

Владимирский государственный университет

БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Учебное пособие



Владимир 2024

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»

БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Учебное пособие

Электронное издание



Владимир 2024

ISBN 978-5-9984-1952-2

© Рожкова А. Н., 2024

УДК 633/635

ББК 41/42

Автор-составитель А. Н. Рожкова

Рецензенты:

Доктор сельскохозяйственных наук, профессор
профессор кафедры земледелия и методики опытного дела
Российского государственного аграрного университета –

МСХА имени К. А. Тимирязева

О. А. Савоськина

Кандидат биологических наук, доцент

доцент кафедры биологии и экологии

Владимирского государственного университета

имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых

Н. В. Чугай

Биотехнологии в сельском хозяйстве [Электронный ресурс] : учеб. пособие / авт.-сост. А. Н. Рожкова ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, 2024. – 148 с. – ISBN 978-5-9984-1952-2. – Электрон. дан. (2,04 Мб). – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Систем. требования: Intel от 1,3 ГГц ; Windows XP/7/8/10 ; Adobe Reader ; дисковод CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.

Описаны основные принципы использования и методы современных биотехнологий, последние достижения в области генетической и клеточной инженерии. Рассмотрены теоретические основы применения методов биотехнологий в сельском хозяйстве и для решения основных экологических, сырьевых и сельскохозяйственных проблем.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлениям подготовки 06.03.02 – Почвоведение, 35.03.03 – Агрохимия и агропочвоведение.

Рекомендовано для формирования профессиональных компетенций в соответствии с ФГОС ВО.

Ил. 15. Табл. 2. Библиогр.: 19 назв.

ISBN 978-5-9984-1952-2

© Рожкова А. Н., 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	7
1.1. Объекты и методы в биотехнологии	10
1.2. Достижения биотехнологии в отраслях народного хозяйства	15
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	23
Глава 2. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	24
2.1. Строение нуклеиновых кислот. Структура ДНК.....	24
2.2. Генетический (биологический) код	26
2.3. Репарация ДНК.....	27
2.4. Репликация ДНК	31
2.5. Транскрипция	36
2.6. Трансляция.....	37
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	39
Глава 3. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	40
3.1. История развития генетической инженерии	40
3.2. Биотехнология рекомбинантных ДНК	42
3.3. Методы секвенирования ДНК	44
3.4. Экспрессия чужеродных генов.....	48
3.5. Использование генетической инженерии в животноводстве	51
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	53
Глава 4. ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	54
4.1. История развития клеточной инженерии	54
4.2. Этапы получения гибридных клеток	56
4.3. Возможности метода слияния клеток.....	57

4.4. Гибридная технология	59
4.5. Клонирование животных.....	66
4.6. Клонирование млекопитающих.....	70
4.7. Методы трансплантации ядер.....	73
4.8. Эмбриотрансферы	74
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	77
Глава 5. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ	78
5.1. Представление о нанотехнологиях	78
5.2. Достижения нанотехнологии в медицине и биологии.....	79
5.3. Направления развития нанобиотехнологии	86
5.4. Риски, связанные с нанобиотехнологиями.....	87
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	89
Глава 6. ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ И ИХ ИММОБИЛИЗАЦИЯ	90
6.1. Значение ферментов и их применение	90
6.2. Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций	95
6.3. Белковая инженерия	96
6.4. Иммуобилизация ферментов	97
6.5. Носители для иммобилизованных ферментов.....	98
6.6. Методы иммобилизации ферментов.....	99
6.7. Применение иммобилизованных ферментов.....	103
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	106
Глава 7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ	107
7.1. Биотехнологические методы в растениеводстве	107
7.2. Технология получения азотных биоудобрений.....	108
7.3. Снабжение растений фосфатами.....	110
7.4. Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений и животных	110
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	116

Глава 8. БИОРЕМЕДИАЦИЯ.....	117
8.1. Понятие биоремедиации, ее принципы	117
8.2. Биоремедиация атмосферы	117
8.3. Биоремедиация почвы	119
8.4. Биоремедиация нефтяных загрязнений	121
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	123
Глава 9. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕТОКСИКАЦИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОЧВ	124
9.1. Почва, ее микрофлора.....	124
9.2. Экологическая оценка состояния почв.....	126
9.3. Микробное выщелачивание и биогeотехнология металлов	127
<i>Вопросы для самоконтроля</i>	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	133
СПИСОК ТЕРМИНОВ И ПОНЯТИЙ.....	135

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных мембранах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения. Современная биотехнология оказывает огромное влияние на все аспекты практической деятельности человека. С ее помощью в настоящее время получают десятки биологически активных веществ (гормоны, ферменты, витамины, антибиотики, стероиды, лекарства). В промышленности используются разнообразные биомолекулы, которые применяются в пищевой промышленности и производстве моющих веществ. Значимым достижением стало создание технологии иммобилизованных ферментов и клеток. Благодаря применению генной инженерии удалось получить жизненно важные биопрепараты – человеческий инсулин, соматотропин, интерфероны, моноклональные антитела, диагностикумы, вакцины.

Важное значение имеет биотехнология в экологии промышленных производств на основе создания безотходных процессов (очистка воды и воздуха, борьба с нефтяными загрязнениями, уничтожение вредителей сельскохозяйственных культур, утилизация отходов, производство бактериальных удобрений и др.). Биотехнологические процессы являются базой для получения кормового и пищевого белка, возобновляемых источников энергии. Будущее связывают с развитием белковой инженерии, биоэлектроники, получением новых стимуляторов роста растений, высокоэффективных лекарственных препаратов, нанобиотехнологиями. Биотехнология многолика и по своим историческим корням, и по своей современной структуре, объединяющей элементы фундаментальных наук и таких прикладных отраслей, как химическая технология, машиностроение и сельское хозяйство. Имеет огромные перспективы развития в разных отраслях народного хозяйства.

В учебном пособии приведены теоретические основы традиционных и новейших технологий, основанных на достижениях в области генетической, клеточной и нанобиотехнологий, а также рассматриваются возможности использования биотехнологий для решения экологических проблем. В каждой теме изучаемой дисциплины предусмотрены контрольные вопросы, в конце приведен терминологический словарь.

Глава 1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ BIOTEХНОЛОГИИ

Впервые термин «биотехнология» был применен венгерским инженером Карлом Эреки в 1917 году для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. Согласно его определению, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».

В настоящее время под термином «биотехнология» (определение предложено Европейской биотехнологической федерацией) понимают науку, которая на основе применения знаний в области микробиологии, биохимии, генетики, геномной инженерии, иммунологии, химической технологии, приборо- и машиностроения использует биотехнологические объекты (микроорганизмы, клетки тканей животных и растений) или молекулы (нуклеиновые кислоты, белки, ферменты, углероды и др.) для промышленного производства полезных для человека и животных веществ и продуктов.



Рис. 1. Возможности использования биотехнологии (Тейлор Д. и др., 2005)

Согласно национальному стандарту Российской Федерации (ГОСТ Р 57095-2016), «Биотехнология» – это применение науки и технологии к живым организмам, как к областям, продуктам и моделям, с целью преобразовать живые или неживые материалы для производства знания, продукции или услуг соответственно.

По определению академика Ю.А. Овчинникова, биотехнология – комплексная, многопрофильная область научно-технического прогресса, включающая разнообразный микробиологический синтез, генетическую и клеточную инженерную энзимологию, использование знаний, условий и последовательности действия белковых ферментов в организме растений, животных и человека, в промышленных реакторах. Возможности использования биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства приведены на рисунке 1.

В 2015 году опубликованы рабочие материалы Евразийской экономической комиссии, в которых они указывают причины стремительного развития биотехнологии, обусловленные рядом ее особенностей:

- биотехнологическое производство является наукоемким производством, а это значит, что его развитие влечет за собой существенное повышение эффективности экономики;

- в сфере биотехнологий трудно разграничить фундаментальные исследования, с одной стороны, и прикладные – с другой. Это находит свое выражение в том, что в биотехнологии практически отсутствует временной разрыв между получением фундаментального результата и разработкой технологий, позволяющих осуществить его практическое освоение;

- технологии, основанные на использовании клеток и биологических молекул, предоставляют большие возможности в использовании природного разнообразия, результаты фундаментальных биотехнологических исследований обладают относительно хорошей программируемостью и потенциальной практической важностью;

- биотехнология обеспечивает возможность замены невозобновляемых ресурсов возобновляемыми, поэтому она расценивается как средство разрешения проблем, связанных с дефицитом невозобновляемых природных ресурсов. Биотехнология формировалась вместе с развитием человеческого общества. В связи с этим этапы развития биотехнологии ученые условно делят на несколько периодов.

В 1984 году на III съезде Европейской ассоциации биотехнологов в Мюнхене голландский ученый Е. Хаувинк предложил разделить историю биотехнологии в зависимости от содержания открытий на пять эр (этапов).

Допастеровская эра (I) (до 1865 года) – использование спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, сыра, хлеба. Получение ферментированных продуктов и уксуса.

Послепастеровская эра (II) (1866–1940 гг.) – производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, органических кислот, вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей из углеводов.

Эра антибиотиков (III) (1941–1960 гг.) – производство пенициллина и других антибиотиков путем глубоинной ферментации. Культивирование растительных клеток и вирусных вакцин.

Эра управляемого биосинтеза (IV) (1961–1975 гг.) – производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение чистых ферментов. Анаэробная очистка сточных вод.

Эра новой биотехнологии (V) (после 1975 года) – использование генной и клеточной инженерии в целях получения агентов биосинтеза, получение гибридов, моноклональных антител, трансплантация эмбрионов. Достижения ученых в разрезе этапов развития биотехнологии приведены в приложении.

Некоторые ученые возникновения, становление и развитие биотехнологии подразделяют на четыре периода:

Эмпирический (доисторический) (I) – охватывает примерно 8 000 лет, из которых более 6 000 лет до н. э. и около 2 000 лет н. э. Для этого периода характерно так же, как и для допастеровской эры, получение кисломолочных продуктов, квашеных овощей, медовых алкогольных напитков и силосование кормов.

Этиологический (II) – включает вторую половину XIX века и первую треть XX века. Тесно связан с исследованиями Луи Пастера, который установил и доказал микробную природу брожения, создал научные основы вакцинопрофилактики.

Биотехнологический (III) (1933–1972 гг.) – начало внедрения крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях.

Геннотехнический (IV) – с 1972 года, когда П. Берг создал первую рекомбинантную молекулу ДНК (Тихонов В.И. и др., 2005).

Достижения биотехнологии применяются во многих отраслях:

– сельское хозяйство – разработка трансгенных агрокультур, получение трансгенных животных, разработка бактериальных удобрений, биологических средств защиты растений, создание кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельскохозяйственного производства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

– медицина и ветеринария – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии;

– промышленность (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) – использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами;

– экология – повышение эффективности защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, ликвидация аварий нефти, конструирование экосистем;

– энергетика – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза, биоконверсии биомассы в биогаз (Егорова Т.А. и др., 2008).

1.1. Объекты и методы в биотехнологии

Одним из терминов в биотехнологии является понятие «биосистемы». Обобщенные характеристики биологической (живой) системы могут быть сведены к трем присущим им основным признакам:

1. Живые системы являются гетерогенными открытыми системами, которые обмениваются с окружающей средой веществами и энергией.

2. Эти системы являются самоуправляемыми, саморегулирующимися, и активными, т. е. способными к обмену информацией с окружающей средой для поддержания своей структуры и управления процессами метаболизма.

3. Живые системы являются самовоспроизводящимися (клетки, организмы). По структуре биосистемы делятся на элементы (подсистемы), связанные между собой, и характеризуются сложной организацией: атомы, молекулы, органеллы, клетки, организмы, популяции, сообщества.

В качестве биологических объектов или систем в биотехнологии используют одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор этих объектов обусловлен следующими причинами:

1. Клетки являются своего рода биофабриками, вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты: белки, жиры, углеводы, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр. Многие из этих продуктов, необходимые в жизни человека, пока недоступны для получения небиотехнологическими способами из-за дефицитности, высокой стоимости сырья, сложности технологических процессов.

2. Клетки быстро воспроизводятся, например, при благоприятных условиях время генерации многих микроорганизмов колеблется от 20 до 30 минут, в проточной среде бактериальные клетки способны делиться каждые 15–18 минут.

3. Биосинтез сложных веществ, таких как белки, антибиотики, антигены, антитела и другие, значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез. При этом исходное сырье для биосинтеза, как правило, дешевле и доступнее, чем сырье для других видов синтеза.

Возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т. е. наличие соответствующего технологического оборудования, доступность сырья, технологии переработки. Таким образом, природа дала в руки исследователям живую систему, содержащую и синтезирующую уникальные компоненты. Объектами биотехнологии являются вирусы, бактерии, водоросли, лишайники, грибы, водные растения, высшие растения *in vivo* и *in vitro*, животные *in vivo* и *in vitro*. Методы, применяемые в биотехнологии, определяются двумя уровнями – клеточным и молекулярным. В первом случае имеют дело с бактериальными клетками (для получения вакцинных

препаратов), актиномицетами (при получении антибиотиков), микромицетами (при получении лимонной кислоты), животными клетками (при изготовлении противовирусных вакцин), клетками человека (при изготовлении интерферона) и др. Во втором случае имеют дело с молекулами, например, с нуклеиновыми кислотами. Однако в конечной стадии молекулярный уровень трансформируется в клеточный.

Клеточная и генная инженерия являются основными методами биотехнологии. Клетки животных и растений, микробные клетки в процессе жизнедеятельности (ассимиляции и диссимиляции) образуют новые продукты и выделяют метаболиты разнообразного физикохимического состава и биологического действия. При росте клетки в ней осуществляется огромное число катализируемых ферментами реакций, в результате которых образуются промежуточные соединения, которые в свою очередь превращаются в структуры клетки. К промежуточным соединениям относятся 20 аминокислот, 4 рибонуклеотида, 4 дезоксирибонуклеотида, 10 витаминов, моносахара, жирные кислоты, гексозамины. Из этих кирпичиков строятся блоки: примерно 2 000 белков, ДНК, три типа РНК, полисахариды, липиды, ферменты. Образующиеся блоки идут на строительство клеточных структур: ядро, рибосомы, мембрану, клеточную стенку, митохондрии, лизосомы и др., из которых состоит клетка (табл. 1).

Таблица 1 – Схема прохождения биологического синтеза клетки и продукты синтеза, используемые в биотехнологии (Тихонов И.В., 2005)

Стадия биосинтеза клетки	Продукты, используемые в биотехнологии
I. Синтез аминокислот, моносахаров, жирных кислот, нуклеотидов, витаминов	Первичные метаболиты (кирпичики)
II. Синтез белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов, их комплексов	Макромолекулы (блоки)
III. Образование ферментов, гормонов, антибиотиков, токсинов, антигенов, антител	Вторичные метаболиты (блоки)
IV. Образование структур клетки (ядро, рибосомы, клеточная стенка, митохондрии, жгутики и т. д.)	Структура клетки (элементы)
V. Формирование клетки	Клетка (цельная система)

На каждой стадии биологического синтеза клетки можно определить те продукты, которые могут быть использованы в биотехнологии. Обычно их делят на четыре категории.

Первая категория – сами клетки как источник целевого продукта, например, выращенные бактерии или вирусы используют для получения живой или убитой корпускулярной вакцины; дрожжи как кормовой белок или основу для получения гидролизатов питательных сред и т. д.

Вторая категория – крупные молекулы, которые синтезируются клетками в процессе выращивания: ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.

Третья категория – первичные метаболиты – низкомолекулярные вещества (менее 1 500 дальтон (равная 1/12 массы атома углерода (12С), или $1,661 \cdot 10^{-24}$ граммов), необходимые для роста клеток, такие как аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты.

Четвертая категория – вторичные метаболиты (идиолиты) – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста клеток: антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны. Биотехнология использует эту продукцию клеток как сырье, которое в результате технологической обработки превращается в конечный, пригодный для использования продукт.

Все микрообъекты, используемые в биотехнологии, относят к акариотам, про- или к эукариотам. Из группы акариот, например, оперируют вирусами, прокариот-клетками синезеленых водорослей и бактерий, эукариот-клетками простейших, водорослей и грибов. Биообъекты из микромира варьируют в размерах от нанометров (вирусы, бактериофаги) до миллиметров и сантиметров (гигантские водоросли) и характеризуются относительно быстрым темпом размножения.

Как наиболее перспективные следует выделить следующие группы биологических объектов:

- рекомбинанты, т. е. организмы, полученные методами генетической инженерии;
- растительные и животные тканевые клетки;
- термофильные микроорганизмы и ферменты;
- анаэробные организмы;
- ассоциации для превращения сложных субстратов;

– иммобилизованные биологические объекты. Процесс искусственного создания биологического объекта (микроорганизма, или тканевой клетки) состоит в изменении его генетической информации с целью исключения нежелательных и усиления нужных свойств или придать ему совершенно новые качества.

