

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Романчук Иван Сергеевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 05.06.2024 14:30:39
Уникальный программный ключ:
6319edc2b582ffdacea443f01d5779368d0957ac34f5cd074d81181530452479

ФГАОУ ВО «ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УТВЕРЖДЕНО
Зам. директора ШЕН,
доцент
Креков С.А.
РАЗРАБОТЧИК(И)
Котов И.А., Пак И.В.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
Генетическая инженерия
для обучающихся по специальности
06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика,
специализация: Молекулярная и клеточная биоинженерия,
форма обучения очная

УДК: 577.21

ББК: Е04я73

Аз: П13

Пак И.В., Трофимов О.В. Генетические методы в биотехнологии: Учебно-методическое пособие для студентов специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика очной формы обучения. Тюмень: Вектор Бук, 2020, 75 с.

Учебно-методическое пособие состоит из описания практических занятий по курсу «Генетика», которые включают краткую теоретическую часть, задания к практическим занятиям, список рекомендуемой литературы. Целью практических занятий является закрепление материала, получаемого на лекционных занятиях.

Рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией Института биологии ТюмГУ.

РЕЦЕНЗЕНТЫ: заведующий кафедрой ботаники, биотехнологии и ландшафтной архитектуры Тюменского государственного университета, д.с.-х.н., профессор Н.А. Боме;
заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии», д.б.н., профессор В.Н. Домаций.

© ФГАОУ ВО Тюменский государственный университет, 2020

© И.В. Пак, О.В. Трофимов, 2020

2

Введение

В настоящее время генетика, методы генетики все шире внедряются в жизнь современного человека. Это и заявленные в Указе Президента (№ 97 от 11 марта 2019 г.) генетическая паспортизация, создание национального банка сывороток крови, а также использование генетических методов в медицине и биотехнологии.

Основой современной биотехнологии является генетика, ее разделы – генетическая и клеточная инженерия. Согласно определению Европейской биотехнологической федерации, созданной в 1978 г., биотехнология на основе применения знаний и методов генетики, биохимии и микробиологии позволяет извлекать выгоду в технологических процессах из свойств микроорганизмов и клеточных культур. Она создает возможность получения с помощью легко доступных и возобновляемых ресурсов тех веществ и соединений, которые важны для жизни и благосостояния людей. Огромные успехи, достигнутые во второй половине 20 века в фундаментальных исследованиях в области молекулярной генетики, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что послужило мощным импульсом для развития биотехнологии. Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, раскрытие механизмов индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы генетической и клеточной инженерии, с помощью которых стало возможным искусственное создание новых форм высокопродуктивных организмов.

В настоящее время внедрение методов генетики в биотехнологию обусловило стремительное развитие этого

3

направления. Использование генетических методов послужило основой для:

- 1) создания разнообразных трансгенных организмов (растений, животных, микроорганизмов), которые широко используются человеком;
- 2) создания современных методов диагностики и лечения в медицине;
- 3) появления новых направлений в биоэнергетике, защите окружающей среды и др.
- 4) разработки вакцин, синтез гормонов, интерферонов и антибиотиков).

Использование методов генетики в биотехнологии позволяет эффективно решать глобальные задачи, стоящие перед человечеством. Это, прежде всего:

- 1) решение проблемы обеспечения населения Земли продовольствием. Решение этой задачи предполагает несколько подходов, включающих: а) производство белков одноклеточных организмов; использование дрожжей, водорослей и микроскопических грибов; б) использование методов генетической инженерии для получения новых видов растений, животных (трансгенные растения и животные) с целью повышения продуктивности и устойчивости к вредителям; в) разработку методов искусственного фотосинтеза и фиксации азота;
- 2) решение проблем окружающей среды, таких как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений;
- 4) использование технологии рекомбинантных ДНК для решения проблем в медицине.

Сегодня является очевидным, что генетика и биотехнология оказывают огромное влияние на все аспекты практической

деятельности человека: сельское хозяйство, медицину, охрану окружающей среды.

Занятие 1. Основные понятия генетики, генетической инженерии **Теоретическая часть.**

Стержневой основой современной биотехнологии является генетика и важнейшая ее составная часть – генетическая инженерия.

Генетическая инженерия (генная инженерия) – раздел молекулярной генетики, связанный с целенаправленным созданием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке-хозяине и синтезировать конечные продукты обмена. Генная инженерия чаще всего ассоциируется с прямым переносом чужеродных или искусственно созданных генов, который сопровождается передачей хозяйственно-ценных признаков от донора к реципиенту. Понятие «генетическая инженерия» шире – включает, помимо переноса отдельных чужеродных генов, введение в клетки изолированных хромосом, митохондрий, хлоропластов и др. Генетическая инженерия значительно расширила экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволила вводить в различные типы клеток чужеродный генетический материал и исследовать его функционирование в необычном окружении, что дало возможность выявлять общие закономерности организации и реализации генетической информации в различных организмах. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микроорганизмов-продуцентов — биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены, определяющие развитие хозяйственно-ценных признаков. Все это дало мощный импульс развитию биотехнологии. Для лучшего усвоения материала по основам генетической инженерии

необходимо уверенное знание основных понятий, используемых в данной области.

Целью занятия № 1 является освоение основных терминов генетики, генетической инженерии, которые используются в биотехнологии.

1. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)

Нуклеиновая кислота (от лат. *nucleus* - ядро) - высокомолекулярное органическое соединение, биополимер (полинуклеотид), образованный остатками нуклеотидов. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации.

Таблица 1. Нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)	РНК (рибонуклеиновая кислота)
Сахар - дезоксирибоза	Сахар - рибоза
азотистые основания: пуриновые — гуанин (G), аденин (A), пиримидиновые — тимин (T) и цитозин (C).	азотистые основания: пуриновые — гуанин (G), аденин (A), пиримидиновые урацил (U) и цитозин (C).
Структура: двойная полинуклеотидная цепь	Структура: одиночная полинуклеотидная цепь

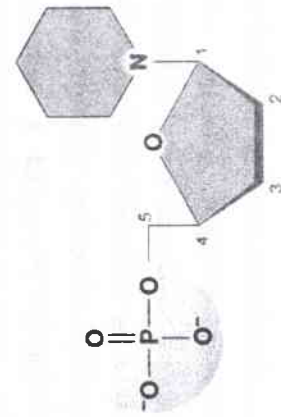


Рис. 1. Структура нуклеотида

Образование нуклеотида происходит в два этапа. На первом этапе в результате реакции конденсации образуется нуклеозид — комплекс азотистого основания с сахаром. На втором этапе нуклеозид подвергается фосфорилированию. При этом между остатком сахара и фосфорной кислотой возникает фосфорэфирная связь. Таким образом, нуклеотид представляет собой нуклеозид, соединенный с остатком фосфорной кислоты.

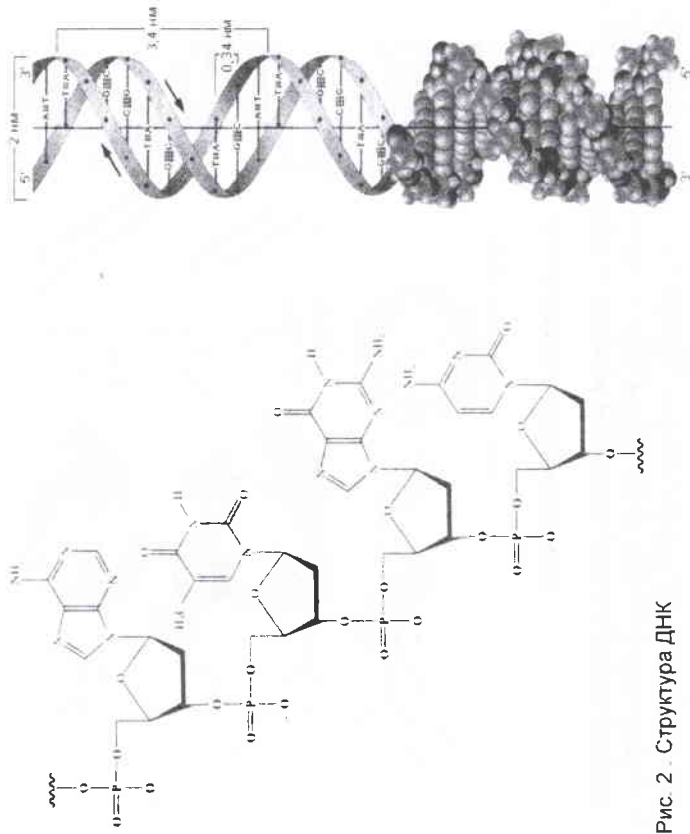


Рис. 2. Структура ДНК

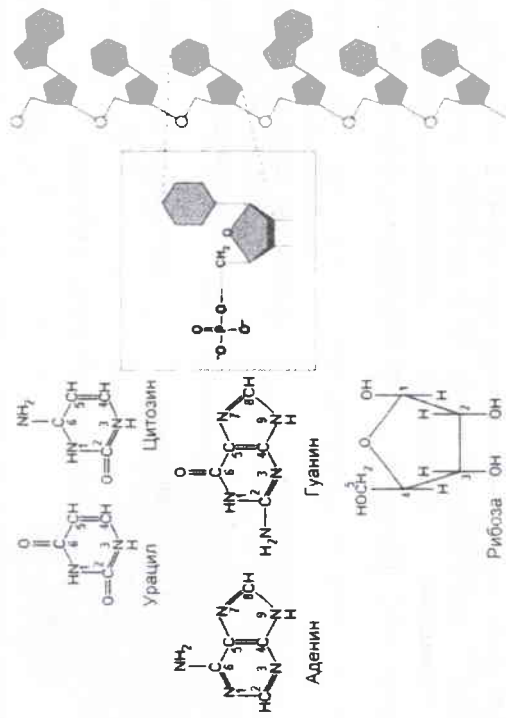


Рис. 3. Структура РНК

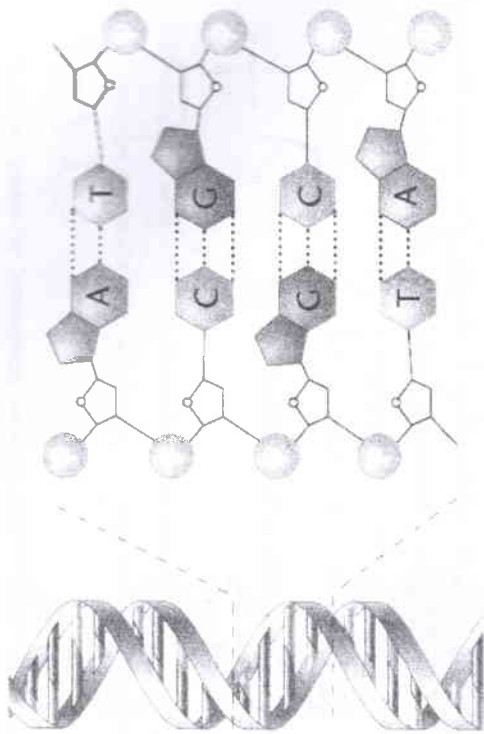


Рис. 4. Принцип комплементарности

Между аденином и тиминном возникают две водородные связи, а гуанином и цитозином – три водородные связи. Закономерность, согласно которой нуклеотиды разных цепей ДНК располагаются строго упорядоченно (аденин – тимин, гуанин – цитозин) и избирательно соединяются друг с другом, называется принципом комплементарности.

Таблица 2. Виды нуклеиновых кислот

ДНК	РНК
Ядерная (в хромосомах)	Информационная (матричная РНК)
Митохондриальная (кольцевая ДНК митохондрий)	Транспортная РНК
ДНК хлоропластов (кольцевая ДНК хлоропластов)	Рибосомальная РНК

2. **Рекомбинантная (гибридная) ДНК** (recombinant DNA) [лат. re- - приставка, обозначающая повторность действия или противоположное действие, и *combatio* - соединение] - молекула ДНК, полученная в результате объединения *in vitro* чужеродных (в природе никогда вместе не существующих) фрагментов ДНК с использованием методов генной инженерии.

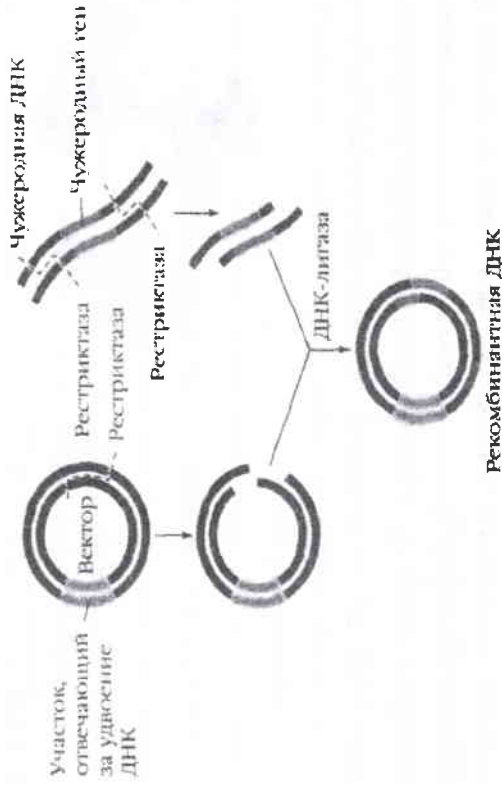


Рис. 5. Создание рекомбинантной ДНК

3. **Ферменты**, или **энзимы** (от лат. *fermentum*, греч. ζύμη, ἐνζύμων — закваска) — обычно белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, ускоряющие (катализирующие) химические реакции в живых системах



Рис. 6. Структура фермента

Ферменты - вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении. Решить эту проблему помогает создание иммобилизованных ферментов. Сущность иммобилизации ферментов - прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему.

