя содержание фермента в них и мало, при стирке он концентрируется на пятнах белковой природы из-за сродства к субстрату.

В состав металлопротеаз входит атом металла, обычно цинка, без которого фермент не активен. В промышленности металлопротеазы получают с помощью Bacillus amyloliguefaciens. Специфичность действия этих ферментов выше, чем у сериновых протеаз. Они применяются в пивоварении , при гидролизе белков ячменя, так как сериновые протеазы ингибируются веществами солода. Удаление с их помощью белков позволяет избежать помутнения пива при охлаждении.

Кислые протеазы синтезируются грибами. По свойствам они похожи на пищеварительные ферменты животных пепсин и ренин. Применяют их для гидролиза соевого белка при производстве соевого соуса, в хлебопекарной промышленности (с их помощью видоизменяют свойства клейковины муки так, чтобы получить мягкое, пластичное тесто, из которого делают бисквиты). Кислые протеазы применяют также как средства, способствующие пищеварению или же предотвращающие помутнение пива при охлаждении. Большинство протеаз вызывает свертывание молока, но творог получается невкусным, из-за глубокого гидролиза казеина.

Протеазы находят применение и в кожевенной промышленности, при удалении шерсти и умягчении кож. Такая обработка делает кожи мягкими и эластичными.

«Королевой» ферментов в промышленности можно считать глюкозоизомеразу, которая катализирует превращение глюкозы во фруктозу. Появление таких препаратов послужило толчком для развития крупного производства фруктового сиропа.

При высокой концентрации субстрата и нейтральной pH несладкая глюкоза с выходом 42-47% изомеризуется ферментом в более сладкую фруктозу. Такие фруктозные сиропы сегодня широко потребляются пищевой промышленностью. Запотентовано множество способов иммобилизации и использования как самой изомеразы, так и содержащих ее клеток. Процесс идет при 60-65 ^{0}C при pH 7,0-8,5 в присутствии ионов магния. При производстве насыщенного фруктозного сиропа из кукурузы в качестве субстрата используется либо глюкоза, либо продукт комплексной ферментативной обработки, заключающейся в ожижении и осахаривании крахмала.

Использование ферментов в производстве крахмала позволяет контролировать глубину его гидролиза и получать продукцию с же-

лаемыми свойствами: вязкостью, сладостью, осмотическим давлением и устойчивостью к кристаллизации. Гидролиз катализируется ферментами трех разновидностей: эндоамилазами, экзоамилазами и α-1,6-глюкозидазами.

Эндоамилазы – это α-амилазы, они расщепляют α-1,4-глюкозидные связи в амилазе и амилопектине с образованием олигосахаридов с разной длиной цепи.

При осахаривании используются термостабильные α-амилазы, особенно мальтогенные ферменты из грибов. Лучше всего они работают при 55 ^{0}C и концентрации субстрата 30-40%. Процесс обычно продолжается более 48 часов. Получаемые из крахмала сиропы содержат много мальтозы (40-50%); они применяются при производстве карамели и замороженных десертных блюд.

Для получения сиропов с очень высоким содержанием мальтозы (80%) мальтогенные экзоамилазы используются вместе с α-1,6-глюкозидазами.

Экзоамилазы расщепляют α-1,4-глюкозидные связи, а глюкогенные экзоамилазы гидролизуют α-1,6-глюкозидные связи в разветвленных молекулах олигосахаридов. Эти ферменты могут также катализировать полимеризацию глюкозы с образованием мальтозы и изомальтозы.

Глюкоамилазы применяются в основном в производстве концентрированного сиропа, из которого вырабатывают кристаллическую глюкозу или концентрированные фруктозные сиропы.

Технологии на основе культуры клеток и тканей

Растения издавна являются поставщиками химических соединений для самых разных отраслей химической промышленности. Это не только такое сырье как сахара, но и целый набор сложных вторичных метаболитов, например каучук, кокаин, красители, вкусовые добавки и пряности.

С проблемами биотехнологии растительных клеток можно познакомиться на примере организации промышленного производства первого вещества, полученного из культуры тканей растения. Известно, что корни растения Lithospermum erytrorhizon содержат шиконин и его производные. Данное вещество используется в Японии для лекарственных целей, так как обладает антибактериальной и противовоспалительной активностью. Шиконин является производным нафтохонина, имеет ярко-красный цвет и используется также как краситель. Выращивать такие растения в промышленном масштабе в Японии невозможно, поэтому их приходилось ввозить из Кореи и Китая. Стоимость чистого природного вещества составляла при этом 4500 долл.

за 1 кг.

Представилось заманчивым наладить его промышленное производство на основе культуры тканей растений. Ученым удалось выделить линии, накапливающие до 15% шиконина на сухую массу клеток. Последующая оптимизация среды позволила достичь тринадцатикратного увеличения продуктивности. Был разработан двухступенчатый процесс культивирования, в котором на первой стадии создавались оптимальные условия для наращивания биомассы, а на второй – для образования вторичных продуктов. Выход продукта из ферментера объемом 750 л. составляет 5 кг.,а стоимость его гораздо ниже, чем при получении из корней растений.

Методы культивирования тканей растений применялись и для улучшения сортов сельскохозяйственных культур: повышения их устойчивости к болезням и неблагоприятным условиям среды, увеличения содержания сахарозы и крахмала, повышения урожайности.

Таким образом, перспективы развития биотехнологии на основе растительных клеток представляются весьма многообещающими. Будет налажено производство новых лекарственных препаратов, подсластителей, средств защиты растений, веществ для косметической и парфюмерной промышленности.

Источником сырья для различных отраслей химической промышленности в обозримом будущем будут нефть и ее производные. Получаемые из них с малыми затратами продукты вряд ли потребуется производить при помощи какой-то другой технологии. Факторами, которые могут оказать сильное влияние на внедрение биотехнологии в эту область, являются истощение источников сырья, повышение стоимости энергии и постоянная необходимость эффективной переработки отходов.

Уменьшение доступных источников горючего приведет к тому,что все более широко будут использоваться ресурсы биомассы. Бродильные производства и технологии на основе ферментов будут и далее дополнять спектр обычных химических технологий.

Что касается применения биотехнологии в крупномасштабных производствах химических веществ или полимеров, то перспективы здесь весьма ограничены. С экономической точки зрения наиболее целесообразным представляется использование специфических преимуществ биотехнологических процессов в малообъемных производствах редких химических веществ с высокой прибавочной стоимостью.

Ключевые слова и понятия

аминокислоты	Лимонная кислота
ацетон	Молочная кислота
бутанол	протеиназа
глутамат	ферменты

Вопросы для самоконтроля:

1. Бродильное производство ацетона и бутанола.
2. Получение уксусной кислоты.
3. Производство лимонной кислоты.
4. Производство молочной кислоты.
5. Производство аминокислот.
6. Получение протеиназ.
7. Технологии на основе культуры растительных клеток и тканей (получение шиконина).
8. Факторы, влияющие на внедрение биотехнологии в химическую промышленность.

Лекция 9
МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

1 Биоэкстрактивная металлургия.
2 Биополимеры.
3 Биоповреждение материалов.

1. Биоэкстрактивная металлургия

Из всех микробиологических технологий меньше всего рекламируется и больше всего недооценивается применение микроорганизмов для экстракции металлов из минералов, для концентрирования и извлечения драгоценных металлов из растворов, а также для получения новых промышленных биоматериалов.

Еще за 1000 лет до н.э. римляне, финикийцы и люди других ранних цивилизаций извлекали медь из рудничных вод или вод, просочившихся сквозь рудные тела. В конце XYII в. валлийцы в Англии и в XYIII в. испанцы на месторождении Рио-Тинто применяли такой процесс «выщелачивания» для получения меди из содержащих ее минералов. Эти древние горняки и не подозревали, что в подобных процессах экстракции металлов активную роль играли бактерии.

Лишь в 50-е и 60-е гг. XX в. выяснилось, что в получении металлов из минералов решающую роль играют бактерии. В 1947 г. Колмер и Хинкл выделили из шахтных дренажных вод бактерию Thiobacillus ferrooxidans. Этот организм окислял двухвалентное железо и восстанавливал серусодержащие соединения и некоторые металлы.

Вскоре оказалось, что бактерия участвует и в переводе меди из рудных минералов в раствор.

Сейчас известны и другие микроорганизмы, активно участвующие в извлечении металлов из минералов:

Leptospirillum ferrooxidans – этот организм впервые был выделен в Армении, однако сейчас известно, что он встречается во многих местах, где осуществляется выщелачивание. Он может расти при 40 ^{0}C и при pH 1,2 на пирите (Fe S_2) и, по-видимому, окисляет только железо, не затрагивая серу. Этим он отличается от Thiobacillus ferrooxidans, который окисляет серу так же хорошо, как железо.

Thiobacillus thiooxidans – эти ацидофильные организмы окисляют только серу и ее соединения. Они могут участвовать в окислении серы, образующейся в результате химической реакции между ионами трехвалентного железа и сульфидами меди.

Обнаружены различные термофильные, окисляющие пирит, железо и серу бактерии, которые лучше всего растут при температуре

около 50 ^{0}C. Эта группа умеренных термофилов включает факультативных гетеротрофов и автотрофов, причем обнаруживаются все новые и новые организмы этого класса. Данные организмы могут играть существенную роль в выщелачивании саморазогревающихся минералов и угольных отвалов. Все упомянутые выщелачивающие бактерии переводят металлы в раствор различными путями. Окислительным процессом, катализируемым бактериями, является окисление железа:

$$4FeSO_4+O_2+2H_2SO_4 \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3+2H_2O$$

и окисление серы:

$$S_8+12O_2+8H_2O \rightarrow 8\ H_2SO_4$$

Ряд минералов непосредственно окисляется некоторыми выщелачивающими организмами. Примером может быть окисление пирита:

$$4FeS_2+15O_2+2H_2O \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3+2H_2SO_4$$

Проведены многочисленные исследования природы организмов, участвующих в процессах выщелачивания металлов. Результаты этих исследований показывают, в частности, что бактериальное выщелачивание может широко использоваться в горнодобывающей промышленности.

В настоящее время бактериальное выщелачивание, известное также как биогидрометаллургия, или биоэкстрактивная металлургия, применяются в промышленных масштабах для перевода в растворимую форму меди и урана.

Методы, использовавшиеся в XYIII в. для извлечения меди из руд выветрившейся породы, в основном сохранились до наших дней.

Выщелачивание отвалов развивается в США; оно используется для получения меди из бедных руд (содержание <0,4% меди по весу), а также из отвальных материалов с очень низким содержанием меди.

Такие отвальные материалы накапливаются при крупномасштабной открытой разработке руды. Отвалы, образующиеся в результате работы землеройной техники, имеют огромные размеры, достигая в высоту 300 и более метров.

Для начала процесса выщелачивания отвал смачивают водой, подкисленной серной кислотой до pH 1,5-3,0, путем ее распыления, полива или иньекции через трубы, помещенные вертикально внутри породы. Этот кислый раствор, или «выщелачиватель» просачивается сквозь бедную руду или отвальные материалы. Он содержит кислород и углекислый газ и создает благоприятную среду для размножения ацидофильных гиобацилл, широко распространенных в сульфидных

рудах. В некоторых случаях содержание Thiobacillus ferrooxidans превышает 10^6 клеток на 1 кг породы и на 1 мл выщелачивающегося раствора.

Поскольку при выщелачивании отвалов в среде развиваются природные тиобациллы, никакого засева не проводят. Проявлению необходимой активности микроорганизмов способствуют обеспечение кислотности отвала и обилие кислорода.

Из выщелачиваемых отвалов вытекают растворы, содержащие 0,75-2,2 г меди в 1 л. Эти растворы направляют в отстойники; медь из них получают путем осаждения с использованием железа или экстракцией растворителями. В первом случае создают условия, при которых растворы контактируют с железом и протекает следующая реакция:

$$CuSO_4+Fe^0 \leftrightarrow Cu^0+FeSO_4$$

«Отработанные» выщелачивающие растворы вновь поступают в отвал. В последние годы для получения меди из раствора начали применять экстракцию растворителями. Ионы меди из водной фазы экстрагируют органическими жидкостями, только частично растворимыми в воде. Затем медь извлекают из органического растворителя.

2. Биополимеры

Термин «биополимеры» относится ко многим высокомолекулярным соединениям (например, к нуклеиновым кислотам, полисахаридам и липидам), синтезируемым самыми разными организмами.

Более подробно рассмотрим образование полисахаридов.

Полисахариды служат источником энергии и структурными компонентами клеточных стенок и внеклеточных капсул. Многие из этих полимеров, имеющих коммерческую ценность как промышленные клеи, были получены из растительных тканей (экстракты семян и морских водорослей). Способность таких полисахаридов изменять свойства воды (вызывая образование геля и влияя на свойства водных растворов) привели к их широкому промышленному использованию в самых различных ситуациях.

Полисахаридные гидроколлоиды часто применяются в пищевой, фармацевтической, парфюмерной, нефтяной, бумажной и текстильной промышленности. Например, из красных водорослей производят в промышленных масштабах каррагенан и агар, а из бурых – альгинаты. Однако получение полисахаридов из растений и водорослей обладает своими недостатками:

1. Химический состав полисахаридов зависит от метаболических потребностей синтезирующих их организмов, связанных в свою

очередь с изменениями внешних условий (например, сезонные изменения, разные циклы развития растений, время их сбора и т.д.). Поэтому при производстве сырья невозможно обеспечить контроль за его качеством.

2. При переработке происходят изменение и разрушение продукта, поскольку такая переработка нередко включает грубые воздействия (щелочная экстракция, выщелачивание горячей водой, отбеливание). При этом конечный продукт может приобрести нежелательный запах и цвет.
3. Количество получаемого растительного продукта зависит от урожайности, погодных условий, заболеваний растений или загрязнения окружающей среды.

При получении полисахаридов из микроорганизмов обеспечивается контролируемый синтез полимеров и постоянство продукции. Кроме того, микробные полисахариды часто обладают уникальными физическими и химическими свойствами, улучшенными функциональными характеристиками. Микроорганизмы синтезируют множество полисахаридов в форме внеклеточных капсул или слизей, не связанных с клеточной стенкой. Как правило, в их состав входит небольшой набор моносахаридов (нейтральные гексозы, метилпентозы, кетосахара, аминосахара, уроновые кислоты), однако разное их сочетание дает полимеры с разнообразными физическими свойствами.

Необходимо отметить, что получение микробных полисахаридов – относительно дорогой процесс: для его осуществления требуются большие капиталовложения и энергетические затраты. Видимо, микробные полимеры не вытеснят окончательно крахмал и его производные из всех сфер их использования. Оценивая целесообразность промышленного производства того или иного полисахарида, следует учитывать следующие факторы:

1. Потенциальный объем годового производства продукта и спрос на него как в настоящее время, так и в будущем;
2. Уникальность свойств данного продукта по сравнению с другими микробными и растительными полисахаридами;
3. Экономичность производства и предполагаемую длительность применения продукта.

Для образования большого количества полимера требуется легкодоступный и дешевый источник углерода. Ферментация позволяет культивировать организм-продуцент в строго определенных условиях среды, контролируя, таким образом, процесс биосинтеза и влияя на тип продукта и его свойства. Специфически изменяя условия роста,

можно менять молекулярную массу и структуру образующегося полимера.

Обычно углеводными субстратами служат глюкоза и сахароза, хотя полисахариды могут образовываться и при росте микроорганизмов на керосине, метаноле, метане, этаноле. Недостатком проведения процесса в фермертерах является то, что среда часто становится очень вязкой, поэтому культура быстро начинает испытывать недостаток кислорода. Необходимо также контролировать быстрые изменения pH среды. Проблемы последующей обработки конечного продукта при синтезе полисахаридов связаны прежде всего с удалением микроорганизмов, что крайне важно, если этот продукт применяется в пищевой промышленности. Для разрушения бактерий используют литические и протеолитические ферменты, что в свою очередь приводит к дальнейшему загрязнению среды.

В настоящее время осуществляется промышленное производство ряда микробных полисахаридов (декстран, ксантан, гелланова смола, политран). Получение многих других находится на стадии разработки.

Ксантан синтезируется Xanthomonas campestris при росте на глюкозе, сахарозе, крахмале, кукурузной декстрозе. В качестве источников углерода могут использоваться промышленные отходы, например, сыворотка, образующаяся при выработке творога. Этот полимер построен из повторяющихся пятичленных блоков, содержащих Д-глюкозу, Д-маннозу, Д-глюкуроновую кислоту; к некоторым из них присоединены остатки уксусной и пировиноградной кислот. Молекулярная масса варьирует от $2 \cdot 10^6$ до $15 \cdot 10^6$. Ксантан был первым микробным полисахаридом, который начали производить в промышленном масштабе (1967г.). уникальные свойства ксантана предопределили его широкое применение в самых разных отраслях промышленности в качестве стабилизатора и средства для контроля за состоянием суспензий, гелеобразованием и вязкостью. Свойства этого полимера в сочетании с устойчивостью к нагреванию, кислотам, щелочам и присутствию катионов обеспечивают ему преимущества над другими смазками и ксантан широко используется при добыче нефти. Он применяется для повышения выхода нефти, где в сочетании с поверхностно-активными веществами и углеводородами служит в качестве агента, контролирующего вязкость жидкости, закачиваемой в нефтяные пласты.

В 1969г. было разрешено использовать ксантан в пищевой промышленности для улучшения вкусовых свойств консервированных и замороженных продуктов, приправ, соусов, быстро приготовляемых

продуктов, заправок, кремов и фруктовых напитков.

Ксантан нашел применение в производстве кормов, например консервированного корма для домашних животных, где он конкурирует с агаром. Простые и сложные эфиры ксантана применяют в косметике и в текстильной промышленности.

Альгинат. Источником альгинатов издавна служили морские водоросли (например Laminaria), однако по природе своей этот источник непостоянен. Среди бактерий близкие к альгинату гетерополисахариды образуют микроорганизмы рода Pseudomonas и Azotobacter.

Этот процесс осуществляют в промышленном масштабе, выращивая Azotobacter в условиях избытка кислорода.

В настоящее время альгинаты из растительных источников используются в основном в пищевой промышленности в качестве загустителей или гелеобразующих агентов. Их применяют для стабилизации йогурта, для предотвращения образования кристаллов льда при получении мороженого, их добавляют в приправы для салатов, поскольку эти соединения образуют гели только при pH ниже 3.

Политран. Политран представляет собой линейный β-1-3-глюкан, выделяемый грибом Sclerotium glucanikum и близкими к нему видами. Политран обладает псевдопластическими свойствами в широком диапазоне pH и температуры и нечувствителен к различным солям. Его применяют для повышения нефтедобычи, в керамических глазурях, латексных и типографских красках. В настоящее время намечается возможность промышленного получения и многих других полисахаридов. За последние несколько лет в выделении и производстве различных полимеров наблюдается быстрый прогресс.

3. Биоповреждение материалов

Под биоповреждением понимают «любое нежелательное изменение свойств какого-либо материала, вызванное жизнедеятельностью различных организмов». В широком смысле слова это поцесс, приводящий к уменьшению ценности материала. При этом имеются в виду те свойства данного материала, которые обуславливают его использование в определенных целях. По своей природе эти изменения могут быть механическими, физическими или касаться эстетических свойств материала и не обязательног приводят к его химическому разрушению. Последний момент важен для определения различий между биоповреждением и биоразложением. «Биоповреждение» - термин более широкий, «биоразложение» – относится только к разрушению какого-либо продукта (часто сырья).

Употребление слова «организм» предусматривает участие в этом

процессе представителей животного и растительного мира. Микроорганизмы как факторы биоповреждения широко изучались и широко представлены в литературе. Однако нельзя недооценивать роль насекомых, грызунов, зеленых растений (в том числе водорослей) и даже птиц.

Классификация биоповреждений:

Условно можно выделить три типа биоповреждений:

1. Механические: повреждение «несъедобных материалов (например, свинцовых труб, пластмассовых покрытий) грызунами, насекомыми. Повреждения дорожных покрытий и стен, вызванные растениями.
2. Химические:

- Ассимиляционные: использование в качестве источников питательных веществ субстратов, содержащихся в тех или иных материалах (например, целлюлозы древесины или кератина шерсти).
- Диссимиляционные: продуцирование организмами каких-либо продуктов (например, кислоты или токсичного вещества), вызывающих коррозию материалов или другие повреждения, в результате которых материал становится непригодным для использования.

3. Засорение и загрязнение: засорение трубопроводов, обрастание ракушками и водорослями корпуса судов, коррозия и потускнение декоративных покрытий и пластиковых занавесей в результате роста грибов не на самом материале, а на поверхностных загрязнениях.

Биоповреждение пищевых продуктов

В тех странах, где наиболее остро стоит продовольственная проблема, особенно велики и потери сырья после уборки урожая. В развитых странах продукты различными способами защищают от грибов, насекомых и грызунов, так что потери сводятся к минимуму. При хранении зерна необходимо использовать различные химические и физические способы защиты, например пестициды и высушивание. Много неприятностей причиняет присутствие микротоксинов в продуктах, которые были заражены грибами, часто на ранних стадиях хранения.

Это может приводить к браковке крупных партий зерна, тем более если оно используется в качестве корма. Особенно тщательной должна быть защита от заражения готовых продуктов. Упаковка может приводить как к подавлению роста микроорганизмов, так и к его стимулированию. Использование немногочисленных химических

консервантов регулируется в соответствии с их химической природой законодательным путем.

Ключевые слова и понятия

автотрофы	выщелачивание
биогидрометаллургия	гетеротрофы
биоповреждения	полисахариды
биополимеры	экстракция

Вопросы для самоконтроля:

1. История развития биоэкстрактивной металлургии.
2. Микроорганизмы, участвующие в извлечении металлов из минералов.
3. Окислительные процессы, катализируемые бактериями при выщелачивании металлов из минералов.
4. Применение полисахаридов.
5. Недостатки полисахаридов, полученных из растений.
6. Получение микробных полисахаридов.
7. Определение понятия «биоповреждения».
8. Классификация биоповреждений.
9. Биоповреждение пищевых продуктов.

Часть 2
ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Лекция 10
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

1 Структура наследственного материала.
2 Реализация генетической информации.
3 Свойства генетического кода.

1. Структура наследственного материала.

Молекулярная генетика исследует процессы, связанные с наследственностью на молекулярном уровне. Единицей генетической или наследственной информации является ген. Ген – это участок молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), несущей информацию об одной полипептидной цепи.

Особенности того или иного организма определяются специфичностью его белков. Именно они влияют на обмен веществ, жизнедеятельность и отдельные функции организма, такие, как развитие, восприятие внешних сигналов, движение и т.п. С молекулярной точки зрения белки реализуют все разнообразие генетической информации, именно они и наследуются. Белки состоят из аминокислот, которые соединены между собой пептидной связью. В состав белков входит 20 различных аминокислот. Информация о структуре каждого белка записана и хранится в молекуле ДНК.

Молекула ДНК – полимер, состоящий из двух цепочек нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, моносахарида дезоксиорибозы (рис.6) и остатка фосфорной кислоты. Азотистые основания в ДНК бывают четырёх типов: аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г) и цитозин (Ц). Вдоль нити ДНК азотистые основания прочно связаны между собой через моносахарид и остаток фосфорной кислоты (рис. 7), между цепочками – через водородные связи. В общей схеме ДНК напоминает лестницу.

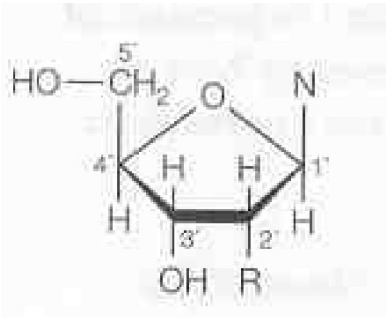


Рис. 6 Формула дезоксирибозы

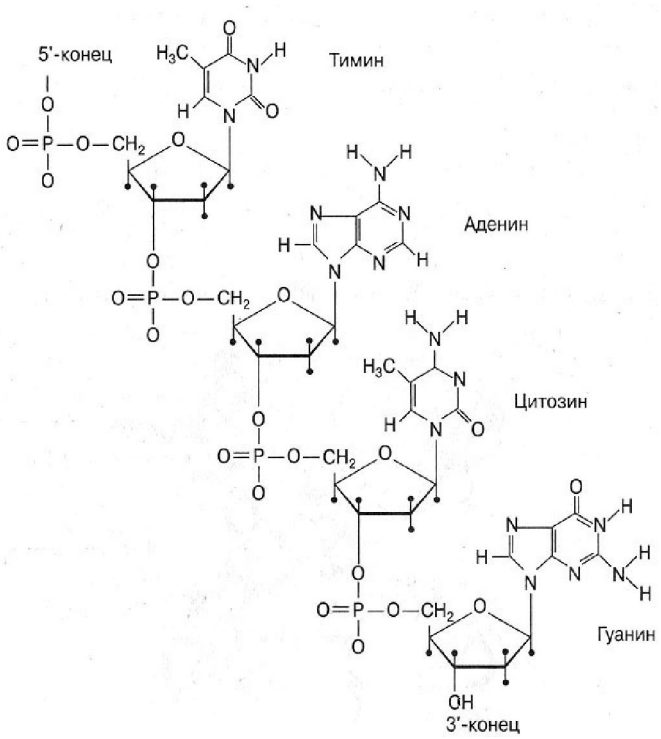


Рис. 7. Строение одной цепочки ДНК

Вся «лестница» ДНК закручена в спираль (рис. 8). Между двумя цепочками азотистые основания располагаются закономерно: аденин всегда против тимина, гуанин – против цитозина. Иными словами, аденин комплементарен тимину, гуанин – цитозину.

Молекулы ДНК обладают способностью к удвоению (реплика-

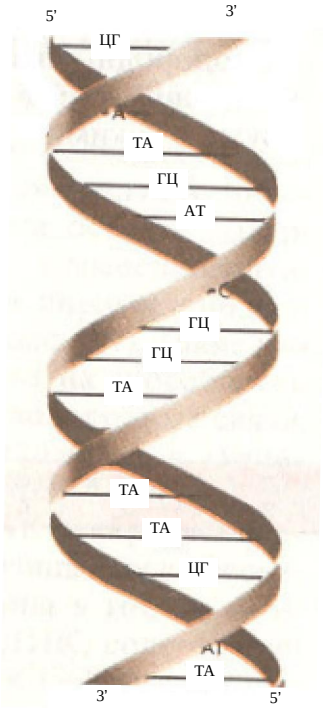


Рис. 8. Модель двухцепочечной структуры ДНК по Уотсону и Крику

ции). В основе процесса удвоения лежит принцип комплементарности.

Количественное соотношение нуклеотидов в молекуле ДНК известны в виде правил Чаргаффа:

1. $\Sigma A = \Sigma T$ или $\Sigma A / \Sigma T = 1$
2. $\Sigma Г = \Sigma Ц$ или $\Sigma Г / \Sigma Ц = 1$
3. $\Sigma(A + Г) = \Sigma(T + Ц)$ или $\Sigma(A + Г) / \Sigma(T + Ц) = 1$
4. Количество комплементарных оснований А + Т и Г + Ц у разных видов живых организмов различно. Отношение $\Sigma(Г + Ц) / \Sigma(A + T)$ является важнейшей характеристикой ДНК, как показатель специфичности её нуклеотидного состава.

Коэффициент специфичности у ДНК варьирует от 0,45 до 2,57 у микроорганизмов, от 0,58 до 0,94 у высших растений и от 0,54 до 0,81 у животных.

2. Реализация генетической информации.

Информация о расположении аминокислот в молекуле белка записана и хранится в ДНК в виде определённой последовательности нуклеотидов. Считывание информации с ДНК осуществляется с помощью рибонуклеиновых кислот (РНК). Процесс расшифровки начинается с синтеза информационной РНК (и-РНК). Информационная РНК – полимер, состоящий из одной цепочки нуклеотидов. В состав нуклеотидов также входят азотистые основания, моносахарид рибоза и остаток фосфорной кислоты. Азотистых оснований в РНК также четыре: аденин, урацил (У), гуанин, цитозин.

Информационная РНК по принципу комплементарности снимает информацию с ДНК. Этот процесс называется транскрипцией. Важно подчеркнуть, что и-РНК транскрибируется всегда только с одной цепочки ДНК в направлении от 3’ к 5’ концу (рис 9.)..

ДНК 5’– Т – Г – Г – Т – А – Т –3’
3’– А – Ц – Ц – А– Т – А –5’

и-РНК 5’– У – Г – Г – У –А – У –3’

направление транскрипции

Рис. 9. Схема строения ДНК и транскрипции и-РНК.

Следующий этап расшифровки генетической информации происходит на рибосомах (полисомах), где осуществляется синтез полипептидной цепи белков по матрице и-РНК. Этот процесс называется трансляцией. В нем кроме и-РНК также участвуют транспортные

РНК (т-РНК), функция которых состоит в том, чтобы доставить аминокислоты к рибосомам и найти им своё место в полипептидной цепи, предусмотренное кодом.

Следует отметить, что в ходе трансляции считывание генетической информации осуществляется с молекулы и-РНК в направлении от 5’ к 3’ концу цепочки.