Наиболее целенаправленные изменения можно выполнить путем рекомбинаций – перераспределяя гены или части генов и объединяя в одном организме генетическую информацию от двух и более организмов. Получение рекомбинантных организмов можно осуществить методом слияния протопластов, путем переноса природных плазмид и методами генной инженерии. К нетрадиционным биологическим агентам на данном этапе развития биотехнологии относятся растительные и животные тканевые клетки, в том числе гибридомы, трансплантаты. Культуры клеток млекопитающих уже сейчас являются продуцентами интерферона и вирусных вакцин, осуществляется крупномасштабное получение моноклональных антител, поверхностных антигенов клеток человека, ангиогенных факторов. С развитием методов биотехнологии все большее внимание будет уделяться использованию термофильных микроорганизмов и их ферментов.

В связи с недостатком энергии и возможностью получения биогаза наблюдается возрождение биотехнологических процессов с использованием анаэробных микроорганизмов, которые успешно используются для переработки отходов и стоков. В последние годы расширяется применение смешанных культур микроорганизмов и их природных ассоциаций.

В реальной биологической ситуации в природе микроорганизмы существуют в виде сообществ различных популяций, тесно связанных между собой и осуществляющих круговорот веществ в природе. Основные преимущества смешанных культур по сравнению с монокультурами следующие:

- способность утилизировать сложные, неоднородные по составу субстраты, зачастую непригодные для монокультур;
- способность к минерализации сложных органических соединений;
- повышенная способность к биотрансформации органических веществ;

- повышенная устойчивость к токсичным веществам, в том числе тяжелым металлам;
- повышенная устойчивость к воздействию окружающей среды;
- повышенная продуктивность;
- возможный обмен генетической информацией между отдельными видами сообщества.

Следует особо выделить такую группу биологических объектов, как ферменты-катализаторы биологического происхождения, изучением которых в прикладном аспекте занимается инженерная энзимология. Основная ее задача – разработка биотехнологических процессов, в которых используется каталитическое действие энзимов, как правило, выделенных из состава биологических систем или находящихся внутри клеток, искусственно лишенных способности роста. Благодаря ферментам скорость реакций по сравнению с реакциями, протекающими в отсутствие этих катализаторов, возрастает в 10^6 – 10^{12} раз.

Таким образом, в биотехнологических процессах возможно использование ряда биологических объектов, характеризующихся различными уровнями сложности биологической регуляции, например, клеточным, субклеточным, молекулярным. От особенностей конкретного биологического объекта зависит подход к созданию всей биотехнологической системы в целом. В результате фундаментальных биологических исследований углубляются и расширяются знания о природе и тем самым о возможностях прикладного использования той или иной биологической системы в качестве активного начала биотехнологического процесса.

1.2. Достижения биотехнологии в отраслях народного хозяйства

Достижения биотехнологии в животноводстве

Генетическое совершенствование популяций сельскохозяйственных животных было и остается ключевой задачей животноводства, от решения которой зависит уровень его интенсификации, увеличение производства продуктов питания и обеспечение продовольственной безопасности страны. В основе системы крупномасштабной селекции животных, которая определяла и определяет темпы генетического

улучшения животноводства, лежат принципы популяционной генетики, система ускорения репродукции животных с использованием методов искусственного осеменения, криоконсервации гамет и эмбрионов, эмбриотрансфертов. Вместе с тем достижения и огромный объем исследований в области молекулярной биологии открыли новые перспективы в совершенствовании животноводства. Главными направлениями биотехнологии в животноводстве являются клеточная и генетическая инженерия.

К успехам клеточной инженерии следует отнести разработку метода трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных. В настоящее время этот метод широко используется в практике продуктивного и непродуктивного животноводства.

С развитием искусственного осеменения была решена проблема ускорения распространения генетического потенциала мужских особей, что позволило на порядок повысить темпы селекционной работы. В результате за короткий период были созданы новые породы, внутрипородные типы. Была поставлена и решена проблема дозревания ооцитов, оплодотворения и раннего эмбрионального развития сельскохозяйственных животных *in vitro*. Это позволило использовать значительное число женских генеративных клеток от животных с ценным генотипом уже после того, когда данные особи уже закончили жизненный цикл. Кроме того, реализация данного метода способствовала получению идентичных по генотипу пар животных, которые широко используются в исследованиях влияния факторов внешней среды на животный организм. Являясь идеальными аналогами, эти особи позволяют повысить достоверность исследований при меньшем числе животных в группах.

Микроманипуляции с эмбрионами, их разделение и агрегация позволяют получить химерных сельскохозяйственных животных (аллофенных животных). Они не представляют интереса для селекционеров, но являются объектами для изучения фундаментальных проблем дифференцировки клеток в процессе онтогенеза, многих вопросов механизма клеточного развития и происхождения отдельных тканей, иммунологического взаимодействия в развитии и др. Перспективным является клонирование животных.

Одним из направлений по клонированию животных является применение метода введения ядра соматической клетки в энуклеированную зиготу. С применением этой методики стало возможным создавать стада стандартизированных высокопродуктивных животных. Важнейшим аспектом исследований в области клеточной инженерии являются работы по созданию линий стволовых тотипотентных клеток животных.

Существенным достижением биотехнологии в животноводстве является использование стимуляторов, полученных трансгенными микробами-продуцентами, например, технология производства бычьего и свиного соматотропинов. Важнейшим направлением биотехнологии в сельском хозяйстве является конструирование генов и интеграция их в геном. Одним из направлений исследований является получение трансгенных животных. Получены трансгенные мыши, которые могут служить модельными системами для изучения болезней человека и тест-системами для исследования возможности синтеза продуктов, представляющих интерес для медицины. Такими болезнями являются, например, болезнь Альцгеймера, артрит, мышечная дистрофия, образование опухолей, гипертония, дистрофия эндокринных желез. Трансгенных мышей использовали в качестве модельных систем для изучения экспрессии генов, кодирующих трансгенные продукты, которые секретируются в молоко. В России получены кролики, выделяющие γ -интерферон, эритропоэтин.

Трансгенный крупный рогатый скот получают с целью изменения содержания в молоке различных компонентов и создания устойчивых к заболеваниям животных. Опыты по трансгенозу овец и коз в основном направлены на превращение молочных желез этих животных в своеобразные биореакторы для получения белковых продуктов, используемых в медицине. Созданы трансгенные овцы и козы, в молоко которых секретировались белки человека, например, в Англии созданы трансгенные овцы, молоко которых содержит фактор свертывания крови. Были созданы трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти. Положительные результаты были получены в ходе экспериментов с трансгенными свиньями.

Например, созданы трансгенные свиньи, в геноме которых присутствовала следующая генетическая конструкция: регуляторная область гена β -глобина человека, два гена $\alpha 1$ -глобина человека и один

ген β A -глобина человека. В результате ее экспрессии в клетках крови свиней синтезировался человеческий гемоглобин. Человеческий гемоглобин, продуцируемый трансгенными свиньями, обладал такими же химическими свойствами, что и природный человеческий. Его можно очистить от гемоглобина свиней обычной хроматографией. Получены трансгенные цыплята, которых можно использовать для улучшения генотипа уже существующих пород, – для придания им устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызываемым кокцидиями, повышения эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в яйцах, повышения качества мяса. По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рыбы в искусственных условиях. Основная цель исследований в этой области – создание рекомбинантных рыб путем трансгеноза.

Первыми общедоступными генетически модифицированными домашними животными стали аквариумные рыбки данио. Первая генетически модифицированная рыбка GloFish появилась на рынке в 2003 году. Отличительной чертой искусственно выведенных генетической модификацией особей GloFish от исходной формы является красная окраска (ДНК коралла (ген RFP)), зеленая – с фрагментом ДНК медузы (ген GFP), рыбки, в генотипе которых присутствуют оба фрагмента, – желтые. Окраски более заметны и интенсивны при ультрафиолетовом освещении.

Достижение биотехнологии в растениеводстве

Основной целью биотехнологических экспериментов на растениях является создание новых сортов культурных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды, насекомым-вредителям, гербицидам, вирусам и бактериям. Биотехнологические пути защиты растений от вредоносных агентов включают: – выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; – химические средства борьбы с сорняками, грызунами, нематодами, бактериями и вирусами; – биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой ценности, создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах.

Применение классических методов селекции не могут решить эти задачи, поэтому применяют методы генетической инженерии. Гены устойчивости к некоторым гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, были успешно перенесены в растения табака. Разведение устойчивых к гербицидам растений открывает возможность применения гербицидов для уничтожения сорняков непосредственно на угодьях, занятых сельскохозяйственными культурами.

С помощью генетической инженерии американские и английские генетики в 1994 году создали томаты *Flavr Savr* с замедленным процессом созревания. Такие плоды долго могут оставаться на растении, при этом повышается урожайность и улучшаются вкусовые качества плодов. Впервые такие томаты поступили в продажу в США в 1995 году, а в Великобритании – в 1996 году.

Важное место в выведении новых сортов растений занимает метод культивирования *in vitro*. Регенерируемая из таких клеток «молодая поросль» состоит из идентичных по генофонду экземпляров, сохраняющих ценные качества избранного клеточного клона. Например, в Австралии из культивируемых *in vitro* клеточных клонов выращивают красные камедные деревья (австралийские эвкалипты), отличающиеся способностью расти на засоленных почвах. Предполагается, что корни этих растений будут выкачивать воду из таких почв и тем самым понижать уровень грунтовых вод. Это приведет к снижению засоленных слоев почвы в результате переноса минеральных солей в более глубокие слои с потоками дождевой воды.

В Малайзии из клеточного клона получена масличная пальма с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и увеличенной способностью к образованию масла (прирост на 20–30%). Клонирование клеток с последующим их скринингом и регенерацией растений из отобранных клонов рассматривают как важный метод сохранения и улучшения древесных пород умеренных широт, в частности хвойных деревьев.

В России первые работы по клональному микроразмножению были проведены в 60-х годах XX века в лаборатории Р.Г. Бутенко (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева).

С клонированием клеток связаны надежды на устранение вирусных заболеваний растений. Разработаны методы, позволяющие получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений. В дальнейшем среди регенерированных растений проводят отбор особей, выращенных из незараженных клеток, и выбраковку больных растений.

Растения-регенеранты получают в результате морфогенеза *in vitro*. К растениям, относительно легко регенерирующим из протопластов, относятся картофель, люцерна, маниок, рапс, табак и др. Клонирование клеток является перспективным методом получения не только новых сортов растений, но и промышленно важных продуктов. При правильном подборе условий культивирования изолированные клетки более продуктивны, чем целые растения. Иммуобилизация растительных клеток или протопластов нередко ведет к повышению их синтетической активности.

Таким образом, в настоящее время клеточная биотехнология имеет в своем распоряжении ряд методов, основными из которых, помимо культивирования клеток и тканей отдельных растений, являются:

- 1) методы клонального микроразмножения, включающие индукцию органогенеза и соматического эмбриогенеза;
- 2) методы изолирования протопластов и получения соматических гибридов;
- 3) методы получения гаплоидных растений и производных от них дигаплоидов;
- 4) методы генетической трансформации с последующей регенерацией модифицированных растений.

Достижения биотехнологии в медицине

Генетическая и клеточная инженерия оказала большое влияние и на развитие современной ветеринарной науки, в частности в направлении создания нового поколения биологических препаратов, разработки методов диагностики и средств специфической профилактики

инфекционных болезней животных. При этом на первый план выдвигается разработка высокочувствительных и высокоспецифичных методов диагностики, в том числе экспресс-методов на основе достижений в физикохимической биологии, технологии рекомбинантных ДНК, гибридной технологии. В последнее время широкое распространение получил иммуноферментный метод индикации различных веществ. На его основе разрабатываются высокочувствительные диагностикумы для ряда инфекционных и инвазионных болезней животных. Освоено производство иммуноферментного диагностикума вирусного энтерита телят, изготовлены опытно-промышленные партии компонентов для иммуноферментной диагностики ряда других заболеваний. На основе созданной рекомбинантной плазмиды разработан и испытан на большом клиническом материале гибридизационный зонд для идентификации возбудителя микоплазмоза свиней. Получена рекомбинантная плазида, разработан и испытан гибридизационный зонд для идентификации возбудителей туберкулеза паравирусной инфекции свиней, герпес вируса, а также для идентификации микоплазменной контаминации клеточных культур. Метод цепной полимеризации (ПЦР) позволяет амплифицировать любую нуклеотидную последовательность. Он высокочувствителен и специфичен, может широко использоваться как исследовательский тест для идентификации различных агентов, в том числе для выявления ретровирусов. С помощью гибридной технологии получены гибридные культуры, продуцирующие моноклональные антитела к вирусам ящура, лейкоза крупного рогатого скота, ринопневмонии лошадей, классической и африканской чумы свиней, бруцеллам, микобактериям, листериям, антигенам эхинококка и т. д.

На их основе разработаны различные диагностические тест-системы. Применение биотехнологических методов позволяет получать вакцины, которые не могли быть созданы с помощью традиционных методов, против гельминтозов, болезней, вызываемых простейшими, риккетсиями, некоторыми бактериями и вирусами. Наиболее значительным достижением в этой области является производство нерепликативных вакцин, в которых используется лишь фрагмент вируса, имитирующий его иммуногенный участок. Большое внимание уделяется исследованиям, в которых генам чужого вектора вводится ген, кодирующий иммуногенную фракцию паразита, бактерии или вируса.

Такие вакцины предусматриваются для вакцинации против гельминтов (шистозомы), протозойных (бабезнозы), вирусных (бешенство, чума крупного рогатого скота) болезней. С помощью биотехнологии получены антибиотики, гормоны, интерфероны, интерлейкины, моноклональные антитела, ДНК или РНК-пробы, рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены, ферменты медицинского назначения. Большие перспективы в лечении наследственных заболеваний человека открывает генетическая терапия (генотерапия). Она позволяет устранить генетические дефекты (коррекция наследственных патологий) путем введения в соматические клетки полноценных генов вместо (или помимо) поврежденного (мутантного гена), а также лечить различные заболевания за счет введения в организм чужеродной генетической информации с целью получения терапевтического эффекта. Применяют два типа терапии: заместительную (заключается во вводе в клетку неповрежденного гена, когда болезнь связана с отсутствием или малым количеством белкового продукта. В клетку вводится неповрежденный ген и создаются условия для его экспрессии с целью получения необходимого количества нормального белка-продукта. Внешенная копия заменяет по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген) и корректирующую (предполагает замену дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Этот метод проходит стадию лабораторных испытаний). В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента существует два принципа лечения: генетическая терапия *ex vivo* («терапевтический» ген переносится в изолированные клетки больного с помощью ретровирусных векторов, трансдуцированные клетки культивируют *in vitro* и снова вводят в организм пациента) и генетическая терапия *in vivo* (предусматривает введение «терапевтического» гена непосредственно в клетки ткани-мишени пациента с помощью вирусных векторов или путем инъекции чистой ДНК, биобаллистики, введения липосом).

Список наследственных заболеваний, которые можно лечить генами, регулярно пополняется. Большие перспективы открывает использование генотерапии для лечения онкологических заболеваний. Таким образом, в будущем генетическая терапия может стать одним из ведущих направлений в лечении наследственной патологии человека в связи с возможностью исправить функции генетического аппарата пациента и нормализовать его фенотип. Биотехнология обладает

громадным потенциалом. Все ее направления должны служить человечеству. В современных условиях открываются широкие перспективы и возможности для использования новых научных исследований и разработок, которые могут решить проблемы современного общества. Таким образом, мы ознакомились с этапами развития биотехнологии, методами и приемами, рассмотрели перспективы использования биотехнологии в народном хозяйстве.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите этапы развития биотехнологии.
2. Назовите основные цели и задачи биотехнологии.
3. Назовите объекты и методы биотехнологии.
4. Расскажите о достижениях современной биотехнологии в животноводстве.
5. Расскажите о достижениях современной биотехнологии в растениеводстве.

Глава 2. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

2.1. Строение нуклеиновых кислот. Структура ДНК

Впервые о нуклеиновых кислотах сообщил Фридрих Мишер в 1869 году, а в 1944 году Освальд Теодор Эвери с сотрудниками доказал, что именно молекула ДНК является хранителем наследственной информации.

Различают два вида нуклеиновых кислот – дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК). Нуклеиновые кислоты являются макромолекулами, т. е. отличаются большой молекулярной массой. Они состоят из мономеров – нуклеотидов (пентозный сахар – дезоксирибоза или рибоза; азотистые основания – пуриновые – аденин и гуанин, пиримидиновые – тимин и цитозин; остаток фосфорной кислоты) (рис. 2).