Рис 7 Имобилизованные ферменты на поверхности углеродных нанотрубок



4. **Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы** (от лат. *restrictio* - ограничение) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции). В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его. Защита бактериального генома от собственной рестриктазы осуществляется с помощью метилирования нуклеотидных остатков аденина и цитозина.

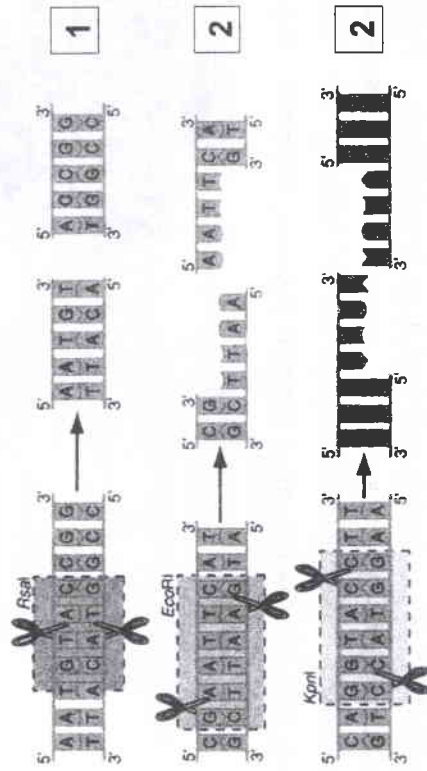


Рис 8. Расщепление ДНК с образованием «тупых» (1) и «липких» (2) концов

5. **ДНК-лигаза.** В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага I показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

ДНК-лигазы сшиваются рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками сахаров. ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репарации ДНК, в процессах репликации - при удвоении цепи ДНК.

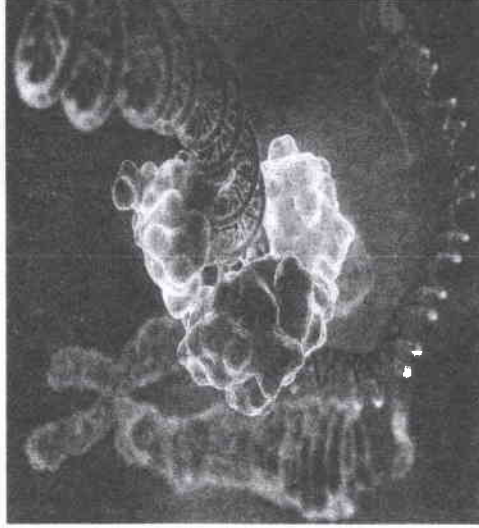


Рис 9 ДНК-лигаза, фото с сайта ru.wikipedia.org

6. Прокариоты и эукариоты

Эукариоты, или ядерные (лат. *Eukaryota* от греч. εὖ- - хорошо и κάρυον - ядро) - домен (надцарство)живых организмов, клетки которых содержат ядра. Все организмы, кроме бактерий и архей,

являются ядерными (вирусы и вирионы также не являются эукариотами).

Прокариоты (лат. *Procaruota*, от др.- греч про «перед» и карюо «ядро»), или **доядерные** - одноклеточные живые организмы, не обладающие (в отличие от эукариот) оформленным клеточным ядром и другими внутренними мембранными органоидами (за исключением плоских цистерн у фотосинтезирующих видов, например, у цианобактерий). Для клеток прокариот характерно отсутствие ядерной оболочки, ДНК упакована без участия гистонов.

7. Оперон - функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами. Такая функциональная организация позволяет эффективнее регулировать экспрессию (транскрипцию) этих генов. Концепцию оперона для прокариот предложили в 1961 году французские ученые Жакоб и Моно, за что получили Нобелевскую премию в 1965 году. Опероны по количеству цистронов делят на моно-, олиго- и полицистронные, содержащие, соответственно, только один, несколько или много цистронов (генов). Характерным примером оперонной организации генома прокариот является лактозный оперон у *Escherichia coli*.

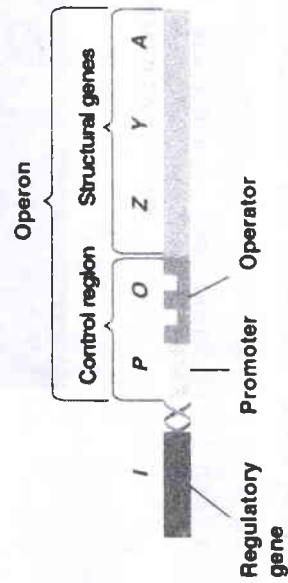


Рис. 10 Структура лактозного оперона

8. Экзоны – последовательности генов, представленные в молекуле иРНК. Многие гены состоят из экзонов (кодирующие участки) и интронов (некодирующие участки). При транскрипции с гена считывается РНК, несущая как экзоны, так и интроны. В процессе сплайсинга интроны вырезаются, а экзоны образуют зрелую РНК (рис. 11).

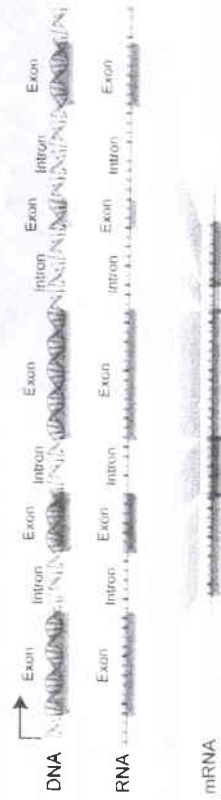


Рис. 11 Процесс сплайсинга

9. Вектор - молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке.

10. Компетентность клетки (клеточная компетентность) – физиологическое состояние, при котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды. Восприимчивость к экзогенной ДНК индуцируют разными способами: химическими, физическими воздействиями. Такую компетентность принято называть индуцированной.

11. Электропорация. В 1982 г. Нейман с сотрудниками для введения ДНК в культивируемые клетки мыши применил метод, получивший название электропорации (кратковременное 5-20 мс воздействие электрического поля высокой напряженности 1-15 кВ/см на клеточную мембрану приводит к образованию в ней пор, через которые проникают молекулы ДНК).

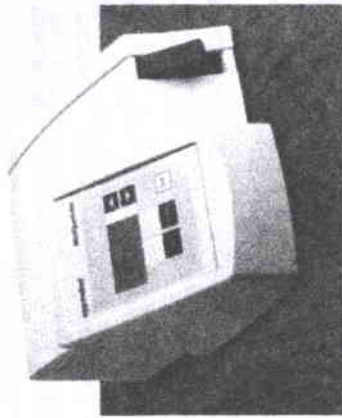


Рис. 12. Электропоратор

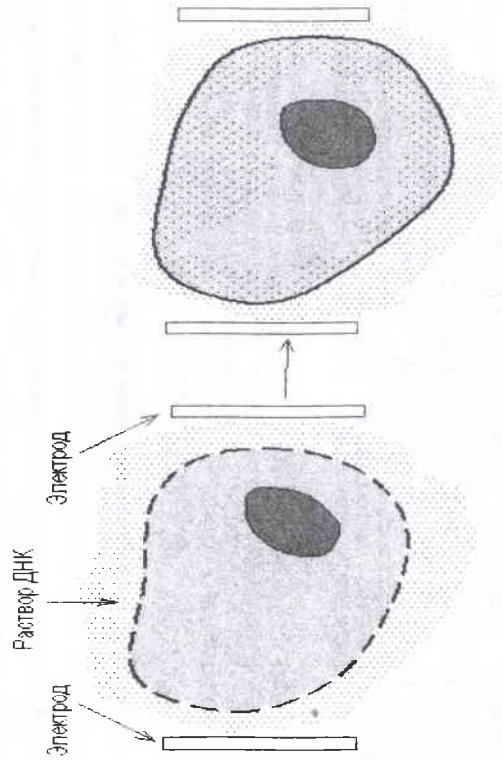


Рис. 13. Процесс электропорации

12. Энхансер - специфический участок ДНК, способный связываться с факторами транскрипции, при этом увеличивая уровень транскрипции гена или группы генов (усилитель транскрипции). Глушители транскрипции – сайленсеры.

13. Экспрессия гена - это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса: и во время транскрипции, и во время трансляции, и на стадии посттрансляционных модификаций белков.

14. Введение рекомбинантных молекул ДНК в клетки.

Введение полученных *in vitro* гибридных молекул ДНК в совместимые клетки (обеспечивающие репликацию этих молекул) осуществляется с целью размножения, селекции и выделения клонов гибридов.

Введение в клетку нуклеиновой кислоты вируса с последующим образованием вирусного потомства называется трансфекцией.

Эффективность трансфекции оценивается количеством инфекционных центров (бляшек, колоний), приходящихся на единицу массы нуклеиновой кислоты вируса. Вирусные клоны, полученные после трансфекции из отдельных бляшек, называются трансфектантами.

Практическое задание:

Итоговым заданием занятия № 1 по освоению основных терминов генетической инженерии является выполнение глоссария.

Глоссарий по генетической инженерии.

Дать развернутое толкование терминов:

1. Рекомбинантная ДНК
2. Рестриктазы
3. ДНК-лигазы
4. Прокариоты
5. Промотор
6. Терминатор
7. Оперон
8. Эукариоты

дифференцировки и регуляции клеточного размножения, превращение нормальной клетки в раковую и др. Клеточная инженерия нашла широкое применение в биотехнологии, например, использование гибридов для получения моноклональных антител, применяемых в медицине и других областях науки и производства. На основе генетически измененных клеток возможно создание новых форм организмов.

1. Культура клеток. Содержание живых клеток определенного вида микроорганизмов, растений и животных на питательной среде с поддержанием условий, обеспечивающих питание, газообмен и удаление продуктов метаболизма, а также асептических условий (например, добавление антибиотиков) получило название «культуры клеток».

Первичные культуры. Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма с использованием первичного этапа фракционирования клеток или без него.

Вторичные культуры. Культуры, которые получают, используя клетки первичной культуры.

Процесс переноса клеток первичной культуры для получения вторичной культуры называют перевиванием.

Клон – это популяция клеток, исходящих из одной клетки – предшественника (выделяют одну клетку и размножают ее до образования большой колонии)



Рис. 14. Культуры клеток: нервные клетки, клетки почки, клетки мышц. В культуре клетки сохраняют черты специализации.

9. Экзон

10. Интрон

11. Вектор

12. Клеточная компетентность

13. Электротпорация

14. Транскрипция гена

15. Трансляция гена

16. Экспрессия гена

17. Трансфекция

18. Энхансер

Занятие № 2. Использование генетических методов в клеточной инженерии

Теоретическая часть

Классические методы генетики (гибридизация) и методы молекулярной генетики широко используются в клеточной инженерии. Клеточная инженерия - метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции. При гибридизации искусственно объединяют целые клетки с образованием гибридной генома. Клеточная реконструкция связана с созданием жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, хромосом, хлоропластов, митохондрий и др.) С помощью клеточной инженерии удается соединить геномы разных видов (принадлежащих даже разным царствам), показана принципиальная возможность слияния соматических клеток животных с клетками растений.

Изучение реконструированных *in vitro* клеток позволяет решать многие теоретические проблемы биологии и медицины: выяснять взаимные влияния ядра и цитоплазмы, механизмы клеточной

2. Гибридизация клеток в культуре. В 1960 г. было показано, что при совместном культивировании клеток двух различных линий они могут сливаться, образуя гибриды, содержащие геномы обеих родительских форм. Первые гибридные клетки были получены при слиянии культивируемых клеток разных линий мышей. Кроме внутривидовых, получены и межвидовые гибриды, например, между клетками человека и мыши, мыши и хомячка и даже мыши и цыпленка.

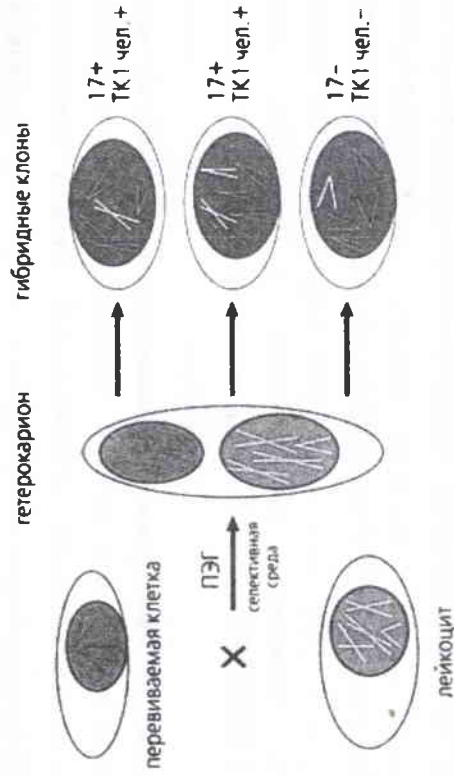


Рис. 15. Гибридизация клеток в культуре

3. Трансплантация ядер. Современные методы трансплантации ядер позволяют вмешиваться в генетическую организацию яиц и эмбрионов мыши. Благодаря этим методам удалось достигнуть больших успехов в ряде областей биологии развития, в частности в изучении: а) вклада материнского и отцовского геномов в развитие; б) ядерно-цитоплазматических отношений; в) морфогенетических потенций ядер, трансплантированных в яйца из эмбриональных клеток, и возможностей их «клонирования»; г) репродукции млекопитающих путем партеногенеза.

Эти исследования позволили по-новому осмыслить функциональные различия между геномами родителей, однако точные механизмы ограничения роста у яиц, получивших донорские ядра с более поздних стадий развития, или у партеногенетических яиц, пока не известны.

Поскольку пронуклеусы и ядра яиц и ранних эмбрионов имеют относительно крупные размеры, введение в яйцо пипетки с диаметром отверстия, достаточным для захвата такого ядра, обычно необратимо повреждает мембрану яйца и приводит к лизису. В связи с этим предложен эффективный метод извлечения ядра в небольшом объеме цитоплазмы. Такие нуклеопласты могут быть слиты с другими яйцами или клетками с помощью вируса Сендай. Вирус Сендай, или гемагглютинирующий вирус (японский штамм), используется в качестве фузогена (фактора, вызывающего слияние клеток). Указанный метод позволяет получить в ходе одного четырехчасового эксперимента до 100 знуклеированных яиц или 40-50 реконструированных яиц.