Генетический код в настоящее время расшифрован для всех 20 аминокислот и составлен по и-РНК в виде таблицы (табл. 3).

В таблице 3 сокращенные названия аминокислот даны по международной терминологии. Обозначения аминокислот: Ала - аланин, Арг - аргинин, Асп - аспарагиновая кислота, Асн - аспарагин, Вал - валин, Гис - гистидин, Гли - глицин, Глн - глутамин, Глу - глутаминовая кислота, Иле - изолейцин, Лей - лейцин, Лиз - лизин, Мет - метионин, Про - пролин, Сер - серин, Тир - тирозин. Тре - треонин, Три - триптофан, Фен - фенилаланин, Цис -цистеин.

Таблица 3. Соответствие кодонов и-РНК аминокислотам

Основания кодонов					
первое	второе	третье			
		У	Ц	А	Г
У	У	Фен	Фен	Лей	Лей
	Ц	Сер	Сер	Сер	Сер
	А	Тир	Тир	–	–
	Г	Цис	Цис	–	Три
Ц	У	Лей	Лей	Лей	Лей
	Ц	Про	Про	Про	Про
	А	Гис	Гис	Глн	Глн
	Г	Арг	Арг	Арг	Арг
А	У	Иле	Иле	Иле	Мет
	Ц	Тре	Тре	Тре	Тре
	А	Асн	Асн	Лиз	Лиз
	Г	Сер	Сер	Арг	Арг
Г	У	Вал	Вал	Вал	Вал
	Ц	Ала	Ала	Ала	Ала
	А	Асп	Асп	Глу	Глу
	Г	Гли	Гли	Гли	Гли

3. Свойства генетического кода.

Генетический код триплетен, т.е. каждую аминокислоту кодируют три рядом стоящие нуклеотида (кодон). Триплеты УАА, УАГ и УГА являются стоп-кодонами.

Генетический код вырожден, т.е. 18 из 20 аминокислот кодируются более чем одним кодоном. Например, каждая из 5 аминокислот - пролин, треонин, валин, аланин и глицин, кодируются четырьмя различными кодонами, а лейцин, аргенин и серин – шестью (табл. 3).

Ключевые слова и понятия

молекулярная генетика	информационная РНК (и-РНК)
ген	транскрипция
дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)	рибосома
	трансляция
молекула ДНК	транспортная РНК (т-РНК)
нуклеотид	генетический код
репликация	триплет
принцип комплементарности	кодон
правила Чаргаффа	стоп-кодон
рибонуклеиновая кислота (РНК)	вырожденность кода

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое молекулярная генетика?
2. Строение ДНК и РНК.
3. Что такое гены?
4. Что такое репликация и какой принцип лежит в основе данного процесса?
5. Каким образом и где осуществляются процессы транскрипции и трансляции?
6. Как можно охарактеризовать генетический код?
7. Что такое стоп-кодоны?

Лекция 11

ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНОЙ ДНК

1 Принцип действия и функция рестриктаз.
2 Виды рестриктаз.
3 ДНК-лигаза.

1. Принцип действия и функция рестриктаз.

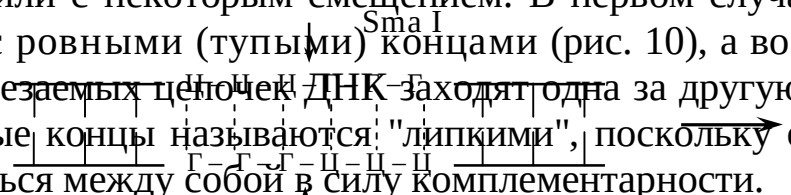
Для того чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него хотя бы один чужеродный ген. Причем, необходимо приготовить (сконструировать) фрагмент чужеродной днк содержащий этот нужный ген.

Осуществляется эта процедура с помощью двух операций "разрезания" и "сшивания". Роль портняжных инструментов играют ферменты рестриктазы и лигазы.

Рестриктазы (своеобразные молекулярные ножницы), действуя на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были распознаваемые участки. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом.

2. Виды рестриктаз.

Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4 – 6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с ровными (тупыми) концами (рис. 10), а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются "липкими", поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.



Ярким примером рестриктазы второго типа является EcoRI, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТТЦ, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А (рис. 11). В результате место разреза в одной це-

Рис. 10. а) схема действия фермента рестриктазы Sma I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; б) фрагменты ДНК с тупыми концами после разрезания ферментом SmaI.

пи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками.

Если с той же EcoR1 получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу “липкие концы” (рис.11). Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент - ДНК-лигаза. Он лигирует, то есть “сшивает“ между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК. Внешне она ничем не отличается от обычной ДНК. Сейчас в арсенале генных инженеров имеется более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах. Несколько рестриктаз и участки ДНК, которые они могут разрезать, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

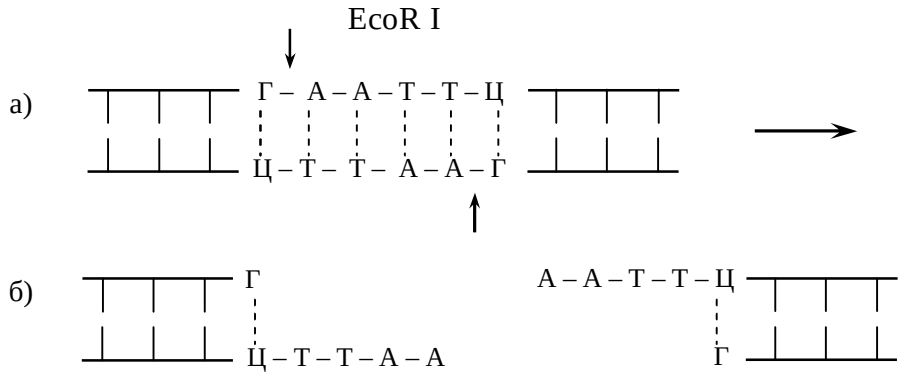


Рис. 11. а) схема действия фермента рестриктазы EcoR I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; б) фрагменты ДНК с липкими концами после разрезания ферментом EcoR I.

Рестриктазы	Участки распознования и места разреза ДНК
Bam I	5`-Г▼Г-А-Т-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Т-А-Г▲Г-5`
EcoR I	5`-Г▼А-А-Т-Т-Ц-3` 3`-Ц-Т-Т-А-А▲Г-5`
Hind III	5`-А▼А-Г-Ц-Т-Т-3` 3`-Т-Т-Ц-Г-А▲А-5`

Hae III	5`-Г-Г-▼Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-▲Г-Г-5`
Hpa II	5`-Ц-▼Ц-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Ц-▲Ц-5`
Sma I	5`-Ц-Ц-Ц-▼Г-Г- Г-3` 3`-Г-Г- Г-▲Ц-Ц-Ц-5`

С помощью этих и некоторых других ферментов многие исследователи начали конструировать и конструируют в настоящее время разнообразные по своим составным частям гибридные (рекомбинантные) ДНК.

Ключевые слова и понятия

ферменты рестрикции рестриктазы распознаваемые участки сайты рестрикции липкие концы ровные (тупые) концы EcoRI	Sma I Hind III ДНК-лигаза гибридные (рекомбинантные) ДНК конструирование ДНК

Вопросы для самоконтроля:

1. Какую функцию выполняют лигазы?
2. Что такое распознаваемые участки?
3. Приведите примеры известных вам рестриктаз.
4. Каким образом осуществляют разрезание фермент рестрикции EcoRI?
5. Что такое конструирование гибридных (рекомбинантных) ДНК?

Лекция 12

АНАЛИЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК (ДНКовых ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ)

1 Электрофоретический метод анализа ДНК в агарозном геле.
2 Построение рестрикционных карт ДНК.
3 Метод Саузерн-блот гибридизации.

1. Электрофоретический метод анализа.

При помощи набора ферментов рестрикции исследователи научились получать фрагменты ДНК разных размеров практически из любых видов. В ходе манипуляций с различными фрагментами ДНК часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Оказалось, что фрагменты ДНК легче всего разделять с помощью метода электрофореза в агарозном геле. ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, помещают в лунки застывшего агарозного геля, который помещается в специальную камеру для электрофореза (рис. 12). В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают перемещаться в пористом, похожем на мармелад геле. Скорость продвижения фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно выделить из геля без всяких повреждений и потери биологических свойств.

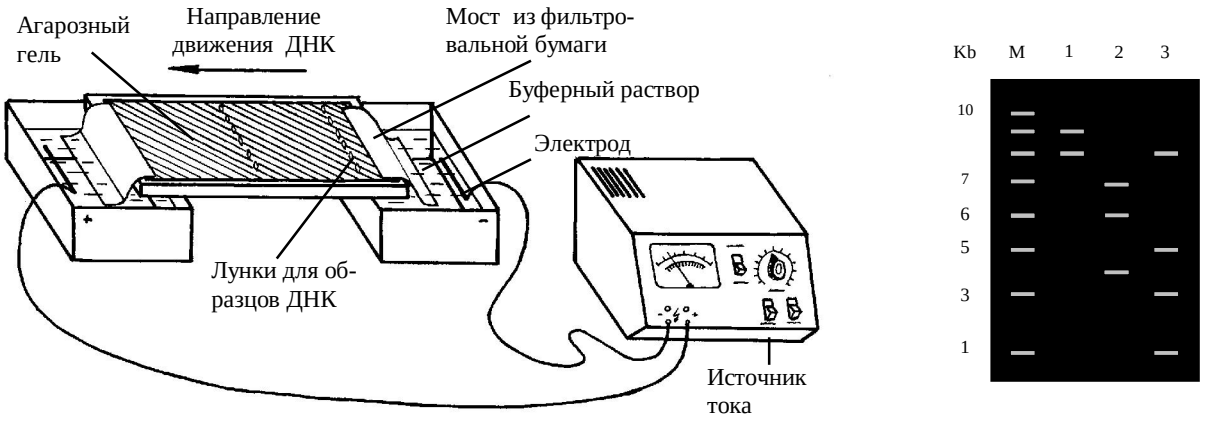


Рис. 12. Схематическое изображение камеры для электрофореза ДНК в агарозном геле. Справа представлена электрофореграмма фрагментов ДНК, окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФ свет. (М – маркеры, 1,2,3 – образцы одной и той же ДНК, разрезанные различными рестриктазами).

Если после электрофореза окрасить гель специальным красителем этидиум бромидом, связывающимся с ДНК и поместить гель под ультрафиолетовый свет, то на нем будут хорошо видны окрашенные в красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга светящиеся фракции ДНК. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК. Следует подчеркнуть, что разные рестриктазы дают разную картину расщепления одной и той же ДНК (электрофореграмма на рис. 12 справа). Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет разделить, а затем легко извлечь любые рестрикционные фрагменты ДНК в чистом виде, для последующего использования.

2. Построение рестрикционных карт ДНК.

Анализируя электрофоретические спектры ДНК на геле, наблюдая за исчезновением одних и появлением других фракций под действием разных рестриктаз, исследователи начали составлять генетические рестрикционные карты расположения участков ДНК для разных видов. Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса SV-40.

3. Метод Саузерн-блот гибридизации.

В 1975 году был разработан метод, который позволяет идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, денатурируются до одноцепочечных молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры (рис. 13). Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий специальный радиоактивно меченый ДНКовый зонд – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая фракции, гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (авторадиограмме) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Это метод получил

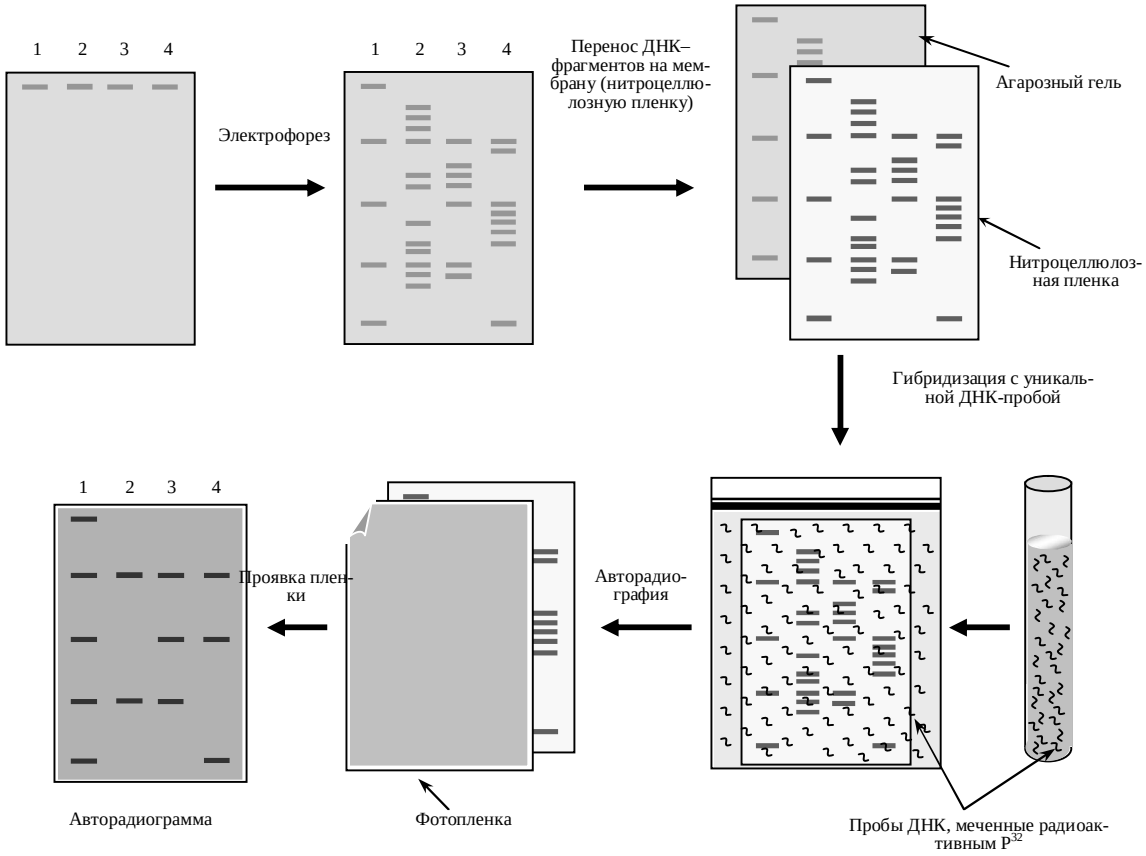


Рис. 13. Схематическое изображение основных этапов Саузерн-блот гибридизации.

название Саузерн-блот гибридизации в честь разработавшего его Эдварда Саузерна.

К настоящему времени удалось практически полностью расшифровать (прочитать) абсолютное большинство генов даже у таких сложных видов как человек и дрозофила. Для этих и многих других видов получено огромное количество различных ДНКовых зондов (проб), которые успешно используются в Саузерн-блот анализе.

Ключевые слова и понятия

ферменты рестрикции фрагменты ДНК манипуляции с фрагментами ДНК электрофорез в агарозном геле электрофоретическая камера скорость продвижения фрагментов краситель этидиум бромид разделение рестрикционных фрагментов ДНК	идентификация генов и рестрикционных фрагментов ДНК денатурация ДНК blotting нитроцеллюлозная мембрана радиоактивно меченый ДНКовый зонд Саузерн-блот гибридизация ДНК пробы фракции гибридизовавшиеся с ра-

выделение рестрикционных фрагментов ДНК из геля светящиеся фракции ДНК рестрикционные карты	диоактивно меченым зондом авторадиограмма Саузерн-блот анализ

Вопросы для самоконтроля:

1. При помощи какого метода можно разделить фрагменты ДНК?
2. В чем сущность метода электрофореза в агарозном геле?
3. Что такое генетические рестрикционные карты?
4. Что такое идентификация генов и рестрикционных фрагментов ДНК и каким образом её можно осуществить?
5. Когда и кем был разработан метод Саузерн-блот гибридизации и в чем его сущность?
6. Что такое денатурация ДНК?
7. Для чего применяют ДНКовый меченный зонд?

Лекция 13

ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРА – СПЕЦИАЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ДОСТАВКИ И КЛОНИРОВАНИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

1 Вектора и их применение.
2 Простейшие плазмидные вектора pSC101 и pBR322.
3 Плазмидные вектора усложненной конструкции.

1. Вектора и их применение.

С помощью ферментов рестриктаз и лигаз исследователи научились конструировать разнообразные по своим составным частям гибридные (рекомбинантные) ДНК, путём сшивки фрагментов разных видов in vitro.

Но как полученным гибридным генам попасть в клетку и начать там “работать” – производить белки?

Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые вектора. Вектор – это молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом vehicle – повозка.

Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались плазмиды, представляющие собой небольшие кольцевые молекулы ДНК, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают генами устойчивости к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (сайты рестрикции) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

2. Простейшие плазмидные вектора pSC101 и pBR322.

Первым успешным вектором-повозкой, который начали использовать в генной инженерии, стала кольцевая плазмида pSC101. Она несет только один участок расщепления (сайт рестрикции) рестриктазой EcoR1 и превращается под действием этого фермента из

кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Кроме того, она несет ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, а значит легко обнаруживается в бактериях, если их растить на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и клонирования первых гибридных (рекомбинантных) ДНК, которые были бы функционально активными, то есть могли бы стабильно существовать в клетке и наделять (трансформировать) ее новыми признаками. Этапы введения фрагмента чужеродной ДНК в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoR1 схематически показаны на рис. 14.

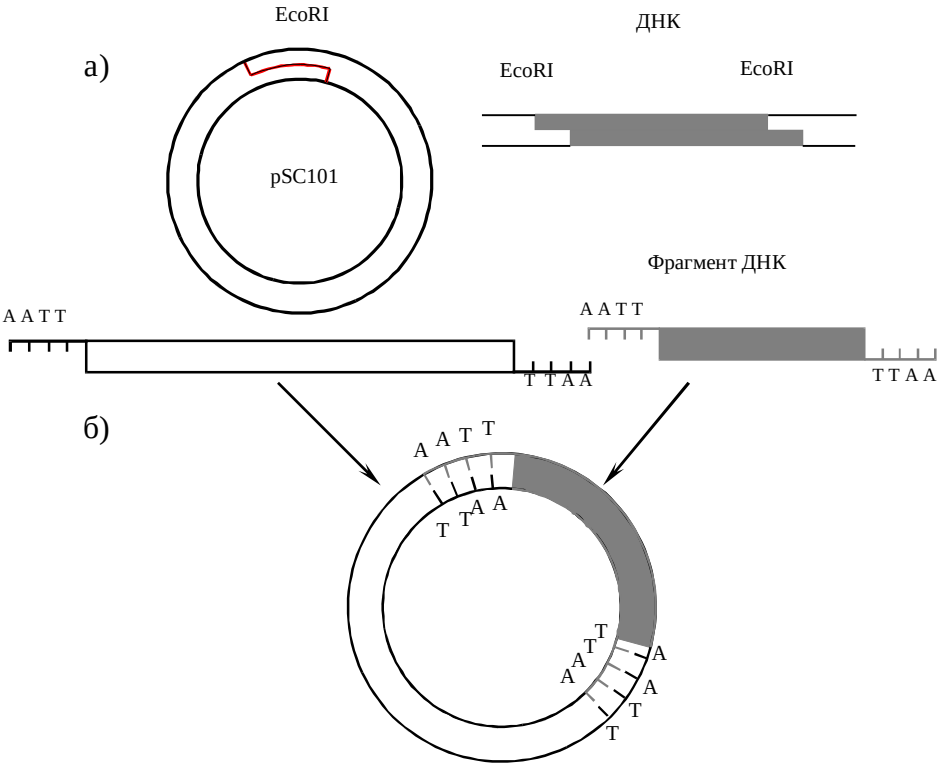


Рис. 14. Введение фрагмента рекомбинантной молекулы ДНК в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoRI, образующей «липкие» концы: а)—разрезание молекул ДНК рестриктазой и образование фрагментов с «липкими» концами; б) — гибридизация и сшивание ферментом лигазой фрагментов ДНК.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные вектора. Широкое распространение получила плазмида pBR322. У нее больше участков, разрезаемых различными рестриктазами, следовательно, с ней можно «сшивать» самые разные фрагменты ДНК. Более того, у pBR322 не один, а два маркера для селекции на бактериальных средах: помимо тетрациклина эта плаз-

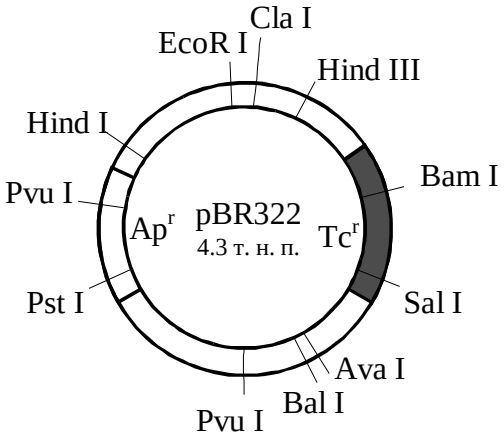


Рис. 15. Вектор pBR322, схема расположения сайтов рестрикции. Ap^r и Tc^r – гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину.

мида кодирует еще устойчивость к ампициллину (рис. 15). Если один из этих генов (например, ген устойчивости к тетрациклину) разрезать определенной рестриктазой, то при встраивании в это место фрагмента чужеродной ДНК целостность гена нарушается и определяемый им признак исчезает. Это позволяет легко отбирать гибридные плазмиды, специальным образом введённые в бактериальные клетки кишечной палочки E. coli при помещении их на твёрдую питательную среду с антибиотиками ампицилином и тетрациклином и на среду только с ампициллином. Трансформированные бактерии E. coli, т.е. содержащие гибридные плазмиды, растут на среде с ампицилином, но не растут на среде с двумя антибиотиками, потому что ген тетрациклиновой устойчивости в плазмиде повреждён вставкой. Селективный рост позволяет отбирать и выращивать только клетки, содержащие гибридные молекулы ДНК.

3. Плазмидные вектора усложненной конструкции.

Многие годы успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу pUC. На рисунке 16 представлена схема использования плазмиды pUC18. У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркёром является ген резистентности к ампициллину (amp^r). Кроме того, имеется крайне интересный ген lacZ, в котором расположен полилинкер или участок множественного клонирования длиной около 200 н.п., содержащий 10 сайтов рестрикции. В результате инсерции (вставки) чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена lacZ в плазмиде. Колонии бактерий содержащие нормальный и повреждённый вставкой гены легко различаются если поместить клетки в чашки Петри на среду содержащую субстрат X-

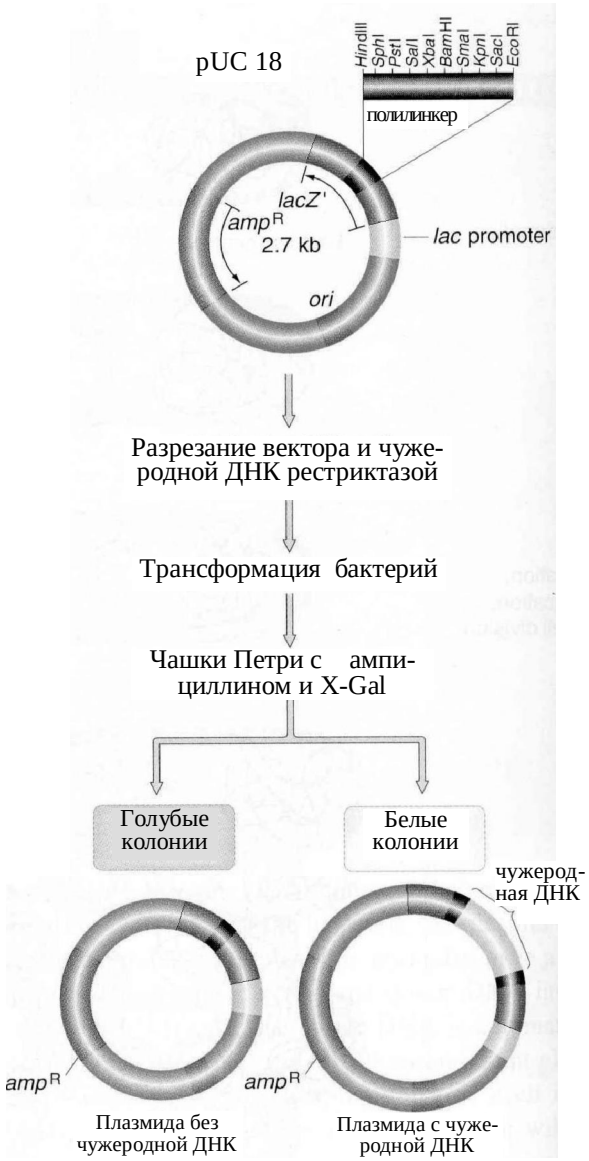


Рис. 16. Схема использования плазмиды pUC18 в ходе клонирования фрагмента чужеродной ДНК

Gal, который расщепляется ферментом β-галактозидазой (продукт гена lacZ), с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Если образовались колонии, окрашенные в синий цвет, значит, в этих бактериальных клетках плазмиды не содержат вставки чужеродной ДНК. В тоже время бактериальные клетки, которые содержат плазмиды со встроенной ДНК, образуют неокрашенные колонии. Следовательно, достаточно лишь взглянуть на трансформированные бактериальные клетки и можно с уверенностью сказать успешно ли прошло клонирование вставленной в плазмиду pUC18 чужеродной ДНК или нет. Поэтому гены подобные lacZ получили название репортерных.

Помимо плазмид в качестве векторов стали успешно использо-

вать фаги и вирусы. Позже были созданы космиды – особый тип векторов, сочетающих свойства плазмиды и фага.

Таким образом, последовательна была создана основная триада элементов техники генной инженерии: выделение генов, «сшивание» их с вектором, доставка гибридной структуры в конкретный (реципиентный) организм, где она сможет размножаться и наследоваться в потомстве.

Ключевые слова и понятия

рестриктазы и лигазы вектор плазмиды кольцевые молекулы ДНК чужеродная ДНК самостоятельная репликация клонирование экспрессия гены устойчивости трансформация участок расщепления сайт рестрикции pSC101 pBR322	маркер для селекции pUC18 lacZ полилинкер участок множественного клонирования X-Gal β-галактозидаза фаги вирусы космиды реципиентный организм трансформированные организмы репортерные гены

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое вектора и какое применение они находят в генной инженерии?
2. Что такое плазмида?
3. Каковыми свойствами должны обладать плазмиды как вектора.
4. Опишите плазмиду pSC101.
5. Опишите плазмиду pBR322.
6. Опишите плазмиды типа pUC.
7. Какие существуют виды векторов.

Лекция 14

ФАГОВЫЕ И КОСМИДНЫЕ ВЕКТОРА И СОЗДАНИЕ ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК

1 Получение векторов с использованием фага λ.
2 Строение космид.
3 Создание генных библиотек и их использование, получение к-ДНК.
4 Методы скрининга.

1. Получение векторов с использованием фага λ.

В принципе не составляет труда получить тысячи химерных плазмид, каждая из которых содержит специфический фрагмент, например ДНК человека, мыши или дрозофилы и посредством скрининга большого числа таких плазмид исследовать весь геном любого из этих организмов. Однако, как оказалось плазмиды, содержащие большие вставки хромосомной ДНК не стабильны и при репликации постепенно уменьшаются в размерах. Это связано с тем, что генетический материал ненужный для размножения плазмиды неизбежно утрачивается.

Большие фрагменты хромосомной ДНК (размером около 15 кб) нестабильные в составе плазмид становятся весьма стабильными при встраивании их в специально сконструированные штаммы фага λ. ДНК этого фага сравнительно невелика, гены его хорошо изучены и размножается он в бактериальных клетках очень интенсивно.

При получении λ векторов используется то обстоятельство, что вся центральная часть молекулы ДНК фага λ не нужна для репликации в E. coli, а функционирует только при интеграции фаговой ДНК в бактериальную хромосому (в состоянии лизогении). Были сконструированы специальные штаммы λ, в ДНК которых сайты для EcoR1 расположены таким образом, что правый и левый концевые фрагменты фаговой ДНК, необходимые для репликации остаются нетронутыми. После расщепления с помощью EcoR1 эти концевые фрагменты благодаря их сравнительно большим размерам легко отделить от всех остальных EcoR1-фрагментов и использовать затем для получения новых λ-подобных фагов, каждый из которых содержит левый и правый концевые фрагменты, а также вставку чужеродной ДНК размером около 15 кб. Удобным оказалось то обстоятельство, что для созревания фага λ его ДНК должна иметь длину около 45 кб, благодаря чему при конструировании химерных ДНК in vitro для последующего размножения отбираются только те из них, которые содержат оба конца фаговой ДНК и вставку чужеродной ДНК подходящего

размера, т.е. около 15 кб. Этапы клонирования фрагмента ДНК мыши длиной 15 кб в бактериофаге λ, с использованием рестриктазы EcoR1 и соответствующих сайтов рестрикции в геномах фага и мыши представлены на рис. 17.