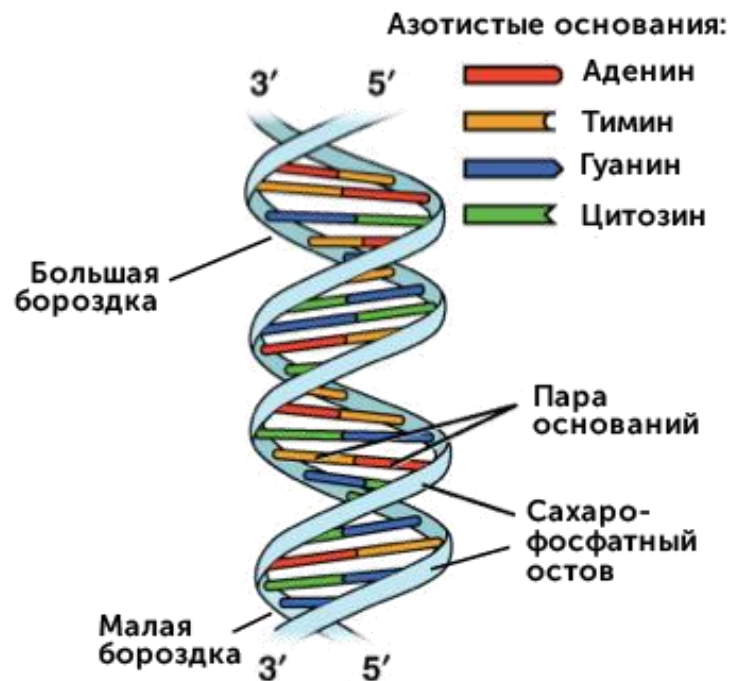


Рис. 2. Структура ДНК

Количество комплементарных оснований $A + T$ и $G + C$ у разных видов живых организмов различно. Отношение $\Sigma (G + C) / \Sigma (A + T)$ является важнейшей характеристикой ДНК, как показатель специфичности ее нуклеотидного состава. Коэффициент специфичности у ДНК

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

Соединение нуклеотидов в макромолекулу нуклеиновой кислоты происходит путем взаимодействия фосфата одного нуклеотида с гидроксидом другого так, что между ними устанавливается фосфодиэфирная связь. Различают первичную, вторичную и третичную структуру ДНК. Первичная структура ДНК представляет собой последовательность нуклеотидов, образующуюся благодаря сложноэфирной связи, возникающей между остатком фосфорной кислоты у одного мононуклеотида и с 3' углеродом дезоксирибозы другого мононуклеотида. Вторичная структура ДНК – спирализация двух полинуклеотидных цепей с образованием двойной спирали. Третичная структура ДНК представляет собой организацию ее молекулы в хроматиновые волокна в ядрах клеток тканей организма.

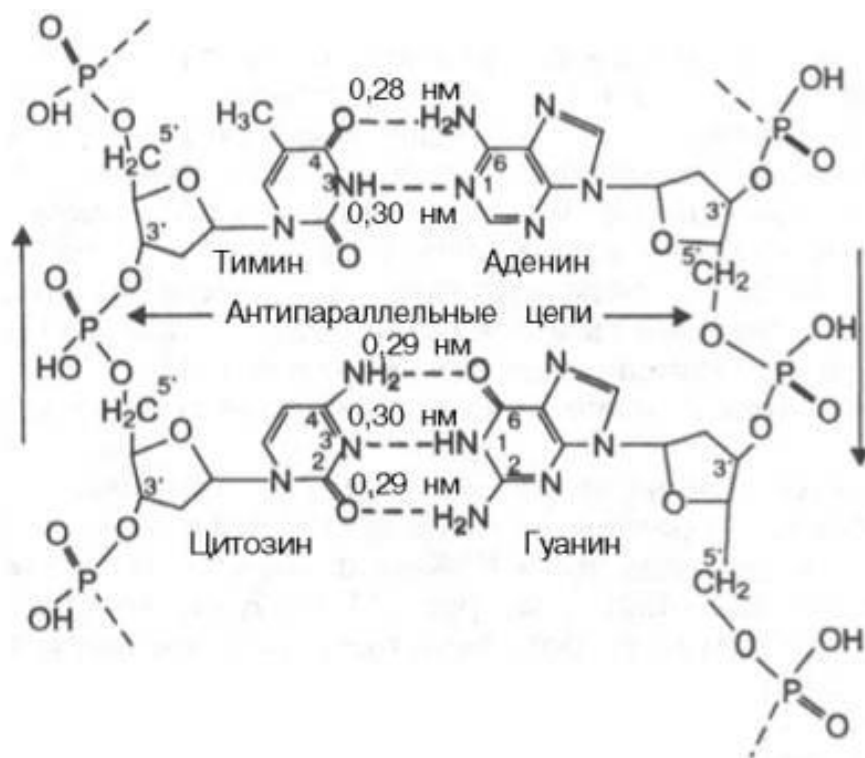


Рис.3. Принцип комплементарности

Обобщив данные рентгеноструктурного анализа, в 1953 г. американский биофизик Дж. Уотсон и английский биофизик и генетик Ф. Крик построили и описали молекулярную модель ДНК. На основании модели они предположили, что гены отличаются друг от друга чередованием пар нуклеотидов, и наследственная информация закодирована

в виде последовательности нуклеотидов. Воспроизведение генов заложено в структуре ДНК – в комплементарности ее оснований и заключается в разъединении комплементарных цепей и последующей достройке новых, комплементарных цепей из нуклеотидов клетки.

2.2. Генетический (биологический) код

Теоретические работы, в которых рассматривались возможные варианты структуры генетического кода, стали появляться вскоре после опубликования в 1953 г. статьи Дж. Уотсона и Ф. Крика, посвященной описанию структуры ДНК.

В 1954 году Г. Гамовым было высказано предположение, что кодирование информации в молекулах ДНК должно осуществляться сочетанием нескольких нуклеотидов. Было обнаружено 20 аминокислот. Для шифровки такого их числа достаточное количество сочетаний нуклеотидов может обеспечить лишь триплетный код, в котором каждая аминокислота шифруется тремя стоящими рядом нуклеотидами. В этом случае из четырех нуклеотидов образуется $4^3 = 64$ триплета. Из 64 возможных триплетов мРНК кодирует различные аминокислоты, оставшиеся 3 (УАА, УАГ, УГА) получили название терминирующих, или стоп-триплетов. Полная расшифровка кода проведена в 60-е годы XX века.

В 1968 году Маршалл Ниренберг, Хар Гобинд Корана, Роберт Уильям Холли за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков стали лауреатами Нобелевской премии по физиологии и медицине. Наблюдается явная *избыточность* кода, проявляющаяся в том, что многие аминокислоты шифруются несколькими триплетами, это свойство кода названо вырожденностью. Это свойство имеет важное значение, так как возникновение в структуре молекулы ДНК изменений по типу замены одного нуклеотида в цепи может не изменить смысла триплета. Возникшее таким образом новое сочетание из трех нуклеотидов кодирует ту же самую аминокислоту. Различные триплеты для одной и той же аминокислоты называют триплетами-синонимами.

В процессе изучения свойств кода была обнаружена его *специфичность*. Каждый триплет способен кодировать только одну определен-

ную аминокислоту. Было выявлено полное соответствие кода у различных видов живых организмов, такая универсальность свидетельствует о единстве происхождения.

Важным свойством является *неперекрываемость* кода – способность каждого нуклеотида мРНК входить в состав всего лишь одного информационного триплета.

Непрерывность кода связана с тем, что между линейно расположенными триплетами, составляющими одну группу считывания информации в молекулах нуклеиновых кислот, отсутствуют какие-либо физические интервалы, способные прервать процесс считывания.

Триплетность – единица кодирования, представляет собой тройку нуклеотидов (триплет), которая определяет место соответствующей аминокислоты в полипептидной цепочке. Успехи в изучении генетического кода и связанного с ним процесса биосинтеза послужили основой для создания нового направления современной генетики – теории генетической информации.

2.3. Репарация ДНК

Стабильность генетического материала связана с системой репарации, которая устраняет из ДНК возникшие в ней повреждения. Явление репарации было открыто в 1958 году В.И. Корогодиным у диплоидных дрожжей. Повреждения ДНК, возникающие при действии повреждающих агентов, в результате приводят к нарушению Уотсон-Криковской структуры, что выражается в локальной денатурации молекулы и приводит к частичному или полному блокированию репликации.

В настоящее время выявлено три основных механизма репарации ДНК:

1. Фотореактивация.
2. Эксцизионная.
3. Пострепликативная.

Фотореактивация заключается в восстановлении биологической активности клеток или молекул ДНК, поврежденных ультрафиолетовым излучением в результате последующего воздействия видимого света. Фотореактивация при действии видимого света (300–400 нМ) была обнаружена в 1949 году в нескольких лабораториях. Механизм

был раскрыт в начале 60-х годов, когда К. Рупертом был выделен фермент дезоксирибопиримидинфотолиаза. Экстракты дрожжей оказались способными восстанавливать трансформирующую активность ДНК *Haemophilus influenzae* на свету. Субстратом фермента фотореактивации служат димеры пиримидиновых оснований, с которыми он образует комплекс в темноте (с неповрежденной ДНК фермент не связывается). На свету комплекс распадается, при этом происходит мономеризация димеров. В клетке эукариот фермент локализован в ядре, у прокариот – в непосредственной близости к нуклеоиду. Этот фермент не обнаруживается в безнуклеотидных миниклетках, которые образуют некоторые мутанты *E. coli*. Известен мутант *r-hr E. coli*, у которого блокирована фотореактивация. При облучении в видимом свете у этого мутанта не исчезают тиминовые димеры из ДНК. Фермент фотореактивации широко распространен, обнаружен даже у примитивных микроорганизмов (микоплазма).

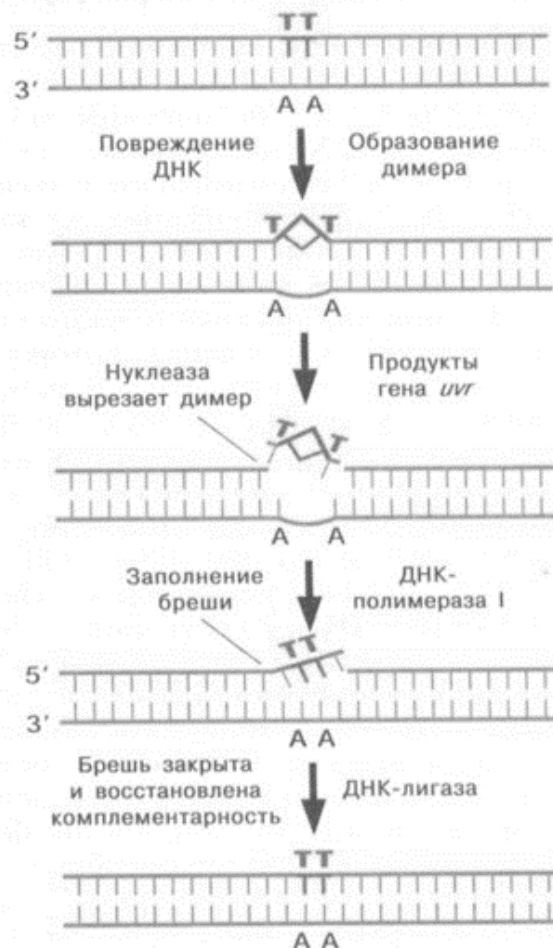


Рис. 4. Эксцизионная репарация нуклеотидов

Эксцизионная репарация – т. е. связанная с удалением поврежденного участка ДНК, называется также репарацией по типу выщепление – замещение. Она не столь специфична в отношении поврежденной ДНК, как фотореактивация.

Эксцизионная репарация представляет собой многоэтапный процесс и заключается в следующем:

1. «Узнавание» димера.
2. Надрезание одной цепи ДНК вблизи димера – инцизии.
3. Удаление димера – эксцизии.
4. Ресинтез ДНК.
5. Восстановление непрерывности репарируемой цепи за счет образования ковалентных связей сахарофосфатного скелета молекулы (рисунок 5).

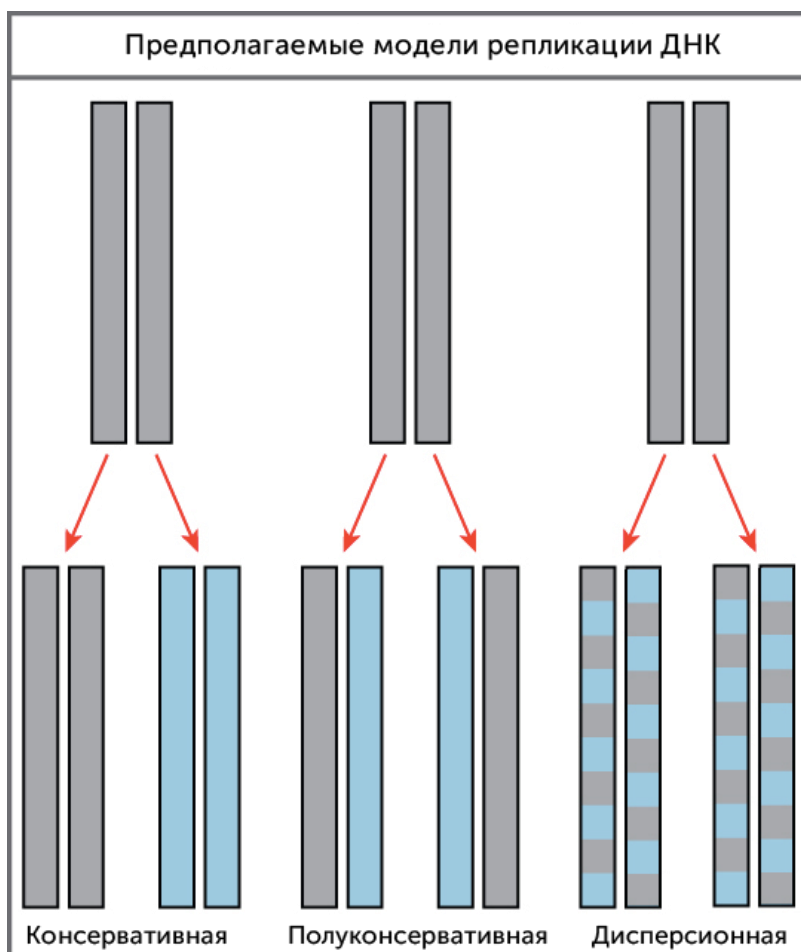


Рис. 5. Способы репликации ДНК

Узнавание повреждения в ДНК осуществляет фермент УФ-эндонуклеаза. Она ответственна и за инцизию, т. е. надрезание одной цепи ДНК непосредственно около димера с 5' -конца в поврежденной цепи. Эксперименты *in vitro* с облученной ДНК показали, что число однонитевых разрывов оказывается равным числу димеров в молекуле.

Эксцизию (вырезание димера) осуществляет другая нуклеаза. Димер удаляется в составе короткого олигонуклеотида (3–5 оснований), что может сопровождаться дальнейшей деградацией поврежденной спирали.

Деградацию ДНК осуществляет АТФ-зависимая ДНКаза. В результате эксцизии и дальнейшей деградации ДНК образуются однонитевые бреши.

Ресинтез ДНК, в результате которого заполняются бреши (пробелы), идет с использованием в качестве матрицы интактной цепи. Последний этап восстановления идет с помощью фермента ДНК-лигазы. Различные варианты эксцизионной репарации широко распространены у про- и эукариотических организмов. Она обнаружена у простейших, в культуре клеток млекопитающих. Нарушение процессов репарации ДНК обнаружено у людей, пораженных наследственными заболеваниями – пигментной ксеродермой. Известно несколько типов этой болезни: ХРІ, ХРІІ, ХРvar, общими симптомами которой служат повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи. Культура клеток ХРІ чувствительна к ультрафиолетовому свету, но не к ионизирующему излучению. У этих больных дефект эксцизионной репарации связан с отсутствием активности УФ-эндонуклеазы. В культуре клеток здоровых людей после облучения ультрафиолетовым светом в дозе 10 Дж/м² через 20 часов из ДНК исчезает до 90% тиминовых димеров, в то время как в клетках больных ХРІ димеры вообще не удаляются из ДНК. Тип ХРІІ чувствителен как к ультрафиолетовому, так и рентгеновскому излучениям. Клетки ХРІІ не способны репарировать ДНК, имеющую однонитевые разрывы. В клетках больных ХРvar выщепление димеров идет нормально, а дефект связан с иным типом репарации – пострепликативной.

Таким образом, биологический смысл эксцизионной репарации состоит в том, чтобы предупредить закрепление у потомства мутаций и последующее размножение измененных форм.

Пострепликативная репарация – это быстрый способ восстановления нативной структуры, по крайней мере части дочерних ДНК. При этом тиминовые димеры остаются в исходных родительских нитях. Эта репарация происходит уже в первые минуты после облучения. Существует медленная пострепликативная репарация, для осуществления которой требуется несколько часов. Ее проводит система ферментов, которых нет в необлученных клетках, и которая индуцирует облучение. Этот механизм называется SOS-репарация. Его характерная черта – неточность восстановления первичной структуры ДНК, в связи с чем он получил также название репарации, склонной к ошибкам. При этом возможен репаративный синтез ДНК в обход тиминовых димеров или, точнее, за счет использования в качестве матрицы цепи ДНК, содержащей димеры. Если в клетке, несмотря на осуществленную репарацию, количество повреждений и структуры ДНК остается высоким, в ней блокируются процессы репликации ДНК. Такая клетка не делится.