В ранних экспериментах, выполненных на амфибиях (рис.16), было показано, что в помещенных в цитоплазму яйцеклетки предварительно извлеченных из дифференцированной клетки ядрах начинались процессы клеточной дифференцировки и во многих случаях развивался совершенно нормальный организм, т. е. ядра специализированных клеток содержали полный набор необходимой для развития полноценного организма информации. Так, слияние ядер, извлеченных из клеток кишечного эпителия головастика, с лишенной ядра яйцеклеткой во многих случаях приводило к развитию лягушки. Эти эксперименты, выполненные на амфибиях, показали, что цитоплазма регулирует активность ядра; у специализированных клеток многие функции ядра подавляются компонентами цитоплазмы.

Ингибирующее влияние, которое испытывало ядро со стороны цитоплазмы дифференцированной клетки, оказавшись в подходящем по химическому составу цитоплазматическом окружении (яйцеклетка), снимается, и в ядрах могут протекать процессы, определяющие клеточную дифференцировку.

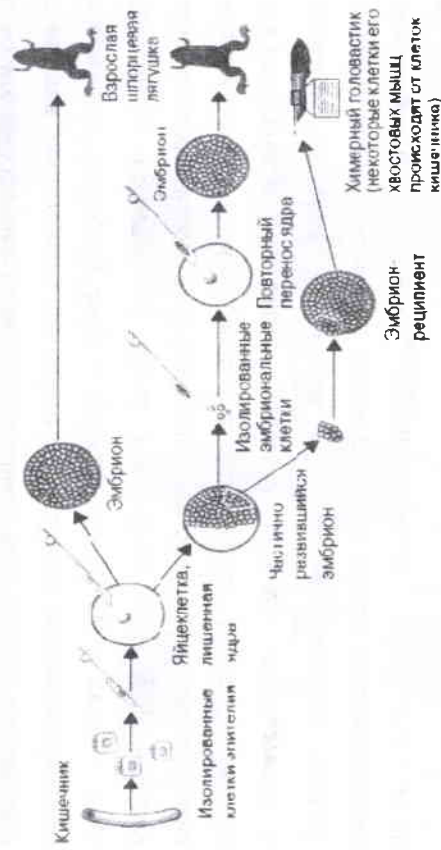


Рис. 16 Опыты Гердона по трансплантации ядер

В разработке методов пересадки клеточных ядер существенную роль сыграло использование цитохалазинов - веществ, синтезируемых грибами. Считается, что цитохалазин В, разрушая структуру микрофиламентов, способствует уникальному расположению ядра, когда оно остается соединенным с клеткой тонким стебельком цитоплазмы. При центрифугировании у большинства таких клеток разрывается «пуловина» стебелька и образуются знуклеированные (безъядерные) клетки (цитопласты); отделившиеся при центрифугировании ядра (кариопласты, или миниклетки) окружены тонким слоем цитоплазмы и плазматической мембраной.

Эффективность реконструирования клеток за счет слияния кариопластов и цитопластов зависит от целого ряда факторов. Так, около 10% цитопластов, полученных путем знуклеации клеток крысы линии НТС, сливались с кариопластами, выделенными из клеток мыши линии А9. Когда гибридизации подвергали цитопласты, полученные из фибробластов куриных эмбрионов, и кариопласты, представлявшие собой покоящиеся ядра эритроцитов, эффективность реконструирования превышала 90%. Высокая эффективность слияния изолированных покоящихся ядер эритроцитов птиц с знуклеированными цитопластами, а также опыты по активированию ядер эритроцитов птиц, в частности кур, путем слияния этих эритроцитов с клетками *HeLa* или другими клетками, имеющими активный метаболизм, позволили исследовать роль ядерно-цитоплазматических взаимодействий в экспрессии генов гибридных зукариотических клеток. Оказалось, что не все образовавшиеся гибриды были жизнеспособными. Примерно 9% из числа реконструированных клеток могут расти и делиться. В гибридных клетках сразу после слияния начинаются морфологические изменения. Через несколько дней реконструированные гибридные клетки почти не отличаются от исходных родительских, используемых в качестве доноров ядер.

Практическое задание:

Практической частью занятия № 2 является выполнение контрольной работы и написание глоссария по клеточной инженерии, которые позволят закрепить полученные на лекциях знания.

Варианты контрольной работы:

Вариант 1.

1. Перечислите основные принципы культивирования клеток.

2. Охарактеризуйте основные особенности метода соматической гибридизации.
3. Значение реконструкции клеток для решения актуальных проблем биологии.

Вариант 2.

1. Перечислите различия между первичной и вторичной культурами клеток.
2. Охарактеризуйте основные особенности метода трансплантации ядер.
3. Значение гибридизации клеток для решения актуальных проблем биологии.

Глоссарий по клеточной инженерии:

Дать развернутое толкование терминов:

1. Методы клеточной инженерии.
1. Культура клеток.
3. Реконструкция клеток.
4. первичная культура клеток.
5. Вторичная культура клеток.
6. Процесс перевивания.
7. Трансплантация ядер.
8. Дикарион.
11. Синкарион.
12. Донорная линия клеток.
13. Реципиентная линия клеток.
14. Цитохолозаины.
15. Микроклетки.
16. Изолированные хромосомы.

Занятие № 3. Использование методов генетики в промышленной микробиологии

Теоретическая часть.

Методы генетики: химический мутагенез, УФ-мутагенез и др. широко используются в биотехнологических процессах в промышленной микробиологии.

Одним из древнейших биотехнологических процессов, широко применявшимся человеком, является сбраживание с помощью микроорганизмов. На протяжении многих тысяч лет люди занимались пивоварением, пеки хлеб. Затем, они придумали способы хранения и переработки продуктов путем ферментации (производство сыра, уксуса, соевого соуса), научились делать мыло из жиров, изготавливать простейшие лекарства, перерабатывать отходы.

Совершенствование процессов сбраживания, увеличение их эффективности, а также изучение многочисленных биохимических реакций, присущих микроорганизмам, шли параллельно с выделением из клеток бактерий и грибов веществ, которые все в большей степени вытесняли синтетические продукты, такие, как гипотензивные и противовоспалительные препараты и противопаразитарные средства. Таким образом, развитие биотехнологии в огромной степени определяется исследованиями в области микробиологии, биохимии, энзимологии и генетики микроорганизмов, а также наличием коллекций культур, надлежащим образом учтенных и постоянно изучаемых. Среди соединений, продуцируемых микроорганизмами, отметим следующие:

Алкалоиды	Окислители
Аминокислоты	Органические кислоты
Антибиотики	Пигменты
Антиметаболиты	Поверхностно-активные вещества

Антиоксиданты
 Белки
 Витамины
 Гербициды
 Ингибиторы ферментов
 Инсектициды
 Ионофоры
 Коферменты
 Липиды
 Нуклеиновые кислоты
 Нуклеозиды и нуклеотиды

Полисахариды
 Противооглистные агенты
 Противоопухолевые вещества
 Растворители
 Ростовые гормоны растений
 Сахара
 Стеарины и превращенные
 стероиды
 Факторы транспорта железа
 Фармакологические вещества
 Ферменты
 Эмульгаторы

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих реакции, полезные для человека, несколько сотен видов (из более, чем 100000 видов, известных в природе). Их относят к четырем группам: бактерии, актиномицеты (филаментозные бактерии, обитающие в почве), дрожжи и плесени.



Рис. 17. *Saccharomyces cerevisiae*

Из 500 известных видов дрожжей люди используют 3 вида, относящихся к классу аскомицетов: *Saccharomyces cerevisiae*; *Yarrowia lipolytica*; *Kluveromyces fragilis*.

Плесневые грибы – микроскопические грибы, образующие характерные налеты (плесени) на поверхности органических субстратов. Принадлежат к различным систематическим группам: зигомикетам (мукор), несовершенным грибам (аспергилл, пеницилл, триходерма и др.). Для плесневых грибов характерен обильно



Рис. 18. Воздушный мицелий со спорами

развивающийся воздушный мицелий (рис. 18). Плесневые грибы вызывают многочисленны превращения в твердых средах, которые происходят перед брожением, их наличием объясняется гидролиз рисового крахмала, соевых бобов, риса и солода при получении пищи, употребляемой в азиатских странах. Плесени продуцируют также ферменты, используемые в промышленности (амилазы, протеазы, пектиназы), органические кислоты (лимонную, молочную), антибиотики. Их применяют в производстве сыров (например, камамбера и рокфора)

Полезные бактерии относятся к зубактериям. Уксуснокислые бактерии, представленные родами *Gliocolobacter* и *Acetobacter* - это грамотрицательные бактерии, превращающие этанол в уксусную кислоту, а уксусную кислоту в углекислый газ и воду, Род *Vacillus* относится к грамположительным бактериям, которые способны образовывать эндоспоры и имеют перитрихальное жгутикование. *B. subtilis* - строгий аэроб, а *B. thuringiensis* может жить и в анаэробных условиях. Анаэробные, образующие споры бактерии представлены родом *Clostridium*, *C. acetobutylicum* сбраживает сахара в ацетон, этанол, изопропанол и п-бутанол (ацетонобутаноловое брожение), другие виды могут также сбраживать крахмал, пектин и различные азотсодержащие соединения. К молочнокислым бактериям относятся представители родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Streptococcus*,

которые не образуют спор, грамположительны и не чувствительны к кислороду.

Истинные актиномицеты - строго аэробные бактерии; они грамположительны и не образуют спор. Наиболее представительный в этой группе - род *Streptomyces*, отдельные виды которого продуцируют широко применяемые антибиотики.

К продуктам микробного брожения и метаболизма относятся первичные метаболиты, ферменты, капсульные полисахариды и сама клеточная биомасса (так называемые белки одноклеточных организмов).

1.Первичные метаболиты. Первичные метаболиты - это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1500 дальтон), необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, растворители и витамины. Микробные клетки, как и клетки других живых существ, не производят избытка первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало способность к выживанию. Имеются, однако, микробные штаммы с нарушениями регуляции синтеза этих метаболитов, которые и служат исходными штаммами для промышленных процессов. Например, штаммы *Brevibacterium flavum* и *Solublebacterium glutamicum* превращают более трети сахара, содержащихся в культуральной среде, в лизин; глутаминовая кислота, которая в виде натриевой соли применяется в качестве специи, синтезируется исключительно культурами *Solublebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* (ежегодно производится и потребляется 3 млн. т.);

2.Вторичные метаболиты. Вторичные метаболиты, называемые также идиолиитами, - низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Они производятся ограниченным числом таксономических групп и часто представляют собой смесь близкородственных соединений, относящихся к одной и той же химической группе. К вторичным метаболитам относятся антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины. Микроорганизмы, производящие вторичные метаболиты, вначале проходят стадию быстрого роста, тропофазу, во время которой синтез вторичных веществ незначителен. По мере замедления роста из-за истощения одного или нескольких необходимых питательных веществ в культуральной среде микроорганизм переходит в идиофазу, именно в этот период синтезируются идиолииты. В случае антибиотиков большинство микроорганизмов в процессе тропофазы чувствительно к собственным антибиотикам, однако во время идиофазы они становятся к ним устойчивыми. Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и затем культивировать микроорганизмы в этой фазе.

Антибиотики - самый большой класс фармацевтических соединений, синтез которых осуществляется микробными клетками. К этому же классу относятся противогрибковые агенты, противоопухолевые лекарства и алкалоиды. Экономическая важность антибиотиков наглядно проявляется в стоимости мирового сбыта ((45 млрд. долларов в 2010 г.) четырех наиболее распространенных групп антибиотиков - цефалоспоринов (27% мирового объема производства); макролидов (эритромицин, олеандомицин, олететрин - 20%); хинолонов (ципрофлоксацин, левофлоксацин, авелокс - 18%); пенициллинов (17%).

3. Производство ферментов. Большинство биотехнологий основано на использовании биокатализаторов - ферментов, потребность в которых постоянно растет. Поскольку ферменты представляют собой макромолекулы, активность которых зависит от их первичной структуры, т. е. от последовательности аминокислот, крупномасштабный химический синтез не всегда возможен и желателен. Поэтому до недавнего времени ферменты преимущественно экстрагировали из животных и растительных клеток или производили при помощи микроорганизмов. В настоящее время все ферменты, используемые в промышленных или полупромышленных процессах, имеют микробное происхождение.

Микробные ферменты имеют существенные преимущества перед тканевыми. Накопление микробной биомассы происходит на питательных средах, которые чаще всего являются отходами других производств с очень высокой скоростью, а это в конечном счете определяет их стоимость. В настоящее время мире производится около 20 ферментов в объеме 65 тыс. тонн. Промышленным способом производят такие ферменты как α -амилаза, глюкоамилаза, протеаза, инвертаза, пектиназа, каталаза, целлюлаза. Для гидролиза крахмала, пивоварения, производства фруктовых соков, хлеба, молока, вина, мощных средств нужны большие количества ферментов, производимых микроорганизмами. Микробные ферменты все активнее заменяют растительные и животные ферменты. Так, амилазы из *Bacillus* и *Aspergillus* заменили аналогичные ферменты из пшеничного солода и ячменя в пивоварении, хлебопечении и производстве сухого печенья, а также в текстильной промышленности; протеазы из *Aspergillus* животные и растительные протеазы, употребляемые для размягчения мяса; протеазы из *Aspergillus* (рис. 20) и *Bacillus licheniformis* (рис. 20) заменили панкреатические протеазы в процессе

размягчения кожи (дубления) и в производстве мощных средств: реннины из *Mucor* (рис. 20) - сычужный фермент из желудка телят в сыроварении.