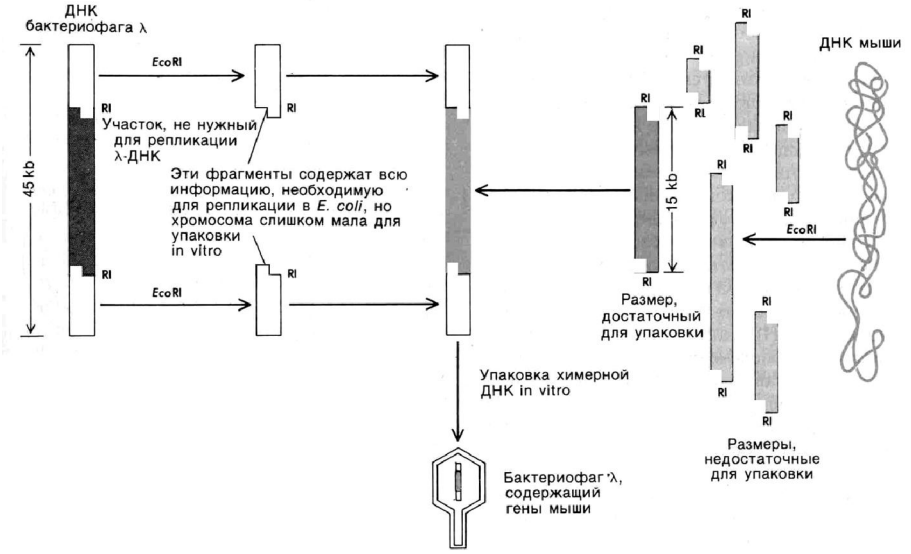


Рис. 17. Клонирование генов ДНК мыши в бактериофаге λ, с использованием рестриктазы EcoR1 и соответствующих сайтов рестрикции в геномах фага и мыши.

Многие гены эукариот оказались длиннее 15 кб, а некоторые достигают 35-40 кб. Кроме того, клонирование в фаге λ обычно не позволяет выделить два соседних гена в виде единой молекулы рекомбинантной ДНК. Поэтому клонирование значительно более длинных фрагментов ДНК в E. coli проводится в космидах.

2. Строение космид.

Космиды - это искусственные конструкции, созданные на основе плазмид и фага λ. Космида имеет последовательность ori, позволяющую ей реплицироваться в E. coli, селекционный маркёр amp^r, полилинкер (сайт множественного клонирования) и так называемые cos-сайты встроенные из фага λ (рис. 18). Cos-сайты представляют из

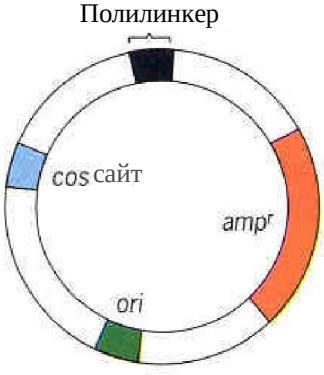


Рис. 18. Структура типичного космидного вектора, объединяющего свойства фага λ и плазмиды.

себя расположенные на обоих концах молекулы ДНК фага λ комплементарные одноцепочечные участки величиной 12 нуклеотидов, благодаря которым линейная форма фага соединяясь со своим соседом через cos-сайт образует длинную цепь из сотен фаговых ДНК или конкатамер. Ферменты, катализирующие упаковку фаговой ДНК узнают в конкатемере два cos-сайта находящихся на расстоянии 35-45 кб выщепляют расположенную между ними ДНК и упаковывают её в головку фага. Поэтому, когда в относительно небольшую космиду, несущую cos-сайты, встраивается чужеродная ДНК размером 35-45 кб, молекула достигает необходимой длины что бы упаковаться в фаговую частицу. Затем полученные фаги, несущие вставленную чужеродную ДНК вводятся в клетки E. coli для последующего размножения (клонирования).

3. Создание генных библиотек и их использование, получение к-ДНК.

На следующем этапе развития генной инженерии учёные начали включать в векторы все гены различных организмов. Иными словами они начали создавать генные банки или генные библиотеки.

Генные инженера, раздробив с помощью определённой рестриктазы (техника «дробовика») суммарную ДНК конкретного организма на фрагменты, добавляют к ним вектор, обработанный той же рестриктазой, и всю эту смесь используют для трансформации бактерий. Обычно в каждую рекомбинантную клетку имеет шанс попасть одна молекула ДНК, представляющая собой гибрид вектора и какого-нибудь одного из многих фрагментов присутствовавших в смеси. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. Набор клонов бактерий содержащих различные рекомбинантные молекулы, включившие все возможные фрагменты ДНК определённого организма и составляют геномную библиотеку (банк генов). Техника «дробовика» позволила получить набор клонов бактерий или гибридных фагов различающихся по включённым фрагментам ДНК. Уже в 1974 г. Д. Хогнес с сотрудниками создали геномную библиотеку дрозофилы в клетках E. coli. Через два года американцы Л. Кларк и Д. Карбон стали владельцами библиотеки всех генов самой бактерии E. coli. Вслед за этим были получены геномные библиотеки ряда других организмов, включая человека.

Допустим, что у нас уже есть геномная библиотека какого-то животного, скажем морской свинки. Мы получили эту библиотеку выделив из клеток свинки ДНК, расщепив её подходящей рестриктазой на фрагменты, встроив эти фрагменты в вектор и введя полученную рекомбинантную ДНК, например в E. coli. Но в какую из тысяч транс-

формированных клеток E. coli попал интересующий нас ген? Для решения этой задачи поиска иголки в стоге сена, в настоящее время применяются так называемые кДНКовые зонды, которые представляют собой радиактивно меченную ДНК характерную для конкретного гена.

Но сначала учёные научились выделять в достаточных количествах мРНК отдельных генов. Дело в том, что практически все мРНК эукариот на своих 3' концах содержат последовательность poly(A). Эта поли(А) последовательность предоставляет прекрасную возможность для синтеза ДНК комплементарной мРНК. Если смешать с мРНК короткие oligo(dT), они будут гибридизоваться с poly (A) и послужат затравками для работы фермента обратная транскриптаза (рис. 19). Этот интересный фермент открытый Тёминым и Балтимором использует РНК как матрицу для синтеза комплементарной цепи ДНК или кДНК (cDNA). Необходимо отметить, что она соответствует только структурной части гена, которая кодирует его белковый продукт, а регуляторные части гена в кДНК не представлены.

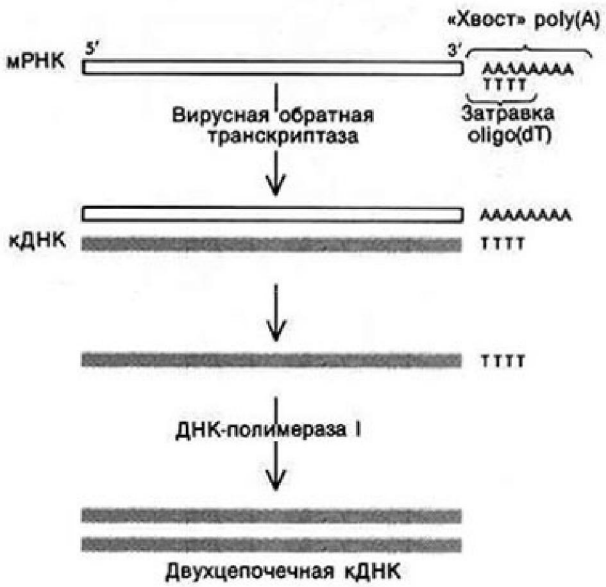


Рис. 19. Синтез двухцепочечной кДНК на мРНК. С poly(A) «хвостом» мРНК гибридизуют короткий фрагмент oligo(dT). Этот - фрагмент служит затравкой для обратной транскриптазы, которая использует мРНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК. Оставшуюся мРНК разрушают обработкой NaOH, и с помощью ДНК-полимеразы I завершают синтез второй цепи ДНК, в результате чего получается двухцепочечная молекула кДНК.

Полученная с помощью обратной транскриптазы двухцепочечная молекула кДНК встраивается затем в плазмиду либо с помощью «хвостов» достроенных концевой трансферазой, либо путём пришивания к концам кДНК искусственных сайтов рестрикции. Эти сайты, так называемые линкеры представляют собой последовательности,

состоящие из 8-10 нуклеотидных пар химически синтезированных олигонуклеотидов. Линкеры пришивают к двухцепочечной кДНК с помощью ДНК-лигазы, а затем расщепляют их рестриктазой, и кДНК, содержащую теперь липкие концы встраивают в плазмиду разрезанную той же рестриктазой. Затем, полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК вводят в клетки соответствующего штамма E. coli, где она размножается.

4. Методы скрининга.

В настоящее время разработаны специальные методы скрининга (поиска), позволяющие с помощью кДНК используемых в качестве зондов обнаруживать нужные гены, хранящиеся в геномных библиотеках. Чаще всего геномная библиотека хранится в E. coli в виде набора бактериальных колоний, каждая из которых содержит различный фрагмент геномной ДНК. Если в чашках Петри к поверхности плотной среды, на которой посеяны различные колонии E. coli, хранящие геномную библиотеку приложить фильтр из нитроцеллюлозы каждая колония разделится – часть останется на чашке, а часть отпечатается на фильтре (рис. 20). Под действием раствора щелочи бактерии на фильтре лизируются, а ДНК распадается на однонитчатые цепочки. После того как фильтр прогреют при высокой температуре в вакуумной печи, цепи ДНК прочно свяжутся с нитроцеллюлозой. Затем на фильтр наносят радиоактивно меченную кДНК интересующего гена. Меченный кДНК-зонд будет комплементарно гибридизоваться только с фрагментом геномной ДНК содержащим искомый ген. Если на нитроцеллюлозный фильтр положить рентгеновскую плёнку, то местоположение метки можно определить по участкам затемнения.

Рис. 20. Идентификация бактериальных колоний, содержащих плазмиду со вставкой фрагмента геномной ДНК. Конструируют библиотеку геномной ДНК, например в pBR322 и трансформируют ею E. coli, после чего получают «реплику» образовавшихся колоний на нитроцеллюлозном фильтре. Бактерии с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности, гомологичные последовательности меченого зонда, гибридизуются и выявляются радиоавтографически. Затем на исходной чашке отыскивают колонию, локализованную там же, где и соответствующая колония на фильтре-реплике.

Этот метод называемый ДНК-ДНК гибридизацией даёт возможность узнать в какой колонии бактерий находится наш ген. Колонии отбирают, выделяют из неё ДНК и анализируют. Убедившись, что нужный ген «пойман», решают, как изучать его строение, определить функции, как заставить его работать в новых хозяевах и нельзя ли улучшить его свойства.

Ключевые слова и понятия

химерные плазмиды	суммарная ДНК организма
большие вставки хромосомной ДНК	трансформация бактерий
штаммы фага λ	набор клонов бактерий
λ вектор	набор клонов гибридных фагов
центральная часть ДНК фага λ	геномная библиотека дрозофилы
лизогения	библиотеки всех генов E. coli
концевые фрагменты фаговой ДНК	кДНКовые зонды
созревание фага λ	последовательность poly(A)
геном фага λ	короткие oligo(dT)
геном мыши	обратная транскриптаза
клонирование в фаге λ	ДНК полимераза 1
космиды	комплементарная цепь ДНК
последовательность ori	кДНК (cDNA)
селекционный маркёр amp^r	структурная часть гена
полилинкер	регуляторная часть гена
cos-сайты	линкеры
конкатамер	двухцепочечная молекула кДНК
головка фага	концевая трансфераза
генные банки	методы скрининга
геномные библиотеки	фильтр из нитроцеллюлозы
техника «дробовика»	лизирование
	меченный кДНК-зонд
	ДНК-ДНК гибридизация

Вопросы для самоконтроля:

1. Каков недостаток плазмид как векторов?
2. Как конструируются специальные штаммы λ?
3. Назовите этапы клонирования фрагмента ДНК.
4. Что такое космиды и каково их строение?
5. Что такое cos-сайты.
6. Как происходит составление геномных библиотек?
7. Что такое кДНКовые зонды какое применение они находят?
8. Как происходит синтез кДНК?
9. Что такое скрининг и какое он имеет применение?
10. Как осуществляется скрининг?

Лекция 15

ГЕННАЯ ДАКТИЛОСКОПИЯ И ПОЛНЫЙ СИКВЕНС (ПРОЧТЕНИЕ) НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

1 Минисателлитная ДНК.
2 Генная дактилоскопия.
3 Методы сиквенирования фрагментов ДНК.

1. Минисателлитная ДНК.

В геноме каждого человека имеется так называемая минисателлитная ДНК. В основе её строения лежит строгая последовательность состоящая из 13 нуклеотидов. Цепочка одной минисателлитной ДНК может насчитывать таких повторяющихся последовательностей от одной до нескольких тысяч. У людей имеется два и более десятков минисателлитных цепочек расположенных на разных хромосомах. В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК различающихся по длине. Было обнаружено, что для каждого человека характерен свой, присущий только ему вариант набора таких тандемно повторяющихся последовательностей отличающихся по длине, то есть по числу отдельных звеньев. Иными словами ситуация оказалась сходной с отпечатками пальцев человека у каждого имеется собственная минисателлитная ДНК. Поэтому и метод анализа фрагментов минисателлитной ДНК получил название генной дактилоскопии (фингерпринт ДНК).

2. Генная дактилоскопия.

Технология генной дактилоскопии включает ряд хорошо разработанных и уже рассмотренных нами методов. Сначала из каких либо клеток выделяют ДНК и с помощью рестриктаз разрезают её на фрагменты разной длины. Среди фрагментов естественно будут те, которые содержат вариабельные минисателлиты. Далее проводится стандартный Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле и фракции содержащие минисателлитную ДНК выявляются с помощью специального меченого зонда комплементарного к звену из 13 повторяющихся нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, то он засвечивает ренгеновскую плёнку только в определённых местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам. Схематическое изображение этапов использования вариабельно-

го числа тандемных повторов (VNTRs, variable number tandem repeats) при проведении фингерпринта ДНК, взятой у двух мужчин Василия и Михаила представлена на рис. 21.

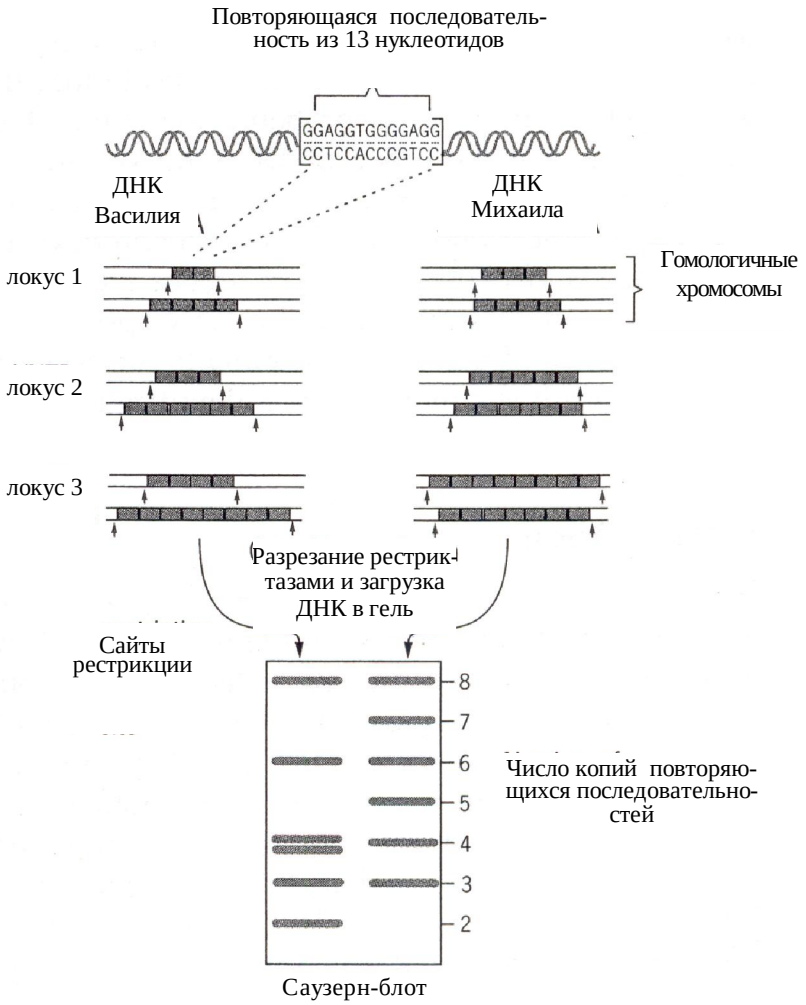


Рис. 21. Упрощенная схема использования вариабельного числа тандемно повторяющихся последовательностей в проведении фингерпринта ДНК.

Для двух людей картина на авторадиограмме существенно отличается как по числу, так и по расположению и интенсивности фракций. Чем более родственны анализируемые особи, тем число совпадающих полос после фингерпринта ДНК будет больше и наоборот. Полностью совпадающие спектры минисателлитной ДНК выявляются только у однояйцевых близнецов. Следует добавить, что метод фингерпринта минисателлитной ДНК обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или нескольких волосяных луковиц. Ниже рассмотрен пример успешного применения этого метода в криминалистике.

Так несколько лет назад в ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружена капля крови принадлежащая убийце.

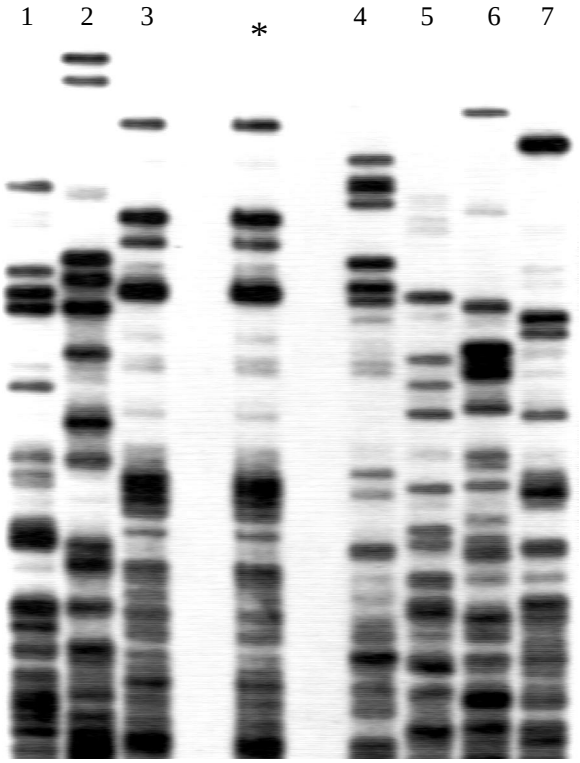


Рис. 22. Фингерпринт спектров минисателлитной ДНК образца капли крови убийцы и семи подозреваемых в преступлении.

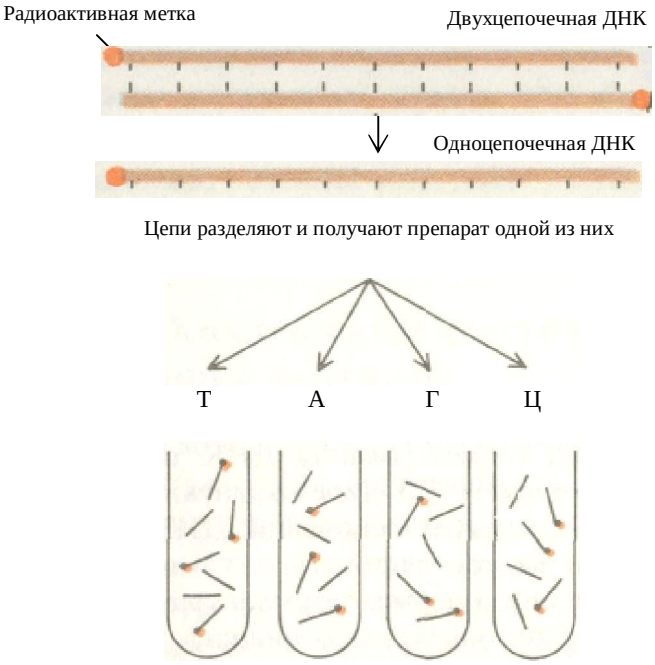
Спектры ДНК данной капли крови, а также семи подозреваемых, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 22. Спектр ДНК образцов капли крови, оставленный преступником на радиограмме отмечен звёздочкой, а спектры семи подозреваемых - цифрами.

Исходя, из представленных спектров ДНК после фингерпринта легко определить, кто из семи подозреваемых является предполагаемым преступником. Это может быть только человек образцы ДНК которого представлены на дорожке № 3, поскольку только здесь все фракции полностью совпадают со спектрами ДНК капли крови предполагаемого преступника, которую удалось обнаружить на месте преступления. В тоже время подозрение в совершении преступления с других шести человек на основании полученных молекулярно-генетических данных можно снять.

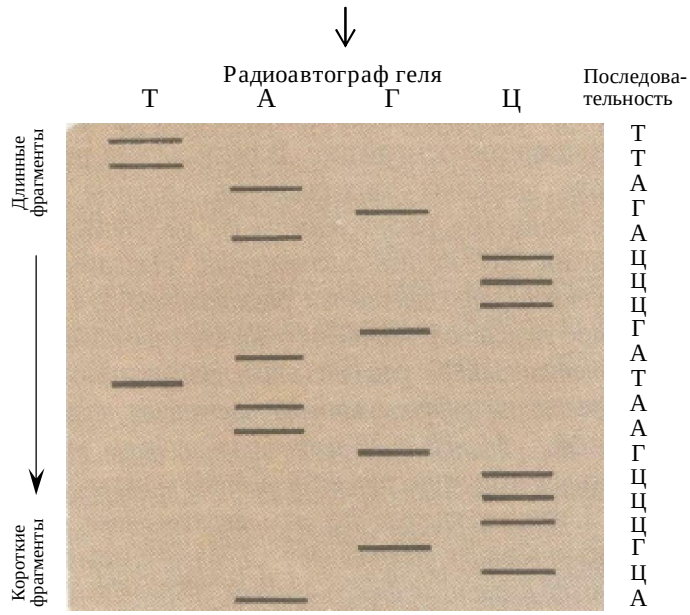
3. Методы сиквенирования фрагментов ДНК.

Фингерпринт, Саузерн блоттинг и другие методы анализа рестрикционных фрагментов ДНК дали возможность сделать много важных открытий в генной инженерии, но настоящим успехом стала разработка методов сиквенирования фрагментов ДНК длиной 100-500 нуклеотидных пар. Первый прямой метод определения последовательности ДНК был предложен Ф. Сэнгером в 1975 г. Он основан на элонгации ДНК при помощи фермента ДНК-полимеразы. Этим способом была быстро сиквенирована короткая ДНК фага φx174, длиной 5,4 кб. Столь же мощный метод сиквенса ДНК был разработан А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. в Гарвардском университете. С его помощью менее чем за год удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).

Метод сиквенирования ДНК по Максамому-Гилберту заключается в следующем. Один из концов фрагмента ДНК, последова-



Химическим путем разрушают одно из четырех оснований, в результате чего происходит расщепление цепи в соответствующих точках. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы в каждой точке расщеплялись только некоторые из цепей; при этом получается набор фрагментов разной длины



С помощью электрофореза в геле фрагменты разделяются по размеру; те из них. которые содержат радиоактивную метку, оставляют «отпечатки» на рентгеновской пленке. По положению этих отпечатков можно определить, какое именно основание было разрушено при образовании каждого из радиоактивных фрагментов

тельность которого нужно прочитать (секвенировать) метят с помощью ^{32}P. Препарат меченой ДНК делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Например, если остатки Г находятся на расстоянии 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов от меченого конца, как в случае рассмотренном на рисунке выше, то обработка данной цепи ДНК реагентами, разрушающими Г, приведёт к образованию меченых фрагментов длиной 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов (при этом, естественно образуются еще и фрагменты длинной 3 и 4 нуклеотида, но эти фрагменты расположенные между остатками Г будут не меченными). Наборы меченых фрагмен-

тов, образующихся при каждой из четырёх реакций подвергают электрофорезу в соседних дорожках полиакриламидного геля, при этом происходит разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами. Затем проводят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской плёнке, «читают», определяя таким образом нуклеотидную последовательность ДНК. Так в примере представленном на рисунке стр. 109 последовательность цепочки ДНК от меченого конца будет следующая АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ.

Для анализа последовательностей ДНК широко используется также метод Сэнгера основанный на использовании дидезокси нуклеотидов.

На рис. 23 приведена радиоавтография полиакриламидного геля, полученного в результате сиквенирования по методу Сэнгера небольшого фрагмента ДНК важного гена человека длиной 50 нуклеотидных пар.

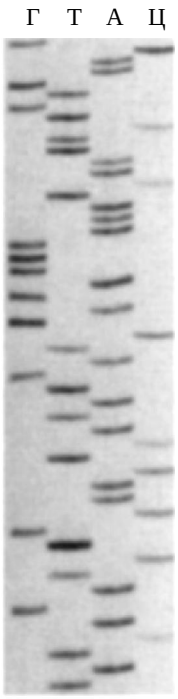


Рис. 23. Схема радиограммы сиквенса ДНК человека

Исходя из электрофоретического спектра ДНК представленного на радиограмме (рис. 22) можно легко определить нуклеотидную последовательность данного фрагмента уже рассмотренным нами способом. Так, просиквенированный фрагмент ДНК важного гена человека будет иметь следующую последовательность своих 50 нуклеотидов: ТАТЦАГАТЦТГЦААЦТЦАТАТГАТЦГАГАГГГАААТЦАТТЦТГТГААЦГ.

В последние годы вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК используются флюорисцентное окрашивание. Флюорисцентные красители разного цвета применяются для каждого из четырёх нуклеотидов и четыре смеси электрофорезируются вместе. Флюорисцентный анализ позволяет определять последовательность ДНК автоматически, что даёт возможность прочитывать более 1000 нуклеотидных пар за одну операцию.

Часто для анализа используется и митохондриальная ДНК. Известно, что она передаётся потомкам только с яйцеклеткой, т. е. наследуется по материнской линии. Анализ нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК позволил установить истину в одной почти детективной истории. Долгие годы многие верили, что некая Анна Мэнехен является Анастасией, спасшейся от смерти дочерью русского царя Николая II и его жены Александры (рис. 24). Другие же считали Анну Мэнехен самозванкой. Однако однозначных

Рис. 24. Семья последнего российского императора Николая II. Царица Александра Фёдоровна вверху справа, Анастасия и Алексей сидят обнявшись.

объективных доказательств своей правоты ни та, ни другая сторона предоставить не могли.

Ниже приведён фрагмент нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) Анны Мэнехен, её племянника Карла Маучера, а также герцога Эдинбургского, который является племянником последней русской царицы Александры – матери Анастасии.

Если бы Анна Мэнехен действительно была принцессой Анастасией, то её мтДНК была такой же, как у всех родственников последней русской царицы Александры, включая её племянника герцога Эдинбургского. И короткий фрагмент проанализированной мтДНК у неё был бы ТТЦЦТЦ. Но фрагмент её мтДНК имеет другой состав и полностью совпадает с мтДНК её истинного племянника Карла Маучера, все предки и родственники которого никогда не имели родственных связей с королевскими семьями Европы, в том числе с семьёй последнего русского царя Николая II.

	Фрагмент митохондриальной ДНК					
Анна Мэнехен	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
Карл Маучер (племянник Мэнехен)	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
герцог Эдинбургский (племянник Александры)	Т	Т	Ц	Ц	Т	Ц

Следовательно, исходя из полученных молекулярно-генетических данных по сиквенсу короткого фрагмента митохондриальной ДНК можно однозначно утверждать, что Анна Мэнехен не являлась принцессой Анастасией.

Таким образом, в последние годы разработанные технологии и методы генной дактилоскопии и сиквенирования нуклеотидных последовательностей ДНК, рассмотренные выше становятся широко доступными и с успехом применяются не только в молекулярной генетике и других биологических науках, но и в таких практических областях как криминалистика, медицина, санитарная эпидемиология.

Ключевые слова и понятия

минисателлитная ДНК строгая последовательность из 13 нуклеотидов	методы сиквенирования фрагментов ДНК метод определения последователь-

минисателлитная цепочка тандемно повторяющиеся последовательности генная дактилоскопия гипервариабельные минисателлиты фингерпринт ДНК участки минисателлитной ДНК отличающиеся по длине	ности ДНК элонгация ДНК ДНК-полимеразы сиквенирование ДНК по Максамому-Гилберту препарат меченой ДНК набор меченых фрагментов «чтение» нуклеотидной последовательности ДНК

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое минисателлитная ДНК?
2. Опишите технологию генной дактилоскопии.
3. Применение генной дакитлоскопии?
4. Что такое сиквенирование ДНК?
5. Метод определения последовательности ДНК Ф. Сэнгера.
6. Метод определения последовательности ДНК, разработанный А. Максамом и У. Гилбертом.

Лекция 16

АМПЛИФИКАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)

1 Характеристика метода ПЦР и его основные стадии.
2 Использование ПЦР в диагностике наследственных заболеваний.
3 ПЦР и направленный сайт-специфический мутагенез.