2.4. Репликация ДНК

Во время деления клеток генетическая информация должна перейти в дочерние клетки. Для достижения этого вся ДНК клетки копируется в процессе репликации во время S-фазы (синтетический период) клеточного цикла, при этом каждая ее цепь служит матрицей для синтеза комплементарной последовательности. В результате из одной двойной спирали ДНК образуются две идентичные двойные спирали. Такой способ удвоения молекулы ДНК называется полуконсервативным. Этот способ репликации подтвердили в 1957 году Мэтью Мезельсон и Франклин Сталь, проведя опыт на клетках бактерий.

Гюнтер Зигмунд Стент предложил рассматривать три способа репликации ДНК:

1. Консервативный, при котором новые молекулы не содержат материалов родительской ДНК.
2. Полуконсервативный.
3. Дисперсный, когда материал исходной молекулы случайно распределяется в обеих дочерних молекулах (рис. 6).

Эксперимент М. Мезельсона и Ф. Сталя позволил сделать выбор между этими тремя вариантами.

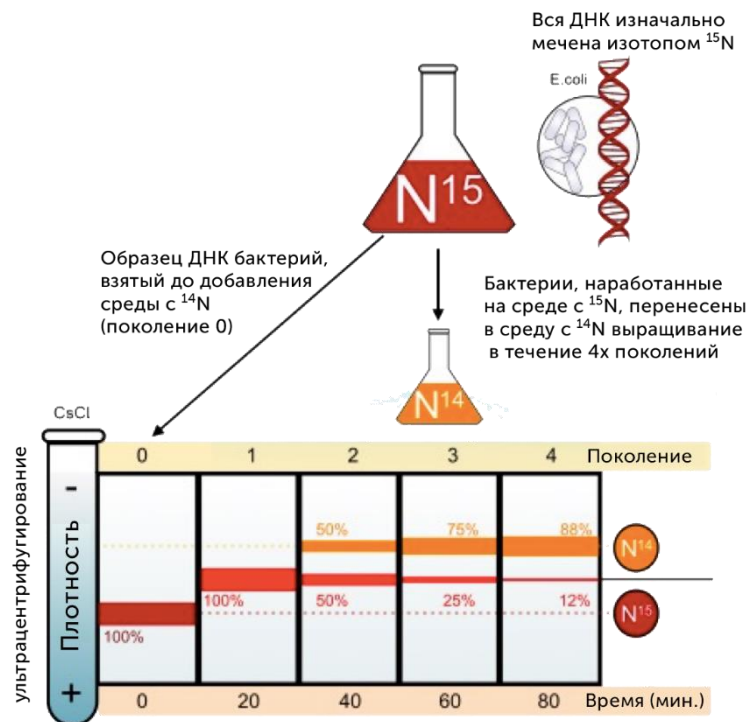


Рис. 6. Эксперимент Мезельсона и Сталля

В 1957 г. Метью Мезелсон и Франклин Сталь поставили один из самых красивых биологических экспериментов, исследуя механизмы репликации ДНК (рисунок 7). Для определения способа репликации ДНК необходимо четко различать материнские и дочерние молекулы. Мезелсон и Сталь выращивали бактерии кишечной палочки (*Escherichia coli*) на среде, содержащей в качестве источника азота его тяжелый изотоп – ^{15}N . Молекула ДНК содержит большое количество атомов азота, при делении ДНК азот для новых цепочек берется из внешней среды. Тяжелый изотоп азота включался в состав молекулы ДНК и служил надежной меткой. Для того чтобы пометить практически всю бактериальную ДНК, необходимо было культивировать *E. coli* на такой среде в течение как минимум 12 поколений.

Мезелсон и Сталь длительное время культивировали *E. coli* на среде с ^{15}N . После этого бактерии быстро переносили на среду, содержащую более легкий изотоп азота ^{14}N . Благодаря тому, что клетки *E. coli* культивировались на двух различных средах, в состав молекул их ДНК входили оба изотопа азота: ^{14}N и ^{15}N . Отличить такие молекулы друг от друга можно было по плотности, поскольку масса нуклеотидов молекулы ДНК, содержащих ^{15}N больше, по сравнению с обычной молекулой. ДНК бактериальных клеток, выращенных на

среде с ^{15}N , имела плотность $1,724 \text{ г/см}^3$, а ДНК клеток, выращенных на среде с ^{14}N – $1,710 \text{ г/см}^3$.

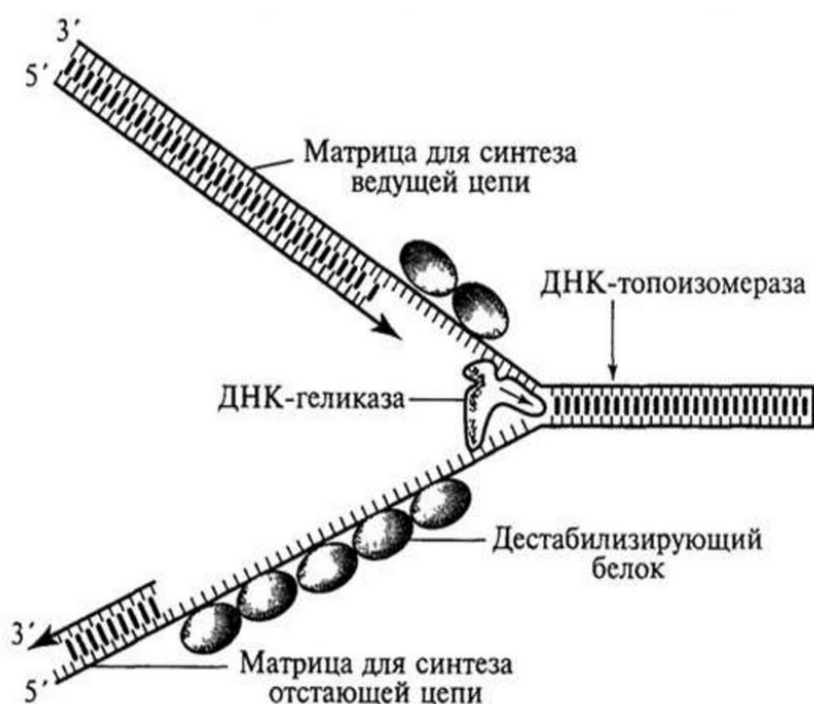


Рис. 7. Схема образования репликативной вилки

После переноса культуры *E. coli* с одной среды на другую через каждое поколение Мезелсон и Сталь отбирали пробы. Контролем служила бактериальная культура, содержащаяся на среде с ^{15}N . Из каждой пробы бактериальных клеток путем центрифугирования извлекали ДНК. После этого ее смешивали с раствором хлористого цезия (CsCl) плотностью $1,7 \text{ г/см}^3$, и вновь центрифугировали с очень высокой скоростью в течение нескольких дней.

В результате осаждения молекул CsCl его раствор приобретал градиент плотности от $1,65 \text{ г/см}^3$ в верхней части пробирки до $1,8 \text{ г/см}^3$ у ее дна. В соответствии с этим, молекулы ДНК концентрировались в строго определенной области: у дна, в центре или в верхней части пробирки. Локализация ДНК устанавливалась на спектрофотометре, поскольку было известно, что она поглощает лучи с длиной волны 260 нм . Этот метод Мезелсон и Сталь разработали и опубликовали совместно с Джермом Виноградом (1913–1976) в 1957 г., непосредственно перед проведением эксперимента по репликации ДНК.

Определяя плотность ДНК в каждой из проб, Мезелсон и Сталь обнаружили, что спустя одно поколение после переноса культуры *E. coli* со среды с ^{15}N на среду с ^{14}N плотность ДНК была промежуточной между ^{15}N -ДНК и ^{14}N -ДНК. Спустя два поколения половина бактериальных клеток содержала ДНК с легким изотопом азота (^{14}N), а другая половина – такую же, как и в предыдущем поколении, ДНК промежуточной плотности. Через три поколения на среде с ^{14}N в $\frac{3}{4}$ клеток содержалась легкая ДНК, а $\frac{1}{4}$ часть клеток сохраняла ДНК промежуточной плотности. Т. о., соотношение между числом генераций и распределением плотности ДНК точно соответствовало полуконсервативному типу репликации.

Вместе с тем, из гипотезы полуконсервативной репликации следовало, что ДНК с промежуточной плотностью между ^{15}N -ДНК и ^{14}N -ДНК должна быть гибридной. Это значит, что одна из ее цепей должна содержать только тяжелый изотоп азота (^{15}N), а другая – только легкий (^{14}N). Проверая это предположение, Мезелсон и Сталь нагревали полученную ими ДНК промежуточной плотности в течение 30 минут при температуре $100\text{ }^\circ\text{C}$ на водяной бане. При таких условиях двойная спираль молекулы ДНК денатурирует, образуя две отдельные цепочки, однако ковалентные связи между нуклеотидами в каждой из них не разрушаются. Проведя центрифугирование денатурировавшей ДНК в градиенте плотности хлористого цезия, Мезелсон и Сталь обнаружили, что в результате образовалось две фракции различной плотности. Плотность одной из них совпадала с плотностью молекул ДНК, содержащих тяжелый изотоп азота (^{15}N), тогда как плотность другой была идентична плотности молекул ДНК с легким изотопом азота (^{14}N). Из этого следовало, что молекула ДНК промежуточной плотности, образовавшаяся в первом поколении после переноса со среды с тяжелым изотопом азота на среду с легким изотопом, представляет собой гибридную молекулу. В ее состав входят две цепи – материнская, содержащая исключительно ^{15}N и вновь синтезированная дочерняя, содержащая только ^{14}N . Эти данные также подтвердили верность модели Уотсона–Крика и полуконсервативный характер репликации ДНК.

Результаты своего эксперимента Мезелсон и Сталь опубликовали годом позже. В дальнейшем, было проделано множество экспериментов по репликации ДНК различных организмов – от прокариот до эу-

кариот. Во всех случаях репликация ДНК шла исключительно по полуконсервативному типу. Это позволило подтвердить справедливость модели молекулы ДНК Уотсона–Крика, на которой базируется вся современная генетика.

Схема репликации ДНК

С помощью фермента хеликазы двойная спираль ДНК в отдельных зонах расплетается. Образующиеся при этом одноцепочечные участки связываются специальными дестабилизирующими белками. Молекулы этих белков выстраиваются вдоль полинуклеотидных цепей, растягивая их остов и делая азотистые основания доступными для связывания с комплементарными нуклеотидами, находящимися в нуклеоплазме.

Разделение спирально закрученных цепей родительской ДНК ферментом хеликаза вызывает появление супервитков перед репликационной вилкой. Это объясняется тем, что при расхождении каждой десяти пар нуклеотидов родительская ДНК должна совершить полный оборот вокруг своей оси. Следовательно, для продвижения репликационной вилки вся молекула ДНК перед ней должна бы быстро вращаться, что потребовало бы больше затрат энергии.

Этого не наблюдается благодаря ферментам ДНК-топоизомеразам. Этот фермент перемещается вдоль двухспиральной родительской ДНК перед вилкой репликации и разрывает одну из цепей ДНК, присоединяется к разорванному концу, и это дает возможность нити ДНК вращаться вокруг второй.

В каждой области репликации при участии ДНК-полимеразы синтезируется ДНК двух новых дочерних молекул. ДНК-полимераза присоединяет очередной нуклеотид к ОН-группе в 3'-положении предшествующего нуклеотида. Особенностью ДНК-полимеразы является ее неспособность начать синтез новой полинуклеотидной цепи путем простого связывания двух нуклеозидтрифосфатов: необходим 3'-ОН-конец какой-либо полинуклеотидной цепи, спаренной с матричной цепью ДНК, с которой ДНК-полимераза может лишь добавлять новые нуклеотиды. Такую цепь называют затравкой, или праймером. Роль затравки выполняют короткие последовательности РНК, образуемые при участии фермента РНК-праймазы. Эта особенность ДНК-полимеразы

означает, что матрицей при репликации может служить лишь цепь ДНК, несущая спаренную с ней затравку, которая имеет свободный 3' ОН-конец. В связи с этим процесс репликации на антипараллельных цепях ДНК применяют по-разному. На одной из матриц сборка новой цепи происходит неправильно от 5' к 3'-концу и постепенно уменьшается на 3'-конце. Синтез второй цепи ДНК осуществляется короткими фрагментами (100–200 нуклеотидов) получившими название фрагментов Оказаки, также в направлении от 5' к 3'-концу (по типу шитья назад иголкой). Синтезу каждого фрагмента предшествует образование РНКзатравки длиной около десяти нуклеотидов. Вновь образованный фрагмент с помощью фрагмента ДНК-лигазы соединяется с предшествующим фрагментом после удаления его РНК-затравки. Одна цепь синтезируется непрерывно и получила название лидирующей. Синтез другой идет медленнее, так как она собирается из отдельных фрагментов, требующих образования, а затем удаления РНК-затравки (запаздывающая). Хотя отдельные фрагменты образуются в направлении 5' к 3', в целом цепь растет в направлении 3' к 5'. На заключительном этапе ДНК-лигаза соединяет 3'-конец одного из фрагментов Оказаки с 5'-концом соседнего фрагмента с образованием фосфорноэфирной связи. Дальнейшая спирализация появившегося участка ДНК происходит с участием ДНК-гиразы (фермент из группы топоизомераз, вызывающий образование отрицательных супервитков в релаксированной кольцевой молекуле ДНК) и некоторых других белков. Конечным результатом процесса репликации является образование двух молекул ДНК, нуклеотидная последовательность которых идентична таковой в материнской двойной спирали ДНК.

2.5. Транскрипция

Транскрипция – перенос информации с двуцепочечной молекулы ДНК на одноцепочечные молекулы РНК. При этом матрицей для синтеза РНК служит только одна цепь ДНК, называемая смысловой. Процесс транскрипции обеспечивается комплексным действием ряда ферментов, в частности РНК-полимеразой.

У эукариот установлено наличие ядерной РНК-полимеразы трех типов (I, II, III) и РНКполимераз клеточных органелл. РНК-полимераза

I типа находится в ядрышке и участвует в синтезе большинства молекул рРНК, РНКполимераза II типа обеспечивает синтез мРНК и мяРНК (малые ядерные РНК), РНК-полимераза III типа осуществляет синтез тРНК и одного варианта молекул рРНК.

Транскрипция подразделяется на три стадии: – инициации – начало синтеза РНК; – элонгации – удлинение полинуклеотидной цепочки; – терминации – окончание процесса. Инициация транскрипции зависит от предварительного специфического связывания РНК-полимеразы с промотором, который расположен перед стартовой точкой структурного гена, с которого начинается синтез РНК. Промоторы многих генов прокариот имеют в своем составе универсальную последовательность 5' –ТАТААТ–3' (блок Прибнова), которая располагается перед стартовой точкой на расстоянии 10 нуклеотидов и распознается РНК-полимеразой. Другая последовательность 5'–ТТГАЦА–3' обычно обнаруживается на расстоянии примерно 35 нуклеотидов от стартовой точки. В геномах эукариот функцию узнавания для РНК-полимеразы II могут выполнять универсальные последовательности –ТАТА– (блок Хогнесса), –ЦААТ– и состоящие из повторяющихся нуклеотидов Г и Ц (ГЦ-мотивы). При этом промоторная область может содержать одну последовательность либо их комбинацию. РНК-полимераза связывается с промотором и начинает процесс расплетения. Дальнейшее расплетение ДНК структурного гена сопровождается удлинением нити РНК (элонгация), продолжающимся до достижения РНК-полимеразной области терминатора (нуклеотидная последовательность ДНК). Терминатор находится, как правило, в конце структурного гена. Важно подчеркнуть, что и-РНК транскрибируется всегда только с одной цепочки ДНК в направлении от 3' к 5'-концу.

2.6. Трансляция

Очередной этап реализации генетической информации заключается в синтезе полипептида на рибосоме, при котором в качестве матрицы используется молекула мРНК. У прокариот, так как нуклеотид лежит в цитоплазме, процессы транскрипции и трансляции идут одновременно. У эукариот процессы разделены во времени в связи с процессингом РНК и необходимостью их последующей упаковки и транспортировки из кариоплазмы в цитоплазму с участием специальных

транспортных белков. Процесс трансляции состоит из трех этапов: инициации; элонгации; терминации. Для инициации трансляции важное значение имеют полисомы (комплекс рибосом). В процессе трансляции участвуют также молекулы тРНК. Процесс присоединения каждой из 20 аминокислот к акцепторному концу соответствующей тРНК связан с ее активацией определенным вариантом фермента аминоксил-тРНК-синтетазы с использованием энергии АТФ. Образовавшийся при этом специфический комплекс тРНК и аминокислоты называется аминоксил-тРНК, перемещается к рибосоме и участвует в синтезе полипептида. Начало инициации трансляции у эукариот обеспечивается точным соединением 5'-конца молекулы мРНК с определенной областью малой субъединицы рибосомы. В Р-участке (один из тРНКсвязывающих участков – пептидил-тРНК-связывающий участок) оказывается стартовый кодон АУГ этой молекулы. Функциональная особенность данного участка состоит в том, что он может быть занят только иницирующей аминоксил-тРНК с антикодоном УАЦ, которая у эукариот несет аминокислоту метионин.