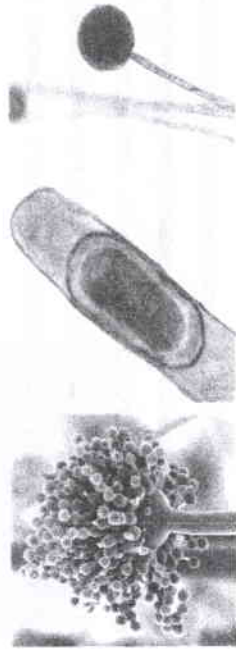


Рис. 20. *Aspergillus*; *Bacillus licheniformis*; *Mucor*

4. Капсульные полисахариды. Капсульные полисахариды относятся к микробным продуктам, синтезируемым в больших количествах. В настоящее время осуществляется промышленное производство ряда микробных полисахаридов (декстран, ксантан, гелловая смола, занфло (Zanflo) и политран (Polytran)). Получение многих других находится на стадии разработки.

Ксантан [келтрол (Keltrol), келзан (Kelzan), родогель (Rhodogel)]

Ксантан синтезируется *Xanthomonas campestris* при росте на глюкозе, сахарозе, крахмале, кукурузной декстрозе и барде. В качестве источников углерода могут использоваться промышленные отходы, например, сывортка, образующаяся при выработке творога. Ксантан был первым микробным полисахаридом, который начали производить в промышленном масштабе (1967 г.). Он нашел широкое применение в промышленности. Это вещество обладает высокой вязкостью при малых концентрациях и низкой скоростью сдвига. Вязкость его остается постоянной в широком диапазоне pH, не зависит от температуры и присутствия солей, например, хлористого калия. В сочетании растительным полисахаридом из семян лжеакации водные

растворы ксантана образуют стабильные гели. Ксантан получают обычным способом в ферментере с использованием коммерческой D-глюкозы в качестве источника углерода.

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. Псевдопластические текучие свойства этого полимера в сочетании с устойчивостью к нагреванию, кислотам, щелочам и присутствию катионов обеспечивают ему преимущественно над другими смазками в составе бентонитовых шламмов, и ксантан широко используется при добыче нефти. Он применяется также для повышения выхода нефти, где в сочетании с поверхностно-активными веществами и углеводородами служит в качестве агента, контролирующего вязкость жидкости, закачиваемой в нефтеносные пласты. В комплексе с бурой ксантан применяют в качестве гелеобразующего агента при производстве взрывчатых веществ.

В 1969 г. было разрешено использовать ксантан в пищевой промышленности для улучшения вкусовых свойств консервированных и замороженных продуктов, приправ, соусов, быстро приготавливаемых продуктов, заправок, кремов и фруктовых напитков. Благодаря синергическому взаимодействию между ксантаном и растительными галактоманнами вместе с камедью из семян лжеакации (рис. 24) он нашел применение в производстве кормов, например, консервированного корма для домашних животных, где он конкурирует с агаром; в качестве суспендирующего агента он используется также в производстве кормов с низким содержанием твердых компонентов. Простые и сложные эфиры ксантана применяют в косметике и текстильной промышленности.



Рис. 24 Ксантановая камедь

5. Белки одноклеточных организмов (БОО). По многим важным показателям биомасса микроорганизмов может обладать весьма высокой питательной ценностью. В незначительной степени эта ценность определяется белками: у большинства видов они составляют значительную долю сухой массы клеток. Чтобы отличать такой тип продуктов от белков высших многоклеточных животных и растений, для микробного белка придумано специальное название - белок одноклеточных организмов (БОО). Производство его связано с крупномасштабным выращиванием определенных микроорганизмов, которые собирают и перерабатывают в пищевые продукты. Выращивание микробов в пищевых целях представляет интерес по двум причинам. Во-первых, они растут гораздо быстрее, чем растения или животные: время удвоения их численности измеряется часами. Это сокращает сроки, нужные для производства определенного количества пищи. Во-вторых, в зависимости от выращиваемых микроорганизмов в качестве субстрата могут использоваться разнообразнейшие виды сырья (отходы производства, торф и т.д.).

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

Основное препятствие, сдерживающее развитие исследований в этом направлении, связана с безопасностью БОО. Безопасность БОО должна быть подтверждена специальными испытаниями.

Это связано со следующими причинами:

- 1) в конечном продукте содержится некоторое количество микроорганизмов;
- 2) в производстве БОО нередко принимают участие микробы, опыт использования которых мал и которые ранее в пищу отсутствовали.

Все это делает процесс производства микробных белков в качестве пищи для человека очень дорогим, поэтому основное производство БОО в настоящее время ориентировано на корм животным.

Практическое задание:

Практическая часть занятия № 3 предусматривает проведение семинара и выполнение рефератов:

Вопросы для семинара:

1. Микроорганизмы – продуценты полезных веществ.
2. Перспективы использования БОО.
3. Законодательная база Российской Федерации, регламентирующая использование БОО.
4. Проблемы биобезопасности микробных продуктов.

Темы для рефератов:

1. Производство первичных метаболитов микроорганизмов
2. Получение вторичных метаболитов микроорганизмов.
3. Капсульные полисахариды.
4. Получение ферментов с помощью микроорганизмов.
5. Биоконверсия.
6. Белки одноклеточных организмов, проблемы и перспективы получения.

7. Микробная переработка отходов и побочных продуктов сельскохозяйственного производства.

8. Индуцированный мутагенез в создании перспективных штаммов-продуцентов.

Занятие № 4. Использование методов генетики в биотехнологии животных.

Теоретическая часть.

1. Трансплантация эмбрионов. Разработка метода искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и его широкое практическое применение обеспечили большой успех в генетическом улучшении животных. Применение этого метода и особенно технология длительного хранения семени в замороженном состоянии открыли возможность получения десятков тысяч потомков от одного производителя в год.

При трансплантации эмбрионов решается несколько задач:

- 1) увеличить число потомков от выдающихся производителей (низкий уровень воспроизводства у самок и длительный интервал времени между поколениями, в среднем 6-7 лет у крупного рогатого скота, ограничивают генетический прогресс в животноводстве);
- 2) быстро размножать импортируемые группы животных (дешевле перевозить зародыши, чем животных, при этом меньше риск ввоза заразных заболеваний, при пересадке такого зародыша местному реципиенту потомок приобретает пассивный иммунитет от материнского молока и его иммунная система будет более устойчивой к местным болезням);
- 3) можно получать потомков от старых высокоценных животных (когда их яичники функционируют нормально, но сами они не способны вынашивать плод).

Трансплантация эмбрионов включает несколько этапов: стимуляция суперовуляции; извлечение эмбрионов; пересадка эмбрионов; глубокое замораживание эмбрионов.

Самки млекопитающих рождаются с большим (несколько десятков тысяч) количеством половых клеток. Большинство из них постепенно отмирают в результате дегенерации, и только небольшое количество проходит через несколько популяций растущих фолликулов. Практически все ооциты в этих фолликулах реагируют на стимуляцию гонадотропными гормонами, что приводит к их созреванию. Суперовуляцию млекопитающих вызывают путем обработки самок гонадотропинами в фолликулярную фазу полового цикла или в сочетании с индуцированием регрессии желтого тела простагландином $F_{2\alpha}$ его аналогами. Установлено, что при вызывании суперовуляции можно получить в 10 раз больше беременностей на одного донора по сравнению с извлечением эмбрионов у необработанного животного.

До середины 70-х гг. эмбрионы у животных извлекали хирургическим методом: методом лапаротомии по белой линии живота с использованием общей анестезии. Несмотря на то, что при хирургическом извлечении эмбрионов у крупного рогатого скота были достигнуты отличные результаты, эта техника была неприемлемой для производства по целому ряду причин (относительно дорогостоящая, неудобная в условиях производства и с послеоперационными осложнениями), что ограничивало кратность извлечений эмбрионов.

Возможность нехирургического извлечения эмбрионов у крупного рогатого скота была продемонстрирована в начале 50-х гг., но техника ее была разработана только в конце 70-х гг. Принцип нехирургического извлечения эмбрионов состоит в следующем. Гибкий катетер с надувной манжетой вводят во влагалище и через

шейку матки он проникает в один из ее рогов. Манжета надувается и закрывает каудальный выход из рога матки, тем самым ограничивая промывную полость. Промывную жидкость (200-300 мл) несколько раз (5-8) вводят в рог матки. В качестве промывной жидкости используют фосфатный буфер Дюльбекко, обогащенный глюкозой и бычьим сывороточным альбумином или 1% эмбриональную сыворотку крови с антибиотиками. Обычно извлекают около 50% овулировавших яйцеклеток. Эмбрионы хранят до пересадки в чашках Петри в той же среде или в среде TCM 199 с добавлением 20%-ой эмбриональной сыворотки. Наиболее оптимальные сроки для извлечения эмбрионов - 6-8-й день после начала охоты, так как ранние бластоциты этого возраста наиболее пригодны для глубокого замораживания и могут быть с высокой эффективностью пересажены нехирургическим способом.

Для нехирургической пересадки эмбрионов используют инструменты и технику, аналогичные тем, которые применяют при искусственном осеменении.

Наряду с нехирургической пересадкой эмбрионов у крупного рогатого скота широко применяется и хирургический метод пересадки путем лапаротомии в области подвздоха у животного в стоячем положении с использованием местной анестезии.

Глубокое замораживание является оптимальным методом для транспортировки биологических объектов при дальних перевозках или международном обмене.

Технология глубокого замораживания спермы хорошо отработана, и поэтому искусственное осеменение замороженной спермой широко применяется в скотоводстве. Разработка надежных методов криоконсервирования эмбрионов позволяет более успешно реализовать технологию трансплантации на практике. С применением замораживания эмбрионов появилась возможность длительного их

хранения и отпала необходимость содержания большого количества реципиентов с целью подбора самок на синхронной с донором стадии полового цикла, улучшения условий их содержания.

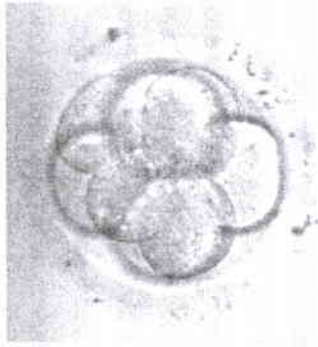
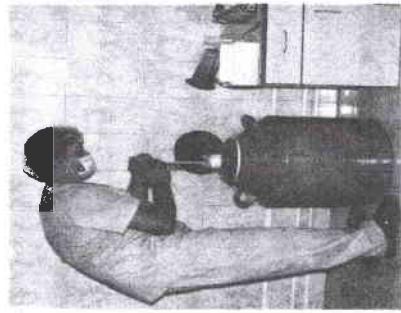


Рис. 21. Сосуд Дьюара для замораживания и хранения клеток, замороженная яйцеклетка

2. Клонирование животных. Клонирование животных можно осуществлять путем пересадки: ядер эмбриональных клеток; ядер соматических клеток.

В 1952 г. Бриггс и Кинг впервые осуществили пересадку ядер клеток на амфибиях и показали, что ядра из ранних эмбриональных клеток сохраняют способность к дальнейшему развитию после пересадки их в яйцеклетки, из которых предварительно были удалены их собственные ядра (энуклеированные яйцеклетки). На более поздних стадиях развития ядра утрачивают это свойство. Способность к репрограммированию у клеток внутренней клеточной массы невелика – 3-15% эмбрионов достигают стадии бластоцисты, однако клетки тотипотентны. Полноценное потомство получено у овец и коров.

Разработка условий культивирования клеток внутренней клеточной массы позволила повысить до 24-39% эффективность развития клонированных эмбрионов до стадии бластоцисты.

Использование клеточных культур позволило получать неограниченное число клеток с одинаковым генотипом, что является важным фактором в создании клонов животных.

В 1998 г. японские ученые Тсунода и Като продемонстрировали возможность полного репрограммирования ядер клеток трофобласта мыши. Рождение двух клонированных мышат подтвердило возможность дедифференцировки до тотипотентного состояния клеток трофобласта.

Эффективность трансплантации ядер герминативных клеток плода низка – от 0 до 16% реконструированных эмбрионов развивались до стадии бластоцисты, а потомство долгое время получить не удавалось.

В 1998 г. Стрельченко удалось получить клонированного теленка методом трансплантации ядер клеток герминативной ткани плода. Теленок носил имя «Ген».

В 1997 г. вышла статья Вильмута получения клонированных ягнят, полученных методом трансплантации ядер с использованием фетальных фибробластов и клеток эпителия молочной железы (овечка Долли) (рис. 22).

С этого момента все исследования были направлены на исследование способности к репрограммированию клеток плода и взрослого организма.

С момента создания овечки Долли из реконструированного эмбриона стало возможным создание клонов животных с известным генотипом и продуктивностью, так как было доказано, что ядра клеток взрослого организма способны к репрограммированию в цитоплазме

энуклеированного ооцита и обеспечению развития реконструированных эмбрионов.