1. Характеристика метода ПЦР и его основные стадии.

Несмотря на то, что методы исследования наследственного материала (нуклеиновых кислот) все время совершенствовались, тем не менее для анализа структуры ДНК требовалось определенное количество клеточного материала. Например, даже при использовании такого чувствительного метода, как фингерпринт, требуется наличие капли крови или другого эквивалентного количества образца животной или растительной ткани, содержащих в клетках достаточное для анализа количество копий ДНК.

Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан Кэри Мюллисом. Этот метод получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР) и стал неотъемлемой процедурой, освоенной во всех генно-инженерных лабораториях мира. Использование ПЦР методики позволяет амплифицировать (размножать) ДНК или её фрагмент in vitro увеличивая количество копий в миллионы раз за несколько часов. ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимераза (Tag-полимеразы), набора всех четырех нуклеотидов А, Т, Г и Ц и коротких олигонуклеотидных затравок – праймеров. Праймеры – это короткие, длиной в 20-30 нуклеотидов, одноцепочечные фрагменты ДНК, комплементарные 3’-концевым последовательностям копируемой ДНК-матрицы. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован Tag-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к 3’-концам праймеров и достраивающие их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 25).

1. Дена т урация. Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы образуется две одноцепочечные.

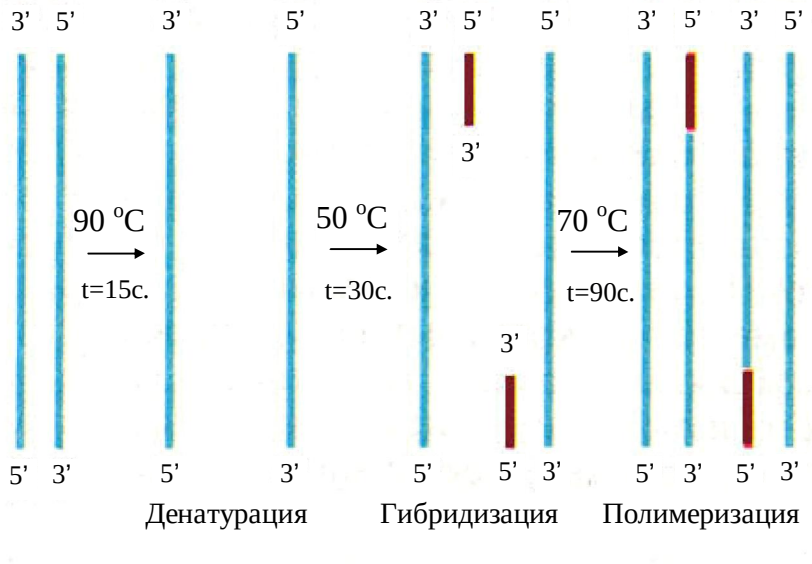


Рис. 25. Последовательные стадии одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Гибридизация праймеров. Температуру снижают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

3. Полимеризация. Инкубационную смесь нагревают до температуры 70°С. При этой температуре Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3’-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате количество ДНК удваивается. Фермент Tag-полимераза была выделена из термофильных бактерий Thermus aquaticus, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6.

В последние годы удалось создать специальный прибор–амплификатор, с помощью которого все три стадии размножения ДНК производятся автоматически, что превратило процесс ПЦР-амплификации конкретной последовательности ДНК в простую задачу.

За разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1993 г. Кэри Мюллис (K. Mullis) был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и материальных затрат получать точные данные по структуре генов и фрагментов ДНК при наличии самого минимального количества биологического материала. Одним из важнейших применений ПЦР стала

диагностика наследственных заболеваний человека, особенно на пренатальных стадиях развития при наличии малого количества ДНК из фетальных клеток. Вторым, не менее важным применением ПЦР технологий стала дактилоскопия и идентификация индивидуумов, используя материал ДНК, полученный из нескольких сперматозоидов, или одного волоса и, в некоторых случаях, даже из одного бластомера, выделенного из зародыша (пре-эмбриона) на стадии восьми зародышевых клеток.

2 Использование ПЦР в диагностике наследственных заболеваний.

Наследственная болезнь Тея-Сакса является аутосомно-рецессивным заболеванием, которое характеризуется недостаточностью лизосомального фермента гексозаминидазы-А. В результате чего в нейронах накапливается ганглиозид G_{M2}. Симптомы заболевания начинают проявляться в возрасте 5 месяцев. В терминальной стадии болезни, которая развивается к 3-4 годам, наступает полная обездвиженность, глухота, слепота, трофические нарушения, декортикация и наступает смерть.

В молодой американской семье первый ребенок (девочка) оказался с заболеванием Тея-Сакса и умер в возрасте 4 лет. Супруги естественно хотели бы иметь здорового ребенка. Проведение молекулярно-генетической диагностики заболевания на эмбриональной стадии путем амниоцитоза для этой семьи не приемлемо по религиозным причинам. Поскольку, если эмбрион окажется вновь с мутантными аллелями, несущими заболевание, супруги не смогут пойти на прерывание беременности, следуя религиозным канонам.

Не смотря на все вышеизложенное благодаря достижениям современной генетики, выход был найден.

Для этого на первом этапе необходимо у жены взять несколько яйцеклеток и оплодотворить спермой мужа. На стадии развития восьми бластомеров из каждого пре-эмбриона можно безболезненно изъять для анализа по одному бластомеру. Фотография процесса извлечения одного бластомера (клетки) из восьмиклеточного эмбриона представлена на рисунке 26. После изъятия из каждого бластомера, на основе метода ПЦР необходимо получить достаточное для анализа количество ДНК и провести Саузерн-блот анализ полученной ДНК с использованием специального ДНК-зонда.

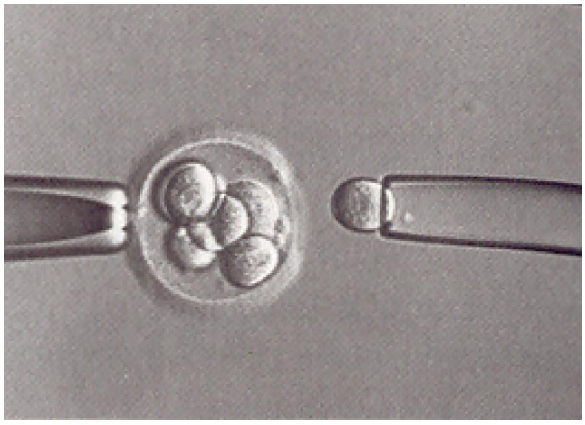


Рис. 26. Фотография процесса извлечения одного бластомера из восьмиклеточного эмбриона

По электрофоретическим спектрам ДНК после Саузерн-блот анализа легко установить, имеется ли дефектный ген заболевания Тея-Сакса в гомозиготном и гетерозиготном состоянии в конкретном восьмиклеточном эмбрионе, или этот эмбрион является нормальной гомозиготой. Такие не несущие мутантных алелей эмбрионы и необходимо в первую очередь оставлять для имплантации и дальнейшего эмбрионального развития. В тоже время половина эмбрионов окажутся гетерозиготными, и у них также заболевание Тея-Сакса будет отсутствовать и в случае необходимости их можно использовать для имплантации.

Выше названная религиозная американская семья, оба супруга в которой являются гетерозиготными носителями заболевания Тея-Сакса успешно прошли все этапы от зачатия в пробирке in vitro и молекулярно-генетического теста до рождения здорового ребенка. Сейчас их дочери Бритни 8 лет и родители счастливы.

Миотоническая дистрофия (MD) характеризуется прогрессирующей дегенерацией мышц на взрослых стадиях и наследуется по доминантно-аутосомному типу. Этот ген содержит район так называемых расширяющихся (expansed) тринуклеотидных повторов ЦТГ. Нормальные аллели гена MD содержат от 5 до 30 копий ЦТГ, тогда как мутантные от 50 до 2000 копий.

Поскольку в настоящее время известна вся последовательность гена миотонической дистрофии (MD) то можно синтезировать олигонуклеотидные праймеры, комплементарные обеим цепочкам фрагмента ДНК в гене MD и размножить этот фрагмент методом ПЦР. Праймер 1 должен быть комплементарным району нижней (3'-5') цепочки, несущей последовательность ГАЦ, а праймер 2 должен быть комплементарен району верхней (5'-3') цепочки ДНК, несущей ЦТГ. После амплификации размер фрагмента ДНК содержащего ЦТГ повторы определяется электрофорезом. Количество тринуклеотидных повторов ЦТГ легко установить включением в гель в качестве маркеров последовательности ДНК с известным количеством повторов ЦТГ.

Все этапы тестирования заболевания миотонической дистрофии по гену MD с использованием методов ПЦР и электрофореза схематически представлены ниже на рисунке 27 . Если менее чем 30 копий ЦТГ повтора присутствует в каждой хромосоме, это означает, что ребенок, фетус или бластомер из восьмиклеточного пре-эмбриона является гомозиготным по нормальному MD аллелю (см. Рис. 23, образец 3 на электрофореграмме) или гетерозиготным по двум нормальным аллелям (Рис. 23, образцы 2, 4). Если более чем 50 копий ЦТГ повтора несет каждая гомологичная хромосома, то ребенок, фетус или пре-эмбрион является гомозиготным по доминантному мутантному аллелю MD (образец 5) или гететозиготным по различным мутантным аллелям (образец 8). Если одна хромосома содержит менее чем 30 копий ЦТГ повтора, а другая гомологичная хромосома содержит более чем 50 копий, то новорожденный, фетус или пре-эмбрион

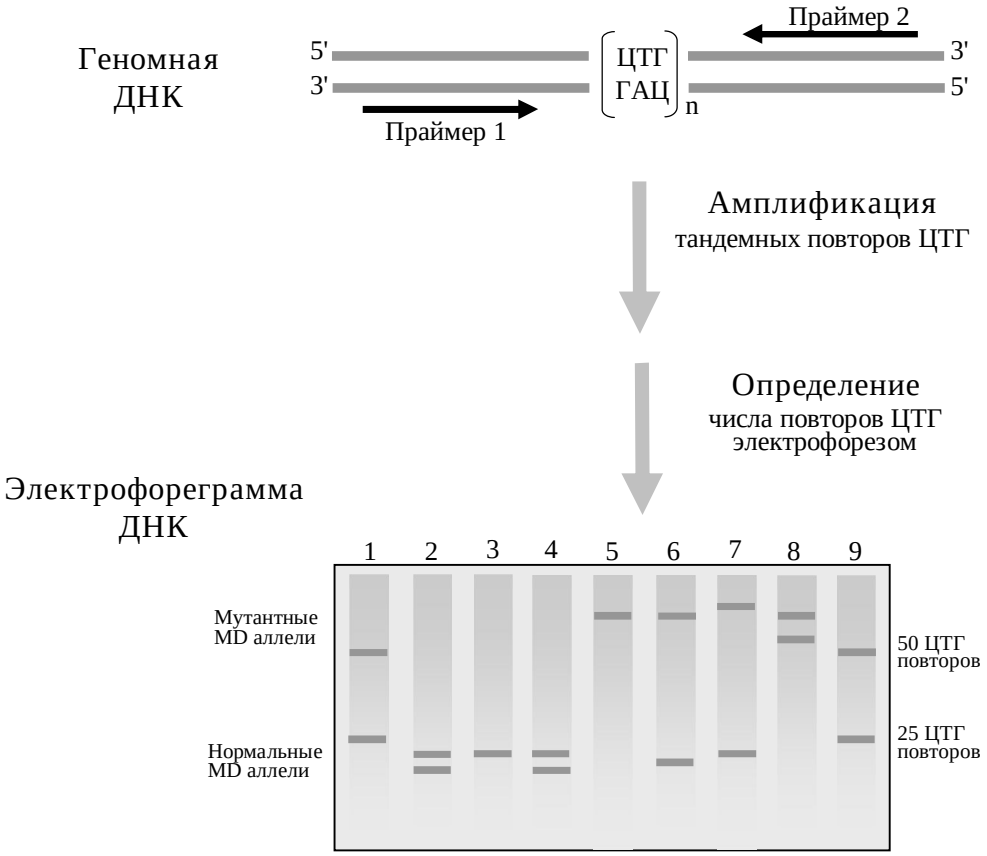


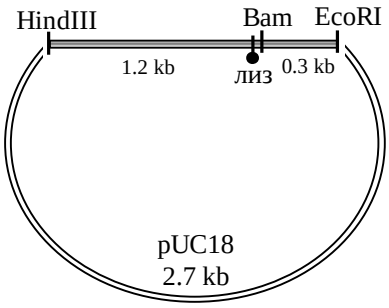
Рис. 27. Этапы тестирования района тринуклеотидных повторов ЦТГ в гене MD, ответственном за заболевание миотоническая дистрофия с использованием метода ПЦР и электрофореза. Образцы 1, 9 – маркеры с 20 и 50 повторами ЦТГ, образцы 2-4 – члены семьи с нормальными аллелями гена MD, 5-8 – образцы несущие мутантные аллели гена MD.

являются гетерозиготами несущими один нормальный, а другой мутантный аллели гена MD (образцы 6, 7).

3. ПЦР и направленный сайт-специфический мутагенез.

Киназы являются переносчиками фосфатных групп от молекулы АТФ к субстрату. В ходе изучения функциональных свойств активного центра одной из киназ понадобилось дезактивировать данный фермент. Ключевой аминокислотой входящей в субстратный карман связывания киназы с АТФ является положительно заряженная аминокислота лизин. Предполагается, что если ее заменить на другую аминокислоту, то связывание с АТФ нарушится и фермент перестанет работать.

Последовательность к-ДНК длиной в 1.5 kb кодирующая белок R-киназу была встроена в плазмиду pUC18 по сайтам рестрикции HindIII и EcoRI. Схема генетического конструкта с рестриктазной картой киназного гена в плазмиде с указанием местоположения триплета, кодирующего аминокислоту лизин, которая располагается в субстратном кармане киназы представлена на рисунке 28. Там же приведена последовательность нуклеотидов, расположенная в начале и в активном центре данного гена.



5'-AAГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ…….ЦЦТГТТТТАААЦГГАТЦЦТТГ……..-3'

Рис. 28. Схема генетического конструкта с рестриктазной картой R-киназ-ного гена в плазмиде с указанием местоположения триплета, кодирующего аминокислоту лизин, которая располагается в субстратном кармане киназы

Заменить одну аминокислоту на другую в белке R-киназа можно путем направленного введения точковой мутации в праймер, с последующим проведением ПЦР. Так как надо заменить положительно заряженную аминокислоту лизин, кодируемую триплетом ААА, на другую аминокислоту, то нам достаточно будет заменить один из трех А на другой нуклеотид и использовать вместо ААА триплет ААТ, что приведет к замене лизина на аспарагин или ГАА, что заменит лизин на отрицательно заряженный глютомат. Так как в нашем случае триплет лизина лежит непосредственно перед сайтом рестрикции BamI можно при помощи ПЦР амплифицировать часть гена R-киназы длинной 1.2 kb от сайта HindIII до BamI.

При этом, включив при конструкции праймеров сайты рестрикции для HindIII и BamI мы сможем в дальнейшем по этим сайтам проводить клонирование амплифицированного участка гена R-киназы.

Для удобства конструирования нужных праймеров достроим вторую цепочку для участка гена R-киназы

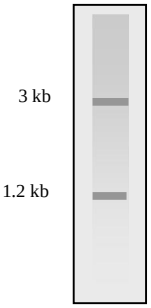
5'-AAГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ…….ЦЦТГТТТТАААЦГГАТЦЦТТГ……..-3'
3'-ТТЦГААТАЦТТАГТАЦАЦГГА……ГГАЦАААТТТТГЦЦТАГГААЦ……..-5'

и легко построим первый праймер, который будет иметь последовательность 5'-AAГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ-3'. Что касается праймера №2, то если бы нам нужно было амплифицировать фрагмент гена без мутации, он бы выглядел следующим образом 5'-ЦААГГАТЦЦГТТТТАААЦАГГ-3', но поскольку нам нужно заменить лизин на аспартат, то триплет ТТТ в праймере №2 изменится на ТТЦ и наш праймер примет вид 5'-ЦААГГАТ-ЦЦГТТЦТАААЦАГГ-3'.

Построенные нами праймеры позволят с помощью ПЦР на первом этапе амплифицировать (размножить) фрагмент киназного гена величиной 1.2 kb от сайта HindIII до BamI. Причем в этом фрагменте произойдет полное замещение триплета ААА, кодирующего лизин, на триплет ГАА, кодирующего глютомат.

Так как амплифицированный нами участок R-киназы длинной 1.2 kb будет естественно представлять собой двухцепочечную ДНК, то обработав его ферментами рестрикции HimdIII и BamI мы получим молекулу с двумя липкими концами, которую можно использовать в дальнейшем клонировании.

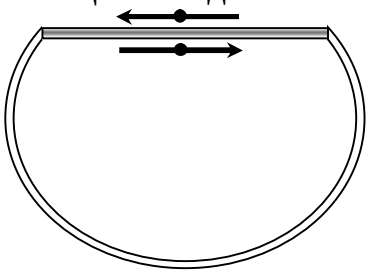
На следующем этапе надо заменить участок исходного R-киназного гена от HindIII до BamI, на полученный нами с помощью ПЦР мутантный. Для этого надо вырезать данный участок из исходного конструкта в плазмиде pUC18 (см. рис. 24), используя рестриктазы HindIII и BamI. Полученную смесь двух молекул - 1.2 kb (фрагмент гена R-киназа) и 3 kb (2.7 kb pUC18 + 0.3 kb остаток гена R-киназа) для разделения необходимо подвергнуть электрофорезу в агарозном геле. Вследствие разной величины два фрагмента в геле легко отделятся друг от друга, что хорошо видно на рисунке справа. Верхнюю более тяжелую фракцию длинной в 3 kb можно вырезать из геля и после очистки (при помощи специальных смол) получим чистый фрагмент ДНК. Причем он будет иметь липкие концы по сайтам HindIII и BamI.



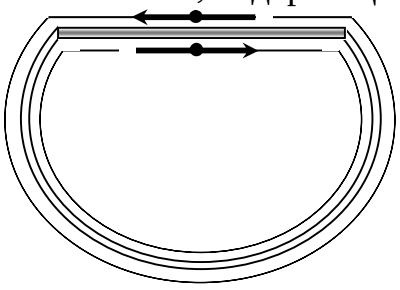
Далее сшиваем при помощи лигазы фрагмент длиной в 3 kb выделенный из геля, и фрагмент с мутацией длиной 1.2 kb полученный нами ранее при помощи ПЦР. В результате у нас будет новая генетическая конструкция с мутантным геном R-киназы встроенным в pUC18.

В последнее время для искусственного сайтспецифического мутагенеза используется еще один способ получения нужных точковых мутаций, который рассмотрен ниже.

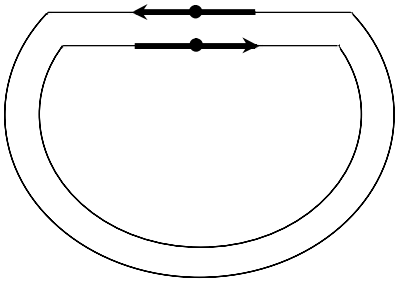
В кольцевую плазмиду встроен фрагмент гена, кодирующий важный белок. Для того, чтобы заменить в этом белке одну аминокислоту на другую конструируются два комплементарных антипарралелльных праймера с точковыми мутациями, изменяющими кодон.



На первом этапе проводится присоединение (отжиг) сконструированных олигонуклеотидных праймеров, содержащих требуемую мутацию к соответствующим комплементарным последовательностями, встроенного в плазмиду участка ДНК. Далее, используя специальный фермент Pfu Turbo ДНК-полимераза производится достраивание кольцевой молекулы ДНК плазмиды и встроенного фрагмента. В результате на обеих материнских матрицах образуются (достроятся) новые кольцевые цепочки ДНК уже с измененной последовательностью, содержащие точковую мутацию.



На втором этапе происходит разрушение только метилированной материнской ДНК с использованием эндонуклеазы DpnI. Данная эндонуклеаза избирательно разрушает метилированную ДНК, которая характерна для всех бактерий, но не затрагивает вновь синтезированную при помощи праймеров не метилированную плазмидную мутантную ДНК.



Плазмидами содержащими мутацию трансформируют XL10-Gold ультрокомпетентные бактериальные клетки. На завершающем этапе культивирование бактериальных клеток позволяет получить достаточно большое количество плазмид, несущих вставку ДНК с нужной мутацией.

Ключевые слова и понятия

фингерпринт	Thermus aquaticus
полимеразная цепная реакция	амплификатор
ПЦР	ПЦР-амплификации
амплификация	ПЦР технологии
праймеры	диагностика наследственных заболеваний
15-30 нуклеотидов	
Tag-полимераза	пренатальная стадия развития
олигонуклеотидные затравки	фетальные клетки
ДНК-матрица	фетус
3’-концы праймеров	генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов
денатурация ДНК	
гибридизация праймеров	бластомеры
полимеризация	бластула
количество ДНК удваивается	амниоцетез

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое метод полимеразной цепной реакции?
2. Каковы достоинства данного метода?
3. Какие вещества необходимы для проведения ПЦР и их назначение?
4. Опишите этап денатурации.
5. Опишите этап гибридизации праймеров.
6. Опишите этап полимеризации.
7. Какое применение имеет метод ПЦР?

Лекция 17

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

1 Основные этапы получения трансгенных животных.
2 Получение трансгенных животных с необходимыми признаками.
3 Получение инсулина на основе методов генетической инженерии.
4 Синтез гормона роста человека.

Применение методов генетической инженерии в животноводстве открывает перспективу изменения ряда свойств организма: повышение продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличение скорости роста, улучшение качества продукции и другие. Организмы, несущие в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть трансгенными, а ген, интегрированный в геном реципиента, — трансгеном. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества.

1. Основные этапы получения трансгенных животных

Получение трансгенных животных предусматривает ряд этапов: приготовление фрагмента ДНК, содержащего конкретный ген, для микроинъекции; извлечение эмбрионов из донорных организмов; микроинъекция ДНК и пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или после культивирования в матку. У родившихся потомков исследуют экспрессию трансгена на уровне транскрипции и трансляции.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появляться так называемые мозаики. К мозаикам относят животных, которые помимо клеток, содержащих трансген, имеют еще и нетрансгенные клетки. Подсчитано, что около 30 % первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции ДНК — мозаики, что затрудняет создание чистых трансгенных линий животных. Этим объясняется тот факт, что трансген не передается потомству с ожидаемой в соответствии с законами Менделя частотой 50 %. Часть мозаиков вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

2. Получение трансгенных животных с необходимыми признаками

Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии

— выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням, а также создание так называемых животных-биореакторов — продуцентов ценных биологически активных веществ. С генетической точки зрения особый интерес представляют гены, кодирующие белки каскада гормона роста: непосредственно гормон роста (ГР), рилизинг-фактор гормона роста (РФ) и инсулинподобный фактор ГР (ИФГР).

В конце 70-х годов XX в. ген гормона роста крупного рогатого скота был интегрирован в геном E. coli. Было показано, что ГР, выделенный из E. coli, оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животных, как и гипофизарный ГР. Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23 — 31 % при дозе 13 мг в день. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие использовать его один раз в две недели и даже в месяц. При ежедневной инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20 — 30 % при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши со встроенным геном ГР были получены в 1982 г. У них отмечалось повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы.

Рассматривается возможность уменьшения лактозы в молоке путем создания животных, у которых присутствует специфический промотор, соединенный с геном фермента β-галактозидазы, катализирующего распад лактозы. Молоко таких животных, не содержащее лактозы, могут использовать люди, у которых не синтезируется β-галактозидаза.

Ведутся работы по введению генных конструкций в организм трансгенных животных, вырабатывающих антитела, предотвращающие маститы.

Одна из важнейших задач стратегии использования трансгенных животных в медицине — получение биологически активных соединений за счет включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков.

Трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков и гормонов имеют ряд преимуществ перед микроорганизмами и клеточными системами. Они легко размножаются, содержание их сравнительно дешево, что делает таких животных хо-

рошими продуцентами разнообразных белков с низкой стоимостью. Важно, что новые белки, получаемые в линиях клеток трансгенных животных, могут быть модифицированы.

Для молочного производства представляет большой интерес получение целенаправленной трансгенной экспрессии в эпителиальные клетки молочной железы с целью выхода белков с молоком. Один из основных этапов получения трансгенных животных, продуцирующих гетерогенный белок с молоком — модификация промотора, направляющего экспрессию структурных генов в секреторный эпителий молочной железы.

Например, в США разработан метод микроинъекции ДНК, отвечающий за экспрессию β-лактоглобулина, который способен продуцироваться только в молочных железах животных. В Эдинбурге в 1992 г. были выведены трансгенные овцы с геном α-1-антитрипсина человека и β-глобулиновым промотором. α-1-антитрипсин используется при лечении эмфиземы легких у человека. Содержание этого белка у разных трансгенных овец составляло от 1 до 35 г/л, что соответствует половине всех белков в молоке. При таком уровне продукции может быть получено около 10 кг трансгенного белка от одного животного в год, что достаточно для 50 пациентов при лечении эмфиземы легких.

В России группой ученых получены трансгенные овцы с геном химозина, в 1 л молока которых содержится 200—300 мг химозина — основного компонента для производства сыра. Стоимость его будет в несколько раз ниже продукта, получаемого традиционным способом из сычугов молочных телят и ягнят. Из 3 л молока трансгенной овцы можно получить достаточное количество химозина для производства 1 т сыра из коровьего молока.

3. Получение инсулина на основе методов генетической инженерии

Инсулин — гормон поджелудочной железы, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий нормальный уровень сахара в крови. Недостаток этого гормона в организме приводит к одному из тяжелейших заболеваний — сахарному диабету, который как причина смерти стоит на третьем месте после сердечнососудистых заболеваний и рака. Инсулин — небольшой глобулярный белок, содержащий 51 аминокислотный остаток и состоящий из двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками. Синтезируется он в виде одноцепочечного предшественника — препроинсулина, содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокис-

лотных остатка) и 35-звенный соединительный пептид (С-пептид). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором А и В-цепи инсулина соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. После протеолитического отщепления С-пептида образуется инсулин.

Известно несколько форм сахарного диабета. Самая тяжелая форма, для лечения которой больному необходим инсулин (инсулинзависимая форма заболевания), вызвана избирательной гибелью клеток, синтезирующих этот гормон (клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе). Форма сахарного диабета, для лечения которой инсулин не требуется, распространена чаще, с ней удается справляться с помощью соответствующих диет и режима.

Работы по генно-инженерному получению инсулина начались более 20 лет назад. В 1978 г. появилось сообщение о получении штамма кишечной палочки, продуцирующего крысиный проинсулин (США). В этом же году были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках E. coli (рис. 28). Каждый из полученных синтетических генов подстраивался к 3'-концу гена фермента β-галактозидазы и вводился в векторную плазмиду (pBR322). Клетки E. coli, трансформированные такими рекомбинантными плазмидами, производили гибридные (химерные) белки, состоящие из фрагмента β-галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождается. Однако замыкание дисульфидных мостиков между образованными цепями инсулина происходило с трудом.

В 1981 г. синтезирован ген-аналог проинсулина — мини-С-проинсулин, в котором 35-звенный С-пептид был заменен на сегмент из шести аминокислот: арг-арг-гли-сер-лиз-арг и показана его экспрессия в E. coli.

В 1980 г. У.Гилберт с сотрудниками выделили мРНК инсулина из опухоли β-клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с нее кДНК. Полученную кДНК встроили в плазмиду pBR322 E. coli, в среднюю часть гена пенициллиназы. Рекомбинантная плазмида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выщепляли из такого белка трипсином.

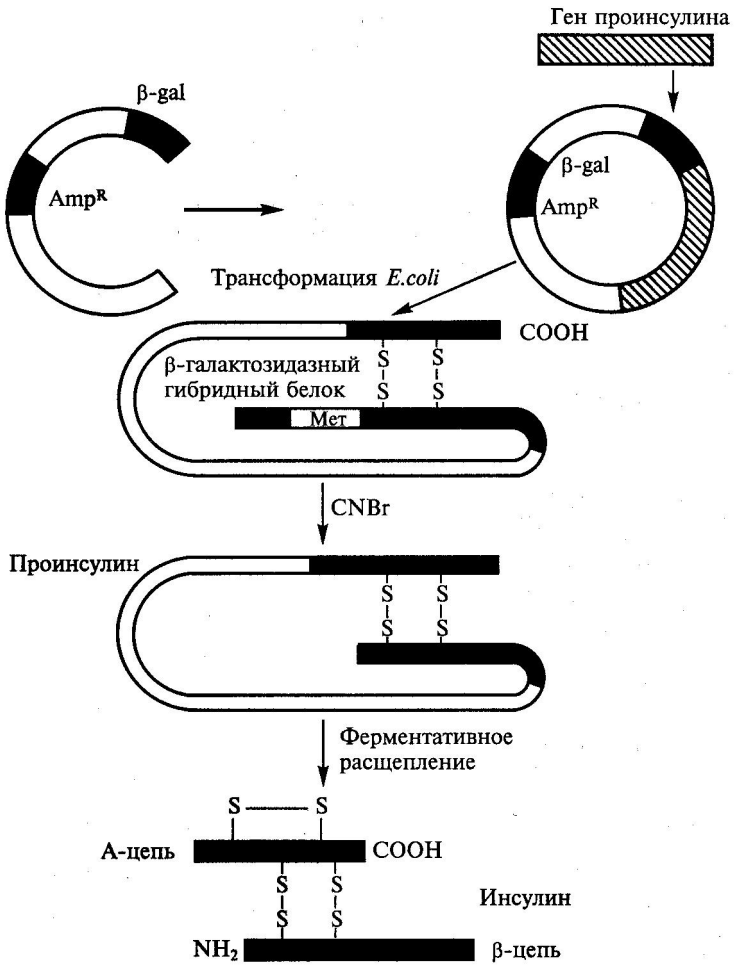


Рис. 29. Схема синтеза инсулина.