После образования иницирующего комплекса в Р-участке становится возможным воссоединение малой и большой субъединиц рибосомы (рис. 8).

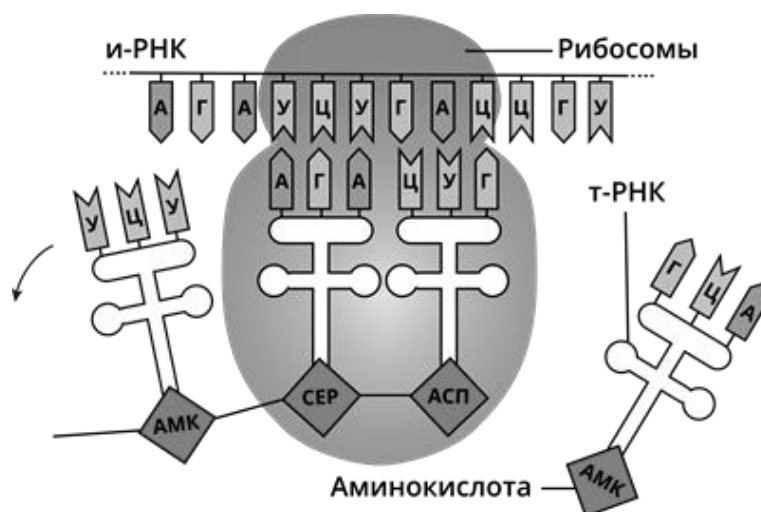


Рис.8. Трансляция на рибосоме

Элонгация полипептида начинается с образования пептидной связи между иницирующей и последующей аминокислотами. Рибо-

сома движется вдоль матрицы в направлении 5/→3/, что сопровождается отсоединением иницирующей тРНК от мРНК, от иницирующей аминокислоты и выходом ее в цитоплазму. При этом рибосома сдвигается на один триплет вдоль иРНК и его свободным А-центром (тРНК-связывающий участок – аминоацил-тРНК) связывает следующую аминоацил-тРНК в соответствии с кодоном иРНК. Процесс идет до тех пор, пока на иРНК не встретится кодонтерминатор. После выхода из функциональной рибосомы свободный 5/-конец мРНК может вступить в контакт со следующей рибосомой полисомной группы, иницируя синтез еще одного полипептида.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте характеристику нуклеиновым кислотам.
2. Перечислите свойства генетического кода.
3. Поясните, почему генетический код является вырожденным.
4. Расскажите, какие ферменты и белки принимают участие в репликации молекулы ДНК.
5. Назовите типы репарации ДНК.
6. Расскажите об этапах транскрипции.
7. Расскажите об этапах трансляции.
8. Как происходит синтез белка на рибосомах?
9. Назовите виды РНК и их функции.

Глава 3. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

3.1. История развития генетической инженерии

Генетическая инженерия – быстро развивающееся направление в биотехнологии, которое возникло на стыке молекулярной биологии, генетики, биохимии и позволяет осуществлять манипуляции с генами разных организмов. Согласно определению академика А.А. Баева, генетическая инженерия представляет собой конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (создание искусственных генетических программ). Э.С. Пирузян определял генетическую инженерию как систему экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем искусственные генетические структуры в виде рекомбинантных молекул ДНК.

Таким образом, основным объектом для генетической инженерии является молекула ДНК. Согласно определению национальных институтов здоровья США, «рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке». Термин «генетическая инженерия» появился в научной литературе в 1970 г. Первая рекомбинантная ДНК получена в 1972 году Полом Бергом с соавторами и была составлена из фрагментов ДНК, взятых у вируса SV-40, бактериофага λ , бактерии кишечная палочка *E. coli*. Формально 1972 год следует считать датой рождения генетической инженерии. Она имеет яркую историю благодаря тому общественному резонансу, который она вызвала с самых первых своих шагов.

Начало этим событиям положило послание участников Гордоновской конференции (1973 г.) президиуму академии наук США, в котором говорилось о возможной опасности технологий рекомбинантных ДНК для здоровья человека. Возможные блага генетической инженерии признавались с самого начала, но разногласия по данной проблеме не затихли и сейчас. Историю развития генетической инженерии можно условно разделить на три этапа.

Первый этап связан с доказательством принципиальной возможности получения рекомбинантной ДНК *in vitro*.

На втором этапе были доказаны:

- возможность создания рекомбинантных молекул с использованием исходных молекул ДНК от разных видов и штаммов бактерий;
- их жизнеспособность;
- стабильность;
- функционирование.

Третий этап связан с началом работ по включению в векторные молекулы ДНК генов эукариот, главным образом растений и животных. Таким образом, можно выделить наиболее значимые открытия, без которых невозможно было становление и развитие генетической инженерии (таблица 2).

Таблица 2. Основные открытия в области генной инженерии

Дата	Открытие
1869	Выделена ДНК из ядер клеток гноя (Ф. Мишер)
1953	Сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК (Д. Уотсон, Ф. Крик)
1961	Открыто явление ренатурации ДНК и установлены точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот (А. Мармур, П. Доти)
1962	Впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК (В. Арбер)
1967	Открыта ДНК-лигаза (М. Геллерт)
1968	Выделена первая рестриктаза (М. Мезельсон, Е. Юань)
1972 – 1973	Разработана технология клонирования ДНК (Г. Бойер, С. Коэн, П. Берг)
1975 – 1977	Разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности (Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт)
1979	Синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК (Г. Корана)
1981–1982	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные экземпляры дрозофилы (Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг, Г. Рубин)
1986	Разработан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) (К. Мюллис)
1988	Началось широкомасштабное производство оборудования и диагностических наборов для ПЦР
1993	Получены трансгенные овцы с геном химозина (Л.К. Эрнст, Г. Брем, И.В. Прокофьев)
1998	Клонирование мышей из ядра взрослой клетки яичника
2004	Создана линия человеческих эмбриональных стволовых клеток, полученных с помощью переноса ядра соматической клетки
2006	Создана порода биотехнологических свиней. Этот эффект достигнут путем встраивания в геном свиньи гена fat-1, выделенного из генома круглого червя <i>Caenorhabditis elegans</i>

2010	Создана первая живая клетка, в которой ее собственную ДНК заменили на искусственно созданную (Крейг Вентер)
2019	Технология CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) применена для редактирования человеческих генов при лечении раковых пациентов
2020	Ученые представляют новый продукт под названием CHyMErA (Cas Hybrid for Multiplexed Editing and Screening Applications), который можно использовать для анализа действия генов

3.2. Биотехнология рекомбинантных ДНК

Используя технологию рекомбинантных ДНК, можно получить минорные клеточные белки в больших количествах и провести тонкие биохимические исследования структуры и функций белков, а также осуществить детальный химический анализ генетического материала. Технология получения рекомбинантных ДНК включает следующие методические подходы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК;
- конструирование рекомбинантных ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК;
- введение рекомбинантных ДНК в клетки или организмы

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя решать такие задачи, как определение строения и функций не только белков, но и индивидуальных доменов, а также расшифровывать механизмы регуляции экспрессии генов, получать многие белки, участвующие в регуляции обменных процессов, клеточной пролиферации и развитии организма.

Расщепление ДНК в специфических участках нуклеотидных последовательностей осуществляется особыми ферментами – рестрицирующими нуклеазами, способными разрушить чужеродную ДНК. Ферменты условно можно разделить на следующие группы:

- используемые для получения фрагментов ДНК (рестриктазы);
- синтезирующие фрагменты ДНК на матрице ДНК (ДНКполимеразы) или РНК (обратные транскриптазы, ревертазы);

- соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы – специфические эндонуклеазы, расщепляющие молекулу ДНК в строго определенных точках – сайтах рестрикции. Впервые были выделены из *E. coli* в 1968 г. В настоящее время различают три основных класса рестриктаз:

- **рестриктазы** первого класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, точнее, на произвольном от сайтов рестрикции расстоянии;
- **рестриктазы** второго класса расщепляют ДНК только внутри сайтов узнавания;
- **рестриктазы** третьего класса узнают и расщепляют ДНК на фиксированном от сайтов рестрикции расстоянии (Якупов Т.Р., 2016). Номенклатуру рестриктаз предложили в 1973 году С. Смит и Д. Натансон.

Согласно их номенклатуре, название рестриктазы складывается из трех букв: первая обозначает родовое название, две последующие – первые буквы вида. Например, фермент из *E. coli* обозначают как *Eco* и т. д. Типовая (или штаммовая) идентификация следует за родовидовой, например, *EcoRI*. Естественной функцией рестриктаз является защита бактерии от чужеродной ДНК.

Выделено свыше 2 000 рестриктаз, которые могут узнавать более 150 сайтов рестрикции. Многие рестриктазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов и образованием на концах фрагментов коротких одноцепочечных участков. Они способны образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента (липкие концы).

Липкие концы позволяют легко соединить любых два фрагмента ДНК в одно целое. Полученный фрагмент ДНК (любого происхождения) можно встроить в очищенную ДНК плазмиды или бактериального вируса. Сравнение размеров фрагментов ДНК после обработки соответствующего участка генома набором рестриктаз позволяет построить рестрикционную карту.

ДНК-полимеразы обладают способностью удлинять цепь ДНК в направлении 5/→3/ путем присоединения комплементарного нуклеотида. Впервые ДНК-полимераза была выделена Артуром Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из *E. coli*.

Обратная транскриптаза (или ревертаза) – РНК-зависимая ДНК-полимераза, с помощью которой осуществляется обратная транскрипция, т. е. синтез ДНК на РНК матрице. Ревертаза кодируется геномами некоторых РНК-содержащих вирусов и подвижных генетических элементов генома высших организмов, в генной инженерии с их помощью можно получить ген. Она используется для транскрипции мРНК в комплементарную цепь ДНК. Фермент впервые открыт в 1970 г., когда Говард Темин с Сатоши Мизутани, а также независимо от них Дэвид Балтимор выделили искомый фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Лигазы сшивают фрагменты ДНК за счет фосфорноэфирных связей, образующихся между 3/-гидроксильной концевой группой одного фрагмента ДНК и 5/-фосфатной группой другого фрагмента. ДНК-лигазы разделяют на два семейства в зависимости от механизма действия:

- АТФ-зависимые лигазы;
- NAD + – зависимые ДНК-лигазы.

Ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК. С их помощью можно «подтупить» несимметричные концы ДНК или укоротить фрагменты ДНК, тем самым сблизив их функциональные элементы. Для успешного решения задач генетической инженерии очень важно быстро секвенировать (определить последовательность нуклеотидов) любые очищенные фрагменты ДНК. Далее рассмотрим методы секвенирования.

3.3. Методы секвенирования ДНК

Полную информацию о молекуле ДНК можно получить, определив ее нуклеотидную последовательность. Без этих данных невозможно проводить исследования по молекулярному клонированию. Секвенирование участка ДНК можно провести разными методами.

Химический метод (метод Максама – Гилберта). Метод основан на химической деградации ДНК. Он был предложен Аланом Максамом и Уолтером Гилбертом в 1976 году. Суть метода состоит в том,

что один из концов фрагмента ДНК метят с помощью изотопа фосфора ^{32}P (в последнее время вместо радиоактивной вводят флюоресцирующую метку. Ее можно «цеплять» и к нуклеотидам, подбирая различную окраску для каждого типа). Препарат меченой ДНК делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно или два из четырех оснований, подбирая условия реакции таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Разрушение идет в два этапа. На первом этапе происходит модификация азотистого основания и последующее его выщепление. На втором этапе производят гидролиз ДНК в местах выщепления оснований. Пуриновые основания модифицируются диметилсульфатом. Адениновые остатки метилируются по третьему атому азота, гуаниновые – по положению N7. Если такую модификацию обработать 0,1 М (децимолярный) HCl при 0 °С, то выщепляется метиладенин. При последующей инкубации в щелочной среде (0,1 М NaOH) при температуре +90 °С происходит разрушение сахаро-фосфатной связи в местах выщепления оснований. Обработка поврежденных молекул пиперидином приводит к гидролизу ДНК по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируются гидразином. В бессолевой среде модифицируется и цитозин, и тимин, в присутствии 2 М (двухмолярный) NaCl модифицируется только цитозин. При дальнейшей обработке пиперидином происходит расщепление ДНК по точкам модификации. Можно использовать и другие реакции химической модификации оснований и расщепления по ним молекул ДНК. В результате получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, образовавшиеся во всех четырех реакциях, подвергают электрофорезу в четырех соседних дорожках; затем проводят радиоавтографию, и те фрагменты, которые содержат радиоактивную метку, оставляют отпечатки на рентгеновской пленке. По положению отпечатков можно определить, на каком расстоянии от меченого конца находилось разрушенное основание, а зная это основание – его положение. Набор полос на рентгеновской пленке определяет нуклеотидную последовательность ДНК. Аналогично наблюдают флюоресцентное окрашивание. Если для каждого из четырех нуклеотидов был подобран свой цвет флюоресцентной метки, то при электрофорезе их наносят на одну дорожку. Тогда расположение нуклеотидов отмечено

штрихами разного цвета, а процедуру считывания легко автоматизировать.

Ферментативный метод (дидезоксисеквенирование, метод Сэнгера). Разработан Фредериком Сэнгером в 1977 году. Метод основан на энзиматическом введении нуклеотида, терминирующего полинуклеотидную цепь. В этом случае обычно используют дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, в которых дезоксирибоза-3'-ОН, представленная в нормальных нуклеотидах, отсутствует. Такой модифицированный нуклеотид, внедряясь в цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразы, блокирует присоединение следующего нуклеотида. Синтез *in vitro* молекулы ДНК в присутствии затравки (праймера) и небольшого количества одного из таких модифицированных нуклеотидов приводит к образованию фрагментов ДНК в виде лесенки. Если для получения таких фрагментов применять меченую ДНК (обычно проводят четыре реакции синтеза с использованием различных нуклеотидов, терминирующих цепь), а электрофоретический анализ проводят на четырех дорожках геля, то можно определить последовательность нуклеотидов.

Автоматическое секвенирование включает автоматизацию проведения секвенирующих реакций и электрофоретического разделения меченых продуктов. При этом используется флуоресцентная метка, которая цепляется к каждому из четырех нуклеотидов. Содержание всех пробирок соединяют и проводят электрофорез на одной дорожке, которую сканируют в луче лазера и регистрируют положение каждой флуоресцирующей полосы. Данные вводят в компьютер, который их сопоставляет с помощью специальных программ и выводит на дисплей нуклеотидную последовательность.

Секвенирование по методу Solexa (Illumina). Молекулу ДНК делят на фрагменты. К каждому участку ДНК с двух сторон добавляют адаптеры (известные небольшие последовательности нуклеотидов), содержащие праймеры для ДНК-полимеразы, которая осуществляет репликацию ДНК. Затем смесь помещают на подложку, на которой в виде решетки размещены участки ДНК, комплементарные адаптерам. На подложке фрагменты ДНК многократно клонируют, получая кластеры. ДНК привязана к подложке сразу двумя концами. ДНК денатурируют. Подложка помещается в раствор, содержащий ДНК-полимеразу и меченные нуклеотиды. После присоединения комплементарного нук-

леотида лишние нуклеотиды смывают, а флуоресцентные метки присоединившихся считывают. Затем ДНК обрабатывают фосфатазой и процесс повторяют. В результате на каждом цикле прочитывают одновременно большое число нуклеотидов из разных последовательностей. После секвенирования множества коротких фрагментов они собираются в единую молекулу ДНК.

Пиросеквенирование – определение последовательности нуклеотидов в ДНК по принципу секвенирования путем синтеза. При включении нуклеотида во вновь синтезируемую последовательность ДНК высвобождается пирофосфат, который регистрируется посредством хемилюминесценции. Так как ДНК иммобилизована (зафиксирована), растворы нуклеотидов аденина, гуанина, цитазина и тимина добавляют и отмывают поэтапно, после каждой реакции. Последовательность растворов, которые дают хемилюминесцентный сигнал, позволяет определить последовательность ДНК. Когда полимеразы включают комплементарный нуклеотид и высвобождается пирофосфат (PPi), фермент АТФ-сульфурилаза превращает PPi в аденозинтрифосфат (АТФ) в присутствии аденозин-5/-фосфосульфата. В присутствии АТФ люцифераза превращает люциферин в оксилуциферин с высвобождением видимого света, который регистрируется и анализируется компьютерной программой. Применяют этот метод, если длина последовательности составляет около 300–500 нуклеотидов.

Платформа Supported Oligonucleotide Ligation and Detection System (SOLiD) – технология секвенирования коротких чтений, основана на лигировании. При секвенировании фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР.