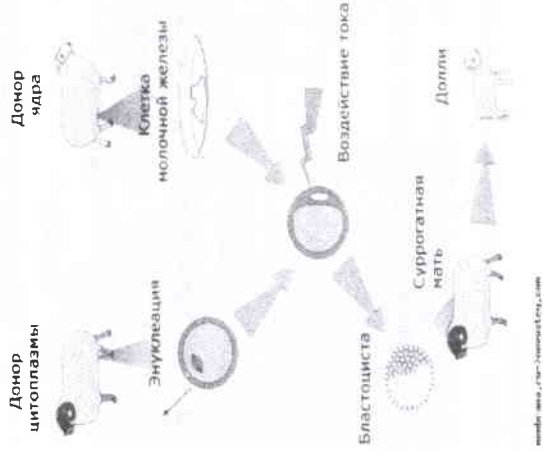


Рис. 22. Создание клонированной овцы

3. Получение трансгенных животных. Разработка методов введения генов в зародышевые клетки млекопитающих является крупнейшим достижением современной биологии. Получение трансгенных животных позволяет:

- 1) изучать регуляцию генов в процессе эмбриогенеза и дифференцировки;
 - 2) исследовать действие онкогенов;
 - 3) изучать взаимодействие клеток;
 - 4) животные представляют экспериментальные системы для выявления эффектов клонированных генов, модели для исследования генетических болезней.
 - 5) животные являются источником полезных белков
- Методы получения трансгенных животных:
- 1) микроинъекция ДНК (рис. 23);

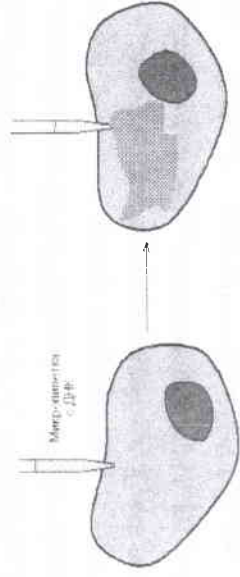
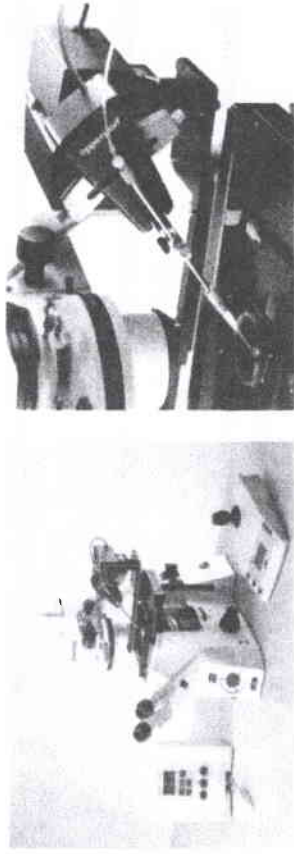


Рис. 23. Микроманипулятор и схема микроинъекции ДНК

- 2) инфицирование вирусами;
- 3) использование эмбриональных стволовых клеток.

Практическое задание:

Практическая часть занятия № 4 предусматривает написание эссе по предложенной теме и проведение семинара:

Тема эссе:

Клонирование животных и человека: аргументы «за» и «против».

Вопросы для обсуждения на семинаре:

1. Значение трансплантации эмбрионов для развития биологии и сельского хозяйства.
2. Криоконсервация: проблемы и перспективы.
3. Клеточная инженерия животных: искусственное получение монозиготных близнецов.

4. Проблемы соматической гибридизации животных клеток.
5. Клонирование животных.
6. Получение и использование трансгенных животных.

Занятие № 5. Использование методов генетики в биотехнологии растений

Теоретическая часть

1. Клеточная инженерия растений. Для растений характерно уникальное свойство: восстанавливаться после повреждений. Оно обусловлено тем, что даже зрелые растительные клетки сохраняют способность к делению и передифференцировке. Такая пластичность (тотипотентность) наглядно проявляется при культивировании растительной ткани в искусственной среде, со держщей необходимые питательные вещества (органические и неорганические) и факторы роста и развития (фитогормоны). Помещенные в такие среды клетки растительной ткани дедифференцируются (утрачивают специализацию) и начинают делиться, образуя сравнительно однородную клеточную массу, называемую каллусом (рис.24). Свойства и путь развития каллуса определяют фитогормоны: ауксины и цитокинины, которые влияют на скорость деления клеток, их дифференциацию и органогенез. При оптимальном соотношении гормонов сначала формируются побеги, затем корни, а через 4-6 мес. можно получить взрослое растение. Если концентрация ауксинов выше, то формируются только корни, если выше концентрация цитокининов – образуются только побеги.

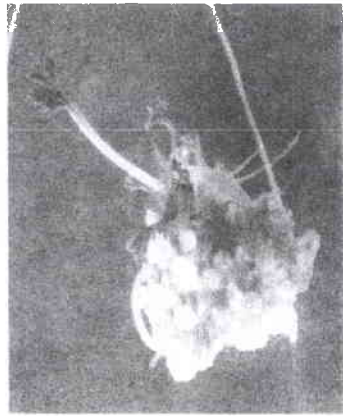


Рис. 24. Каллус

В жидкой среде под действием пектиназа каллус распадается на изолированные клетки. Отдельные клетки на плотной среде вновь образуют каллус, из которого удается получить целое растение. Целое растение можно получить даже из протопластов (клеток, не имеющих клеточных стенок). Лучшим источником протопластов служат молодые листочки, которые сначала обрабатывают пектиназами для удаления межклеточных связей, а затем целлюлазами для удаления самой клеточной стенки. Затем их помещают на плотные среды, где через 5-10 дней происходит регенерация клеточной стенки и начинается деление клеток. Дальнейшее развитие процесса идет стандартным образом: образование каллуса → формирование побегов и корней → становление целого растения.

На основе этой технологии разработаны методы получения безвирусных растений, таких как картофель и др. (рис. 25).

Получение безвирусного картофеля

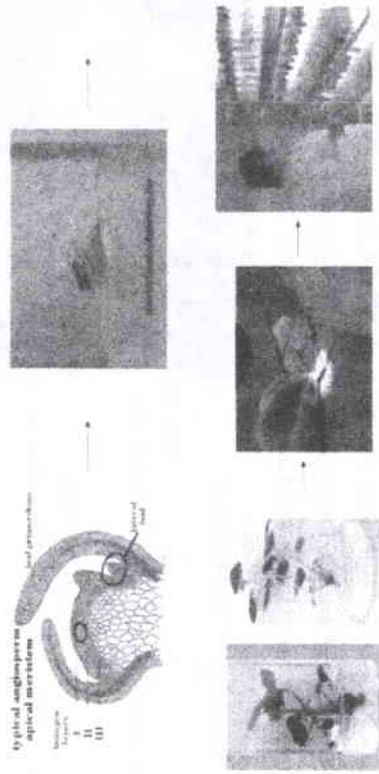


Рис. 25. Технология получения безвирусного картофеля

2. Получение и использование протопластов. С тех пор, как удалось индуцировать регенерацию целого растения из отдельной клетки, техника культуры клеток стала все шире применяться для клонирования. Эта тотипотенция была продемонстрирована в 1965 г. на культурах тканей ряда видов, а позднее на соматических и половых клетках, изолированных из обширной группы растений. В 1971 г. Такебе и его сотрудники, обрабатывая клетки листа табака для растворения клеточных стенок сочетанием целлюлазы и пектиназы, добились успеха в получении протопластов (рис. 26). Протопласты культивировали в среде, в которой они могли делиться и формировать каллус, способный к регенерации с образованием целого растения. Эти первые эксперименты, проведенные на протопластах табака, показали, что более 90% всех прокловов, т. е. клонов, которые получены из протопластов, удивительно сходны с родительскими линиями как по фенотипу, так и по генотипу. Разработка и применение способов получения и слияния протопластов растительных клеток, а также регенерации у них клеточной стенки в сочетании с методами

культивирования и дифференцировки клеток *in vitro* позволили конструировать рекомбинанты, минуя половой процесс, т. е. создавать соматические гибриды. Как известно, процесс слияния протопластов неспецифичен. Слияние протопластов осуществляют в жидких средах с помощью полистиленгликоля. Это позволяет объединять протопласты отдаленных видов растений, между которыми половая гибридизация невозможна, и таким образом расширять круг растений, вовлекаемых в гибридизацию.

Первые успехи в получении соматических гибридов растений данным методом были достигнуты в середине 60-х гг. Вначале были выделены межвидовые гибриды (табака, моркови, петунии и дурмана). Затем удалось получить и межродовые соматические гибриды (картофель x томат; дурман x беладонна). Осуществлено слияние протопластов растений, относящихся к разным видам, родам и семействам, проведены также исследования по разработке методов регенерации целых растений из протопластов после слияния.



Рис. 26. Протопласты табака

4. Генетическая инженерия растений. Целью генетической инженерии является конструирование растений с полезными признаками (повышение урожайности, устойчивость, накопление различных веществ, используемых в фармацевтической и пищевой промышленности). Решение этой задачи осуществляют одним способом: переносом в геном растений чужеродных генов (получением трансгенных растений). Чужеродные гены могут быть

различного происхождения: гены бактерий, дрожжей, млекопитающих, человека, а также гены эволюционно далеких видов растений. Решение проблем генетической инженерии растений оказалось в значительной степени связанным с образованием у растений корончатых галлов. Корончатый галл - это злокачественная болезнь многих двудольных растений, возбудителем которой является почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens*. Тi-плазмиды, обнаруженные во всех вирулентных штаммах *A. tumefaciens*, имеют размеры около 200-250 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) и стабильно сохраняются в агробактериях при температуре ниже 30°C. Согласно данным ДНК-ДНК-гибридизации в Тi-плазмидах различных штаммов агробактерий имеются четыре области гомологии. Генетический анализ показал, что две области, Т-ДНК и viг-область (от англ. virulence), связаны с опухолеобразованием, тогда как две другие вовлечены в конъюгационный перенос и репликацию плазмид в клетках агробактерий. В процессе опухолеобразования определенная последовательность Тi-плазмиды Т-ДНК переносится в клетки растения и встраивается в их ядерный геном. Т-ДНК стабильна в растительном геноме. Как показала гибридизация опухолевой ДНК со специфичным Тi-плазмидным зондом, содержащаяся в растительных клетках Т-ДНК коллинеарна исходной Т-ДНК Тi-плазмиды агробактерий, что свидетельствует об отсутствии заметных перестроек в последовательности плазмидной ДНК в процессе генерации опухоли. В растительную ДНК может включаться одна или более копий Т-ДНК, и, хотя множественные копии Т-ДНК могут образовывать tandemные повторы, они могут быть разбросаны по геному и сцеплены с различными районами растительной ДНК. Место встраивания Т-ДНК в растительную ДНК, по-видимому, случайно. В различных Тi-плазмидах найдены области, гомологичные Т-ДНК. Т-ДНК содержит гены (*tms* 1, *tms* 2, *tmg*), продукты которых препятствуют нормальной регуляции

метаболических процессов, вовлеченных в синтез фитогормонов, что и приводит к онкогенному фенотипу. Следовательно, эти гены (*tms* 1, *tms* 2, *tmg*) можно отнести к так называемым *onc*-генам. Однако следует отметить, что входящие в состав Т-ДНК гены не участвуют в переносе в растительные клетки и не влияют на ее стабильность в геноме растений (рис.27-28).

Природная способность агробактерий переносить определенные последовательности ДНК в растительный геном была использована при конструировании ряда векторов для трансформации растений с учетом различных особенностей процесса трансформации под действием агробактерий. В начале 80-х гг. многие группы исследователей модифицировали Тi-плазмиды таким образом, чтобы удалить все онкогены Т-ДНК. При этом было обнаружено, что кодируемые Тi-плазмидой онкогены не участвуют ни в переносе Т-ДНК в растительную клетку, ни в ее интеграции с ядерной ДНК. Следовательно, эти гены можно заменить, встроив вместо них чужеродную ДНК. При этом плазида теряет онкогенные свойства. Следует, однако, отметить, что *loc*- или *ocs*-гены представляют собой удобные маркеры для трансформации, поскольку ферментативную активность их продуктов легко тестировать. До настоящего времени не сообщалось о возможных ограничениях размера вставки. Важную роль в данной области исследований сыграло и открытие того факта, что продукты *vir*-генов способны функционировать в трансположении. Наконец, неонкогенные Т-ДНК, присутствующие в регенерированных целых растениях, передаются в потомстве согласно законам Менделя.

Используя характер переноса генов, осуществляемого агробактериями, можно любую клонированную чужеродную ДНК перенести в геном клетки растения. Для разрешения проблемы идентификации трансформированных клеток между повторами длиной 25 п. н. встраивают бактериальные гены устойчивости к

антибиотикам, помещенные под контроль промоторов T-ДНК и снабженные сигналами полиаденилирования. Такие химерные гены устойчивости к антибиотикам эффективно экспрессируются в растительных клетках как доминантные признаки в любом генетическом окружении. Удобно, чтобы маркерные гены были тесно сцеплены с чужеродной ДНК по двум причинам. Во-первых, это позволяет осуществлять прямую селекцию трансформированной ткани растения, чтобы убедиться в переносе чужеродной ДНК. И во-вторых, это гарантирует, что фланкирующая чужеродная ДНК в конкретном трансформированном клоне, полученном в результате селекции, не была встроена в нетранскрибируемую область генома.

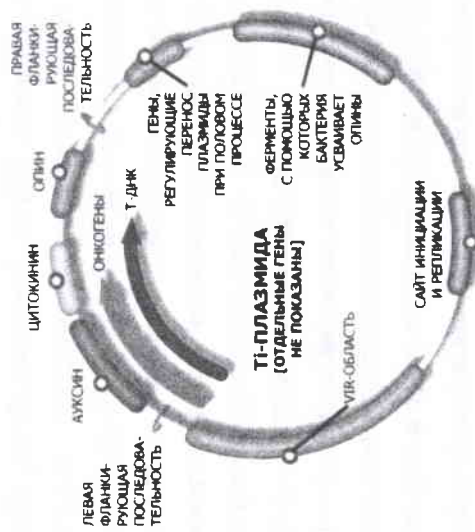


Рис. 27. Тi – плазида *Agrobacterium tumefaciens*

Другие методы генетической трансформации растений: обстрел растительной ткани микрокастицами золота, покрытыми раствором ДНК; микроинъекции ДНК; введение ДНК в протопласты; электропорация; опосредованная вирусами инфекция; прокалывание клеток путем встряхивания их в суспензии микроигл.