4. Синтез гормона роста человека

Соматотропин (или гормон роста человека ГРЧ) секретируется передней долей гипофиза. Впервые он был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза. Его недостаток приводит к заболеванию — карликовости (1 случай на 5000 человек). Гормон обладает видовой специфичностью. Ранее его получали из гипофиза трупов, но в недостаточном количестве. В настоящее время ГРЧ синтезируют методами генетической инженерии в специально сконструированных клетках бактерий. Будучи синтезированным в клетках E. coli, ГРЧ содержит дополнительный остаток метионина на H_2N-конце молекулы. Биосинтез ГРЧ из 191 аминокислотного остатка был осуществлен в 1979 г. Сначала клонировали двунитевую кДНК; далее путем расщепления получали последовательность, кодирующую аминокислотный порядок гормона, за исключением первых 23 аминокислот, — с фен (— NH_2) до лей (23), и синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от первой до двадцать третьей со стартовым ATG-кодоном в начале. Затем два фрагмента объединяли и подстраивали к

паре lac-промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры, что составляет 100000 молекул гормона на клетку. Полученный гормон на конце полипептидной цепи содержал дополнительный остаток метионина и обладал значительной биологической активностью. С 1984 г. после серьезных клинических испытаний на токсичность компанией «Генетек» (Сан-Франциско) было начато широкомасштабное производство бактериального соматотропина.

Огромный интерес представляют выделение и синтез полипептида, обладающего полной биологической активностью гипоталамического рилизинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ). Введение этого фактора способно компенсировать недостаток соматотропина. Таким образом, наличие СТГ-РФ и самого гормона, полученных в генетически сконструированных бактериальных клетках, очень важно для успешного лечения заболеваний, обусловленных недостатком этого гормона, и ряда патологических заболеваний, таких, как некоторые формы диабета, регенерация тканей после ожогов и др.

Ключевые слова и понятия

видоаая специфичность	трансген
инсулин	трансгенные организмы
микроиньекции	экспрессия
соматотропин	

Вопросы для самоконтроля:

1. Основные этапы получения трансгенных животных.
2. Получение трансгенных животных с высокой продуктивностью.
3. Выведение трансгенных животных, устойчивых к заболеваниям.
4. ИМспользование трансгенных животных в медицине.
5. Получение инсулина на основе методов генетической инженерии.
6. Синтез гормона роста человека.

Лекция 18
ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

1 Получение трансгенных растений.
2 Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава белков растений.
3 Повышение устойчивости растений к болезням и вредителям.

Генно-инженерные методы, в частности технология рекомбинантных ДНК, позволяют создавать новые генотипы и, следовательно, новые формы растений гораздо быстрее, чем классические методы селекции. Кроме того, появляется возможность целенаправленного изменения генотипа — трансформации — благодаря введению определенных генов.

Проблемы выращивания сельскохозяйственных растений связаны с перспективой ввода в них генов устойчивости к стрессовым факторам, фитопатогенам, гербицидам и пестицидам, генов скороспелости, а также с расширением круга культурных растений, способных к симбиотической фиксации азота и т.д.

Генетическая трансформация заключается главным образом в переносе чужеродных или модифицированных генов в эукариотические клетки. Можно вводить гены в клетки прокариот, но этот перенос осуществляется не для трансформации, а в целях увеличения экспрессии чужеродных генов, их клонирования. В клетках растений также возможна экспрессия генов, перенесенных не только от других растений, но и от микроорганизмов и даже от животных.

Получение растений с новыми свойствами из трансформированных клеток (регенерация) возможно благодаря их свойству тотипотентности, т.е. способности развиваться в целое растение.

Однако возможности генной инженерии растений ограничиваются рядом причин. Во-первых, геном растений изучен хуже, чем геном млекопитающих. Это значит, что определение и выделение искомых генов — задача очень трудная. Во-вторых, не для всех растений удается подобрать условия регенерации.

1. Получение трансгенных растений

Перенос генов в растительные клетки, так же как в клетки животных, и их встраивание в геном растений (трансформация) осуществляются главным образом благодаря специфическим структурам — векторам. Некоторые виды агробактерий (Agrobacteria) могут заражать двудольные растения, вызывая образование опухолей — корон-

чатых галлов. Одним из самых сильных индукторов опухолей служит почвенная бактерия A. tumefaciens. Способность этой бактерии к образованию опухоли связана с большой внехромосомной плазмидой, получившей название Ti-плазмида (от англ. tumor inducing— индуцирующие опухоль). Ti-плазмиды — это естественные векторы для генов, обладающие всеми функциями, необходимыми для переноса, стабильного включения и экспрессии генетической информации в растениях. Они имеют широкий круг хозяев. В бактериальных клетках Ti-плазмиды реплицируются автономно. Эти плазмиды различаются по типу кодируемых опинов — белков, которые используются бактериями в качестве источников азота и углерода. Обычно встречаются плазмиды, кодирующие два типа опинов: либо октопин (октопи-новая плазмида), либо нопалин (нопалиновая плазмида).

После заражения часть Ti-плазмиды встречается в хромосомах клеток растения-хозяина. Следовательно, A. tumefaciens встраивает часть своего генома в ДНК растительной клетки и заставляет ее таким способом изменять метаболизм, синтезируя вещества, необходимые для бактерий. Именно это свойство A. tumefaciens и послужило поводом для создания на основе Ti-плазмиды вектора, доставляющего необходимые гены в клетку.

Участок Ti-плазмиды, встречающийся в хромосомах растительных клеток, называется Т-областью в бактерии и Т-ДНК в клетках растений. Т-область включает примерно 10 % Ti-плазмиды и содержит гены, отвечающие за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференцировки (гормоннезависимый рост клеток). Важно отметить, что все гены, ответственные за перенос и интеграцию генов Т-области, находятся не в ней самой, а рядом — в области вирулентности — vir-области.

Т-области ограничены прямыми повторяющимися последовательностями, и любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за Т-область и перенесена в растительную клетку.

Недостаток этих плазмид состоит в том, что некоторые гены, находящиеся в Т-ДНК, заставляют расти клетки растений независимо от гормонов, вносимых в питательную среду, на которой культивируются данные клетки. В связи с этим очень трудно регенерировать нормальное растение из клеток, содержащих полную последовательность Т-ДНК. Другой недостаток — большие размеры Ti-плазмиды, из-за которых затруднены какие-либо манипуляции с ней, поэтому вставить ген в плазмиду традиционными методами невозможно.

В настоящее время конструируются производные Ti-плазмиды,

в которых оставляют регуляторный участок Т-области, а вместо ее структурных генов вшивают структурную часть гена, который надо ввести в растение. Такие гены с позиции их регенерации безвредны для растений.

Существуют и другие бактерии (A. rhiwgenes), вызывающие усиленное образование корешков при заражении растений. За этот процесс ответственны содержащиеся в них так называемые Ri-плазмиды (от англ. root inducing — индуцирующий корни). Ri-плазмиды выгодно отличаются от Ti-плазмид тем, что они служат естественными безвредными векторами, так как трансформированные с их помощью растительные клетки сохраняют способность к морфогенезу и к регенерации здоровых растений. В связи с этим Ri-плазмиды в данный момент рассматриваются как более перспективные векторы.

В настоящее время на основе Ti-плазмид конструируются и другие типы векторов (например, промежуточный и бинарный векторы).

Благодаря появлению специфического объекта — изолированных протопластов, т. е. клеток, лишенных целлюлозной стенки, возникли методы прямого переноса генов в растение. К таким методам можно отнести:

1. Трансформация растительных протопластов. Осуществляется благодаря комбинации методик кальциевой преципитации ДНК и слияния протопластов. Для трансформации может быть использован практически любой ДНК-вектор. Донорная ДНК может не содержать специальных биологических сигналов (vir-областей, пограничных областей Т-ДНК).

2. Культуру протопластов на начальной стадии ее роста заражают агробактериями, которые используют в качестве векторов.

3. Микроинъекции ДНК. Аналогичен методу микроинъекций животных клеток. Этот метод можно рассматривать как наиболее универсальный. Эффективность трансформации растительных клеток — 10-20 % независимо от типа вектора. Трансформация не видоспецифична, возможен перенос генов в любое растение.

4. Электропорация. Метод основан на повышении проницаемости биомембран за счет действия импульсов высокого напряжения. В результате молекулы ДНК проникают в клетки через поры в клеточной мембране.

5. Упаковка в липосомы. Это один из методов, позволяющих защитить экзогенный генетический материал от разрушения нуклеазами растительной клетки. Липосомы — сферические тельца, оболочки которых образованы фосфолипидами.

6. Метод биологической баллистики. Метод основан на напыле-

нии ДНК-вектора на мельчайшие частички вольфрама, которыми затем бомбардируют клетки. Бомбардировка осуществляется с помощью биолистической пушки за счет перепада давления. Часть клеток гибнет, а выжившие клетки трансформируются, затем их культивируют и используют для регенерации растений.

2. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава белков растений

В большинстве случаев запасные белки растений имеют несбалансированный для питания человека и животных аминокислотный состав. Так, запасные белки злаков — проламины — бедны лизином, триптофаном и треонином, что снижает их питательную и кормовую ценность. Улучшение аминокислотного состава белка путем традиционной селекции не дает желательных результатов, поскольку необходимые гены часто сцеплены с нежелательными признаками и наследуются вместе. Например, у мутантов кукурузы и ячменя повышение содержания лизина коррелировало с уменьшением синтеза запасных белков и с уменьшением урожайности.

Генно-инженерные методы более перспективны для создания улучшенных сортов, так как позволяют избирательно вводить в геном растения-реципиента гены искомого признака. Операции по получению трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка разделены на ряд этапов: 1) клонирование генов запасных белков; 2) изучение механизмов тканеспецифичной и временной экспрессии белков и выявление последовательностей ДНК, определяющих данный механизм; 3) целенаправленное изменение последовательностей генов запасных белков для улучшения аминокислотного состава; 4) создание векторов, содержащих измененный ген; 5) введение модифицированных генов в растения.

В настоящее время клонированы 10 генов гордеинов ячменя, гены α- и β-глиадинов и глютенина пшеницы, зеинов кукурузы, легумина бобовых, пататина картофеля и ряд других. Имеются практические результаты трансформации растений. Так, введение в геном пшеницы модифицированного гена проламина привело к активному синтезу модифицированного белка, а также повлияло на состав и уровень соответствующих запасных белков. В итоге улучшилось хлебопекарное качество пшеничной муки.

3. Повышение устойчивости растений к болезням и вредителям

Устойчивость растений к фитопатогенам. Наибольший урон растениям наносят грибные, бактериальные и вирусные патогены. В

растении существуют защитные механизмы, которые в большей или меньшей степени (в зависимости от устойчивости растений) начинают действовать в ответ на проникновение фитопатогенов в клетку. Начинается синтез соединений, вызывающих гибель патогенов. Примером могут служить специфические белки PRP (pathogen related proteins). Из них наиболее изучены ферменты хитиназы и β-1,3-глюконазы, которые угнетают рост грибов и некоторых видов бактерий, разрушая их клеточные стенки.

Применение методов генетической инженерии, использующих естественные защитные механизмы, позволяет получать трансгенные растения, устойчивые к грибной, бактериальной и вирусной инфекции. Так, были получены трансгенные растения табака и турнепса, в состав генома которых ввели ген хитиназы. Лабораторные и полевые испытания выявили большую устойчивость трансгенных растений. В растения томатов был введен ген защитных пептидов редьки (дефензинов) rs, отвечающих за устойчивость к фитопатогенным грибам. Перспективны клонирование и перенос генов, кодирующих специфические белки (small antibiotic-like proteins), содержащиеся в семенах многих растений. Эти белки защищают семена в период покоя и во время прорастания от грибных и бактериальных инфекций.

Другой подход к получению трансгенных растений, устойчивых к вирусной инфекции, состоит во введении в геном исходных растений гена оболочки вируса. Это приводит к ингибированию размножения вируса и снижению инфицированности. Благодаря такому подходу был получен стойкий антивирусный эффект у растений табака, трансформированных геном оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ).

Устойчивость растений к гербицидам. В настоящее время в сельском хозяйстве широко используют гербициды — химические соединения, применяемые для уничтожения сорной растительности. Гербициды широкого спектра действия могут не только уничтожать сорняки, но и угнетать рост культурных растений. В связи с этим возникает необходимость в создании растений, устойчивых к этим веществам. Существует два подхода к решению этой проблемы: прямая селекция устойчивых к гербицидам мутантных форм растений, или мутантных клеточных штаммов (клеточная селекция), и генно-инженерный метод, который состоит во введении в растения генов гербицид-резистентности растительного или бактериального происхождения.

Благодаря использованию методов генетической инженерии были созданы новые, устойчивые к различным гербицидам сельскохо-

зяйственные культуры. В геном этих культур вводились мутантные гены, кодирующие синтез ферментов, на которые гербициды (атразин, бромоксилин, имидазол) не оказывают негативного действия. Например, растения лядвенца рогатого (Lotus comiculatus) были трансформированы с помощью штамма A281/pCBE21. Эта бактерия содержит плазмиду со встроенным геном bar, кодирующим фермент, придающий устойчивость к гербициду биалофосу. Трансгенные растения содержат ген bar и невосприимчивы к гербициду. Однако в тканях таких растений наблюдается накопление гербицидов, и использовать эти растения можно только в технических целях. Вместе с тем показано, что введение генов, кодирующих другие ферменты, позволяет проводить детоксикацию гербицидов, создавая, таким образом, растения, пригодные в пищу.

Устойчивость растений к насекомым. Создание трансгенных растений, устойчивых к насекомым, с помощью методов генной инженерии стало возможным после того, как было обнаружено, что бактерии Bacillus thurengiensis синтезируют специфический белок — прототоксин, высокотоксичный для насекомых. Попадая в кишечник насекомого, этот белок расщепляется, образуя активную форму токсина. В результате насекомое погибает. Ген, ответственный за экспрессию прототоксина, удалось обнаружить, выделить из генома B. thurengiensis и с помощью бинарного вектора ввести в геном растений табака. Аналогичным образом растения томата были трансформированы генами другого инсектицидного белка — эндотоксина. В итоге были получены первые трансгенные растения, которые не повреждали насекомые.

Ключевые слова и понятия

тотипотентность	проламины
вектор	патогены
Ti-плазмиды	экспрессия
трансформация	

Вопросы для самоконтроля:

1. Получение трансгенных растений.
2. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава белков растений.
3. Получение растений, устойчивых к фитопатогенам.
4. Повышение устойчивости растений к гербицидам.
5. Устойчивость растений к насекомым.

Часть 3
ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Лекция 19
ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

1 Краткая история культуры клеток и тканей.
2 Методы и условия культивирования изолированных тканей и клеток организмов.
3 Дифференцировка каллусных тканей.

1. Краткая история культуры клеток и тканей

Клеточная инженерия — одно из наиболее важных направлений в биотехнологии. Она основана на использовании принципиально нового объекта — изолированной культуры клеток или тканей эукариотических организмов, а также на тотипотентности — уникальном свойстве растительных клеток воспроизводить целый организм. Применение этого объекта раскрыло большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач. В области фундаментальных наук стало осуществимым исследование таких сложных проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, реализация тотипотентности клеток, механизмы появления раковых клеток и др. При решении практических задач основное внимание уделяется вопросам селекции, получения значительных количеств биологически ценных метаболитов растительного происхождения, в частности более дешевых лекарств, а также выращивания оздоровленных безвирусных растений, их клонального размножения и др.

Бурное развитие клеточной инженерии приходится на 50-е годы прошлого века, хотя первые попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. В конце XIX — начале XX в. немецкие ученые Х. Фехтинг (1892), С. Рехингер (1893), Дж. Хаберландт (1902) сделали первую неудачную попытку стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Несмотря на отсутствие положительного результата, их работы представляют большой интерес. В них были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того времени и которые нашли свое подтверждение несколько десятилетий спустя. Так, Фехтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. Рехингер определил минимальный размер сегмента, обра-

зующего каллус. Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5 — 2,0 мм клетки не делились. Хаберландт впервые четко сформулировал идеи о возможности культивирования in vitro изолированных клеток растений и о тотипотентности клеток, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовывать свой потенциал развития. Иначе говоря, о способности каждой растительной клетки давать начало целому организму.

Первые успехи были получены в 1922 г. американским ученым В.Роббинсом и немецким ученым В. Котте. Независимо друг от друга они показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Считается, что их работы легли в основу метода культуры изолированных корней растения.

Настоящее развитие метода культуры тканей и клеток высших растений началось в 1932 г. с работ французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф.Уайта. Они показали, что при периодической пересадке на свежую питательную среду кончики корней могут расти неограниченно долго. Кроме того, ими были разработаны методы культивирования новых объектов: тканей древесных растений камбиального происхождения, каллусных тканей запасающей паренхимы (Р. Готре), а также тканей растительных опухолей (Ф.Уайт). С этого момента начинаются массовые исследования по разработке новых питательных сред, включающих даже такие неконтролируемые компоненты, как березовый сок или эндосперм кокоса, и по введению в культуру новых объектов. К 1959 г. насчитывалось уже 142 вида высших растений, выращиваемых в стерильной культуре.

В 1955 г. после открытия Ф. Скугом и С. Миллером нового класса фитогормонов — цитокининов — оказалось, что при совместном их действии с другим классом фитогормонов — ауксинами — появилась возможность стимулировать деление клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез в контролируемых условиях.

В 1959 г. был предложен метод выращивания больших масс клеточных суспензий. Важным событием стала разработка Е. Коккингом (Ноттингемский университет, Великобритания) в 1960 г. метода получения изолированных протопластов. Это послужило толчком к получению соматических гибридов, введению в протопласты вирусных РНК, клеточных органелл, клеток прокариот. В это же время Дж. Морелом и Р. Г. Бутенко был предложен метод клонального микроразмножения, который сразу же нашел широкое практическое применение. Весьма важным достижением в развитии технологий культиви-

рования изолированных тканей и клеток стало культивирование одиночной клетки с помощью ткани-«няньки». Этот метод был разработан в России в 1969 г. в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН под руководством Р. Г. Бутенко. В последние десятилетия продолжается быстрый прогресс технологий клеточной инженерии, позволяющих значительно облегчить селекционную работу. Большие успехи достигнуты в развитии методов получения трансгенных растений, технологий использования изолированных тканей и клеток травянистых растений, начато культивирование тканей древесных растений.

2. Методы и условия культивирования изолированных тканей и клеток организмов

Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (in vitro) получило название метода культуры изолированных тканей.

В связи с тем что в жизни человека наибольшее значение имеют семенные растения, методы и условия для их культивирования разработаны лучше, чем для голосеменных растений или водорослей, выращивание которых в стерильных условиях вызывает определенные затруднения. Однако независимо от принадлежности растений к той или иной таксономической группе существуют общие требования к выращиванию объектов в культуре in vitro.

Асептика. Прежде всего культивирование фрагментов ткани или органа растения — эксплантов, а тем более отдельных клеток требует соблюдения полной асептики. Микроорганизмы, которые могут попасть в питательную среду, выделяют токсины, ингибирующие рост клеток и приводящие культуру к гибели, поэтому при всех манипуляциях с клетками и тканями при культивировании in vitro соблюдают определенные правила асептики.

Питательные среды. Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, однако, в состав всех сред обязательно входят необходимые растениям макро- и микроэлементы, углеводы, витамины, фитогормоны и их синтетические аналоги. Углеводы (обычно это сахароза или глюкоза) входят в состав любой питательной смеси в концентрации 2—3%. Они необходимы в качестве питательного компонента, так как большинство каллусных тканей лишено хлорофилла и не способно к автотрофному питанию. Поэтому их выращивают в условиях рассеянного освещения или в темноте. Обязательными компонентами питательных сред должны быть аук-

сины, вызывающие дедифференцировку клеток экспланта, и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

Физические факторы. На рост и развитие растительных тканей in vitro большое влияние оказывают физические факторы — свет, температура, аэрация, влажность. Большинство каллусных тканей могут расти в условиях слабого освещения или в темноте, так как они не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторичного синтеза. Для большинства каллусных культур оптимальна температура 26 °С. Для выращивания суспензионных культур большое значение имеет аэрация. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров. Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60—70%.

Таким образом, культивирование клеток и тканей зависит от многих факторов внешней среды, и действие их не всегда хорошо известно. Поэтому при введении в культуру нового вида растений необходимо прежде всего тщательно изучить влияние физических факторов на рост и физиологические характеристики этой культуры.

3. Дифференцировка каллусных тканей

Одна из наиболее интересных, но сложных проблем в биологии — развитие многоклеточных организмов. Изучение данного вопроса возможно несколькими путями. Так, большое распространение получило моделирование процессов онтогенеза на более простых системах. При этом используют изолированные ткани, клетки, протопласты, культивируемые в стерильных условиях. Преимущество этого процесса состоит в том, что нет необходимости постоянно учитывать результаты взаимодействия органов в целостной системе растительного организма. Кроме того, экспериментатор сам имеет возможность выбирать, изменять и повторять условия опыта в соответствии с поставленной задачей. После завершения дедифференцировки дальнейшее развитие каллусной клетки может идти в нескольких направлениях. Во-первых, это вторичная дифференцировка разной степени сложности. Во-вторых, в клетке может сформироваться состояние стойкой дедифференцировки («привыкание»), а следовательно, способность расти на безгормональной среде. В-третьих, каллусная клетка проходит свой цикл развития, завершающийся ее старением и отмиранием.

В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Вторичная дифференцировка каллусной клетки может завершиться образованием в каллусной ткани отдельных дифференцированных клеток. Они имеют определенное строение и выполняют специфические функции. Примером служит образование эпибластов — клеток, в которых запасаются вторичные метаболиты. Это наиболее простой тип дифференцировки каллусной клетки. Более сложная гистологическая дифференцировка завершается образованием в каллусе различных тканей: млечников, волокон, трихом, элементов ксилемы (трахеи и трахеиды) и флоэмы (ситовидные трубки и клетки-спутницы). К самым сложным видам вторичной дифференцировки относятся органогенез — образование органов и соматический эмбриогенез — образование из соматических клеток эмбриоидов, биполярных зародышеподобных структур. Все эти типы дифференцировки возможны только благодаря тотипотентности: любая растительная клетка содержит полный набор генов, характерный для того организма, из которого она была выделена. Потенциальные возможности всех клеток этого растения одинаковы; каждая из них в определенных условиях может дать начало целому организму. Однако выяснено, что реально детерминируется только одна из 400—1000 клеток, что, вероятно, связано с физиологическим состоянием клетки, с ее компетентностью. Так, у эксплантов стеблевого происхождения компетентны к действию экзогенных фитогормонов и, следовательно, способны к морфогенезу только клетки эпидермальных и субэпидермальных тканей (Тран Тан Ван, 1981). Однако компетентность клеток может приобретаться ими в процессе культивирования каллусной ткани, в условиях, индуцирующих морфогенез. Время в течение которого в каллусных клетках возникает это свойство' изменяется в широких пределах. Кроме того, существенную роль в дифференциации играют генотип растения-донора, условия и физические факторы культивирования.

Все каллусные клетки, готовые ко вторичной дифференцировке, т. е. детерминированные, характеризуются общими чертами. Эти клетки — «клетки-инициали»— образуют утолщенную клеточную стенку, обособляясь от остальных каллусных клеток. Для них характерно более крупное ядро, большее количество запасных веществ, меньшие размеры вакуолей. В «клетках-инициалях» начинается синтез определенных белков, интенсифицируется пентозофосфатный путь расщепления гексоз. Очень важно, что между этими клетками, формирующими меристематические очаги, восстанавливаются плазмодесмы, которые практически отсутствуют в массе каллусных кле-

ток.

Интересное предположение было высказано Л. Саксом и С.Тойвоненом (1963). Оно сводится к тому, что существует минимальная масса каллусных клеток, которая определяет способность уже детерминированных клеток к дальнейшему морфогенезу. Это подтвердилось в опытах с культурой семядолей ели: детерминация адвентивных побегов происходила в клеточных комплексах из 5 — 6 клеток (Б.С.Флинн и др., 1988). В исследованиях С.Номура и А.Комамине (1989) было показано, что развитие соматических зародышей детерминируется в 6— 10 - клеточном агрегате.

Ключевые слова и понятия

дедифференцировка	фитогормоны
каллусная культура	цитокинины
морфогенез	эксплант
тотипотентность	регенерант

Вопросы для самоконтроля:

1. История изучения культуры клеток и тканей.
2. Методы культивирования изолированных тканей и клеток организмов.
3. Правила асептики при культивировании in vitro.
4. Требования к питательным средам при культивировании изолированных тканей и клеток.
5. Влияние физических факторов на рост и развитие растительных тканей in vitro.
6. Дифференцировка каллусных тканей.
7. Направления развития каллусных клеток.

Лекция 20

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СОЗДАНИИ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

1 Области применения метода культуры клеток и тканей.
2 Технологии, облегчающие селекционный процесс.
3 Гибридизация соматических клеток.

1. Области применения метода культуры клеток и тканей

Метод культуры тканей широко используется в сельском хозяйстве и промышленном производстве (рис. 30). Примером может служить массовое клональное микроразмножение плодовоовощных и декоративных растений, а также их оздоровление от вирусных и других инфекций. С помощью культуры in vitro можно расширить возможности селекционной работы: получать клоны клеток, а затем и растения с запрограммированными свойствами. Благодаря способности клеток синтезировать в культуре вторичные метаболиты возникла отрасль промышленности, осуществляющая биологический синтез веществ, необходимых человеку.

В настоящее время известно примерно $2 \cdot 10^4$ синтезируемых растениями веществ, которые используются человеком, и их количество постоянно увеличивается. Растения всегда служили источником пищи, эфирных масел, красителей и, конечно же, лекарственных соединений. Так, мак снотворный (Papaver somniferum) является источником болеутоляющего вещества — кодеина; из наперстянки (Digitalis lanata) получают дигоксин, тонизирующий сердечную деятельность; из хинного дерева (Cinchona ledgeriana) — антималярийное средство «хинидин». Особое место занимают наркотики и стимулирующие вещества. В небольших, строго контролируемых количествах их используют в медицине.

Однако при систематическом употреблении низких концентраций наркотиков возникают наркозависимость и стремление к увеличению употребляемой дозы. Применение высоких концентраций наркотика убивает человека. Наиболее известны опиум и героин из Papaver somniferum, кокаин из Erythroxylon, никотин из различных сортов табака. Наиболее известный стимулятор — кофеин, содержащийся в растениях чая и кофе. Стимуляторы не токсичны в концентрациях, рекомендуемых к применению. Однако высокие их концентрации негативно влияют на сердечно-сосудистую и нервную систему человека.

Большой интерес вызвало открытие пиретринов, выделенных из

цветков Chrysanthemum cinerariaefolium. Эти вещества — мощные инсектициды. Особая их ценность заключается в том, что пиретрины не вызывают привыкания у насекомых, а также не проявляют кумулятивного токсического эффекта.