Одномолекулярное секвенирование Helicos Biosciences – метод секвенирования единичных молекул. Принцип работы состоит в том, что после клональной амплификации образца происходит фрагментация ДНК с последующим полиаденилированием на 3/-конце с дальнейшим секвенированием, чередующимся с промыванием образцов нуклеотидами с флуоресцентной меткой. Одномолекулярное секвенирование в реальном времени Pacific Biosciences (Single molecule real time sequencing, SMRT) основано на наблюдении за работой единичной мо-

лекулы ДНКполимеразы. Использование четырех флуоресцентно меченых нуклеотидов позволяет определить, какой нуклеотид присоединяет ДНКполимераза в данный момент времени.

Ion Torrent Sequencing (pH-индуцированное секвенирование) – метод основан на связи между химической и цифровой информацией, что позволяет быстро секвенировать большое количество образцов. Процесс основан на обнаружении (детекции) протонов, которые получают при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, pH раствора меняется, что и детектируют. Платформа Ion Torrent отличается от остальных технологий секвенирования тем, что в ней не используются модифицированные нуклеотиды и оптические методы. Метод позволяет исследовать транскриптомы, малые РНК, проводить ChIP-seq (метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина), изучать геномы микробных сообществ.

Нанопоровое секвенирование – метод основан на измерении тока ионов через единичную нанопору в непроводящей мембране. При прохождении нуклеотидов через нанопору ток падает. Время, на которое изменяется ток ионов, и величина этого падения зависят от того, какой нуклеотид в данный момент находится внутри поры. После секвенса проводят поиск открытой рамки считывания (ORF) – последовательности, ограниченной старт- и стоп-кодонами. Выбор зависит от того, какое сочетание из трех нуклеотидов выбрано в качестве первого кодона. Возможны три рамки считывания одной и той же нуклеотидной последовательности. Кроме того, последовательность всегда читается в 5' → 3' направлении, а значит, что в целом для одной последовательности возможны шесть различных рамок считывания. Поиск проводят с помощью компьютерных программ.

3.4. Экспрессия чужеродных генов

Эффективность функционирования бактериальных генов неодинакова, что обуславливает вариабельность концентрации отдельных белков в зависимости от их функций. Такие вариации белков, например, у *E. coli*, обусловлены системой контроля, генной экспрессии, осуществляемой в основном на уровне транскрипции ДНК, и зависят от

количества синтезируемой на данном гене мРНК и активности фермента РНК-полимеразы. Порядок в чередовании нуклеотидных последовательностей в промоторном участке структурного гена определяет степень активности РНК-полимеразы и инициацию процесса транскрипции. Бактериальные гены, включенные в геном, как правило, экспрессируются легко, давая мРНК и белок, в силу того, что в сигнальных последовательностях, управляющих процессами транскрипции и трансляции, у различных прокариотических организмов много общих черт.

Экспрессия генов эукариот в бактериях происходит редко, поскольку регуляторные участки эукариот отличны от таковых у бактерий. Регуляторные (сигнальные) участки не узнаются бактериальными РНК-полимеразами, что приводит к замедлению транскрипции. При клонировании геномной ДНК эукариотической клетки экспрессия генов не происходит из-за отсутствия у бактерий системы сплайсинга. Следовательно, для репрессии эукариотических генов в клетках прокариот необходимо, чтобы данные гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. В связи с этим для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК (или синтетическая ДНК), содержащая кодирующую последовательность в составе векторной молекулы (например, плазмиды), присоединяется к регуляторным элементам бактерии-промотора, оператору и рибосом-связывающему участку.

Таким образом, в сконструированных промежуточных рекомбинантных ДНК эукариотический ген будет находиться под контролем бактериальных регуляторных элементов. Целесообразнее встраивать ген в подходящий вектор для экспрессии, который уже содержит регуляторные элементы, способствующие активной экспрессии встроенного гена после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку. Например, к таким эффективным регуляторным участкам принадлежит промотор гена бета-лактамазы.

Промотор гена бета-лактамазы нерегулируемый, а использование таких промоторов не всегда удобно, так как синтезированные белки в большом количестве могут блокировать рост бактерий. В связи с этим целесообразнее использовать регулируемые сильные промоторы, включить которые для синтеза чужеродного белка можно и в том случае, когда получена большая бактериальная масса. В частности, к

числу регулируемых сильных промоторов следует отнести термочувствительный промотор рL, который ответственен за экспрессию нескольких генов бактериофага.

Белок репрессор, блокирующий данный промотор, активен при температуре +31 °С, но неактивен при +38 °С, следовательно, при инкубировании бактерий при +31 °С чужеродный ген не экспрессируется, и, наоборот, повышение температуры вызывает инактивацию репрессора и высокий уровень синтеза нужного белка. Последовательность оснований длиной 6–8 нуклеотидов, расположенная непосредственно перед иницирующим кодоном АУГ у *E. coli*, определяет эффективность процесса трансляции. Эта последовательность представляет собой участок связывания мРНК с рибосомой, и его сдвиг в ту или иную сторону способен уменьшать эффективность трансляции мРНК. По имени исследователей, идентифицировавших этот участок, он был назван последовательностью Шайна – Дальгарно. Обычно эту последовательность включают в состав самого вектора вместе с иницирующим кодоном на нужном расстоянии.

При экспрессии векторов такого типа образуется гибридный белок, в котором несколько N-концевых аминокислотных остатков происходят от источника регуляторных элементов и иницирующего кодона прокариотического гена. Такие гибридные белки часто более стабильны; обработка их химическим или ферментативным способом приводит к выделению эукариотической части белка.

Суммарная активность экспрессируемого гена возрастает с ростом числа копий рекомбинантной ДНК в расчете на клетку. Используя многокопийные плазмиды, можно получить сверхсинтез нужных белковых продуктов. Получены температурно-чувствительные мутантные плазмиды, способные накопить до 1–2 тысяч копий на клетку без нарушения жизненно важных функций бактерий. Обычно же используемые плазмидные векторы поддерживаются в клетке в количестве 20–50 копий. Получение бактериальных штаммов сверхпродуцентов плазмидных генов – одна из важнейших задач современной биотехнологии в экономическом, медицинском и социальном аспектах.

3.5. Использование генетической инженерии в животноводстве

Применение методов генетической инженерии в животноводстве открывает перспективу изменения ряда свойств организма: повышение продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличение скорости роста, улучшение качества продукции и др.

Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, называют трансгенными, а ген, интегрированный в геном реципиента, трансгеном. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества, а дальнейшая селекция позволяет закрепить их в потомстве и создавать трансгенные линии. Введение чужеродной ДНК в животные клетки можно осуществить либо физическими методами (микроинъекция, электропорация, слияние липосом), либо при помощи вирусных векторов.

Стратегия получения трансгенных животных состоит в следующем:

- 1) клонированный ген в составе вектора вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки;
- 2) инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в реципиентную женскую особь;
- 3) отбирают потомков, которые содержат клонированный ген во всех клетках;
- 4) скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Для исследования у трансгенных животных выделяют РНК из тех тканей, в которых предполагается наиболее высокий уровень экспрессии. Качественный и количественный анализы экзогенных белков позволяют судить об уровне трансляции инъецированного генного материала.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появиться так называемые мозаики.

К мозаикам относят животных, происходящих из одной зиготы, но имеющих разные генотипы. Помимо клеточных линий, содержащих

трансген, они имеют еще нетрансгенные клеточные линии. Подсчитано, что около 30% первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции ДНК, мозаики, что затрудняет создание чистых трансгенных линий животных. Этим объясняется тот факт, что трансген передается потомству с ожидаемой в соответствии с законами Г. Менделя частотой 50%.

Часть мозаиков вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству. Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии – выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням, а также создание так называемых животных-биореакторов – продуцентов ценных биологически активных веществ.

Другая важная задача – выведение трансгенных животных, устойчивых к заболеваниям. Ведутся исследования в целях получения трансгенных животных, резистентных к маститу за счет повышения содержания белка лактоферина в тканях молочной железы.

Л.К. Эрнст продемонстрировал устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК к лейкозу крупного рогатого скота, к заражению вирусом лейкоза. Получены трансгенные коровы, в молоке которых содержится человеческий белок лактоферрин, который планируют применять для профилактики гастроэнтерологических заболеваний у людей с низкой иммунорезистентностью (больные СПИДом, недоношенные младенцы, больные раком, прошедшие радиотерапию и др.).

Перспективным является использование трансгенных животных в медицине. Получение биологически активных соединений за счет включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков. В России группой ученых под руководством Л.К. Эрнста получены трансгенные овцы с геном химозина, в одном литре молока которых содержится 200–300 мг химозина, основного компонента для производства сыра. Из трех литров молока трансгенной овцы можно получить достаточное количество химозина для производства одной тонны сыра из коровьего молока.

Возможности генетической инженерии в животноводстве и других отраслях народного хозяйства огромны и перспективны. На основе методов генетической инженерии получены инсулин, соматотропин,

интерфероны. Перспективу в развитии новых трансгенных технологий связывают с созданием трансгенных животных – источников органов для пересадки человеку, моделированием генетических заболеваний.

Вопросы для самоконтроля

1. Из каких фрагментов была составлена первая рекомбинантная ДНК?
2. Назовите этапы становления и развития генетической инженерии.
3. Какие методы секвенирования применяются в генетической инженерии?
4. Что такое лигирование, какими основными методами осуществляется?
5. Расскажите о сшивании генов (фрагментов) ДНК по липким и тупым концам.
6. Какие молекулы ДНК называют векторными и какими особенностями они должны обладать?
7. Назовите виды векторов, применяемых в генетической инженерии.
8. Расскажите об экспрессии чужеродных генов у прокариот.
9. Назовите достижения генетической инженерии в отрасли животноводства. Какие имеются перспективы дальнейшего использования методов и приемов генетической инженерии?
10. Перечислите этапы получения трансгенных животных.
11. Что означает выражение «трансгенные животные – биореакторы биологически активных веществ»?

Глава 4. ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

4.1. История развития клеточной инженерии

Клеточная инженерия – одно из наиболее важных направлений в биотехнологии. Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным или же клетка-реципиент может приобрести отдельные части клетки-донора: цитоплазму, митохондрии, хлоропласты, ядерный геном или его крупные блоки. Введение небольших блоков генетической информации обычно осуществляется средствами генетической инженерии.

Соматическая гибридизация имеет более широкие возможности для скрещивания филогенетически отдаленных организмов, чем половое размножение. Интенсивное развитие клеточной инженерии началось в 50-е годы XX века, хотя попытки выращивания изолированных кусочков растительной ткани были сделаны гораздо раньше.

В конце XIX – начале XX века немецкими учеными Х. Фёхтингом (1892), С. Рехингером (1893), Дж. Хаберландом (1902) были проведены опыты по стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Хотя положительные результаты отсутствовали, в их работах были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того времени и нашли свое подтверждение несколько десятилетий спустя.

Так, Х. Фёхтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. С. Рехингер определил минимальный размер сегмента, образующего каллус. Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5–2 мм клетки не делились. Дж. Хаберланд впервые четко сформулировал идеи о возможности культивирования *in vitro* изолированных клеток растений и о тотипотентности клеток, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовать свой потенциал развития (Загоскина Н.В. и др., 2009).

Первые успехи были получены в 1922 году американским ученым В. Роббинсом и немецким ученым В. Котте. Независимо друг от друга они показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Считается,

что их работы легли в основу метода культуры изолированных корней растений.

Настоящее развитие метода культуры тканей и клеток высших растений началось в 1932 году с работ французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта (Рис. 9). Ими были разработаны методы культивирования объектов.

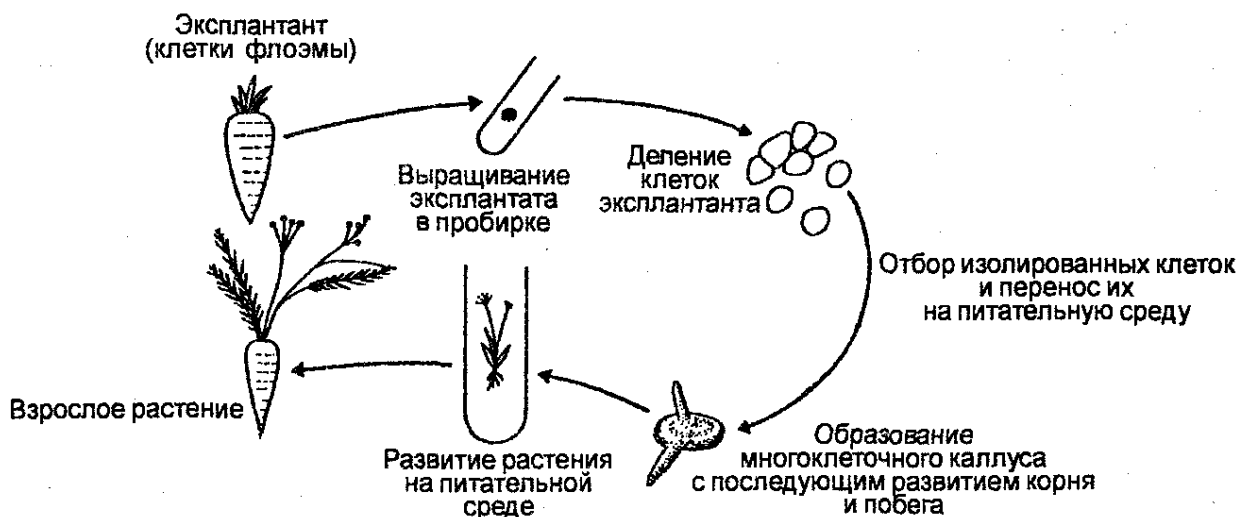


Рис. 9. Микрклональное размножение растений

Э.К. Коккинг разработал метод получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. В настоящее время изолированные протопласты применяются для изучения химии и структуры клеточной стенки (разрушение, синтез); изучения свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений; мягкого выделения органелл; наблюдения за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживания взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучения соматических гибридов; введения чужих органелл и чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).

Разработанный метод получения изолированных протопластов послужил толчком к получению соматических гибридов. В это же время Дж. Морел и Р.Г. Бутенко предложили метод клонального микроразмножения, который сразу же нашел широкое практическое применение. Важным достижением в развитии технологий культивирования

изолированных тканей и клеток стало культивирование одиночной клетки с помощью ткани-«няньки».

Этот метод был разработан в России в 1969 г. в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под руководством Р.Г. Бутенко. Достигнуты большие успехи в развитии методов получения трансгенных растений, технологий использования изолированных тканей и клеток. Широкое распространение получил метод трансплантации эмбрионов и создание гибридом. Интерес представляет также получение химерных животных.

4.2. Этапы получения гибридных клеток

Работа по получению гибридных клеток складывается из нескольких этапов. Слиянию клеток предшествует установление тесного контакта между плазматическими мембранами. Однако этому препятствует наличие поверхностного заряда на природных мембранах, обусловленного отрицательно заряженными группами белков и липидов. Деполяризация мембран переменным электрическим или магнитным полем, нейтрализация отрицательного заряда мембран с помощью катионов способствует слиянию клеток.

Для индукции слияния клеток используются вещества различной природы, ионы Ca^{2+} , полиэтиленгликоль, лизолецитин, моноолеат глицерина, лектины растений и антитела и др. Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, при этом получают протопласты.

Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу, применяя лизоцим (для бактериальных клеток), зимолиазу улитки (для клеток грибов), комплекс целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, продуцируемый грибами (для клеток растений). Затем проводят скрининг (отбор, сортировка) гибридных клеток, при этом используют различные подходы – учет фенотипических признаков; создание селективных условий, в которых выживают лишь гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

4.3. Возможности метода слияния клеток

Метод слияния отдельных соматических клеток открывает перед биотехнологией значительные перспективы. Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. Впервые зрелый межвидовой гибрид, полученный в результате парасексуальной гибридизации протопластов двух сортов табака (*Nicotiana glauca* с 24 хромосомами и *N. langsdorfii* с 18 хромосомами), описан Карлсоном в 1972 году. Каллус амфиплоидного гибрида мог расти на безгормональной среде. Гибридное растение цвело. С тех пор были получены жизнеспособные внутривидовые, межвидовые, межродовые гибриды. Путем слияния клеток растений получены плодовые фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом (эквивалентные природному рапсу), петунии. Первая попытка по созданию межродовых гибридов принадлежит Г. Мельхерсу, создавшему в 1978 году гибрид картофель + томат (томатофель).

Гибрид был стерилен, морфологически аномален: толстые корни, отсутствие типичных столонов, махровые цветки. Было еще несколько попыток получения таких гибридов, но все растения стерильны. Эти эксперименты показали ограниченность применения парасексуальной гибридизации для прикладной селекции.