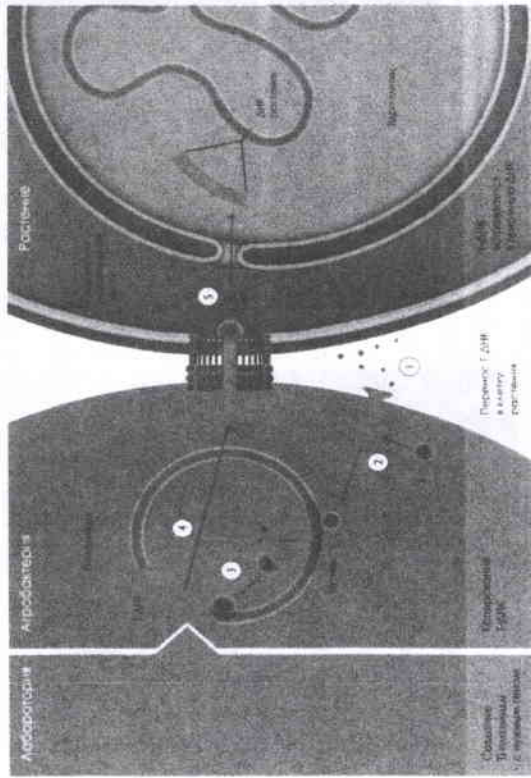


Рис. 27. Встраивание T-ДНК в геном растения

Практическое задание:

Практическая часть занятия № 5 связано с решением задачи, проведенном дискуссии по актуальным проблемам использования методов генетики в биотехнологии растений и выполнением рефератов по предложенной тематике:

Задача:

Обстрел протопластов гороха микрокастицами золота с ДНК позволил внести в геном растения ген *Ass* – ген устойчивости к пестициду фосфинотрицину. Опишите последовательные этапы 1,2,3 (рис. 29) выявления прошедшего трансгена:

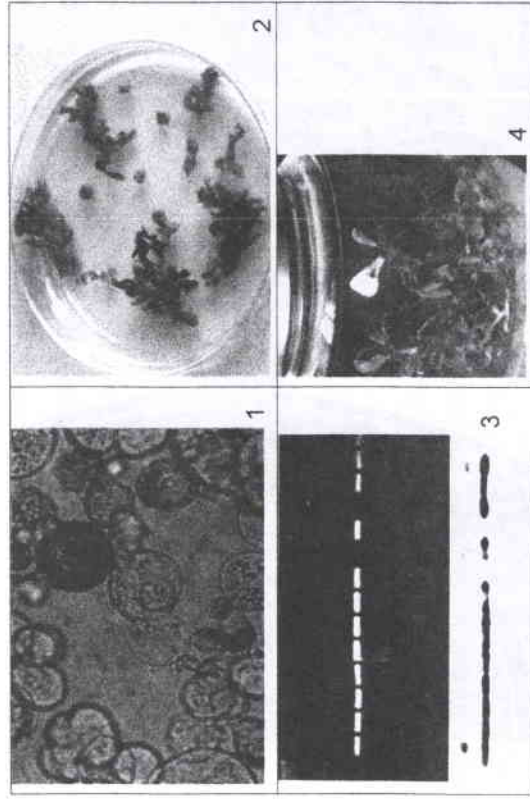


Рис. 29. Этапы трансгеноза

Проведение дискуссии на тему: Трансгенные растения и биобезопасность.

Вопросы для обсуждения:

1. Почему современные технологии создания ГМО служат источником биологических и экологических рисков?
2. Перечислите современные источники биологической опасности.
3. В чем основной смысл законов РФ по контролю безопасности ГМО?

Темы рефератов:

1. Задачи генетической инженерии растений.
2. Кориччатые галлы и их значение в генетической инженерии растений.
3. Опины и их роль в злокачественных образованиях растений.
4. Векторы в генетической инженерии растений.
5. Т-ДНК, ее строение и значение в генетической инженерии растений.
6. Традиционные генетические методы усовершенствования растений.

7. Культуры клеток и тканей в создании новых сортов растений.
8. Культуры клеток и протопластов растений и их использование для получения полезных соединений.

9. Диазотрофные микроорганизмы и тест на восстановление ацетилена.

10. Биохимические аспекты диазотрофности.

11. Основные физиологические аспекты диазотрофности.

12. Гены азотфиксации и продукты их деятельности.

13. Пути расширения границ и повышения эффективности биологической фиксации атмосферного азота

Занятие № 6. Использование методов генетики в биомедицине

Теоретическая часть.

Исключительная особенность генетических разработок проявляется в широчайшем охвате различных сфер человеческой деятельности. Общеизвестно, что разработка методов изменения генетического аппарата клеток, позволяющих вводить в них чужеродные гены, клонировать их, экспрессировать и получать нужные продукты, совершила настоящую революцию в биологии. Эти достижения находят широкое применение и в медицине. Белки и пептиды, доступные совсем недавно лишь в очень небольшом количестве, сегодня предполагается производить в массовом масштабе и использовать для лечения многих больных.

Основные направления использования методов генетики в биомедицине:

1. **Биосинтез инсулина человека в клетках кишечной палочки.** В 1979 г. Креа, Крашевски, Хируз и Итакура из Национального медицинского центра «Хоуп» (Дуарте, Калифорния) за три месяца работы синтезировали гены, кодирующие А- и В-цепи инсулина: каждый ген был собран соответственно из 18 и 11 олигонуклеотидов

Каждый синтетический ген встраивали в плазмиду в конце гена β -галактозидазы *E. coli* K 12. Синтезированные полипептиды отщепляли от фермента, проводили их очистку, и цепи соединяли *in vitro* для получения полной молекулы инсулина. Исходно в бактериях синтезировалось около 100 000 молекул инсулина на бактериальную клетку.

В клетках *E. coli* осуществлен также биосинтез проинсулина, а не только ее отдельных цепей - А и В; для этого на мРНК проинсулина с помощью обратной транскриптазы синтезировали ее ДНК-копию. Биосинтез проинсулина, молекула которого сворачивается и после образования дисульфидных связей образует молекулу инсулина, имеет серьезное преимущество, поскольку различные этапы экстракции и выделения гормона сведены к минимуму.

По наблюдениям исследователей американской компании «Эли Лилли», включения, содержащие проинсулин или А- и В-цепи инсулина, могут занимать до 20% объема клетки *E. coli*. Можно повысить выход гормона, синтезируемого в клетках бактерий, встраиванием в ДНК коротких последовательностей нуклеотидов (промоторов), которые обеспечивают бы более высокий уровень экспрессии ДНК в составе рекомбинантной плазмиды. Кроме того, в одну бактериальную клетку можно ввести несколько копий рекомбинантной плазмиды. В центре прикладной микробиологии в Портон-Дауне (Великобритания) был получен высокий выход этого белка — до 200 г из 1000 л культуральной среды - (это эквивалентно количеству инсулина, выделенному приблизительно из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы).

Исследователям из компании «Генентек» потребовалось 10мес., чтобы в сентябре 1978 г. получить инсулин человека в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Производство

инсулина в бактериальных клетках не зависит от перебоев в поставках сырья с боен и позволяет получать человеческий инсулин, который при длительном применении не вызывает неприятных последствий, как инсулин животных (имеются в виду нарушение работы почек и расстройство зрения; у одного из каждых 20 больных диабетом инсулин животных вызывает аллергию). «Эли Лилли» совместно с «Генентек» вложила 40 млн. долл. В строительство завода для крупномасштабного производства инсулина в американском городе Индианаполис (шт. Индиана).

Начиная с июля 1980 г. имеющихся количеств синтезированного гормона оказалось достаточно, чтобы начать клинические испытания и фармакодинамические исследования в США, Франции, Японии и Великобритании. В октябре 1982 г. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA) одобрило выпуск в США «хемулина» — препарата синтетического инсулина человека, производимого фирмой «Эли Лилли», которая, по оценкам, затратила 100 млн. долл., чтобы начать поставку продукта на рынок. Месяцем раньше подобное решение в отношении хемулина было принято в Великобритании. Эти решения были вынесены через пять месяцев после регистрации препарата в FDA на основании положительных результатов клинических испытаний в отношении безопасности применения, проведенных на здоровых добровольцах и на 1000 больных диабетом в ряде стран (400 из них в США).

Инсулин человека, полученный с помощью *E. coli*, оказался первым «генно-инженерным» белком, испытанным на людях. Генно-инженерный или синтетический инсулин (хемулин) заменяет инсулин животных, который снимается с производства.

2. Биосинтез гормона роста (соматотропина). Гормон роста человека (ГРЧ), или соматотропин, секретируется передней долей гипофиза. Впервые он был выделен и очищен в 1963 г. коллективом во главе с Русом из гипофиза, полученного из трупного материала. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости, частота встречаемости которой оценивается от 7 до 10 случаев на миллион человек (среди детей западных стран она составляет 1 на 5000 человек). Гормон обладает видовой специфичностью и является единственным средством лечения детей, страдающих от его недостатка

Биосинтез соматотропина (состоящего из 191 аминокислотного остатка) был осуществлен в фирме «Генентек». Поскольку при синтезе ДНК на мРНК гормона с последующим превращением ее в двуниевую форму получается ген, кодирующий предшественник соматотропина, который не расщепляется в бактериальных клетках с образованием активного гормона, исследователи избрали следующий подход. На первом этапе клонировали двуниевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й, со стартовым АТГ кодоном в начале. Наконец, два фрагмента объединили вместе и «подстроили» к паре /ас-промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры или 1% от растворимых белков клеток этого генетически сконструированного штамма *E. coli* (т. е. 100000 молекул гормона на клетку). Синтезированный в бактериях гормон обладал нужной молекулярной

массой и не был связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было бы отщеплять.

Первые полные клинические испытания с целью установить безопасность и эффективность гормона, синтезированного в клетках бактерий, были проведены с согласия FDA 12 января 1981 г. в Отделении педиатрии Медицинской школы в Пало-Альто (Калифорния) на взрослых добровольцах. В Великобритании подобные испытания проводились с февраля 1981 г. в Клинике детских заболеваний на Грейт-Ормонд-Стрит.

В 1981 г. клинические испытания и тесты на токсичность, проводимые «Генентек» и «Каби витрум», были завершены, и уже в следующем году в Канаде, США, Европе и Японии были начаты массовые испытания на детях, страдающих карликовостью и по возрасту близких к половой зрелости.

С августа 1982 г. «Каби витрум» приняла решение начать производство синтетического соматотропина в промышленном масштабе на своем заводе в Стренгнесе в ферментерах объемом по 1500 л, намереваясь поставить его на рынок в конце 1983 г.

3. Биосинтез интерферона. 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 еще двумя важными свойствами: подавляют пролиферацию клеток (и, таким образом, потенциально являются противоопухолевым средством) и модулируют иммунную систему.

В январе 1980 г. Гилберт и Вейсман из Бостона сообщили, что им удалось получить интерферон человека в генетически сконструированных клетках кишечной палочки. Исходная трудность, с

которой они столкнулись, заключалась в том, что матричной РНК α -интерферона мало даже в лейкоцитах, стимулированных заражением вирусом. Используя современную технику, исследователи получили из матричной РНК, выделенной из лейкоцитов (из 17 л крови в одном опыте), дуплицированную ДНК-копию, которую встроили в плазмиду и получили клоны. Они испытывали свыше 20 000 клонов, подвергая гибридизации содержащиеся в них плазмиды с мРНК из лейкоцитов, выделяли РНК, которая связывалась с каждым из клонов, и проверяли ее способность кодировать интерферон, причем не в системе *in vitro*, а в ооцитах (синтезирующегося интерферона было достаточно, чтобы провести испытание биологической активности). После этого Вейсман и его коллеги установили, что отдельные клоны кишечной палочки, которые содержали ген лейкоцитарного интерферона, были способны синтезировать лишь крайне незначительные количества этого белка: всего 1-2 молекулы на клетку (бактериальные белки представлены в клетке 1000-100 000 молекул).

В июле 1980 г. группа японских исследователей, возглавляемая Танигучи, подобным же способом получила фибробластный интерферон, однако выход белка был выше, чем в опытах американских исследователей: он составлял до 100 молекул на одну бактериальную клетку. По мнению Танигучи, выход можно было довести до 10 000 молекул на бактериальную клетку.

В марте 1981 г. сотрудники факультета генетики Университета Вашингтона в Сиэтле сообщили, что им совместно с исследователями «Генентек» (Сан-Франциско) удалось синтезировать лейкоцитарный интерферон, используя генетически сконструированные клетки дрожжей. Это был первый случай синтеза человеческого белка в дрожжевых клетках. Исследователи соединили в клетках *Saccharomyces cerevisiae* последовательность ДНК, кодирующую

лейкоцитарный интерферон человека (LeIF-D), с геном алкогольдегидрогеназы дрожжей в плазмиде, способной к автономной репликации как в клетках *E. coli*, так и в клетках *S. cerevisiae*, и ввели полученную плазмиду в клетки *S. cerevisiae*. Замена промотора и 5'-лидерного участка гена интерферона на соответствующие последовательности гена алкогольдегидрогеназы дрожжей и встраивание обоих генов в плазмидный вектор позволили добиться эффективной экспрессии гена LeIF-D. При этом синтезировалось до 10^6 молекул лейкоцитарного интерферона на клетку.

В апреле 1982 г. Фалькофф и его коллеги из лаборатории по исследованию интерферона (INSERM U 196, Институт Кюри в Париже) совместно с исследователями компании «Трансжен» (Страсбург) и фармацевтической компании «Руссель-Юклаф» выделили и клонировали ген, способный кодировать γ -интерферон в ооцитах лягушки. Клонирование этого гена в клетках бактерий и в культурах клеток было уже следующим этапом, необходимым для начала широкомасштабного производства препарата. В июне 1982 г. исследователи японской компании «Сантори» добились успеха в клонировании гена, кодирующего γ -интерферон, в клетках *E. coli*; предварительно они химически синтезировали этот ген, включая его интроны - некодирующие последовательности.