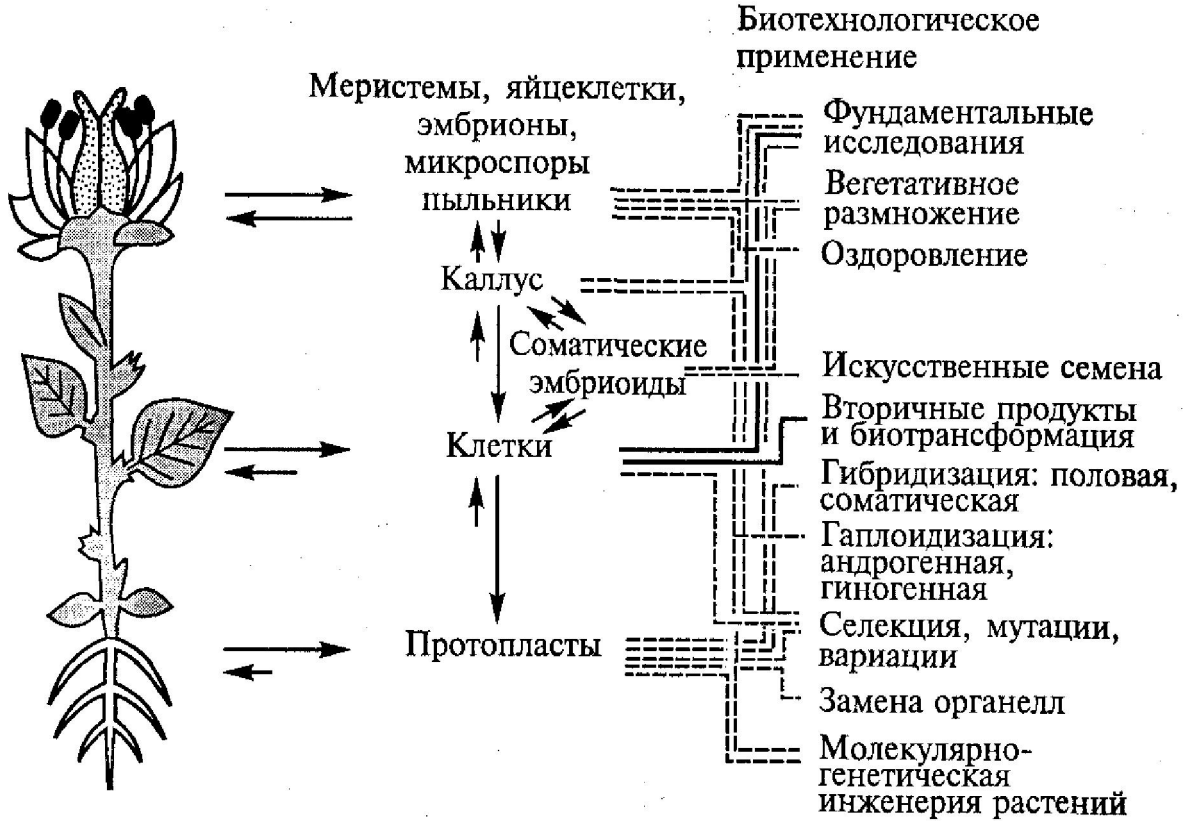


Рис. 30. Использование культуры клеток и тканей растений в биотехнологии (по Х. Борнман, 1991)

Способность растений синтезировать различные соединения привела к предположению, что тем же свойством будут обладать клетки и ткани этих растений, выращиваемые в стерильных условиях. Для некоторых культур это оказалось справедливым, Но в отдельных случаях клетки либо не проявляли способности к синтезу необходимых веществ, либо синтезировали их в минимальных количествах. Понадобились долгие эксперименты по подбору питательных сред, условий культивирования, исследованию новых штаммов, полученных благодаря генетической гетерогенности каллусных клеток или применению мутагенных факторов чтобы добиться серьезных успехов в этой области.

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов — очень перспективное направление. Синтез вторичных метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток, в регулируемых условиях, поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают

на малых площадях в отличие от больших массивов плантаций с необходимыми растениями. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. Например, выход аймалицина и серпентина в культуре клеток Catharanthus roseus составляет 1,3% сухой массы, а в целом растении — 0,26 %. В культуре клеток Dioscorea deltoidea диосгенин синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях растений его содержание составляет 20 мг на 1 г сухой массы. Кроме того, в культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для исходного растения, либо расширяется набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, либо вещества, содержавшиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так, в культуре клеток Papaver bracteatum содержится сангвирин, характерный для ювенильных растений, и отсутствует тебаин, синтезируемый взрослыми растениями.

Важная особенность культивируемой популяции клеток — ее стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вторичного синтеза. Так, российскими учеными были получены разные штаммы клеток Dioscorea deltoidea, в том числе штамм-сверхпродуцент ИФР ДМ-0,5. Все эти штаммы сохраняли стабильность в отношении синтеза фуростаноловых гликозидов около 26 лет. Интересная особенность большинства клеток в культуре состоит в том, что обычно эти клетки не транспортируют синтезируемые метаболиты в питательную среду или другие клетки, хотя некоторые культуры составляют исключение, в частности культура клеток мака, которые депонируют алкалоиды в млечники. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами, в основном с пластидами и эндоплазматическим ретикулумом. В клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в вакуолях и свободном пространстве клеток.

На синтез вторичных метаболитов влияет целый ряд факторов. Прежде всего, выход продукта зависит от генотипа растения-донора. Показано, что культуры клеток, полученных от высокопродуктивных растений, продуцировали большее число метаболитов. Другой важный фактор — состав питательной среды и концентрация ее компонентов, которые должны обеспечивать, с одной стороны, увеличение количества клеток-продуцентов, с другой — усиливать сам процесс

синтеза. На рост, т.е. на увеличение биомассы, существенно влияет природа и количество углеводов, соединений азота и фосфора, на синтез метаболитов — природа и концентрация фитогормонов. Так, при замене одного ауксина на другой, например нафтилуксусной кислоты на 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту), трехкратно увеличился синтез антрахинона суспензионной культурой Morinda citrifolia.

Существует современная технология получения вторичных метаболитов с помощью иммобилизованных клеток культуры, т. е. помещение их в определенный носитель или адсорбция в нем. Носитель с клетками помещают в питательную среду. Клетки остаются живыми. Они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.

Еще один из примеров использования вторичных метаболитов растений — получение карденолидов, гликозиды которых используют в медицине для лечения болезней сердца. Растения наперстянки (Digitalis lanata) в большом количестве синтезируют дигитоксин вместо необходимого дигоксина. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки. Иммобилизованные клетки этой культуры способны долгое время с постоянной скоростью трансформировать β-метилдигитоксин в β–метилдигоксин.

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы, и не только с точки зрения экономической выгоды получения более дешевой продукции в запланированных количествах. Важно, что использование культуры клеток спасет от уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших уже редкими, которые синтезируют необходимые человеку вещества. Увеличение выхода продукта может быть достигнуто благодаря дальнейшей исследовательской работе по селекции специализированных популяций клеток и оптимизации условий культивирования. Большой интерес представляет также дальнейшее развитие методов биотрансформации метаболитов и иммобилизации культивируемых клеток.

Достаточно успешно развиваются с помощью технологий клеточной инженерии, культуры клеток и тканей ускорение и облегчение селекционного процесса, создание растений с новыми качествами, а также клональное микроразмножение растений, тесно связанное с проблемой их оздоровления от вирусных инфекций и криосохранение генофонда — технология, в настоящий момент приобретшая экологическую направленность.

2. Технологии, облегчающие селекционный процесс

Одна из наиболее важных технологий этой группы — оплодотворение in vitro, помогающее предотвратить прогамную несовместимость, которая может быть вызвана следующими причинами:

1) генетически детерминированное (определенное) несоответствие секрета рыльца материнского растения и пыльцы отцовского, которое тормозит рост пыльцевых трубок на рыльце пестика;

2) несоответствие длины столбика пестика и пыльцевой трубки, в результате чего пыльцевая трубка не достигает семяпочки (гетеростилия);

3) тканевая несовместимость партнеров, приводящая к остановке роста пыльцевой трубки в любой момент ее прорастания от рыльца пестика до микропиле семяпочки (гаметофитный тип несовместимости).

Преодоление прогамной несовместимости возможно благодаря выращиванию в стерильных условиях изолированной завязи с нанесенной на нее пыльцой или изолированных кусочков плаценты с семяпочками, рядом с которыми или непосредственно на ткани которых культивируется пыльца.

Значительным препятствием для селекции служит также постгамная несовместимость, вызванная разновременным развитием зародыша и эндосперма при отдаленной гибридизации. В результате образуются невсхожие щуплые семена. Получить растение из таких семян можно только при использовании метода эмбриокультуры, т. е. выращивания изолированного зародыша на искусственной питательной среде. Метод эмбриокультуры широко применяют при межвидовой гибридизации овощных растений, для микроразмножения ценных гибридов, для клеточной селекции.

Существует несколько методов клеточной селекции:

1. Прямая (позитивная) селекция, при которой выживает только заданный тип мутантных клеток.

2. Непрямая (негативная) селекция, которая ведет к гибели делящихся клеток дикого типа и выживанию метаболически неактивных клеток. Этот прием требует дополнительной идентификации мутационных изменений у выживших клеток.

3. Тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны.

4. Визуальная селекция и неселективный отбор, когда необходимая вариантная линия выбирается среди прочих визуально или с помощью биохимических методов.

3. Гибридизация соматических клеток

Множество теоретических и практических задач позволяет решать использование изолированных протопластов. С их помощью можно вести селекцию на клеточном уровне, работать в малом объеме с большим числом клеток, осуществлять прямой перенос генов, изучать мембраны, выделять пластиды. Изолированный протопласт – это содержимое растительной клетки, окруженное плазмолеммой. Целлюлозная стенка у данного образования отсутствует.

В 1971 г. Такебе и его сотрудники, обрабатывая клетки листа табака для растворения клеточных стенок сочетанием целлюлазы и пектиназы, добились успеха в получении протопластов. Протопласты культивировали в среде, в которой они могли делиться и формировать каллюс, способный к регенерации с образованием целого растения. Эти первые эксперименты, проведенные на протопластах табака, показали, что более 90 % всех протоклоннов, т.е. клонов, полученных из протопластов, удивительно сходны с родительскими линиями как по фенотипу, так и по генотипу.

Таким образом, протопласты табака позволили преодолеть обычную изменчивость, характерную для других способов получения клонов. Обнаруженная стабильность была подтверждена и на некоторых других видах растений.

В 1974 г. Дж. Мельхерсом был введен в практику термин «соматическая гибридизация», означающий процесс слияния протопластов соматических клеток. При соматической гибридизации развиваются гибриды, объединяющие геном обеих клеток. Соматическая гибридизация имеет важные особенности. Во-первых, этому процессу доступны практически любые скрещивания, во-вторых, слияние протопластов способствует объединению цитоплазматических генов родительских клеток, чего не бывает при скрещивании половых клеток.

Самопроизвольное слияние протопластов происходит достаточно редко. Механизм этого процесса до конца не выяснен. Однако известно, что протопласты имеют отрицательный поверхностный заряд, который вызывает их взаимное отталкивание. Впервые искусственное слияние протопластов с помощью индуктора слияния (фьюзогена) было осуществлено в 1970 г. Коккингом и его сотрудниками. Схема слияния протопластов представлена на рисунке 31.

Первый неполовой гибрид высших растений был получен в 1972 г. при слиянии изолированных протопластов двух видов табака: Nicotiana glauca и Nicotiana langsdorfii. В 1978 г. было произведено успешное слияние протопластов картофеля и томатов. Полученные в результате растения «поматы» представляют не только научный, но и

практический интерес, поскольку они образуют клубни и плоды.

В отличие от томатов картофель принадлежит к видам, которые с большим трудом поддаются генетическому улучшению. Факторы устойчивости к болезням, скомбинированные в одном сорте томатов, при применении метода слияния протопластов могут быть перенесены в сорт картофеля в ходе одной операции. Аналогичная работа, проведенная с использованием обычных селекционных приемов, заняла бы около 20 лет.

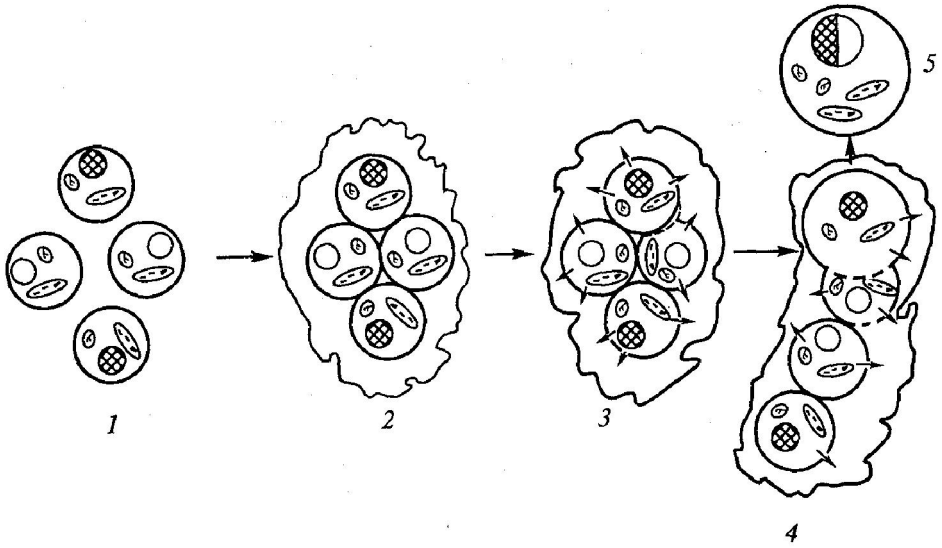


Рис. 31. Схема слияния протопластов под действием полиэтиленгликоля (по Х.Борнман, 1991):

1 — изолированные протопласты; 2— слипание протопластов в результате дегидратации; 3 — образование пор в мембране протопласта; 4 — перетекание через поры внутриклеточного материала; 5 — гибридный протопласт

В настоящее время получено много межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов, значительную часть которых нельзя считать нормальными растениями. Возникающие аномалии — результат хромосомной несбалансированности. Описаны случаи возникновения гибридов между протопластами эритроцитов крысы и дрожжевых клеток, моркови и человека и др. Любые исследования, любые манипуляции в области создания новых генотипов должны быть тщательно и всесторонне продуманы, а ученые должны помнить об ответственности и научной этике.

В 1964 г. Индийские исследователи Гуха и Махесвари культивировали в искусственной среде пыльники растений, пыльцевые зерна которых образовали эмбрионы, а затем и гаплоидные растения. Сангван и Сангван-Норилл в 1976 г. добились успеха в культивировании пыльцевых зерен, выделенных из пыльников растений семейства Solanacea. Пыльцевые зерна развивались несколько дней в своих

пыльниках, после этого их выделяли для культивирования. Таким способом удалось получить жизнеспособные растения. Культуральная среда в опытах такого рода содержит до 10000 пыльцевых зерен на 1 мл, но даже при самом тщательном соблюдении необходимых условий лишь очень немногие из них дают начало развитию андрогенных растений (в опытах около 9%).

Культура пыльцевых зерен стала основным источником гаплоидных растений у декоративных, овощных, зерновых и кормовых видов. Пыльцевые зерна могут оказаться более удобными, чем протопласты, для экспериментов по генетической трансформации, предназначенных для получения растений с заданными свойствами.

Растения, полученные в результате размножения вегетативным путем (клоны), обычно похожи на родительское растение, но не все клоны генетически одинаковы. Иногда возникают клоны, которые существенно отличаются от исходной формы. Их называют соматическими вариантами, сомаклонами или «спортами», и появляются они в результате генетических изменений в клетках меристемы, которые дают начало всему новому растению или его части. Сомаклональная изменчивость – прекрасный источник генетического разнообразия, которое может использоваться при создании генетически измененных организмов с новыми свойствами. Отмечены случаи появления сомаклональных вариантов, сочетающих признаки, которые невозможно или трудно соединить в одном генотипе традиционным селекционным путем. Так, из сомаклональных вариантов, возникших в каллусной культуре риса, были выделены растения, сочетавшие скороспелость и длиннозерность. На их основе за короткий срок был создан новый сорт риса. В ряде случаев размножение спортов привело к созданию новых сортов. Например, апельсины «Навель», персики-нектарины.

Таким образом, изменчивость протоклонов, наблюдающаяся в отсутствие мутагенов, весьма важна для селекции: благодаря ей селекционеры получают богатый исходный материал.

Ключевые слова и понятия

клональное микроразмножение вторичные метаболиты пыльцевые зерна	биотрансформация соматическая гибридизация

Вопросы для самоконтроля:

1. Области применения метода культуры клеток и тканей.

2. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках.
3. Технологии, облегчающие селекционный процесс.
4. Методы клеточной селекции.
5. Гибридизация соматических клеток.

Лекция 21
КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ

1 Технология микроклонального размножения.
2 Оздоровление посадочного материала.
3 Криосохранение.

Клональным микроразмножением называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т.е. свойство тотипотентности. Метод клонального микроразмножения получает все более широкое распространение во всем мире. В большинстве стран эта технология приобрела коммерческий характер.

В России первые работы по клональному микроразмножению были проведены в 60-х годах XX в. в лабораториях Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева. В настоявшее время созданы и развиваются лаборатории клонального микроразмножения, связанные с нуждами селекции, размножением декоративных, лекарственных и других растений. Кроме того, технология используется для размножения лучших экземпляров взрослых лесных деревьев, особенно хвойных, для сохранения редких и исчезающих видов растений.

Свое название эта технология размножения получила от термина «клон» (от греч. clon — отпрыск), который предложил Веббер в 1903 г. Клональное микроразмножение имеет существенные преимущества перед традиционными способами размножения:

1. Высокий коэффициент размножения. Одно растение герберы за год при микроклональном размножении дает до 1 млн новых растений, тогда как при обычных способах размножения — только 50—100 растений. Большинство культивируемых в настоящее время сортов лилий размножается только вегетативно. Луковички (возникают на материнских луковицах или на побеге в небольших количествах. Технология микроклонального размножения позволяет получить из одной чешуи луковицы за 6 месяцев до 10^5 новых растений (сорт Red Carpet).

2. Получение генетически однородного посадочного материала.

3. Возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов благодаря клонированию меристематических тканей.

4. Возможность размножения растений, которые в естественных условиях репродуцируются с большим трудом.

5. Воспроизведение посадочного материала круглый год, что значительно экономит площади, занимаемые маточными и размножаемыми растениями.

6. Сокращение продолжительности селекционного периода, ускорение перехода растений от ювенильной фазы развития к репродуктивной.

1. Технология микроклонального размножения

Обязательное условие клонального микроразмножения — использование объектов, полностью сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса, от экспланта до растений в поле. Такому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки органов стеблевого происхождения, т. е. меристематические ткани. Их устойчивость к генетическим изменениям, вероятно, связана с высокой активностью систем репарации ДНК, а также с негативной селекцией измененных клеток.

Процесс клонального микроразмножения можно подразделить на 3 этапа:

1. Получение хорошо растущей стерильной культуры. На этом этапе необходимо правильно выбрать растение-донор, получить свободную от инфекции культуру, добиться ее выживания и быстрого роста на питательной среде.

2. Собственно размножение, осуществляемое несколькими способами:

- активизация пазушных меристем;
- индукция образования адвентивных почек тканями листа, стебля, чешуйками и донцем луковиц, корневищем и зачатками соцветий без первоначального образования каллусной ткани;
- микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование;
- стимуляция образования микроклубней и микролуковичек;
- индукция соматического эмбриогенеза.

3. Подготовка к высадке в поле или к реализации. Это очень важный этап, во время которого в теплице укорененные растения, полученные in vitro, адаптируют к новым условиям внешней среды: проводят закаливание растений, повышают их устойчивость к патогенным микроорганизмам и различным неблагоприятным факторам внешней среды. Существует много различных способов адаптирования растений к пересадке in vivo. Это подбор почвенного субстрата, создание определенной влажности, обработка химическими вещест-

вами (глицерин, парафин) для предотвращения обезвоживания листьев. Некоторые древесные растения лучше приживаются, если их заразить in vitro микоризообразующими грибами. Упрощенный способ адаптации пробирочных растений винограда был разработан в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Адаптацию проводят прямо в пробирках, снимая с них пробки, когда растения винограда дорастают до верха пробирки. Через 1,5—2 недели, когда верхушки побега с двумя развитыми листьями появляются над пробиркой, растение готово к пересадке в почву. Для предотвращения механических повреждений корневой системы растение пересаживают в почву вместе с агаром, заглубляя его так, что над поверхностью почвы остаются только 2 развитых листа, которые выросли из пробирки и уже адаптировались к внешним условиям. Такая методика позволяет значительно упростить, ускорить и удешевить этап акклиматизации растений.

Клональное микроразмножение растений проводят разными способами. Первый и основной способ — активизация пазушных меристем. Он состоит в снятии апикального доминирования и активизации развития меристем, существующих в растении. Этот способ основной и в обычном вегетативном размножении. И на интактном растении, и в случае клонирования снятие апикального доминирования достигается или удалением апикальной меристемы побега, или благодаря действию цитокинина. При клонировании цитокинины (6-бензиламинопурин, 6-фурфуриламинопурин, зеатин) добавляют в питательную среду, что приводит к развитию многочисленных пазушных побегов. Эти побеги отделяют от первичного экспланта и культивируют на свежей питательной среде. Активизацию пазушных меристем широко используют в промышленном размножении овощных сельскохозяйственных культур (картофель, томаты, огурцы, сахарная свекла, топинамбур и др.), цветов (гвоздика, роза, гербера), плодовых и ягодных культур (яблоня, вишня, малина, крыжовник и др.), древесных растений (туя, можжевельник и др.). Однако бесконечно размножать таким способом растения нельзя, поскольку длительное воздействие цитокининов, входящих в состав питательных сред, вызывает аномалии в морфологии стебля, потерю способности побегов к укоренению, иногда — гибель растений. В опытах с размножением земляники было показано, что при микроклональном размножении необходимо чередовать 2—3 цикла получения побегов с их укоренением.

Второй способ — индукция развития адвентивных почек, т. е. почек, возникающих из растительных клеток и тканей, которые их

обычно не образуют. Этот метод в значительной мере обусловлен тотипотентностью клеток. Почти любой орган или ткань растения, свободные от инфекции, могут быть использованы в качестве экспланта и в определенных условиях образуют адвентивные почки. Данный процесс вызывают внесением в питательную среду определенных концентраций цитокининов и ауксинов, причем цитокинина должно быть гораздо больше, чем ауксина. Это наиболее распространенный способ микроразмножения высших растений. Развивая адвентивные почки на апикальных и пазушных меристемах, размножают растения томата, лука, чеснока; на сегментах листовых пластинок — салат, глоксинию, фиалки; на тканях донца луковиц — лук, чеснок, гладиолусы, тюльпаны и другие луковичные растения.

Третий способ — микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование. Растения-регенеранты, полученные любым другим способом, можно черенковать в стерильных условиях, высаживать на свежую питательную среду, укоренять, и адаптировать к полевым условиям либо снова подвергать микрочеренкованию для того, чтобы увеличить количество посадочного материала.

Четвертый способ — размножение в биореакторах микроклубнями. Это один из способов ускоренного размножения оздоровленного материала. О. Мелик-Саркисов сконструировал гидропонную установку, позволяющую получать около 7000 микроклубней с 1 $м^2$ при массе одного клубня 5 г. Предусмотрена последующая механизированная посадка их в грунт. В отделе биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН создана эффективная полупромышленная замкнутая система пневмоимпульсного биореактора для получения микроклубней картофеля, в которой предусмотрена возможность воздействия на направление и скорость процессов клубнеобразования. Технологии клонального микроразмножения в биореакторах разработаны не только для сельскохозяйственных, но и для декоративных растений (лилии, гладиолусы, гиацинты, филодендроны и т.д.). Однако созданные установки пока носят лабораторный, модельный характер.

Пятый способ размножения — образование соматических зародышей — основан на морфогенных изменениях — соматическом эмбриогенезе. Впервые это явление было отмечено в середине 50-х годов XX в. в культуре клеток моркови. Формирование эмбриоидов в культуре осуществляется в два этапа. На первом соматические клетки дифференцируются в эмбриональные в присутствии в питательной среде ауксинов, обычно это 2,4-D. На следующей стадии развиваются эмбриоиды. Этот процесс идет только при значительном снижении

концентрации ауксина или полном отсутствии его в питательной среде. Соматический эмбриогенез может происходить в тканях первичного экспланта, в каллусной и суспензионной культурах.

Поскольку соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растения, данный метод позволяет сократить затраты, связанные с подбором условий укоренения и адаптации растений-регенерантов. Кроме того, преимущество получения соматических эмбриоидов состоит в том, что при использовании соответствующей техники капсулирования из них можно получать искусственные семена.

Соматический эмбриогенез в настоящее время применяют для размножения пшеницы, ячменя, моркови, редиса, винограда, некоторых древесных растений (дуб, ель, эвкалипт).

2. Оздоровление посадочного материала

Оздоровление посадочного материала начинается с момента стерилизации экспланта в асептических условиях бокса, с обработки ткани антибиотиками. Однако таким образом удается освободиться главным образом от бактерий, грибных инфекций, нематод. Вирусы, вироиды, микоплазмы остаются в тканях инфицированных растений. Именно из-за вирусных болезней погибает от 10 до 50 % урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативно. Некоторые бобовые растения (соя) могут передавать вирусы даже при семенном размножении.

В 1949 г. было выяснено, что клетки меристематических тканей растений обычно не содержат вирусов. В 1952 г. Дж. Морель и Г. Мартин предложили, используя культивирование меристем, получать здоровые, избавленные от вирусной инфекции растения. Они обнаружили, что при выращивании верхушки побега, состоящей из конуса нарастания и 2—3 листовых зачатков, на ней образуются сферические образования — протокормы. Протокормы можно делить, и каждую часть культивировать до образования корней и листовых примордиев, получая в большом количестве генетически однородные безвирусные растения. В настоящий момент культивирование меристем побега — наиболее эффективный способ оздоровления растительного материала от вирусов, вироидов и микоплазм. Однако при этом способе требуется соблюдать определенные правила. Как уже говорилось, чем меньше размер меристематического экспланта, тем труднее вызвать в нем морфогенез. Чем больше размер экспланта, тем легче идет морфогенез, в результате которого получается целое растение, но тем больше вероятность присутствия вирусов в экспланте. У

многих видов и сортов-растений зона, свободная от вирусных частиц, различна. Так, при клонировании апикальной меристемы картофеля размером 0,2 мм (конус нарастания с одним листовым зачатком) 70 % полученных растений были свободны от Y-вируса картофеля, но только 10 % — от X-вируса. В некоторых случаях не удается найти оптимальное соотношение между размером меристематического экспланта и морфогенезом в нем, и при этом избавиться от вирусной инфекции. Приходится дополнять метод культуры меристем термо- или(и) хемитерапией. Так, предварительная термотерапия исходных растений позволяет получать свободные от вирусов растения-регенеранты из меристемных эксплантов размером от 0,3 мм до 0,8 мм. Вместе с тем этот прием может вызвать отставание растений в росте, деформацию органов, увеличение латентных (скрытых) инфекций.

Хорошие результаты дает совместное применение метода культуры тканей и хемитерапии. При внесении в питательную среду препарата «Вирозол» (1-рибофуранозил-1,2,4-триазолкарбоксамид) количество безвирусных растений увеличивается до 80—100 %.

В настоящее время для диагностики вирусных растений используют иммуноферментную технику, моноклональные антитела, метод молекулярной гибридизации меченых фрагментов РНК- и ДНК-вироидов и вирусов с вирусами тестируемого объекта. Эти методы очень чувствительны, но трудоемки и дорогостоящи.

После оздоровления с помощью вышеперечисленных технологий нормальные растения-регенеранты размножают обычными методами клонального микроразмножения. Для некоторых растений, например цитрусовых, получить морфогенез из меристем малого размера не удается, поэтому требуется разработка оригинальных методов. Лимоны и апельсины оздоровляют и размножают, используя прививки меристем размером 0,14— 0,18 мм на пробирочные подвои, полученные из семян. Достоинство такого подхода состоит и в том, что развивающиеся из меристем побеги не имеют ювенильных признаков, при этом цветение и плодоношение ускоряются.

3. Криосохранение

Сохранение разнообразия форм жизни — важнейшая проблема, с которой столкнулось современное человечество. Еще Г.Ф.Гаузе доказал, что устойчивость сообщества тем выше, чем больше число составляющих его видов. Следовательно, сохранение биоразнообразия — единственный механизм стабильности жизни на Земле.

Кроме того, для обеспечения питанием растущего населения на-

шей планеты необходимо выведение новых, более продуктивных сортов сельскохозяйственных растений, а для успешной селекции важен постоянный приток генов из новых источников. Традиционным источником генетического материала служат дикие виды растений. Однако в связи с расширением городов, сельскохозяйственных угодий, вырубкой лесов, ухудшением экологии эти виды постепенно вытесняются, а многие из них находятся на грани вымирания, поэтому их необходимо сохранить.

Существует несколько способов сохранения генофонда высших растений: заповедники, национальные парки, банки семян. В последнее время большое внимание уделяется созданию и развитию новых способов: пересадочных коллекций каллусных клеток, депонированию культур клеток и, наконец, криосохранению, т.е. хранению объектов при очень низкой температуре, обычно это температура жидкого азота (-196°С). Криосохранение имеет существенные преимущества по сравнению с остальными методами. При сохранении в глубоко замороженном состоянии полностью прекращается обмен веществ, отсутствуют значительные физико-химические молекулярные изменения не только в клетке, но и в окружающей водной среде. Сохраняется генотип, а следовательно, все свойства замороженного объекта. Единственный негативный фактор, которого не удается избежать, — это фоновая ионизирующая радиация. Однако, по мнению М.Ашвуд-Смита, потребуется примерно 32000 лет для накопления 10% летальных хромосомных повреждений. Следовательно, криогенный метод дает возможность неограниченно долго хранить растительный материал без существенных изменений: сохраняются жизнеспособность клеток, их свойства, а также способность к морфогенезу и регенерации целых растений.