Японскими исследователями путем электрослияния протопластов ячменя и риса был получен межродовой соматический гибрид. Протопласты риса получали из суспензионной культуры, а протопласты ячменя были изолированы из молодых листьев. Часть полученных каллусов сформировали зеленые участки и побеги. Только один побег сформировал корни, и это растение было успешно перенесено в почву. Оно по морфологии было близко к растениям риса. Цитологический анализ показал, что гибрид имел и маленькие хромосомы от риса, и большие от ячменя. Были проанализированы также митохондриальная и хлоропластная ДНК. Растение содержало новые последовательности и в митохондриальной, и в хлоропластной ДНК, которые не обнаруживались ни в одном из родителей. Имеются стерильные межтрибные гибриды арабидопсиса и турнепса, табака и картофеля, табака и белладонны, которые образуют морфологически ненормальные стебли и растения. Первые работы по получению межсемейственных гибридов проведены

К. Као и В. Веттером в 1976–1977 годах (soя + табак). Позднее в лаборатории Ю.Ю. Глебы провели аналогичные эксперименты: пасленовые + бобовые и лилейные (горошек + табак и лук + табак). И.Ф. Каневскому удалось индуцировать морфогенез стеблеподобных тератом в культуре межсемейственных гибридов *N. tabacum* + *Vicia faba*.

Практически во всех случаях наблюдалась видоспецифичная элиминация хромосом одного из родителей. В культурах межсемейственных гибридов наблюдалось много многоядерных клеток, клеток с мини-ядрами, в метафазах делений встречались гигантские хромосомы. Отмечена асинхронность в расхождении родительских хромосом в анафазе. Морфогенез у такого материала отмечен не был. Получены клеточные гибриды между представителями различных семейств, существующие, однако, лишь как неорганизованно растущие клетки (табака и гороха, табака и сои, табака и конских бобов). Получены межвидовые (*Saccharomyces uvarum* и *S. diastaticus*) и межродовые (*Kluveromyces lactis* и *S. cerevisiae*) гибриды дрожжей. Были получены межвидовые гибриды рапса с сурепицей: Крис (*Brassica napus*) × Золотистое (*Brassica rapa*) и Крис (*Brassica napus*) и Янтарное (*Brassica rapa*). Полученные дигаплоидные линии межвидовых гибридов используют для создания сортов, устойчивых к абиотическим факторам. Имеются данные о слиянии клеток различных видов грибов и бактерий. Проведены опыты по слиянию клеток лягушек и протопластов моркови. Гибридная растительно-животная клетка постепенно одевается клеточной стенкой и растет на средах, на которых культивируют растительные клетки, но ядро животной клетки быстро теряет свою активность. Получение асимметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильного деления клеток в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. Возможен прицельный перенос из клетки в клетку нужной хромосомы. Представляет интерес получение клеток, у которых гибридной является цитоплазма. Цитоплазматические гибриды образуются, когда после слияния клеток ядра сохраняют свою автономию и при последующем делении гибридной

клетки оказываются в разных дочерних клетках. Скрининг таких клеток проводится по генам-маркерам ядерного и цитоплазматического геномов. Клетки со слившейся цитоплазмой, но не ядрами, содержат ядерный геном одного из родителей и в то же время совмещают цитоплазматические гены слившихся клеток. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках. Получение гибридов путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут быть выращены растения (грибы) регенераты (растение, сформировавшееся в результате морфогенеза в культуре изолированных клеток или тканей растений). Гибридизация клеток, несущих различные программы развития. Слияние клеток различных тканей или органов, слияние нормальных клеток с клетками, программа развития которых изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получают гибридные клетки, или гибридомы, наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной клетки – способность к быстрому и неограниченному росту.

4.4. Гибридная технология

Получение гибридом на сегодняшний день – наиболее перспективное направление клеточной инженерии. Основная цель – обессмертить клетку, продуцирующую ценные вещества, путем слияния с раковой клеткой и клонирования полученной гибридной клеточной линии. Гибридомы – бессмертные клоны клеток лимфоидной ткани, синтезирующие моноклональные антитела. Гибридомы могут быть получены на основе клеток представителей различных царств живого. Слияние клеток растений с клетками растительных опухолей позволяет получить клоны быстрорастущих клеток-продуцентов нужных веществ. Многообразно применение гибридной технологии к животным клеткам, где с ее помощью планируется получение неограниченно размножающихся продуцентов гормонов и белковых факторов крови. Наибольшее практическое значение имеют гибридомы – продукты слияния клеток злокачественных опухолей иммунной системы (миелом) с нормальными клетками той же системы – лимфоцитами. Многие исследователи пытались отыскать способы получения антител с узкой

специфичностью, однако в большинстве случаев попытки были не-успешными. Решение проблемы было предложено в 1975 году английскими учеными Георгом Кёлером и Цезарем Мильштейном, которые в 1984 году получили за ее создание Нобелевскую премию.

Они разработали методику получения клеточных гибридов – гибридом (Рис.10). Гибридомы образуются в результате слияния лимфоцитов, взятых от иммунизированных животных, с клетками миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*.

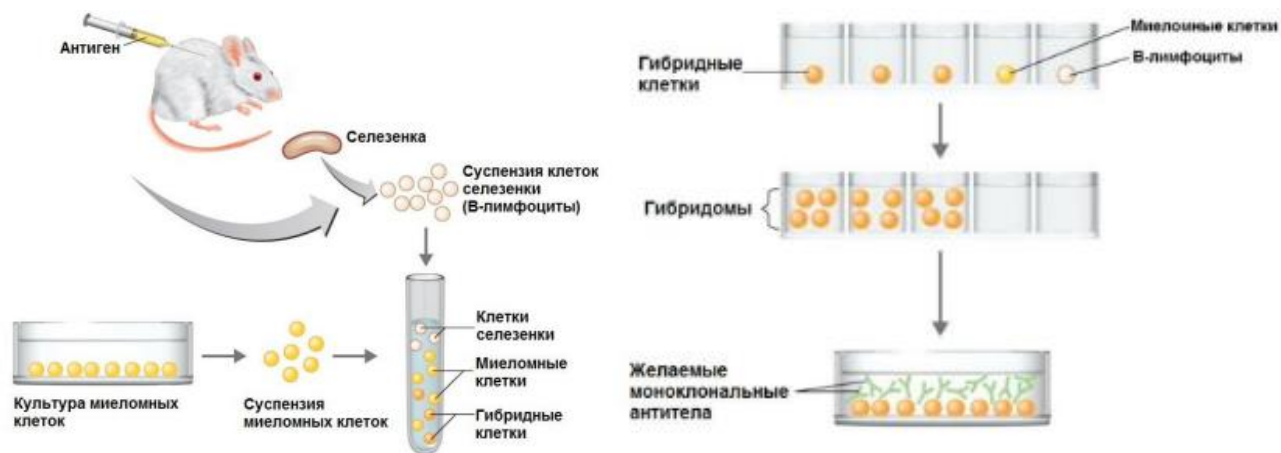


Рис. 10. Схема получения моноклональных антител

Животное иммунизируют, в ответ на введение антигена в организме мыши активизируются продуцирующие антитела В лимфоциты. Эти клетки могут жить только в организме хозяина, при переводе на искусственную питательную среду они гибнут. Если слить иммунную клетку с опухолевой, образуются гибридные клетки, способные неограниченно долго жить в искусственных средах. Одновременно они сохраняют способность синтезировать антитела. Гибридомы, синтезирующие определенные виды антител, отбирают на селективных ростовых средах. Затем их помещают в культуральную жидкость, в которой они размножаются и образуют родственные клетки (клон). Такие клоны могут синтезировать антитела, получившие название моноклональных (МкАт).

МкАт – антитела, однородные по структуре и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах. Другой метод получения антител основан на инъекции полученной гибридомы в брюшную полость мыши. Там гибридома реплицируется и вызывает

образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела. Клетки и белки, не относящиеся к МкАт, удаляются. Оставшийся материал, представленный преимущественно антителами, используют. Этот метод позволяет получать высококонцентрированные препараты антител. Но массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей. Кроме того, получаемый материал требует доочистки. Это дорого и трудоемко, поэтому в настоящее время предпочтение отдается первому способу, с использованием культуры клеток.

Предпосылками для возникновения метода получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела, были разработки двух методических подходов:

1) получение миелом, адаптация их к условиям культивирования вне организма

2) метод соматической гибридизации клеток.

У мышей можно легко получить миеломы. Эти опухоли являются потомками одной клетки, т. е. имеют моноклональное происхождение и секретируют уникальные иммуноглобулины, некоторые из них могут взаимодействовать с известными антигенами. Опухоли индуцируют у животных путем внутрибрюшного введения минеральных масел или инертного твердого пластика. Для возникновения миелом большое значение имеет генетический статус животного, и только у двух линий инбредных мышей экспериментаторам удалось получить такие опухоли.

Другой предпосылкой возникновения метода получения гибридом явилась техника гибридизации соматических клеток, разработка которой широко проводилась после открытия феномена спонтанной гибридизации. При слиянии плазматических мембран клеток образуются клетки с двумя или большим числом ядер – гетерокарионы.

После первого деления ядра сливаются и образуют одно ядро с набором хромосом от всех слившихся партнеров – образуется гибридная клетка. Одним из препятствий использования гибридной техники являлось то, что в гибридах синтезировались не только антитела клеток иммунной селезенки, но и иммуноглобулины родительской миеломной линии, а также гибридные молекулы, состоящие из полипептидных цепей, как миелом, так и селезенки. Эта проблема была преодолена путем

использования миеломных клеток, в которых отсутствовала экспрессия иммуноглобулинов.

Гибридная технология была с успехом использована и для получения гибридов опухолевых лимфоидных клеток с Т-лимфоцитами. Получены гибридомы с сохранением дифференцированных функций Т-лимфоцитов: Т-киллеры, Т-супрессоры, Тхелперы. Эти гибридомы синтезируют разнообразные иммунорегуляторные факторы, что позволяет выделять и исследовать их структуру. Получена и макрофагальная гибридома. Исследование этих гибридом внесло большой вклад в изучение закономерностей функционирования отдельных популяций Т-лимфоцитов и макрофагов.

Полностью процедура получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы:

1. Иммунизация животных.
2. Подготовка клеток к слиянию.
3. Слияние.
4. Отбор продуцирующих специфические антитела клонов.
5. Клонирование.
6. Реклонирование.
7. Массовая наработка гибридомных клеток.
8. Получение культуральной жидкости или асцита, содержание антитела.
9. Выделение этих антител.

Обычно вся процедура от момента начала иммунизации до выделения антител занимает 3–4 месяца. Первый шаг в процессе получения гибридной клеточной линии, продуцирующей антитела одного типа, состоит во введении мышам антигена. После ряда иммунизаций, проведенных в течение нескольких недель, проверяют, произошло ли развитие у животных иммунного ответа.

Если ответ развился, то животных умерщвляют, извлекают селезенку, промывают ее, измельчают и несильно встряхивают для высвобождения единичных клеток, среди которых находятся и антителопродуцирующие В-клетки.

Взвесь клеток селезенки смешивают со взвесью миеломных клеток, дефектных по гипоксантингуанин-фосфорибозил-трансферазе (ГГФРТ). Комбинированную взвесь в течение нескольких минут инку-

бируют в 35%-м полиэтиленгликоле, а затем переносят в среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда ГАТ). Обработка полиэтиленгликолем облегчает слияние клеток, тем не менее слияние происходит редко и является в достаточной степени случайным событием. В смеси присутствуют клетки миеломы, селезенки, а также слившиеся клетки миеломы-селезенки, миеломы-миеломы, селезенки-селезенки. Однако в среде ГАТ растут только гибридные клетки миеломы-селезенки, все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать.

Клетки селезенки и слившиеся клетки селезенки-селезенки вообще не растут в культуре, а миеломные клетки и слившиеся клетки миеломы-миеломы не могут использовать гипоксантин в качестве предшественника в процессе биосинтеза пуриновых оснований гуанина и аденина, без которых невозможен синтез нуклеиновых кислот. Но у них есть другой естественный путь синтеза пуринов – при участии дигидрофолатредуктазы, поэтому в состав среды и входит аминоптерин, ингибирующий активность этого фермента. Таким образом, миеломные клетки и слившиеся клетки миеломы-миеломы не могут синтезировать пурины в среде ГАТ и погибают.

Слившиеся клетки селезенки-миеломы растут в среде ГАТ, поскольку:

1) клетки селезенки поставляют функциональную ГГФРТ, которая может утилизировать экзогенный гипоксантин среды, несмотря на блокирование синтеза пуринов с участием дигидрофолатредуктазы аминоптеринном;

2) клетки миеломы способны активно делиться.

Тимидин необходим для устранения блокирования в синтезе пиримидинов, обусловленного ингибированием дигидрофолатредуктазы. На 10–14-е сутки после слияния клеток в среде ГАТ остаются и растут только слившиеся клетки селезенки-миеломы. Их затем вносят в лунки пластиковых микротитровальных плашек и выращивают на полной культуральной среде без ГАТ.

После отбора гибридных клеток, синтезирующих определенные антитела, можно приступить к их массовому наращиванию с целью получения больших количеств моноклональных антител. В начале культивирования гибридные клетки могут расти медленно и плохо переносить низкую плотность посева. В связи с этим при пересеве клеток

их надо разводить не более чем в 3–5 раз. Ускорению роста клеток может способствовать добавление клеток питающего слоя. Моноклональные антитела находят очень широкое применение, так как их основное преимущество – высокая специфичность.

Это связано с тем, что моноклональные антитела продуцируются одним лимфоцитом, который распознает лишь одну антигенную детерминанту, поэтому их широко используют, в том числе для диагностики и терапии различных заболеваний человека и животных. Например, антитела против опухолевых антигенов, сшитые с токсинами, могут быть применены для селективного убивания опухолевых клеток в организме человека. Однако употребление этих антител очень ограничено, так как при введении их в организм человека, особенно повторном, возникают реакции на гетерологический белок.

Поэтому желательно получать моноклональные антитела человека. Человек не может служить экспериментальной моделью, поэтому обычные способы получения антител, т. е. использовании активной иммунизации, невозможны. В связи с этим одним из направлений исследований является разработка способов иммунизации вне организма. Другой сложностью является сама техника получения стабильных антителообразующих линий клеток человека.

В настоящее время для получения моноклональных антител применяется несколько подходов:

- 1) обработка В-лимфоцитов человека вирусом Эпштейна – Барр;
- 2) гибридизация с миеломными клетками;
- 3) комбинация этих двух методов.

Вирус Эпштейна – Барр является лимфоцитотропным. Он проникает в клетки, адсорбируясь на рецепторе С3d компонента комплемента. Вирус трансформирует клетки, в результате чего у них появляется способность бесконечно размножаться в культуре, при этом сохраняется продукция иммуноглобулинов, преимущественно IgM класса.

Вероятно, наиболее перспективным подходом к получению моноклональных антител служит комбинация методов трансформации под действием вируса Эпштейна – Барр с соматической гибридизацией клеток. В будущем моноклональные антитела смогут заменить сложную антисыворотку для типирования тканей человека при выборе доноров для трансплантации органов. Эти антитела уже применяют для

изучения структуры антигенов главного комплекса гистосовместимости человека. МкАт можно использовать для более точного выявления типов антигенов при пересадке органов и тканей, чем меньше различаются антигены, тем меньше риск отторжения.

В вирусологии с помощью моноклональных антител строят карты молекулы гемагглютинина вируса гриппа. В подобных исследованиях установлена скорость мутации вируса гриппа при его культивировании *in vitro* в присутствии одного нейтрализующего моноклонального антитела. Этим моноклональным антителом опознавались только вирионы, у которых произошел мутагенез. В данных опытах для определения скорости мутации можно использовать частоту проявления зон роста вируса.

Эта работа важна для понимания генетических изменений вируса, происходящих в естественных популяциях. Наиболее широко используются моноклональные антитела в медицинской диагностике для постановки диагнозов. Если к антителам присоединить радиоактивные или магнитоактивные материалы и ввести их в живой организм, то можно выявить в нем патологические зоны. Такие МкАт присоединяются к пораженным болезнью клеткам организма, а соответствующие индикаторные материалы позволяют выяснить их местонахождение. МкАт используются и в процессах очистки веществ.

Современные технологии основаны на присоединении антител к твердой матрице носителя. К ним добавляют смесь молекул, содержащую искомый антиген. Затем комплексы антиген-антитело отмываются от примесей, не связанных с матрицей. После разрушения ковалентных связей антиген-антитело в растворе остаются свободные антигены.

Если получить антитела определенного типа и иммунизировать ими животное, то образуются анти-антитела (антиидиотипные антитела). Они действуют на иммунную систему как псевдоантиген и поэтому могут быть использованы для ее стимуляции. На этом принципе основано получение вакцин нового типа.

Наборы МкАт могут быть также предназначены для борьбы с аллергенами. Моноклональные антитела можно использовать как диагностические средства: тест на беременность, диагностика хламидиоза, стрептококковых инфекций горла, герпес первого (вызывает простудные поражения кожи на губах) и второго типа (вызывает генитальные

инфекции), лейкоза и лимфомы, рака легких, молочной железы, толстой и прямой кишок и др. Со временем МкАт можно будет использовать для лечения болезней. Благодаря способности моноклональных антител находить специфичные мишени и связываться с ними, например, с раковыми клетками, эти антитела стали называть волшебными пулями.

Если присоединить к антителу радиоактивный изотоп или токсическое химическое вещество, можно надеяться, что они разрушат клетку. Одна из проблем состоит в том, что антигены, наиболее характерные для раковых клеток, обнаружены также и в некоторых нормальных клетках, которые тоже должны будут погибнуть. Другая проблема состоит в том, что антитело связывается с поверхностью раковой клетки, а не проникает внутрь ее, чтобы доставить токсин по назначению.