Важный шаг на пути к производству интерферона в достаточных количествах был сделан в августе того же года, когда группа из девяти английских исследователей из фармацевтического отделения компании «Империл кемикал индастриз» (ICI) и из Школы биологических наук Лестерского университета опубликовала результаты своей работы по полному синтезу гена, кодирующего лейкоцитарный интерферон человека. Эти эксперименты были начаты, когда в результате получения ДНК-копии мРНК интерферона

были установлены нуклеотидные последовательности генов интерферона. Эксперименты продолжались полтора года. На основе нуклеотидной последовательности ДНК-копии лейкоцитарного интерферона (IFN- β), опубликованной Вейсманом с соотр. в 1980 г., английским исследователям удалось сконструировать близкую к ней полную последовательность ДНК, способную кодировать α -интерферон. Оригинальный подход английских исследователей позволил начать новому методу синтеза олигонуклеотидов, который позволил существенно ускорить синтез гена. Они начали с присоединения нуклеотида к полиакриламидной смоле, после чего проводили присоединение пар нуклеотидов, используя конденсирующий агент в безводном пиридине. Каждый цикл завершался за полтора часа, так что за год можно было синтезировать последовательность длиной 5000 нуклеотидов. Благодаря такому методу, ученые синтезировали 67 олигонуклеотидов, которые с помощью лигазы были соединены с образованием двунитовой ДНК, состоящей из 514 пар нуклеотидов. Этот химический синтез был проведен за время, сравнимое с тем, которое необходимо для выделения гена из клеток человека.

В ряде исследовательских учреждений и промышленных компаний для получения различных классов интерферона были применены методы генной инженерии: так, в США получением α -интерферона занималась компания «Биоген» (в сотрудничестве с «Шеринг-плау»), β -интерферона (компания «Цетус» в сотрудничестве с «Шелл»), синтезом β -интерферона в клетках дрожжей — «Коллаборейтив генетикс» (в сотрудничестве с «Интерферон сайенс, инк.»), получением α , β и γ -интерферона в клетках *E. coli* и дрожжей — «Генентек», производством α , β -интерферонов по технологии «Генентек» (без права продажи в США) - фирма «Хофман - Ла Рош», в

Японии над получением γ -интерферона по технологии «Генентек» (исключительно для японского рынка) работала компания «Дайичи сейяки», над синтезом β -интерферона - «Киёва хакко когио» и «Мицу тоацу кемикл» (в сотрудничестве с «Генентек»), над получением β и γ -интерферонов — компания «Торей индастриз» совместно с «Генентек»; во Франции синтезом β -интерферона занимался Институт Пастера, γ -интерферона - компания «Трансжен»; в Великобритании β -интерферон разрабатывала компания «Серл»; в Швеции компания «Каби витрум АБ» занималась синтезом β и γ -интерферонов в клетках *E. coli*; в Израиле в Вейцманновском институте получали β -интерферон; в СССР был осуществлен полный синтез гена α -интерферона группой академика М. Н. Колосова (Институт биорганической химии АН СССР).

4. Гибридомы. В 1973 г. Коттон и Милстейн (лаборатория молекулярной биологии в Кембридже) слили клетки крысиной и мышинной миеломы и обнаружили, что гибридные клетки продуцируют иммуноглобулины, состоящие из различных комбинаций полипептидных цепей, синтезируемых родительскими линиями. Сотрудник Милстейна Кёлер заинтересовался проблемой получения двух разных мышинных миелом и изучением иммуноглобулинов, продуцируемых гибридными клетками (эти исследования аналогичны экспериментам Коттона и Милстейна по слиянию мышинных и крысиных миеломных клеток). Среди миелом, полученных Кёлером, была линия клеток Р3, также некогда изолированная Поттером. Клетки миеломы Р3 могли расти *in vitro*, и Милстейну удалось получить из нее мутантные линии. Кёлер выделил вариант Р3, устойчивый к азагуанину, и слил его с другой миеломой, Р1. При этом он обнаружил, что гибридные клетки продуцировали иммуноглобулины обеих родительских линий.

В конце 1974 г. Кёлеру удалось получить гибридому путем слияния клеток миеломы P3 и лимфоцитов из селезенки мыши, иммунизированной эритроцитами барана. Эксперимент состоял в иммунизации мышей эритроцитами (продукция антител против этого антигена легко тестируется в сыровотке методом, разработанным в 1963 г. Эрне и Нурдином) и в последующем смешивании клеток миеломы P3 мыши с клетками селезенки иммунных мышей в присутствии полиэтиленгликоля. Полученные в результате такого слияния гибридные клетки затем обнаруживались при культивировании в селективной среде – они секретируют иммуноглобулины, характерные для обеих родительских клеток. Некоторые гибриды продуцировали антитела против эритроцитов (приложение, рис. 14). Таким образом, Келер и Милстейн сумели выделить клоны клеток, способные секретировать единственный тип молекул антител и расти в культуре. Будучи полученными путем слияния антителообразующих и опухолевых клеток, эти клетки химеры, названные гибридами, наследовали способность к неограниченному росту в культуре и в то время к продукции антител определенной специфичности (моноклональных антител). Эта работа, признанная одним из важнейших достижений в период с 1970 по 1980 г., в значительной степени явилась результатом исследований в области синтеза антител, культивирования клеток и клеточных слияний, проводимых в течение двух десятилетий.

Практическое задание:

Практическая часть занятия № 6 предусматривает выполнение компьютерных презентаций и контрольного задания:

Темы презентаций:

1. Генно-инженерный инсулин.

2. Генно-инженерный соматотропин.
3. Создание интерферонов методами генетической инженерии.
4. Получение и использование гибридом.
5. Получение вакцин методами генетической инженерии.
6. Использование моноклональных антител в лечении и диагностике рака.
7. Использование стволовых клеток.
8. Генная терапия.

Контрольное задание:

Опишите (ориентируясь на рисунок 30, с указанием числа аминокислотных остатков) все этапы образования молекулы инсулина.

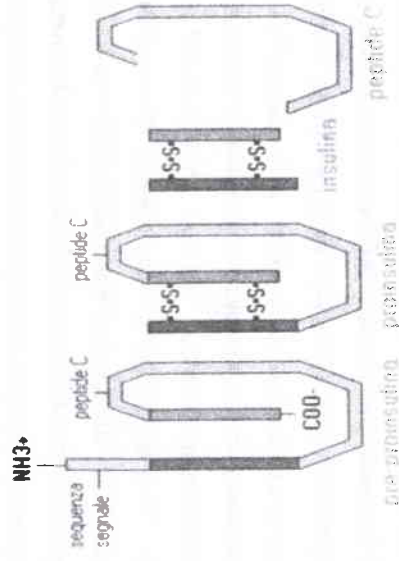


Рис. 30. Образование молекулы инсулина

Занятие № 7. Методы генетики в экологической биотехнологии

Теоретическая часть

1. Очистка сточных вод и переработка отходов. Аэробная переработка стоков - это самая обширная область контролируемого

использования микроорганизмов в биотехнологии. Она 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.

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 анаэробному разложению. Анаэробная ферментация отходов или растительных культур, специально выращиваемых для получения энергии, очень перспективна для экономичного получения газообразного топлива при умеренных температурах (30-35°C). Эта новая отрасль биотехнологии была развита микробиологами в сотрудничестве с инженерами-химиками и механиками, работниками сельского хозяйства и экономистами. Промышленное применение систем анаэробного разложения неуклонно возрастает; они используются при переработке отходов животноводческих ферм и промышленных, в том числе пищевых отходов, а также для переработки культур, специально выращиваемых для получения энергии.

2. Биологическая переработка промышленных отходов. Промышленные отходы 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 не выгоден, 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) или путем извлечения из них ценных соединений.

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, и тем не менее подобный подход представляется весьма перспективным. Это может быть: 1) деградация отдельных видов отходов *in situ* с помощью специализированных культур микроорганизмов или их сообществ; 2) введение специально подобранных культур в обычные системы переработки отходов; 3) ликвидация и обезвреживание разливов нефти; 4) извлечение металлов; 5) биологическая очистка газов от пахучих и вредных соединений (меркаптанов, сероводорода, цианида,

хлорзамещенных углеводородов и т. д.); 6) получение биомассы из отходов; 7) превращение отходов в метан.

3. Биодegradация нефтяных загрязнений Сточные воды нефтяной промышленности обычно очищают биологическим способом после удаления большей части нефти физическими способами или с помощью коагулянтов. Самые большие утечки нефти в окружающую среду происходят в море, где она затем подвергается различным физическим превращениям, известным как выветривание. В ходе этих биотических процессов, включающих растворение, испарение и фотоокисление, разлагается - в зависимости от качества нефти и 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, а также асфальтенов в различных типах нефти различно. Определенную устойчивость нефти придают разветвленные алканы, серу содержащие ароматические соединения и асфальтены. Кроме того, скорость роста бактерий, а, следовательно, и скорость биодegradации определяются доступностью питательных веществ, в частности азота и фосфора. Оказалось, что добавление таких веществ увеличивает скорость биодegradации.

Количество разных организмов, способных расти на компонентах нефти, зависит от степени загрязненности углеводородами. Например, больше всего их находят поблизости от крупных портов или нефтяных платформ, где среда постоянно загрязнена нефтью. Полная деградация нефти зачастую не происходит даже при участии богатых по видовому составу микробных сообществ. Наиболее

биологически инертные компоненты, например, асфальтены, содержатся в осадочных породах и нефтяных залежах. Основные физические факторы, влияющие на скорость разложения нефти - это температура, концентрация кислорода, гидростатическое давление и степень дисперсности нефти. Наиболее эффективная биодegradация осуществляется тогда, когда нефть эмульгирована в воде.

4. Биодegradация пестицидов. Пестициды попадают в окружающую среду 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 биодegradации. Для этого хорошо было бы использовать внеклеточные ферменты, способные функционировать в отсутствие кофакторов или специфических факторов и осуществлять детоксикацию разнообразных пестицидов. Это могут быть такие гидролазы, как эстеразы, ациламидазы и фосфоэстеразы. В ряде случаев в качестве биологического агента детоксикации была испробована паратионгидролаза, выделенная из

Pseudomonas sp. С ее помощью удалось удалить 94-98% остаточного паратиона (около 75 г) из контейнера с пестицидом за 16 ч при концентрации субстрата 1 % (по весу).

5. Методы генной инженерии в контроле загрязнений. Аэробные и анаэробные микроорганизмы способствуют удалению существенной части органического материала, содержащегося в сточных водах. Были получены впечатляющие результаты по переработке жидких отходов предприятий, производящих дрожжи, сидр, по переработке нефти, молока и картофеля на крахмал с помощью анаэробного процесса. При этом активные биологические компоненты используются в повторных циклах, уменьшается количество остаточных шлаков, в значительной степени снято распространение неприятных запахов и, что не менее важно, образуется немного метана, который служит топливом для бойлеров используемого оборудования.

Можно также выделить микробные штаммы для контроля различных видов химического загрязнения, например деструктурирования биоцидов, биодеградация которых трудно достижима, детергентов, пластиков или углеводородов.

Так, в бактериях, относящихся к роду *Pseudomonas*, имеются оксиредуктазы или гидроксилазы, способные разлагать большое число молекул углеводородов и ароматических соединений, часто высокотоксичных (бензол, толуол, ксилол). В случае некоторых штаммов *Pseudomonas putida* гены, кодирующие эти ферменты, находятся в составе плазмид. Известны четыре такие плазмиды: OСТ (разложение октана, гексана и декана), ХУL (разложение ксилола и толуола), САМ (разрушение камфоры) и NАН (разложение нафталина). Плазмиды САМ и NАН обеспечивают собственный перенос, индуцируя скрещивание бактериальных клеток; остальные

плазмиды могут быть перенесены только в том случае, если в бактерии введены другие плазмиды, обеспечивающие скрещивание. Сотрудники компании «Дженерал электрик» получили штамм, содержащий плазмиды ХУL и NАН, а также гибридную плазмиду, полученную путем рекомбинации частей плазмид САМ и OСТ (сами по себе они несовместимы, т. е. не могут сосуществовать как отдельные плазмиды в одной бактериальной клетке). Этот штамм способен быстро расти на неочищенной нефти, так как он метаболизирует углеводороды гораздо активнее, чем любой из штаммов, содержащих только одну плазмиду. Штамм может быть особенно полезен в очистных водоемах для сточных вод, где можно контролировать температуру и другие внешние факторы.

Исследования, связанные с деградацией углеводородов бактериями, в основном направлены на ускорение этого в обычных условиях очень медленного процесса. Американским исследователям удалось выделить со станций очистки сточных вод бактериальные штаммы, которые могут разлагать углеводороды и которые уже прошли испытания в Мексиканском заливе. Исследователи из лаборатории окружающей среды Национального общества «Эльф-Акитэн» (SNEA) в г. По (Франция) разработали технологию ускоренного размножения живущих в море бактериальных видов, которые способны разлагать углеводороды. Для ускорения биоразложения загрязненная поверхность покрывалась микромульсией, содержащей инкапсулированную смесь углерода, азота и фосфора. Как оказалось, добавление этих веществ стимулировало размножение полезных бактериальных штаммов. Эксперименты, проведенные французскими исследователями в Атлантике, Средиземноморье и в районе островов Кергулен, позволили сделать следующий вывод: там, где применяли новый

метод, в течение недели с загрязненной поверхности исчезало 79-90% углеводов по сравнению с 12-20% на необработанных местах. После каждой операции плотность фитопланктона повышалась. Микромульсия была эффективна при концентрации 1: 10, такая концентрация характерна для большинства диспергаторов, которые применяются для контроля загрязнения, вызываемого углеводородами. Преимущество биологического процесса состоит главным образом в том, что он не вызывает появления нового загрязняющего агента в окружающей среде. Новая технология найдёт применение как в морях, так и в болотах и лагунах, куда нелегко добираться, а также для контроля случайных загрязнений, например, в акваториях портов. Исследования в лабораториях Франции направлены на разработку процесса, который смог бы обеспечить стимуляцию роста большого числа групп морских бактерий, деградирующих углеводороды. Часто результатом химического превращения токсичной молекулы является не полное разложение, а детоксификация: фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и т. д. Ферменты, катализирующие реакции детоксикации, часто кодируются генами, находящимися в составе плазмид. Исследователям из Иллинойского университета в Чикаго удалось получить микробную культуру, способную полностью метаболлизировать 2,4,5-Е (2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту), которая является сильным и широко применяемым гербицидом. Исследователи выделили на очистных станциях несколько микроорганизмов и смешали их с другими бактериальными штаммами, содержащими ряд плазмид с генами, кодирующими ферменты разложения органических соединений (толуола, ксилола), хлорпроизводных (4-хлоркатехола) и салицилатов. Затем смесь бактерий выращивали в хемостате исключительно на 2,4,5-Е. После 10 мес. культивирования в этих условиях скорость роста бактерий

значительно повысилась в связи с тем, что 2,4,5-Е начала использоваться для роста бактерий даже в случае очень высокой концентрации (1,5 мг/мл) в течение нескольких дней. В настоящее время исследователи пытаются выделить отдельный штамм, содержащий плазмиды с генами всех ферментов, ответственных за разные стадии разрушения 2,4,5-Е. Методы генной инженерии должны сделать достижение такого результата возможным. Это позволит затем решить проблему конструирования микробных штаммов, способных разрушать и ассимилировать множество соединений, часто не подверженных биоразложению (или ксенобиотиков), которые, в частности, производятся химической промышленностью.