Сущность метода криосохранения сводится к замораживанию специально подготовленных растительных клеток при использовании криопротекторов — веществ, ослабляющих повреждения клеток при замораживании и оттаивании. В настоящее время известны два метода криосохранения: программное (медленное) и сверхбыстрое замораживание. Программное замораживание изучалось уже давно, поэтому оно довольно широко применяется для сохранения животных и растительных клеток. Разработка сверхбыстрого замораживания началась сравнительно недавно, однако считается, что именно этот метод со временем станет наиболее перспективным.

Трудности криосохранения растений связаны со спецификой растительных клеток. Клетки растений имеют большие размеры (в культуре тканей они изменяются от 15 до 1000 мкм), прочную целлюлоз-

ную стенку и вакуоли. Причем именно степень вакуолизации играет основную роль в устойчивости клеток к действию низких температур. В зрелой клетке центральная вакуоль занимает до 90 % общего объема клетки, т.е. клетка представляет собой как бы резервуар с водой, которая необходима для ее нормальной жизнедеятельности. Поэтому основные факторы, способные привести клетку к гибели при замораживании, — это образование льда и дегидратация. Обычно кристаллы льда сначала образуются во внешнем растворе вокруг клеток. Максимальная скорость их роста в зависимости от состава раствора находится в пределах температур от -20 до -60 °С. При температуре –140 °С рост кристаллов льда совершенно прекращается. Следовательно, и при замораживании, и при оттаивании клеткам очень важно с оптимальной скоростью «проскочить» температуру образования льда. Кристаллы внеклеточного льда могут механически разрушать клетки. Кроме того, они играют водоотнимающую роль, что приводит к значительной дегидратации клетки и возможной ее гибели от осмотического стресса. При очень быстром замораживании лед может образовываться и внутри клеток, что ведет к разрушению в ней многочисленных мембран.

Избежать кристаллизации льда помогла бы витрификация воды, т. е. затвердение ее в аморфном состоянии. Получить витрификацию чистой воды практически невозможно. Но в коллоидных растворах скорость образования центров кристаллизации и роста кристаллов льда снижается и повышается температура, при которой их рост прекращается. Все это облегчает витрификацию. Добавление криопротекторов также затрудняет кристаллизацию льда и способствует витрификации.

Наиболее известны такие криопротекторы, как диметилсульфоксид (ДМСО), различные сахара, глицерин, этиленгликоль и их производные. Действие криопротекторов состоит в снижении количества свободной воды, повышении вязкости раствора. Все криопротекторы делят на две группы: проникающие и непроникающие. Это разделение достаточно условно. Так, глицерин — первое вещество, определенное как криопротектор, может проникать в клетку, если его добавлять при комнатной температуре, или выступать как непроникающее соединение, если его добавлять при температуре 0 °С. Принято считать, что непроникающие криопротекторы специфически влияют на мембрану, повышая ее проницаемость. Применение сильных, проникающих в клетку криопротекторов ограничено их токсичностью. Поэтому обычно используют смеси криопротекторов, так как в них токсичность одного из веществ снижается за счет присутствия другого.

Жизнеспособность клеток после замораживания зависит не только от предупреждения образования льда, но и от их состояния. Крупные вакуолизированные клетки погибают гораздо чаще, чем мелкие меристемоидные. Поэтому на этапе подготовки культуры к замораживанию ее культивируют в условиях, способствующих образованию мелких клеток и синхронизации их деления.

Кроме того, концентрирование клеток в культуре, т.е. увеличение ее плотности, способствует повышению выживаемости клеток после замораживания.

Таким образом, криосохранение достаточно надежно обеспечивает сохранение генофонда. Перспективность этого метода подтверждается возобновлением после хранения в жидком азоте суспензионных культур моркови, явора, кукурузы, риса, сахарного тростника; каллусных — тополя, маршанции, сахарного тростника; андрогенных эмбриоидов — беладонны, табака и др. Из восстановленных после замораживания культур моркови и табака удалось регенерировать целые растения. После быстрого замораживания сохранили жизнеспособность меристемы земляники, малины, гвоздики, томатов, картофеля и ряда других растений. Однако для криосохранения требуется сложная работа по подбору условий, обеспечивающих выживание клеток и, следовательно, возможность последующей регенерации из них целых растений. Необходимо учитывать генетические и морфофизиологические особенности клеток, способность к закаливанию, уровень проницаемости клеточных мембран, подбор криопротекторов, скорость снижения температуры при замораживании, условия оттаивания.

Ключевые слова и понятия

антиоксиданты	тотипотентность
криопротекторы	фитогормоны
криосохранение	экспланты

Вопросы для самоконтроля:

1. Технология микроклонального размножения.
2. Способы клонального микроразмножения растений.
3. Оздоровление посадочного материала.
4. Криосохранение.
5. Методы криосохранения.

ГЛОССАРИЙ ТЕРМИНОВ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А

Авторадиограмма — фотографический отпечаток, фиксирующий расположение фракций ДНК, полученных в результате электрофореза и гибридизовавшихся с радиоактивно меченым зондом. Получают путем наложения чувствительной к радиоактивному излучению фотопленки на нитроцеллюлозную мембрану, полученную после Саузерн-блот гибридизации (см.).

Амниоцетез (amniocentesis) — взятие проб амниотической жидкости при пренатальной диагностике (см.) пороков развитая плода, генных и хромосомных мутаций, определении пола эмбриона путем прокола через кожу и мускулатуру брюшной полости, матку и амниотический мешок, окружающий плод. Клетки, отслаивающиеся от плода и находящиеся в жидкости в виде суспензии, культивируют в течение 3 недель, чтобы получить большее их количество и провести хромосомный, биохимический и молекулярно-генетический анализ. А. не может быть проведен раньше 16 недель беременности из-за недостаточных размеров мешка, в котором находится эмбрион.

Амплификация (amplification) — процесс увеличения (размножения) количества нитей ДНК, числа копий гена (см. Амплификация генов).

Амплификация генов (gene amplification) — 1. Увеличение числа копий к.-л. гена в данной клетке или в пробирке методом ПЦР — полимеразной цепной реакции (см.). 2. Любой процесс, при котором специфическая последовательность ДНК увеличивается непропорционально родительским клеткам. В течение развития некоторые гены амплифицируются в специализированных тканях, напр., рибосомные гены амплифицируются и активно функционируют в течение оогенеза, особенно в ооцитах некоторых амфибий. Гены у дрозофилы, кодирующие белки хорионов, также амплифицируются в овулирующих фолликулярных клетках.

Амплификатор, термосайклер (amplificator or thermocycler) — прибор, обеспечивающий по программе быстрое нагревание и охлаждение малых объемов реакционной смеси. А. используется для осуществления ПЦР — полимеразной цепной реакции (см.). Он позволяет проводить тепловую денатурацию ДНК (ок. 90-94°С), отжиг праймера (при 50°С) и удлинение праймера (синтез цепи ДНК при 70-72°С).

Антикодон — группа из трёх оснований, занимающая фиксированное положение в транспортной РНК (см. Транспортная РНК), которая комплементарна кодону (см.) в информационной (матричной) РНК (см. Информационная (матричная) РНК).

Б

Бактериофаг — вирус, поражающий определенный тип бактерий. Общее название вирусов, инфицирующих бактерии – фаги (бактериофаги).

Бактериофаг λ, фаг λ — умеренный бактериофаг, инфицирующий E. coli (см.). Его геном представляет собой линейную двунитчатую ДНК размером в 49 кб, упакованную в белковую оболочку. На каждом 5'-конце ДНК имеются одно-

цепочечные комплементарные участки (см. Cos-сайты) длиной в 12 нуклеотидов (см. Липкие концы, Космиды), что позволяет ей образовывать кольцевые структуры после попадания в клетку-хозяина. Фаг λ обладает способностью к умеренной инфекции, т. е. кроме разрушения клетки он может встраивать свою ДНК в хромосому бактериальной клетки и длительное время реплицироваться синхронно с ДНК хозяйской клетки.

Банк генов (gene bank) — набор генов данного организма, полученный на основе рекомбинантных ДНК (см. Геномная библиотека, Библиотека генов).

Библиотека генов (gene library) — коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма (см. Геномная библиотека, Банк генов) или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, напр., коллекцию иРНК (см. РНК информационная, кДНК), экспрессирующуюся в клетке в определенное время. В таких библиотеках фрагменты инсерцируются (включаются) в подходящие вектора, напр, космидные (см. Космида) или бактериальные векторы, и трансформируются (см. Трансформация) в подходящего хозяина. В идеале геномная библиотека должна содержать практически весь геном вида, из которого она происходит, а библиотека кДНК — все различные молекулы иРНК данной клетки на одной и той же стадии развития. Сейчас сконструировано множество типов генных библиотек для различных целей исследования.

Бластомеры (blastomere) — дробящиеся клетки, образующиеся при митотических делениях яйцеклетки (зиготы), которые обладают потенциями, реализуемыми в процессе развития. Б. не растут, поэтому уменьшаются в размерах при последовательных делениях.

Бластула (blastula) — зародыш многоклеточных животных, образующийся в процессе последовательных дроблений яйца (зиготы), от типа которых зависит строение Б.

Блоттинг (blotting – промакание) — этап процесса Саузерн-блот гибридизации, в результате которой весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

В

Вектор, переносчик — молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов, включать в себя чужеродную ДНК и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. Является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку (перенос) генетической информации в клетку-реципиент и ее клонирование (см.).

λ вектор — вектор сконструированный на базе фага λ (см.), использующийся при клонировании достаточно больших фрагментов чужеродной ДНК длиной около 15 кб.

Величина генома (genome size) — количество пар оснований (п. о.) в расчете на гаплоидный геном (см. Гаплоидный набор).

Вирусы — формы внеклеточной жизни, которые состоят из ДНК (ДНК-вирусы: аденовирусы, бакуловирусы, геминивирусы и др.) или РНК (РНК-вирусы: бромовирусы, ретровирусы и др.) и белковой оболочки. В. не содержат клеточных органелл и используют для репликации метаболизм клетки хозяина.

Клетка хозяина может быть разрушена в процессе репликации, и В. освобождается из клетки. В., патогенные для бактерий называют бактериофагами (см.).

Вирус sv-40, вирус обезьян — полиомавирус, геном которого состоит из кольцевой двунитчатой молекулы ДНК размером в 5,2 кб, содержащей 5 генов. Впервые был обнаружен у зеленой африканской обезьяны (зеленой мартышки) Cercopithecus aethiops. Инфицирует культивируемые клетки приматов, исключая человека. Размножение В. о. приводит к образованию до 100 000 вирусных частиц в одной клетке — это его свойство позволяет использовать вирусную ДНК в качестве эффективного вектора в генной инженерии.

Вырожденность кода — в молекулярной биологии генетический код (см.) является вырожденным, поскольку одна аминокислота кодируется более чем одним нуклеотидным триплетом, кодоном (см.). Напр., тирозин кодируется двумя триплетами УАУ и УАЦ, а лейцин может кодироваться даже шестью.

Г

β-галактозидаза (*β*-galactosidase) — фермент, который катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. У E. coli *β*.-г. является тетрамером, кодируемым 1ac-Z-геном, размером 500 Д. *β*.-г. относится к группе адаптивных ферментов, т. е. его синтез возможен только при наличии субстрата (лактозы) во внешней среде.

Гель — желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза макромолекул ДНК (агарозный Г.), РНК (агарозный, полиакриламидный Г.) или белков (полиакриламидный или крахмальный, Г.).

Ген — основная физическая и функциональная единица наследственности, несущая информацию от одного поколения к другому. Г. представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, а у некоторых вирусов — в РНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК (тДНК), или рибосомных РНК (рДНК), или последовательность аминокислот в белках. Как правило, Г. состоят из кодирующих (экзоны) и некодирующих (интроны) последовательностей. Интронные последовательности чаще всего встречаются у эукариот. Любой Г., занимает строго определенное место, или локус, в хромосоме и может мутировать в различные аллельные состояния, а также рекомбинировать с гомологичными генами. Действие Г. проявляется в фенотипе. По выполняемым функциям Г. подразделяют на 3 класса: а) структурные Г., которые транскрибируются (см. Транскрипция) на ДНК, а затем транслируются на рибосомах (см. Трансляция) в полипептидные цепочки; б) структурные Г., которые транскрибируются в рРНК или тРНК и сами непосредственно используются; в) регуляторные Г., которые не транскрибируются, но служат сайтами узнавания (см.) для ферментов и др. белков при репликации и транскрипции ДНК. Термин введен В. Иогансеном в 1909 г. и нередко заменяется понятиями "наследственный фактор".

Ген устойчивости — ген, кодирующий белок, который катализирует разрушение токсина. Г. у. часто используются в векторах клонирования (см.) для облегчения отбора трансформантов (напр., ген антибиотикоустойчивости и др.).

Генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов — точная идентификация (дактилоскопия) индивидуумов животных и растений на ос-

нове молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Генная дактилоскопия, ДНК-фингерпритинг, Фингерпринт ДНК, Сиквенирование ДНК, ПЦР-технологии).

Генетическая инженерия, генная и. — 1. Наука о генетическом конструировании, направленном создании новых форм биологически активных ДНК и генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток). 2. Экспериментальные разделы молекулярной и клеточной биологии, которые позволяют in vitro изменять структуру генов, создавать новые гены или конструировать химерные гены (см. рекомбинантная ДНК). Г. и. возникла в 1972 г., когда впервые П. Берг создал рекомбинантную ДНК, включавшую в себя фрагменты фага-λ, E. coli и вируса обезьян sv40 (см.).

Генетическая трансформация (genetic transformation) — см. Трансформация.

Генетические карты — карты линейного расположения генов на хромосоме (группы сцепления), выявленные в экспериментах по генетическим рекомбинациям, а также распределение генов по разным хромосомам, как правило, с указанием генетического расстояния между ними.

Генетический код — система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот (см.), основанная на определенном чередовании последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны (см.) соответствующих аминокислот белков. Каждый кодон кодирует одну молекулу аминокислоты. Г. к. триплетен (см. Триплет) — 3 нуклеотида кодируют 1 аминокислоту. Последовательности нуклеотидов в иРНК (см. РНК информационная) обозначены от 5' до 3', т. е. слева направо, т. к. имеется определенная направленность трансляции (см.). Код называют вырожденным (см. Вырожденность кода), если аминокислота определяется не одним, а большим числом кодонов. Код читается с фиксированной точки старта, в одном направлении, по 3 последовательно следующих друг за другом нуклеотида (триплета). Г. к. универсален для всех живых организмов.

Генная дактилоскопия — точная идентификация (дактилоскопия) личности на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. ДНК-фингерпритинг, Фингерпринт ДНК).

Геном (genom) — совокупность генов, характерных для гаплоидного набора хромосом данного вида организмов. Основной гаплоидный набор хромосом.

Геномная библиотека (genomic library) — набор клонированных (см. Клонирование) фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном (см. Библиотека генов, Банк генов). У млекопитающих (в т. ч. у человека) геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки (см.).

Гекомная ДНК (geitomic DNA) — 1. Вся хромосомная ДНК организма; 2. Ядерная ДНК в клетках эукариот (см. Дезоксирибонуклеиновая кислота).

Гибридизация праймеров — вторая стадия ПЦР в ходе которой при снижении температуры в реакционной смеси in vitro с 92°С до 50°С происходит гибридизация праймеров с матричными цепями ДНК (см. отжиг). Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

Гибридная (рекомбинантная) ДНК — новая последовательность ДНК, образованная in vitro путем лигирования (см.) двух или более негомологичных молекул ДНК. Напр., рекомбинантная плазмида (см.), содержащая одну или более вставок чужеродной ДНК, которые включены в сайт клонирования или в полилинкер. Организмы, содержащие такие in vitro сконструированные ДНК, также относятся к рекомбинантам (рекомбинантный фаг, бактерия). Рек. ДНК широко используется в генетической инженерии in vitro.

Д

Двухцепочечная молекула кДНК — см. кДНК, комплементарная ДНК.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, Ц, Г), апериодическим чередованием которых кодируется генетическая информация вирусов, бактерий и высших организмов. ДНК может быть однонитчатой (ssДНК), как, напр., у некоторых вирусов, или двунитчатой (dsДНК) у всех высших организмов. У двунитчатой ДНК две комплементарные нити закручены в спираль, одна нить вокруг другой с противоположной ориентацией (антипараллельны, 5' à à à 3' и, наоборот, 3' à à à 5'). Две нити удерживаются вместе водородными связями между комплементарными основаниями (А = Т; Г = Ц). ДНК способна к самоудвоению, что обеспечивает генетическую преемственность между поколениями в процессе размножения. Нарушение последовательностей нуклеотидов в цепи ДНК приводит к наследственным изменениям — мутациям.

Денатурация ДНК — 1. Процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, pH и др.). 2. Первая стадия ПЦР в ходе которой происходит нагревание температуры в реакционной смеси in vitro до 90°С. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы ДНК образуется две одноцепочечные.

ДНК-ДНК гибридизация (DNA-DNA hybridization) — процесс образования двухцепочечной ДНК из двух комплементарных однонитчатых молекул ДНК.

ДНК-лигаза — фермент, который катализирует образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. Связи образуются между С—С, С—S, С—О и С—N за счет энергии сопряженной реакции гидролиза. В технологии рекомбинантной ДНК используются в основном две ДНК-л., выделенные из E. coli и Т4. ДНК-л. соединяет две молекулы ДНК путем лигирования (см.) тупых или липких концов. Впервые была выделена Б. Вейсом и К. Ричардсоном в 1966 г.

ДНК-зонд (проба) — определенная (известная) радиоактивно- и нерадиоактивно меченая последовательность нуклеиновой кислоты, используемая в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих комплементарные последовательности. Для этого используется радиоавтография или к.-л. др. система детекции (обнаружения) нерадиоактивно меченого зонда.

ДНК-матрица (template) — последовательности оснований ДНК (РНК), служащие в качестве основы для синтеза комплементарных нитей нуклеиновых кислот (см.).

ДНК-полимеразы (DNA-polymerases) — ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У E. coli были выделены 3 типа ДНК-п.: pol I, pol II и pol III. Pol III является основным ферментом, ответственным за репликацию (см.) ДНК в клетке бактерий. Два др. фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-п., находящихся в разных частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие, как репликация. репарация и рекомбинация.

ДНК-фингерпринтинг, метод (техника) создания фингерпринта (DNA fingerprinting or DNA fingerprint technique) — (см. Фингерпринт ДНК), для чего геномная ДНК рестриктируется эндонуклеазами (см.), образующиеся фрагменты разделяются при помощи гелевого электрофореза (см.), переносятся на мембраны (нитроцеллюлозные фильтры, см.) и гибридизуются с мечеными зондами (с.м.) для фингерпринта (ДНК фага M13, различные синтетические олигонуклеотиды, кДНК; геномные зонды, содержащие последовательности генов; мини- и микросателлиты ДНК). В случае наличия в исследуемой ДНК участков, гомологичных зондам, образуются полиморфные полосы гибридизации, как правило, специфичные для каждого образца ДНК. Поэтому метод может быть использован для генетической идентификации (дактилоскопии) индивидуумов одного вида. Применяется при картировании геномов, выяснении отцовства, в криминалистике.

E

Escherichia coli, E. coli, кишечная палочка — грамотрицательная кишечная бактерия, широко известная в молекулярной биологии. Её геном (хромосома) включает ок. 4500 кб ДНК, организованных в 50 независимых топологических доменов, и содержит серию инсерций. В н. вр. весь геном E. coli секвенирован полностью. E. coli имеет большое значение для экспериментальных исследований рекомбинантной ДНК (см.), т. к. она служит хозяином для большого числа разных вирусов, плазмид и космидного клонирования векторов (см. Вектор клонирования. Космида).

EcoRI — одна из широко применяемых рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), извлекаемая из Escherichia coli, которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ГААТТЦ и разрезает ее между Г и А, образуя липкие концы (см.). В н. вр. выделено 7 рестриктаз группы EcoR — от EcoRI до EcoRVII.

И

Информационная (матричная) РНК (и-РНК, мРНК) — форма РНК, осуществляющая передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка, состоит из одной цепи, содержит от одной до десяти тысяч пар оснований.

Интроны, интрогенные районы (introns or intragenic regions or intervening sequences) — последовательности нуклеотидов у эукариотических генов, транскрибируемых в про-иРНК, которые затем вырезаются и деградируют в ядре. Остающиеся последовательности транскрипта (см. Экзоны) соединяются, образуя зрелую информационную РНК (см.), с которой осуществляется трансляция белка. Т. о. И. никогда не присутствуют в белке. И. различаются по длине (от 50 до 12000 нуклеотидов), по их числу на один ген (один и более) и по последовательности нуклеотидов. Однако в большинстве И. пограничные сайты между И.

и экзоном идентичны. Эти пограничные участки обеспечивают правильное вырезание (эксцизию, см.) И. и сплайсинг экзонов.

Искусственные генетические структуры — целенаправленно сконструированные (созданные) новые формы биологически активных ДНК и генетически новые формы клеток с помощью искусственных приёмов переноса фрагментов ДНК, целых генов или их частей.

In vitro (лат.), "в пробирке" — биологические процессы, смоделированные при их экспериментальном изучении в условиях изоляции от всего (целого) организма, т. е. "в пробирке", напр., культура ткани, фермент-субстратная реакция и т.д.

К

Картирование (mapping) — установление позиций генов или каких-то определенных сайтов (см.) вдоль нити ДНК (см. Генетические карты, Рестрикционные карты).

Картирование генов (gene mapping) — установление линейной организации генов, определение относительной локализации генов на хромосомах (см. Хромосомные карты) или плазмидах (кольцевая карта сцепления) и относительного расстояния между ними. Генетические карты можно создавать на основе анализа рекомбинаций (см.), принятого в классической генетике, или на основе данных молекулярной генетики, т, е. напрямую используя данные сиквенса ДНК (см. Сиквенирование ДНК).

Кб, килобаза (kb, kilobase) — единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот (см.), 1 кб = 1000 нуклеотидов, или пар оснований (п. о.), в двухцепочечной ДНК.

кДНК, комплементарная ДНК (cDNA, complementary DNA) — одно- или двунитчатая молекула ДНК, комплементарная молекуле иРНК. Образуется при обратной транскрипции иРНК с помощью обратной транскриптазы (см.) in vitro. кДНК соответствует определенному гену без интронов.

Кишечная палочка — см. Escherichia coli.

Клонирование (cloning or molecular c.) — получение клонов (см.) с помощью одного или многих методических приемов. Различают клонирование генов — выделение и амплификация отдельных генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование — размножение молекул ДНК в составе вектора.

Клонирование гена (gene cloning) — см. Клонирование

Клонирование ДНК (DNA cloning) — использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена, в клонирующий вектор (см.) и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, напр, в клетки кишечной палочки.

Кодон — последовательность из трех соседних нуклеотидов в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту либо начало и конец трансляции (см.), т. е. это дискретная единица генетического кода. Всего возможно 64 сочетания нуклеотидов в триплетах — 61 из них кодирует 20 аминокислот, а 3 являются нонсенс-кодонами (см. Стоп-кодон).

Кольцевые молекулы ДНК — см. плазмиды (кольцевые).

3'-Конец (3'-carbon atom end or 3'-terminus) — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной группой

(OH^-) у 3’-атома углерода рибозы или дезоксирибозы.

3’-Конец праймера — конец праймера со свободной гидроксильной группой (ОН) у 3’ атома углерода рибозы с которого Tag-полимераза достраивает растущую цепь ДНК в 5’-3’ направлении на третьей стадии цикла ПЦР (см.).

5'-Конец (5'-carbon atom end or 3'-terminus) — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной (OH^-) группой у 5'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы. С 5'-конца начинается синтез полинуклеотидных цепей в процессе репликации (см.), транскрипции (см.) и репарации (см.).

Конкатамер ДНК (DNA concatemer) — структура из нескольких повторяющихся (одна за другой) единиц гена. У некоторых фагов (напр., фагλ и Т4) геном во время репликации представлен в виде конкатамерных молекул — больших молекул ДНК, образованных из нескольких тандемно повторяющихся единиц генома.

Конструирование гибридных молекул ДНК — создание новых форм биологически активных ДНК с помощью искусственных приёмов переноса и сшивания различных фрагментов ДНК.

Концевая (терминальная) трансфераза (terminal transferase) — фермент, катализирующий достройку 10-40 дезоксинуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группам обоих концов двунитчатой ДНК или к однонитчатой ДНК, образуя 3'-гомополимерное удлинение нити (полидезоксиаденилат) и освобождая неорганический пирофосфат. Фермент используется для радиоактивного мечения молекулы ДНК и образования гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК. Т. т. широко используется в технологиях рекомбинантной ДНК (см.).

Космиды — векторная плазмида, содержащая cos-участок (cos-сайт) ДНК фага лямбда, являющийся местом замыкания его линейной формы в кольцо. Благодаря наличию cos-участка К., включающая чужеродные гены, может быть упакована в головку фага in vitro. Метод клонирования ДНК с использованием К. разработан Дж. Коллинзом и Б. Холманом в 1977 г.

Л

lac-Z-ген (lac-Z-gene) — ген лактозного оперона E. coli, кодирующего β-галактозидазу. Этот фермент катализирует превращение дисахаридов лактозы в моносахариды и глюкозу. lac-Z-ген входит в состав различных клонирующих векторов и выполняет роль репортерного гена (см.) в экспериментах по трансформации.

Лигаза, синтетаза — см. ДНК-лигаза.

Лигирование (ligalion) — 1. Процесс ковалентного соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемый с участием фермента лигазы. 2. Прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы (см.).

Лизирование, лизис (lysis) — разрушение растворение вирусами, клеток хозяина под действием ферментов, содержащихся в лизосомах и выделяемых инфицирующими вирусными частицами, в результате чего в среду высвобождается новое потомство вируса.

Лизогения (lysogeny or lisogenicity) — состояние бактериальной клетки, при котором в ее хромосоме находится один или несколько встроившихся умеренных бактериофагов (профагов) и при этом не инициируется синтез фагового материала, а профаги репродуцируются вместе с хромосомами хозяина, передаваясь при каждом клеточном делении в дочерние клетки. При Л. бактериофаг сохраняет способность выходить из генома клетки-хозяина.

Линкер, линкерная ДНК (linker, l. DNA) — Синтетический олигодезоксирибонуклеотид определенной последовательности, содержащий один или несколько сайтов узнавания (см.) для рестрикционных эндонуклеаз (см.). Л. может быть лигирован к любому тупому концу (см.) дуплексной ДНК с помощью Т4ДНК-лигазы (см.).

Липкий конец — термин, относящийся к двунитчатой молекуле ДНК, у которой одна нить длиннее ("выступающая"), чем другая ("заглубленная"). Выступающий участок нити может спариваться с др., комплементарным ему выступающим (липким) концом. Пример: два коротких (12 нуклеотидов) однонитчатых 5'-выступов на каждом конце линейного генома фага лямбда (cos-сайт). Эти Л. к. комплементарны по последовательностям нуклеотидов друг другу и могут спариваться, образуя кольцевую ДНК.

М

Маркер для селекции (селективный маркер) — специальный ген, кодирующий устойчивость к к.-л. антибиотику (напр., канамицину), который вводят в вектор для последующего отбора трансформантов.

Минисателлиты (minisatelliles) — короткие (9-64 н.п.), среднеповторяющиеся, тандемно организованные, высоко-вариабельные последовательности ДНК (обычно богатые ГЦ-последовательностями), рассредоточенные по геному человека (встречаются также у растений и животных). Они имеют одну общую короткую последовательность в 10-35 н.п. М.-с. проявляют значительный полиморфизм по длине, который возникает в результате неравного кроссинговера). В итоге в М.-с. изменяется число коротких тандемных повторов (см.), что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб. Короткий тандемно повторяющийся М.-с., являясь хорошим генетическим маркером для анализа сцепления (см. ДНК-фингерпринтинг), может использоваться в качестве гибридизационного зонда для одновременного обнаружения высокополиморфных М.-с. в пределах рестриктов ДНК. Вероятность идентичности того же набора фрагментов ДНК у двух человек теоретически настолько мала, что каждый человек считается уникальным по набору полос (за исключением однояйцевых близнецов, см.), выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

Молекула ДНК — см. Дезоксирибонуклеиновая кислота.

Молекулярная биология — область биологии, исследующая проявление жизни на молекулярном уровне. Основное направление М. б. — выяснение роли биологически важных молекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) в росте и развитии организмов, хранении и передаче наследственной информации, превращении энергии в живых клетках и т. п. явлениях. М. б. включает в себя молекулярную генетику, молекулярную вирусологию, молекулярную иммунологию и т. д. М. б. сформировалась в середине XX в. и бурно развивается в наши дни.

Молекулярная генетика — раздел современной генетики, изучающий за-

кономерности и молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и передачи наследственных признаков.