Практическое задание:

Практическая часть занятия № 7 проводится в интерактивной форме: проводится конференция, которая предусматривает устные выступления студентов (для зачета дополнительно предоставляется доклад в письменной форме и компьютерная презентация) и обсуждение докладов.

Темы для выступлений:

1. Ксенобиотики, основные источники их поступления в природные среды
2. Особенности миграции органических загрязнений
3. Особенности миграции тяжелых металлов и радионуклидов
4. Основные биохимические пути микробиологической трансформации органических ксенобиотиков
5. Методы очистки и обезвреживания загрязненных сред с использованием водорослей и растений
6. Особенности трансформации нефти и нефтепродуктов в водных и почвенных средах

7. Проведение ремедиационных и рекультивационных работ при загрязнении поверхности водоемов и почв нефтью и нефтепродуктами
8. Защита от биоповреждений
9. Биобезопасность, особенности получения разрешений на использование и нормирование воздействий компонентов биотехнологических производств и биопрепаратов.
10. Микробиологическая переработка органических отходов.

11. Биодegradация синтетических полимерных материалов и использование биодеградируемых пластиков
12. Биологическая очистка газовоздушных выбросов.

Занятие № 8. Методы генетики и биотехнология в производстве энергии

Теоретическая часть

Методы генетики активно используются в такой области биотехнологии, как производство энергии: это прежде всего генетические методы модификации растений с целью увеличения биомассы, используемой для получения энергии.

1. Биомасса и энергия. Биомасса - суммарная масса особой вида, группы видов или сообщества организмов, выражаемая обычно в единицах массы сухого или сырого вещества, отнесенных к единицам площади или объема любого местообитания (кг/га, г/м², г/м³, кг/м² и др.). В основе как запасаения энергии (фотосинтез), так и переработки сырья (биомассы) в более ценное топливо (путем ферментации) лежат биологические процессы. Получение топлива по схеме «биомасса - биотехнология» основывается на сочетании фотосинтеза, животноводства, кормопроизводства и ферментации с использованием наиболее подходящих организмов. Все это должно быть совмещено с инженерным обеспечением сбора урожая, его перевозки, обработки и получения конечного продукта. Единственным поставщиком энергии в такой системе является солнечный свет (этап

фотосинтеза). Соответственно все другие потребности должны быть удовлетворены за счет комбинированных источников энергии (ископаемого топлива, электроэнергии или части самой биомассы). Следовательно, определяющим фактором является отношение количества солнечной энергии, запасенной в конечном продукте, к энергии, затраченной на его производство.

2. Получение этанола. Химический синтез этанола осуществляется из этилена (получаемого из нефти или природного газа), который конвертируется при высокой температуре в присутствии воды и катализаторов. В начале текущего столетия этанол получали в крупных масштабах путем брожения, но в последние годы 70% этанола, производимого, например, в США, было получено при помощи химического синтеза. Это объясняется тем, что цены на сахар и крахмал слишком высоки. Однако, в связи с ростом цен на нефть, спиртовое брожение снова становится предпочтительным.

Среди растений, продуцирующих этиловый спирт, которые уже культивируются или могли бы культивироваться для производства этанола, следует выделить маниок, злаки (особенно кукурузу) и земляную грушу. Запасным углеводом этих растений служит крахмал (за исключением земляной груши, где запасным углеводом является инулин). Используются также сахарный тростник, ананас, сахарная свекла и сахарное сорго; основным углеводом этих растений является сахароза (рис.31).

Усовершенствованию ферментационного производства способствовали как уже разработанные (использование иммобилизованных ферментов или клеток), так и разрабатываемые биотехнологические методы (генная инженерия для выделения более высокопродуктивных дрожжей). Рост производства этанола связан с широтой его применения в химической промышленности и с

использованием в качестве топлива (добавка к бензину или заменитель бензина).

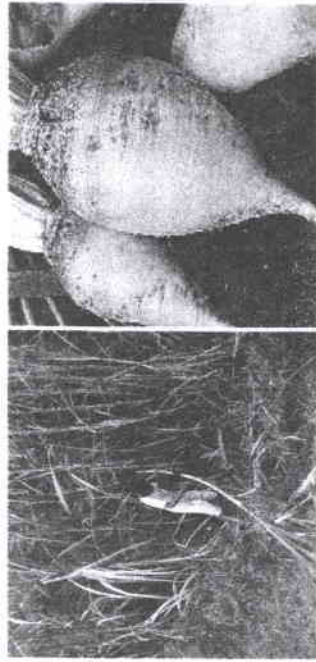


Рис. 31. Сахарный тростник и сахарная свекла

Этанол выступает как растворитель, экстрагент и антифриз. Он служит субстратом для синтеза многих растворителей, красителей, фармацевтических препаратов, смазочных веществ, моющих средств, пластификаторов, взрывчатых веществ и смол для производства синтетических волокон. В качестве топлива в двигателях внутреннего сгорания этанол можно использовать либо в безводном виде (99,8%), либо в смеси с бензином (где его доля достигает 20%), либо в форме гидратированного этанола (94%), не смешанного с бензином.

Попытки усовершенствовать производство этанола были сосредоточены на разработке технологии непрерывного брожения, которая обеспечивает более высокую концентрацию спирта (12% вместо 8-10%); на повышении энергоэффективности за счет более эффективной перегонки и совершенствования теплоуловителей; на утилизации сельскохозяйственных отходов или побочных продуктов в качестве топлива или продуктов питания и использовании альтернативных энергетически богатых растений, таких, как сахарное сорго и маниок.

В настоящее время главные сложности, связанные с производством спирта как горючего, обусловлены тем, что сырье для этого процесса является одновременно и сырьем для производства пищевых продуктов и кормов. Из-за этой конкуренции стоимость сырья весьма высока. Эту проблему можно будет решить, если в качестве исходного сырья будет использоваться целлюлоза и удастся разработать новый энергетически более выгодный метод выработки спирта.

Сложность использования целлюлозы заключается в том, что в природном состоянии в клеточных стенках растений она находится в составе нерастворимого комплекса с гемицеллюлозами и лигнином. Кроме того, за счет образования водородных связей отдельные молекулы целлюлозы определенным образом ориентируются относительно друг друга и образуют microfibrиллы, которые в какой-то мере подобны кристаллам, что препятствует действию гидролитических агентов. Даже после исчерпывающего гидролиза веществ растительных клеток дрожжи, которые обычно используются при получении спирта, не способны усваивать пятиуглеродные сахара, урновые кислоты и фенольные соединения, образующиеся из сопутствующих целлюлозе веществ клеточных стенок растений.

Чтобы решить эту проблему, работа ведется в нескольких направлениях. При создании одних методов ставится цель получить глюкозный сироп, и основное внимание уделяется гидролизу целлюлозы. В других случаях предпринимаются попытки разрушить ферментами возможно большую часть лигноцеллюлозы либо после разделения клеточных компонентов химическими методами, либо с помощью бактерий, способных непосредственно атаковать как целлюлозу, так и гемицеллюлозу. Размол - наиболее эффективный

физический способ предварительной подготовки сырья, но он дорог и энергоемок.

Для делигнификации можно использовать химическую обработку такими веществами, как едкий натр, надуксусная кислота или гипохлорит натрия. Под действием щелочи волокна набухают и разделяются. Гидролиз ведут либо минеральными кислотами, либо биологическими методами. В последнем случае используют гидролизующие целлюлозу ферменты грибов, например *Trichoderma*, *Aspergillus* либо *Sporotrichum*. После отделения целлюлозы и гемицеллюлозы для сбраживания глюкозы в спирт можно использовать дрожжи. Если для сбраживания используют бактерии, например *Klebsiella* или *Aeromonas*, то из пентоз можно получить бутанол.

Другая возможность заключается в том, что лигноцеллюлозу используют как субстрат для бактерий *Clostridium thermocellum*. Главными побочными продуктами производства являются CO_2 , дрожжи, сивушные масла и кубовые остатки. Каждый из них обладает определенной ценностью, но переработка жидких остатков может быть затруднена.

3. Получение биогаза. Получение метана (биогаза) методом анаэробной переработки сырья представляет другой пример биологических технологий, которые могут использоваться для получения более высококачественного топлива из растительного материала.

Метановое «брожение», или биометаногенез, - давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Энергия, заключенная в 28 м^3 биогаза, эквивалентна энергии $16,8 \text{ м}^3$ природного газа, $20,8 \text{ л}$ нефти или $18,4 \text{ л}$ дизельного топлива.

В анаэробном реакторе можно перерабатывать самое разнообразное сырье: отходы сельского хозяйства (испорченные растительные или пищевые продукты), стоки перерабатывающих предприятий, содержащие сахар, жидкие отходы, образующиеся на сахарных заводах или при отжиме пальмового масла, бытовые отходы, сточные воды городов и спиртовых заводов. Можно перерабатывать и специально выращиваемые культуры, включая и экзотические, растущие в пресной или морской воде и на бросовых землях; водяной гиацинт, гигантские бурые водоросли или слоновью траву.

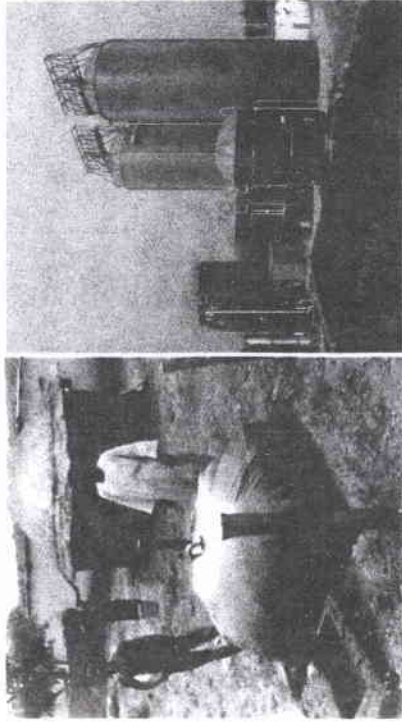


Рис. 32. Первые и современные дайджестеры (реакторы для получения биогаза)

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. Его можно подавать в газораспределительную сеть. В последнем случае требуется некоторая очистка биогаза: сушка, удаление углекислоты и сероводорода. Очищенный биогаз ничем не отличается от метана и

других источников, т. е. природного газа или же SNG (синтетический газ, получаемый из угля или водородсодержащего сырья). В развитых странах умеренного пояса, реакторы для получения биогаза используют главным образом для переработки отходов (рис. 32)

Практическое задание:

Практическая часть занятия № 8 предусматривает проведение семинара.

Вопросы для обсуждения:

1. Биометаногенез.
2. Биотехнология и энергия.
3. Получение водорода, перспективы и проблемы.
4. Перспективы глубинной переработки зерна для получения этанола.

По результатам занятий 1–8 для проверки качества усвоения полученных знаний проводится итоговый тест.

Литература:

1. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: издательство НГУ, Сибирское университетское издательство. 2002. 455 с.
2. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия: учебно-справочное пособие. Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. 514 с.
3. Тейлор, Д., Грин, Н., Стаут, У. Биология: в 3 т.: учебник. Москва: Лаборатория знаний. 2020. 1463 с.
4. Субботина, Т. Н., Николаева П.А., Харсекина А.Е. Молекулярная биология и геновая инженерия: практикум. Красноярск: Сибирский федеральный университет. 2018. 60 с.

5. Клунова, С.М., Егорова Т.А., Живухина Е.А. Биотехнология: учеб для студентов вузов, обуч. по спец. "Биология". Москва: Академия. 2010. 256 с.

6. Кузнецов, А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В. и др. Прикладная экобиотехнология : учеб. пособие в 2 т. - 2-е изд. - Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний. 2010. Т.1. 621 с. Т.2. 446 с.

7. Пак, И. В., Трофимов О.В., Величко О.А. Введение в биотехнологию. Тюмень: Изд-во Тюм. гос. ун-та, 2018. - 160 с.

8. Якупов, Т.Р., Фаизов Т.Х. Молекулярная биотехнология. Издательство: Лань. 2020. 160 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/145846> (дата обращения 14.05.2020).

Рисунки в пособии заимствованы с сайтов:

www.tigr.jrg

www.sanger.ac.uk

www.biotechnology.ru

Формат 60x84/16. Бумага офисная. Печать Riso.
Усл. печ. л. 4,41. Тираж 100 экз. Заказ 125.

Отпечатано с готового набора в типографии
ООО «Вектор Бук».

625004, г. Тюмень, ул. Володарского, 45.
Тел. (3452) 42-72-17, 46-90-03.