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний — точная идентификация наследственных заболеваний на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Саузерн-блот анализ, ДНК-фингерпритинг, Сиквенирование ДНК, ПЦР-технологии). Молекулярно-генетическая диагностика может давать точную идентификацию наследственных заболеваний на всех стадиях развития и жизни организма человека, начиная с восьмиклеточной бластулы (пре-эмбриона), всех эмбриональных стадий внутриутробного развития, пост эмбриональных стадий и т.д.

Н

Наследственно измененные организмы — см. Трансгенные организмы. Трансформированные организмы.

Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана — состоит из нитроцеллюлозных нитей, образующих поры определенного размера (0,45μм). Селективно (выборочно) улавливают двунитчатую ДНК или ДНК-РНК-гибриды, но свободно пропускают однонитчатые молекулы. Однонитчатые ДНК и РНК также могут задерживаться на Н. м., если ее проинкубировать при 80 °С в течение 2 ч (спекание). Такие блоты (пленки) используются в Саузерн- и Нозерн-блот экспериментах.

Нуклеотиды — органические вещества, состоящие из пуринового или пиримидинового основания, сахара рибозы (дезоксирибозы) и фосфорной кислоты; составная часть нуклеиновых кислот и многих коферментов (НАД, НАДФ, кофермента А и др.). Н. также называют нуклеозидфосфатами: аденозинмонофосфат (АМФ), гуанозинмонофосфат (ГМФ), цитидинмонофосфат (ЦМФ), уридинмонофосфат (УМФ) и тимидинмонофосфат (ТМФ). Н. являются некоторые макроэргические соединения, напр. АТФ.

О

Обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза (reverse transcriptase, RNA-dependent DNA-polymerase) — ретровирусный многофункциональный фермент класса трансфераз, синтезирующий двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы однонитчатой РНК. О. т. широко используются в ДНК-рекомбинантной технологии для синтеза кДНК (см.) с информационной РНК и в генной инженерии для получения нужных ДНК in vitro. У некоторых ретровирусов (см.) О. т. является мономером, у других — димером.

Олиго(dT) праймер (oligo(dT) primer — синтетический гомополимерный олигодезоксирибонуклеотид, который может быть подсоединен к поли(А)хвосту (см.) полиаденилированной иРНК и использоваться как праймер (см.) для синтеза первой нити кДНК с помощью обратной транскриптазы.

Олигонуклеотидные затравки — см. праймер.

Отжиг (annealing) — процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двухцепочечную молекулу с водородной связью между комплементарными нуклеотидами двух цепей. О. может происходить между комплементарными цепочками ДНК или РНК, в результате образуются гибридные двухцепочечные молекулы. Название обусловлено тем, что процесс О. связан с первоначальным нагреванием образца и последующим его охлаждением.

П

Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК — создана в 1972 г. П. Бергом, которая включала в себя фрагменты фага λ, E. coli и вируса обезьян sv-40.

Плазмиды — внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более кб и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (напр., устойчивость к антибиотикам). Конъюгативные П. имеют набор генов, обеспечивающих их перенос в др. клетки. Бактериальные П. широко используются для конструирования векторов клонирования. Термин «П.» предложен Дж. Ледербергом и др. в 1952 г.

Плазмида pBR322 — серия сравнительно небольших, мультикопийных и неконъюгативных плазмидных векторов клонирования, содержащих гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину, а также несколько уникальных сайтов клонирования (или полилинкеры). Сайты клонирования локализованы в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде. Плазмида синтезирована в 1977 г. мексиканскими исследователями Боливаром и Родригесом. Они использовали ген тетрациклин-устойчивости от pSC101, ориджин репликации ori и rep-ген от ColE1, а ген ампициллин-устойчивости — от транспозона Tn 3. Плазмида реплицируется в E. coli.

Плазмида pSC101 — первая плазмида, которую начали использовать в генной инженерии. Несет только один сайт рестрикции для EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Обладает геном устойчивости к антибиотику тетрациклину и поэтому легко обнаруживается в бактериях на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и клонирования первых гибридных (рекомбинантных) ДНК (см.).

Плазмида pUC18 — один из серии относительно мелких E. coli плазмидных векторов клонирования (см.), содержащий PvuII / EcoR-фрагмент из pBR322 (см.) с amp^r геном, кодирующим ампиниц иллин-устойчивость, ориджином репликации ori (см.) и последовательностями, кодирующими α-пептид lac-Z-гена (β-галактозидазы) с полилинкером (см.). Инсерция чужеродной ДНК в полилинкер приводит к нарушению β-галактозидазного гена. В этом случае хозяйская бактериальная клетка образует бесцветные колонии, если она растет на среде с ампициллином и субстратом X-gal, который должен расщепляться при помощи β-галактозидазы. Штаммы, трансформированные плазмидой pUC18 без вставки чужеродной ДНК на той же среде с X-gal, образуют колонии окрашенные в синий цвет. Т. обр., можно легко отбирать рекомбинантные (т. е. с чужеродной ДНК) колонии.

Поли(А), полиаденилат (poly(A) or polyadenylate) — гомополимер, содержащий остатки адениновых нуклеотидов. Практически все мРНК эукариот на своих 3'-концах содержат последовательность поли(А) или поли(А) хвост.

Полилинкер, сайт множественного клонирования (polylinker or multiple cloning site) — синтетический двунитчатый олигонуктлеотид, содержащий много сайтов рестрикции (см.). П. вводят в векторы, чтобы расширить их возможности для клонирования чужеродных ДНК в любом из этих сайтов.

Полимеризация — третья стадия цикла ПЦР в ходе которой при увеличении температуры в реакционной смеси in vitro с 50°С до 72°С Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов до размеров матричной нити ДНК. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате количество ДНК удваивается. Фермент Tag-полимераза был выделен из термофильных бактерий Thermus aquaticus, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью.

Полимеразная ценная реакция, ПЦР (polymerase chain reaction, PCR) — процесс амплификации (см.) in vitro, при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб может быть амплифицирован (размножен) до 10^8 раз (копий). Для этого синтезируются два олигонуклеотида размером в 10-30 нуклеотидов, комплементарных последовательностям на двух концах исследуемой ДНК. Избыточное количество этих двух олигонуклеотидных праймеров (см.) смешивается с геномной ДНК, смесь нагревается для денатурации дуплексов ДНК. При последующем снижении температуры праймеры присоединяются к их геномным гомологам и могут с помощью ДНК-полимеразы удлиниться, т. е. на ДНК-матрице синтезируется вторая цепь. Последовательный процесс (цикл процессов) денатурации, отжига праймера и его удлинения повторяется 20-40 раз. В результате происходит экспоненциальное увеличение копий изучаемой ДНК. За 25 амплификационных циклов количество целевых последовательностей ДНК увеличивается приблизительно в 10^6 раз. Для синтеза новых цепей ДНК используются термостабильные ДНК-полимеразы (Taq-полимераза, Vent™-ДНК-полимераза). В н. вр. ПЦР нашла широкое распространение в молекулярной биологии и на ее основе разработано множество методов анализа геномов. Имеет место также инвертированная полимеразная цепная реакция, т. е, модификация обычной ПЦР, позволяющая амплифицировать неизвестные последовательности ДНК, прилежащие к коровой области известной последовательности.

Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR) — модификация стандартного метода ПЦР, позволяющая осуществлять амплификацию (см.) целевых последовательностей ДНК с помощью произвольно взятых праймеров (см.), без предварительного знания нуклеотидных последовательностей данного генома. Метод позволяет выявлять полиморфизм между штаммами бактерий и грибов, различными сортами растений.

Последовательность узнавания — см. Сайт узнавания.

Правило Чаргаффа — правило, гласящее, что в любой двунитчатой молекуле ДНК число адениновых оснований всегда равно числу тиминовых (А = Т), а число гуаниновых — числу цитозиновых (Г = Ц) оснований. Согласно П. Ч. количество пиримидинов (Т + Ц) равно сумме пуринов (А + Г). П. Ч. открыто в 1950 г. и лежит в основе классической модели ДНК Уотсона—Крика.

Праймер, затравка (primer) — короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-

концу ДНК-полимераза (см.) может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'—3'-направлении. У прокариот РНК-полимераза (см.) катализирует синтез таких РНК-праймеров для репликации ДНК. П. также нужны для РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, см), In vitro (см.) используются синтетические П. размером до 10 п. о. для реакции полимеризации ДНК с помощью ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы, П. нужны для синтеза кДНК, ДНК секвенирования по Сэнгеру (см.), полимеразной цепной реации, ПЦР (см.) и др.

Пренатальная стадия развития — стадия развития зародыша (плода) живородящих животных в период перед рождением. Этим термином обычно обозначают поздние стадии развития зародыша млекопитающих.

Принцип комплементарности — пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных (Ван-дер-Вальсовых, водородных, ионных) связей между ними. Уникальность и прочность комплементарных структур определяется высокой избирательностью, большой площадью взаимодействия на уровне атомных группировок или зарядов по принципу «ключ - замок» (комплексы антиген – антитело и фермент – субстрат, четвертичная структура белков, вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот). Наиб. ярко К. проявилась в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу. Уникальная вторичная и третичная структура одноцепочечных полинуклеотидов (тРНК, рРНК) также определяется комплементарным спариванием оснований с образованием «петель» и «шпилек» вдоль по цепи. К. лежит в основе мн. явлений биол. специфичности, связанных с «узнаванием» на молекулярном уровне.

ПЦР (PCR) — см. Полимеразная ценная реакция.

ПЦР-амплификации — см. полимеразная ценная реакция (ПЦР), амплификация генов.

ПЦР технологии — различные методы размножения (амплификация) ДНК с помощью ПЦР.

Р

Радиоактивно меченный ДНКовый зонд — см. ДНКовый зонд.

Разделение рестрикционных фрагментов ДНК — см. Электрофорез в агарозном геле.

Распознаваемые участки — см. Сайты распознавания.

Репликация — процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации в ряду поколений. Термин Р. в основном используется для определения процесса синтеза новой нити ДНК на матричной нити ДНК с целью точного копирования информации, содержащейся в геноме. Р. ДНК является полуконсервативной. Основные стадии этого процесса включают разделение нитей ДНК с образованием репликативной вилки, связывание ДНК-полимеразы и добавление комплементарных нуклеотидов начиная с 3'-конца. Нить, непрерывно реплицирующаяся (ведущая нить, лидерная нить), должна отделяться от др. (запаздывающей) нити, которая реплицируется прерывисто, короткими кусками (фраг-

менты Оказаки). После синтеза фрагменты Оказаки лигируются (с участием ДНК-лигазы), образуя целую запаздывающую нить.

Репортерный ген (reporter gene) — ген, хорошо изученный генетически и биохимически, который легко может быть сшит с регуляторной областью др. генов. Его активность в норме не обнаруживается в организме, в который этот ген переносится. Активность большинства Р. г. можно легко протестировать достаточно простыми методами (напр., определением ферментативной активности белкового продукта для галактозидазы, β-глюкуронидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы, люциферазы, неомицин фосфотрансферазы, нопалинсинтазы и др.).

Рестриктазы — ферменты рестрикции, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции (см.). Р. могут кодироваться не только геномом бактерий, но также плазмидами и бактериофагами. Являются одним из главных инструментов генной инженерии, широко используются для получения рекомбинантных ДНК(см.). Синоним – рестрикционные эндонуклеазы.

Рестрикционные карты — диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания (см.) рестриктазами. Самыми полными являются Р. к., построенные для небольших молекул ДНК (напр., хромосом прокариот). Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса sv-40.

Реципиентный организм, реципиент — 1. Любая клетка или организм, получающий: а) новую генетическую информацию в форме чужеродной ДНК или РНК; б) к.-л. биологический материал от др. организма-донора. 2. Клетка, принимающая генетический материал при трансдукции и конъюгации.

Ровные (тупые) концы — термин, относящийся к двухцепочечным фрагментам ДНК у которых ни одна нить на концевых участках не выступает за другую в отличие от липких концов (см.). Р.к. образуются в результате действия рестриктаз (рестрикционных эндонуклеаз) Alu I, Ecor V, Hpa I, Nac I, Pvu II, Sma I и др., а также путем удаления однонитчатых концов с помощью S1-нуклеазы или достройки их с помощью ДНК-полимеразы I.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — чаще всего однонитчатый полинуклеотид, характеризующийся наличием в нем сахара рибозы и урацила (вместо дезоксирибозы и тимина в ДНК). Обеспечивает передачу генетической информации (информационная иРНК и транспортная тРНК), служит в качестве структурного каркаса для рибосом (рибосомная рРНК) и выполняет ферментативные функции (рибозимы). Около 90% всей клеточной РНК составляет рРНК, около 8% составляет тРНК, а на долю иРНК приходится менее 2%. У эукариот молекулы РНК, как правило, транскрибируются в виде больших молекул (предшественников про-РНК), а затем путем сплайсинга и др. посттранскрипционных модификаций преобразуются в активные (зрелые) формы, имеющие меньшие (иногда существенно) размеры. У про- и эукариот функции РНК сильно различаются. У многих вирусов вся генетическая информация вместо ДНК содержится в одно- и двунитчатых РНК.

Рибосома — органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка. Р. представляет собой асимметричную рибонуклеопротеидную частицу диаметром 10—20 μm, которая состоит из двух субъединиц и обладаю-

щая каталитической функцией, ответственной за образование пептидных связей, т. е. за полимеризацию аминокислотных остатков в полипептидную цепь белка. При связывании Р. с информационной РНК начинается синтез полипептидов. Малая субъединица содержит единственную цепь рРНК (16S — у прокариот, хлоропластов и растений, 18S рРНК — у животных), ассоциированную с рибосомным белком (5-белки), которая связывается с иРНК. Крупная субъединица является комплексом единственной большой цепи рРНК (23S рРНК — у прокариот, 25S — у растений и митохондрий, 28S — у животных), одной или двух малых рРНК (5S— у прокариот, 5S и 5,8S— у эукариот) и рибосомных L-белков. Этот комплекс несет сайт для присоединения 2—3 молекул транспортной РНК.

С

Сайт клонирования — место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде в процессе клонирования (см.).

Сайт рестрикции — последовательность пар оснований в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее.

Сайт узнавания — специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания. Обычно С. у. представлен коротким палиндромом.

Cos-сайты (cos-sites) — однонитчатые, комплементарные участки на обоих концах ДНК фага лямбда (см. Липкие концы), состоящие из 12 нуклеотидов. Обеспечивают фагу образование кольцевых структур путем соединения водородными связями комплементарных концов и упаковку ДНК в фаговые частицы. С. cos используются для конструирования космид (см.).

Самостоятельная репликация — способность ряда внехромосомных генетических элементов (плазмид) к автономной репликации.

Саузерн-блот анализ — анализ молекул ДНК и их фрагментов при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

Саузерн-блот гибридизация — метод, позволяющий идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, денатурируются до одноцепочечных молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры. Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий специальный радиоактивно меченный ДНКовый зонд – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая фракции

гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (авторадиограмме) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Метод разработан Э. Саузерном и Р. Дейвисом в 1975 г.

Светящиеся фракции ДНК — двунитчатые фракции ДНК в агарозном или полиакриламидном геле, окрашенные красителем этидий бромидом, в комплексе с которым приобретают малиновую окраску при УФ освещении.

Сиквенирование ДНК (DNA sequencing) — метод определения последовательности оснований в молекуле ДНК. Существует несколько методов секвенирования: автоматическое, химическое, прямое, секвенирование по Максаму-Гилберту, Сэнгеру и др.

Сиквенирование ДНК по Максаму-Гилберту, химический метод (Maxam-Gilbert sequencing or chemical s.) — один из наиболее распространенных методов определения первичной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, Вначале ДНК режется на фрагменты размером 0,6—2,0 кб, концы фрагментов метятся радиоактивной или нерадиоактивной меткой и плавятся для получения однонитчатых молекул. Радиоактивное мечение может осуществляться изотопами серы ^{35}S или фосфора ^{32}P, нерадиоактивное мечение — с помощью биотиновой или флуоресцентной метки. После мечения образец ДНК разделяется на 4 части, каждую из которых обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор 5'-меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, полученные в результате 4 типов реакции, подвергаются электрофорезу (см.) в полиакриламидном геле, и затем полосы выявляются соответствующим методом в зависимости от способа мечения. На основе результатов электрофореза определяются нуклеотиды и их последовательность в исходной ДНК.

Сиквенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (Senger sequencing or enzymatic method s.) — техника сиквенирования (см.) однонитчатой ДНК. В основе метода — присоединение к однонитчатой ДНК-матрицы сиквенирующего праймера (см.) (обычно синтетических олигонуклеотидов). Реакционная смесь переносится в 4 пробирки, куда добавляются все 4 дезоксинуклеозидтрифосфата, один из которых мечен по ^{32}P. Каждая пробирка содержит также различные дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ и ддТТФ). Для синтеза комплементарной цепи к однонитчатой последовательности-матрицы в пробирки добавляется фермент ДНК-полимераза(см.). В результате происходит удлинение праймера в соответствии с матричной последовательностью. Когда в растущую цепь вместо соответствующего дНТФ в матрице включается ддНТФ, 3'-конец растущей цепи теряет гидроксильную группу и не может дальше удлиняться: цепь терминируется. В итоге каждая реакционная смесь получит набор радиоактивно меченных фрагментов ДНК с общим 5'-концом (праймер), но с разными 3'-концами. После окончания реакции ДНК денатурируется, затем подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле (см. Секвенирующий гель) и с помощью радиоавтографии (см.) выявляются радиоак-

тивные полосы. Последовательность нуклеотидов в исходной ДНК-матрице может затем прочитываться прямо с радиоавтограммы.

Скрининг — поиск в генной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

Создание рекомбинантных ДНК — конструирование новых последовательностей ДНК, образованных in vitro путем сшивания двух или более негомологичных молекул ДНК. Первая рекомбинантная ДНК была создана (сконструирована) в 1972 г. П. Бергом и включала в себя фрагменты фага λ, E. coli и вируса обезьян sv40 (см. Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК).

Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор — тринуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полилептидной цепи от рибосомы (см.). Существует три различных типа данных С.-к.: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Ни один из них не соответствует антикодону тРНК.

Sma I — одна из рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ЦЦЦГГГ и разрезает ее между Ц и Г, образуя ровные (тупые) концы (см.).

Т

Tag-полимераза, Tag-ДНК-полимераза (Tag polymerase or Tag DNA p) — фермент из термофильной эубактерии Thermus aquaticus, осуществляющий полимеризацию дезоксинуклеотидов. Фермент исключительно термостабилен (оптимум температуры 70-75 °С) и обеспечивает выборочную амплификацию (см.) любой клонированной ДНК до 10 млн. раз с высокой точностью методом т. н. полимеразной цепной реакции (см. ПЦР). Может использоваться для мечения фрагментов ДНК с помощью радиоактивных нуклеотидов, а также биотина или дигоксигенина.

Thermus aquaticus — термофильная эубактерия, обитающая в горячих источниках. Из нее был выделен фермент Tag-полимераза, который отличается устойчивостью к высокой температуре и способен работать с большой скоростью при температуре 70°С в ходе третьей стадии цикла ПЦР.

Таблица (словарь) генетических кодов, с. кодонов (genetic code table (dictionary)) — таблица, включающая генетические значения отдельных кодонов (см.), или триплетов (см.), соответственно продуктам их функционирования. Содержит 64 кодона, из которых 61 смысловой т.е. каждый из них кодирует конкретную аминокислоту и 3 стоп-кодона (см.), или нонсенс-кодона, которые сигнализируют об окончании синтеза полипептида и освобождении полипептидной цепи от рибосомы (см.).

Тандемный повтор (tandem repeat) — организация двух или более расположенных рядом одинаковых последовательностей в пределах двунитчатой молекулы ДНК. Возможны два типа их ориентации — прямые повторы (голова к хвосту 5' – ЦГААТЦ ГТТАТЦГ ГТТАТЦГ АЦГГТ - 3') или непрямые повторы (голова к голове 5' - ЦГААТЦ ЦТТАТЦГ ГЦТАТТГ АЦЦГТ - 3'). Т. п. в области кодирующих генов могут вести к тандемно повторяющимся аминокислотным последовательностям.

Транскрипция — синтез молекул РНК на ДНК- или РНК-матрице, осуществляемый ДНК-зависимой или РНК-зависимой РНК-полимеразой. Т. — первый этап реализации генетической информации, записанной в ДНК, осуществляемый

с участием фермента РНК-полимераза у прокариот и не менее 3 типов РНК-полимераз, транскрибирующих гены у эукариот.

Трансляция — считывание (декодирование) информационной РНК, рибосомами (см.) и транслирование этого кода в белок. Процесс Т. начинается с того, что 5'-лидирующее окончание иРНК связывается с рибосомой. Затем иРНК движется через рибосому и служит матрицей для встраивания аминокислот в белок. Как только 5'-лидирующий конец иРНК пройдет через первую рибосому, он может связаться с др. рибосомой, на которой вновь будет происходить повторное декодирование и синтез белка (трансляционная амплификация). Как только 3'-поли(А)хвост иРНК выйдет из первой рибосомы, вновь синтезированный белок отделяется, а рибосома может начать следующий цикл Т. Группировка аминокислот в белок, осуществляемая с помощью тРНК, начинается с аминоконца (N-конец) и заканчивается карбоксильным концом (С-конец). На рибосоме имеются два сайта связывания для тРНК: Р- и А-сайты. Р-сайт (пептидил тРНК-сайт) связывает тРНК, которая прикрепляется к концу исходной полипептидной цепи, а А-сайт (аминоацил тРНК-сайт) связывает вновь подходящую тРНК, которая несет следующую аминокислоту. Связывание каждой тРНК с этим сайтом обеспечивает спаривание оснований ее антикодона (см.) с соответствующим кодоном иРНК, движущейся через рибосому. Изменение скорости трансляции иРНК регулирует экспрессию генов.

Транспортная РНК (т-РНК) — низкомолекулярная РНК (содержит 75-90 нуклеотидов), обеспечивающая перенос аминокислот к рибосомам (см.) для включения их в белки. т-РНК имеют специфическую вторичную структуру в виде “листа клевера”, антикодон расположен в антикодоновой петле, а на 5'-конце всегда находится гуанин (G). Аминокислоты присоединяются к 3'-концу последовательности ССА в тРНК в результате реакции аминоацилирования. Модель “листа клевера” для вторичной структуры тРНК предложена Р. Холли с сотр. в 1965 г.

Трансформация — 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки при помощи изолированной ДНК с участием или без участия плазмид (см.), но всегда без участия вирусов. 2. Направленная модификация генома клетки с помощью очищенной или рекомбинантной ДНК из клетки др. генотипа, которая интегрирует (поглощается) в геном модифицируемой клетки. 3. Изменение морфологии клетки или др. ее характеристик (напр., неопластического роста и др.), происходящее после интеграции нуклеиновой кислоты от онкогенных вирусов в клеточный геном, после воздействия химическими канцерогенами или спонтанно (онкогенная Т.). 4. Изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые обнаружена в 1928 г. у пневмококков Ф. Гриффитом.

Трансгенные организмы — организмы, в наследственные структуры которых искусственно введён хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма.

Трансформированные организмы — организмы с измененными наследственными свойствами в результате проникновения в них чужеродной ДНК.

Триплет — комбинация из трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты (см. Кодон).

У

Участок расщепления — см. Сайт рестрикции.

Участок узнавания — см. Сайт узнавания.

Ф

Фаги — см. Бактериофаги.

Ферменты рестрикции — см. Рестриктазы.

Фетальные клетки — эмбриональные зародышевые клетки, отслаивающиеся от плода и находящиеся в амниотической жидкости в виде суспензии. Эти клетки путем амниоцетеза (см.) можно извлечь из амниотической жидкости для культивирования и проведения их хромосомного, биохимического и генетического анализа.

Фетус (от лат. fetus) — зародыш.

Фильтр из нитротцеллюлозной плёнки — см. Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана.

Фингерпринт ДНК (DNA fingerprint) — высокоспецифичные гибридизационные полосы на электрофореграммах (фингерпринт), образующиеся как результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК (ПДРФ, см.). Причиной такого полиморфизма могуг быть мутации в пределах сайта рестрикции (см.), повторы ДНК (мини- и микросателлиты) и др.

Фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом — часть молекул ДНК, которые после электрофоретического фракционирования комплементарно связались с радиактивным зондом в процессе Саузерн-блот гибридизации.

Х

X-Gal — специальный субстрат, который расщепляется ферментом β-галактозидазой (продукт гена lac-Z) (см.) с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Широко используется в генной инженерии для детекции (выявления) бактериальных колоний содержащих плазмиды со встроенной чужеродной ДНК.

Химерные плазмиды — плазмиды содержащие вставку (фрагмент) чужеродной ДНК.

Хромосомная библиотека (chromosome specific library) — один из видов геномной библиотеки (см.), используемый для анализа геномов больших размеров, напр. человека. Х. б. создают клонированием (см.) фрагментов ДНК индивидуальных гомологичных хромосом.

Ч

Чужеродная ДНК — ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

Э

Экзоны (exons) — последовательности эукариотных генов, которые, как правило, сохраняются при процессинге (см.) про-иРНК и образуют зрелую матричную, или информационную РНК. Э., как правило, чередуются с нитронами (см.). Э. кодируют три принципиально различные функции: а) функцию лидера: первый Э. содержит сигналы для инициации транскрипции (см.) и последовательности с функцией, управляющей присоединением матрицы к рибосомам (см.), и не транслируется (см. Трансляция) в белок; б) функции матрицы (ин-

рмации); Э. содержат информацию, которая обеспечивает образование белка из отдельных аминокислот; в) терминирующие функции (см. Терминация): последний Э. включает последовательности, которые в зрелой иРНК являются сигналом для окончания трансляции, а также гомополимерное адениловое окончание (хвост) — поли(А) иРНК. Термин экзон предложен У. Гилбертом в 1978 г.

Экспрессия гена — реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции (см.) и трансляции (см.) иРНК.

Электрофорез в агарозном геле — Метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру. Молекулы мигрируют через инертный агарозный гель под действием электрического поля. Э. открыт Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. В биологии Э. начал использовать А. Тизелиус, сконструировавший первый прибор для электрофоретического разделения белков в 30-е гг. XX в.

Электрофоретическая камера — часть прибора для проведения электрофореза. Различают вертикальную и горизонтальную Э.к.

Элонгация (elongation) — удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

Этидиум бромид (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиум бромид) — флуоресцирующий краситель (канцероген), который обладает способностью интеркалировать между парами оснований в двунитчатой ДНК и РНК. Комплекс нуклеиновой кислоты с Э. б. флуоресцирует под УФ светом. Используется для визуального обнаружения двунитчатых молекул ДНК в агарозном и полиакриламидном геле (см.) при флуоресцентном излучении в 590 нм. Э. б. позволяет производить количественную оценку содержания нуклеиновых кислот в препарате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биотехнология. Принципы и применение (под ред. И. Хиггенса).- М.: Мир.- 1980.
2. Ворфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология. - М.: Высшая школа.- 1980.
3. Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. - М.: Наука, 1984.
4. Гриневич А. Г., Босенко А. М. Техническая микробиология. - Мн.: Вышэйшая школа, 1986.
5. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ. - М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
6. Биотехнология сельскохозяйственных растений. - М.: Агропромиздат, 1987.
7. Льюин Б. Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
8. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. - М.: Мир, 1987.
9. Серия "биотехнология": В 8 т./ Под ред. Н. С. Егорова и В. Д. Самуилова. - М.: Высш. шк., 1987-1988.
10. Вакула В. Что такое биотехнология? - М.: Молодая гвардия-1989.
11. Картель Н.А. Биоинженерия: методы и возможности. - Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с.
12. Бекер М. Е., Лиепиный Г. К., Райнулис Е. П. Биотехнология. - М.: Агропромиздат, 1990.
13. Сидоров В.А. Биотехнология растений. — Киев: Наукова думка 1990.
14. Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования. - М.: Агропромиздат, 1991.
15. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: Учеб. Пособие для высш. пед. учеб. заведений.– М.: Издательский центр "Академия", 2003.
16. Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии. - Мн.: Вышэйшая школа, 2005.
17. Snustad P., Simmons M. Principles of genetics. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
18. Griffiths A.J., Gelbart W.M., Miller J.H. et al. An introduction to genetic analysis.– Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.
19. Nicholl D. An introduction to genetic engineering. / Second edition – Cambridge University press. 2002. – 292 p.
20. Hartwell L., Hood L., Goldberg M. et al. Genetics: from genes to genomes.– McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

ГОНЧАРЕНКО Григорий Григорьевич
КРУК Андрей Викторович

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Тексты лекций

В авторской редакции

Лицензия ЛВ № 02330/0133208 от 30 апреля 2004 г.
Подписано в печать 01.07.2005 г. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетая.
Печать офсетная. Гарнитура "Таймс". Уч.-изд. л. 8,9.
Усл.-п.л.6,1. Тираж _____. Заказ № ____.

Учреждение образования
"Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины"
246019, г. Гомель, ул. Советская, 104

Отпечатано в учреждении образования
"Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины"
246019, г. Гомель, ул. Советская, 104