Тем не менее в этом направлении есть уже некоторый прогресс. МкАт более эффективно, чем лекарства, подавляют иммунную систему. Они подавляют только Т-клетки, а не всю систему, как это делают медикаменты, и, таким образом, у больного сохраняется способность противостоять болезни. Эту способность МкАт можно использовать при трансплантации органов и тканей. Сегодня более 20% разрабатываемых биофармацевтических препаратов являются продуктами гибридной технологии. Названия всех моноклональных антител заканчиваются на *maб*. Если антитело получено от мыши – добавляют букву «о», и окончание у таких антител – *omaб*, химерные антитела – *ximaб*, гуманизированные – *zumaб*, полностью человеческие – *umaб*. Наиболее изученными препаратами на основе МкАт являются «Герцептин», «Ритуксимаб» («Мабтера»), «Алемтузумаб», «Бевацизумаб», «Ремикейд» и др.

4.5. Клонирование животных

В основе эволюции лежит механизм полового размножения, который направлен на поддержание необходимого генетического разнообразия в популяции животных. В то же время половой процесс, обеспечивая для сохранения и эволюции популяции генетическое разнообразие, препятствует точному воспроизведению генетически ценных животных, создаваемых в результате длительной селекционной работы. Такие животные не всегда передают своим потомкам все свои ценные

генетические комбинации, поэтому в селекции возникла проблема разработки метода получения потомков, которые были бы точной копией своих выдающихся родителей, т. е. их клонами. Все клетки организма животного несут одинаковую генетическую информацию. Однако в процессе морфогенеза соматические клетки дифференцируются, в результате чего часть генома репрессируется. Чем выше уровень специализации клеток, тем меньше их тотипотентность. Эта закономерность была установлена в экспериментах по пересадке ядер.

Впервые трансплантацию ядер соматических клеток зародышей в энуклеированные клетки лягушки осуществили американские исследователи Р. Бриггс и Т. Кинг в 1952 году.

Ученые, пользуясь микропипеткой, удаляли ядра из яйцеклеток шпорцевой лягушки, а вместо них пересаживали ядра клеток эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития. Проведенные исследования показали, что ядра ранних эмбрионов в стадии поздней бластулы и даже ранней гаструлы обладают тотипотентностью и обеспечивают нормальное развитие эмбрионов (рис.11).

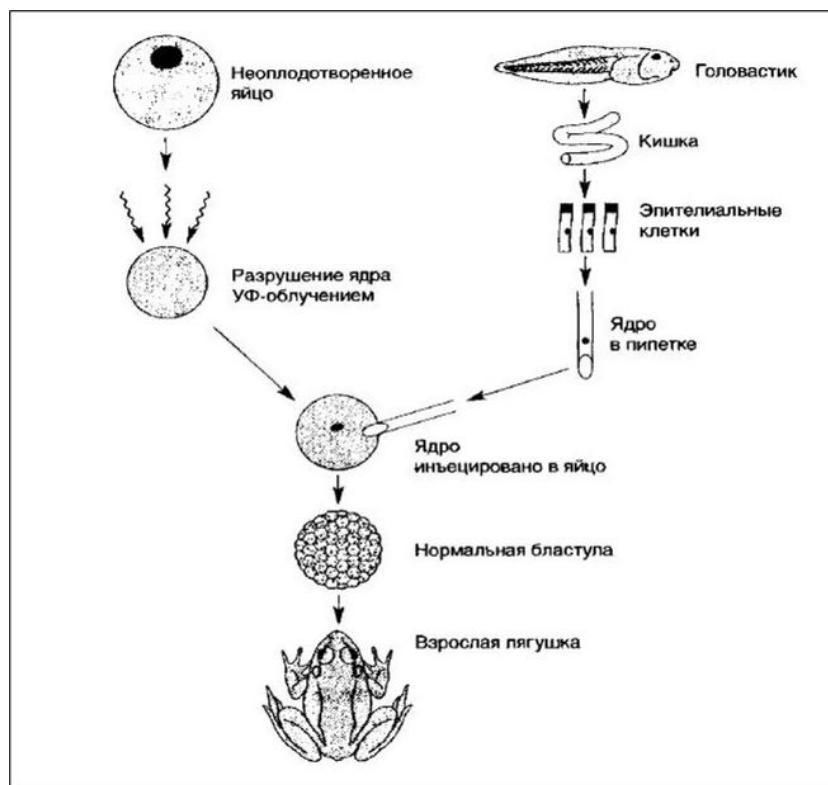


Рис.11. Реконструкция яйцеклеток животных

Более широкие исследования, охватывающие не только амфибий, но и рыб, а также дрозофил, в 1962 году были начаты английским биологом Дж. Гердоном. Он первым в опытах с южноафриканскими жабами (*Xenopus laevis*) в качестве донора ядер использовал не зародышевые клетки, а клетки эпителия кишечника плавающего головастика.

Ядра яйцеклеток реципиентов он не удалял хирургическим путем, а разрушал ультрафиолетовыми лучами. В большинстве случаев реконструированные яйцеклетки не развивались, но примерно десятая часть их них образовывала эмбрионы, 6,5% из этих эмбрионов достигали стадии бластулы, 2,5% – стадии головастика, и только 1% развился в половозрелых особей. Однако появление нескольких взрослых особей в таких условиях могло быть связано с тем, что среди клеток эпителия кишечника развивающегося головастика довольно длительное время присутствуют первичные половые клетки, ядра которых могли быть использованы для пересадки. В последующих работах как сам автор, так и многие другие исследователи не смогли подтвердить данные этих первых опытов.

Позже Дж. Гердон модифицировал эксперимент. Поскольку большинство реконструированных яйцеклеток (с ядром клетки кишечного эпителия) погибают до завершения стадии гастролы, он попробовал извлечь из них ядра на стадии бластулы и снова пересадить их в новые энуклеированные яйцеклетки (такая процедура называется серийной пересадкой в отличие от первичной пересадки). Число зародышей с нормальным развитием после этого увеличивалось, и они развивались до более поздних стадий по сравнению с зародышами, полученными в результате первичной пересадки ядер. Затем Гердон и Ласки (1970) культивировали *in vitro* клетки почки, легкого и кожи взрослых животных и использовали уже эти клетки в качестве доноров ядер. Примерно 25% первично реконструированных яйцеклеток развивались до стадии бластулы. При серийных пересадках они развивались до стадии плавающего головастика. Таким образом, было показано, что клетки трех разных тканей взрослого позвоночного (*X. laevis*) содержат ядра, которые могут обеспечить развитие, по крайней мере, до стадии головастика.

В свою очередь, другими учеными были использованы для трансплантации ядра неделящихся и полностью дифференцированных кле-

ток крови – эритроцитов лягушки *Rana pipiens*. После серийной пересадки таких ядер 10% реконструированных яйцеклеток достигали стадии плавающего головастика. Эти эксперименты показали, что некоторые ядра соматических клеток способны сохранять тотипотентность.

В 1985 году была описана технология клонирования костных рыб, разработанная советскими учеными Л.А. Слепцовой, Н.В. Дабагян и К.Г. Газарян. Пересадки ядер у млекопитающих начались позднее, в 80-х годах XX века. Это было связано с техническими трудностями, так как зигота млекопитающих имеет небольшие размеры. Например, диаметр зиготы мыши приблизительно 60 мкм, а диаметр оплодотворенной яйцеклетки лягушки – около 1 200 мкм, т. е. в 20 раз больше. Зигота коровы несколько крупнее, чем зигота мыши, диаметр ее составляет 160 мкм, но пронуклеусы скрыты яичным желтком, поэтому перед микроманипуляциями необходима специальная обработка зигот.

Несмотря на перечисленные трудности, первые сообщения о получении клонов мышей, идентичных донору, появились уже в 1981 году. В качестве донора были использованы эмбриональные клетки одной из линий мышей, взятые на стадии бластоцисты. Достоверность полученных данных вначале была поставлена под сомнение, так как воспроизвести результаты проведенных экспериментов в других лабораториях не удавалось, однако пару лет спустя Дж. Мак Грат и Д. Солтер также достигли успеха.

В этих экспериментах клоны мышей удавалось получить лишь в том случае, если трансплантировали ядра эмбрионов на стадии не позднее двух бластомеров. Было показано, что ядра 8-клеточных зародышей и клеток внутренней клеточной массы бластоцисты не обеспечивают развитие *in vitro* реконструированных яйцеклеток даже до стадии морулы, которая предшествует стадии бластоцисты.

Небольшая часть (5%) ядер 4-клеточных зародышей дает возможность развиваться только до стадии морулы. Эти и многие другие данные показывают, что в эмбриогенезе у мышей клеточные ядра рано теряют тотипотентность, что связано, очевидно, с очень ранней активацией генома зародыша – уже на стадии двух клеток. У других млекопитающих, в частности у кроликов, овец и крупного рогатого скота, активация первой группы генов в эмбриогенезе происходит позднее, на 8–16-клеточной стадии. Возможно, поэтому первые значительные успехи в клонировании эмбрионов были достигнуты на других видах

млекопитающих, а не на мышах. Тем не менее работы с мышами, несмотря на их непростую судьбу, значительно расширили наши представления о методологии клонирования млекопитающих.

4.6. Клонирование млекопитающих

Американские исследователи С. Стик и Дж. Робл, используя методику Мак Грата и Д. Солтера, в 1988 году получили шесть живых кроликов, пересадив ядра восьми клеточных эмбрионов одной породы в лишенные ядер яйцеклетки кроликов другой породы. Фенотип родившихся крольчат полностью соответствовал фенотипу донора.

В этих экспериментах только шесть из 164 реконструированных яйцеклеток (3,7%) развились в нормальных животных. Ценность этой работы тем не менее в том, что она показала возможность клонирования эмбрионов кроликов. Первые успешные эксперименты по клонированию сельскохозяйственных животных были проведены С. Уилладсином (S. Willadsen) в 1986 году. Он сливал безъядерные яйцеклетки с бластомерами, выделенными из 8- и 16-клеточного эмбриона овцы.

Дж. Робл и его сотрудники в 1987 году провели работы по пересадке ядер крупного рогатого скота. Они пересаживали в зиготы карิโอпласты – мужской и женский пронуклеусы вместе с окружающей их цитоплазмой, а также ядра 2-, 4- или 8-клеточных эмбрионов коровы. Реконструированные зародыши были заключены в агаровый цилиндр и пересажены в перевязанный яйцевод овцы. Через пять дней культивирования их вымывали, освобождали от агара и исследовали.

Реконструированные зародыши в этой работе развивались только в тех случаях, когда в зиготы пересаживали пронуклеусы: 17% таких зародышей достигли стадии морулы или бластоцисты. Два зародыша были пересажены второму реципиенту – в матку коровы, и развитие их завершилось рождением живых телят.

Если в качестве доноров использовали ядра 2-, 4- или 8-клеточных зародышей, то реконструированные яйцеклетки не развивались даже до стадии морулы. Позже были и более успешные работы. С. Уилладсин, в частности, сообщил, что ему удалось получить четырех генетически идентичных бычков в результате пересадки в реципиентные яйцеклетки ядер бластомеров одного 32-клеточного зародыша.

Автор утверждал, что большинство ядер сохраняет тотипотентность на 32-клеточной стадии, а значительная их часть даже на 64-клеточной стадии, обеспечивая нормальное развитие реконструированных яйцеклеток до стадии ранней бластоцисты в яйцевом овцы. После пересадки в матку коров – окончательных реципиентов, как полагает автор, они могут и дальше нормально развиваться. К. Бондиоли и соавторы, используя в качестве доноров ядер 16–64-клеточные зародыши коров, трансплантировали 463 реконструированных зародыша в матку синхронизированных реципиентов, и было получено 92 живых теленка. Семь из них были генетически идентичны, представляя собой клон, полученный в результате пересадки ядер клеток одного донорского эмбриона. Таким образом, клеточные ядра зародышей крупного рогатого скота достаточно долго сохраняют тотипотентность и могут обеспечить полное развитие реконструированных яйцеклеток.

Иначе говоря, методические трудности клонирования зародышей крупного рогатого скота практически решены. Экспериментов по клонированию свиней немного. Успешные исследования провели Р. Прайтер с сотрудниками в 1989 году. Скудность данных, видимо, связана с определенными трудностями работы с этим объектом. В 1993–1995 годах группа исследователей под руководством Йена Вилмута (Ian Wilmut) из Рослинского института получила клон овец – 5 идентичных животных, донорами ядер которых была культура эмбриональных клеток. Эта работа, особенно в части культуры эмбриональных клеток, – значительное достижение в клонировании млекопитающих, хотя она и не вызвала столь шумного интереса, как статья того же Й. Вилмута с соавторами, опубликованная в начале 1997 года, где сообщалось, что в результате использования донорского ядра клетки молочной железы овцы было получено клональное животное – овца по кличке Долли. Последняя работа методически во многом повторяет предыдущее исследование 1996 года, но в ней ученые использовали эмбриональные и фибробластоподобные клетки плода и клетки молочной железы взрослой овцы. Овца по кличке Долли развилась из реконструированной яйцеклетки, донором ядра которой была культивируемая клетка молочной железы овцы породы финн дорсет. По фенотипу Долли не отличалась от овец этой породы, но сильно отличалась от овцы-реципиента. Анализ генетических маркеров подтвердил этот результат.

В августе 1997 года появилось сообщение о том, что Алан Троунсон (Австралия) разработал технологию, которая позволяет сформировать эмбрион из 16, 32 или 64 клеток, и затем каждая из них может использоваться для формирования 16, 32 или 64 идентичных эмбрионов. Коллектив исследователей во главе с Аланом Троунсоном создал 470 генетически идентичных эмбрионов рогатого скота от единственной бластоцисты. Такая технология обеспечивает безграничный источник генетического материала для клонирования. В настоящее время выделяют два вида клонирования: репродуктивное и терапевтическое. В результате репродуктивного клонирования образуется новый целостный организм, который является генетической копией другого организма, – клон (рис.12). Терапевтическое клонирование – это технология клонирования с целью получения эмбриональных стволовых клеток для научных исследований и использования в терапии различных заболеваний человека. В процессе терапевтического клонирования эмбрион не переносится для дальнейшего развития в полость матки, а используется в качестве объекта научных исследований и получения стволовых клеток. Несмотря на отсутствие немедленных практических результатов сделанного открытия, теоретическую значимость его трудно переоценить. Впервые было доказано, что гены запрограммированы обратимо. Дальнейшие исследования могут позволить понять, как регулируется работа генов, дифференциация клеток, почему клетки в одних случаях растут и размножаются управляемо, а в других (при раке) – неконтролируемо.

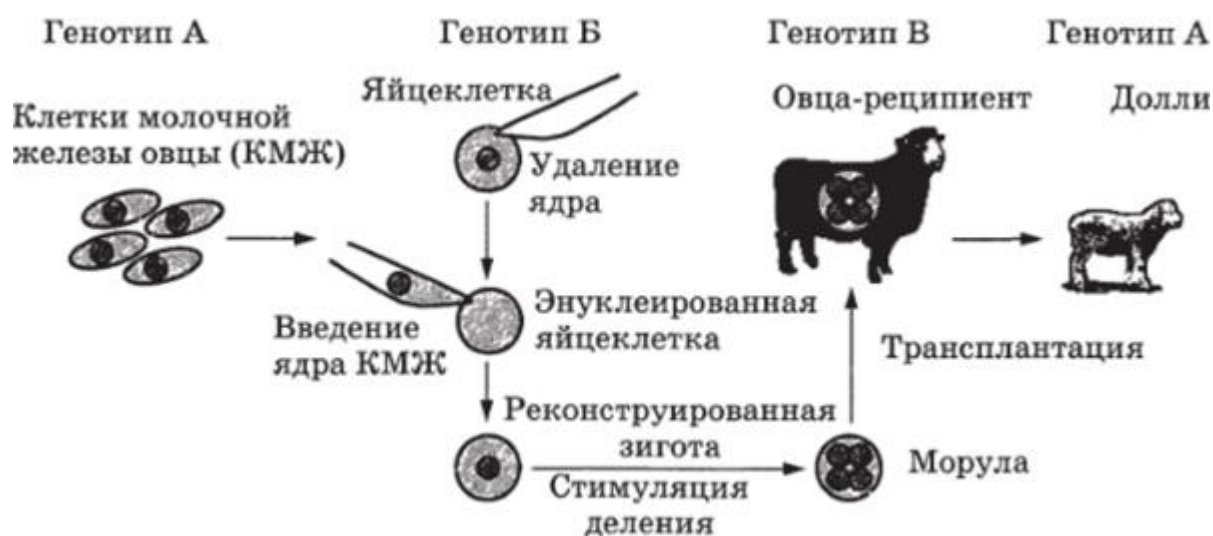


Рис.12. Схема клонирования

4.7. Методы трансплантации ядер

В нашей стране Б.В. Конюховым и Е.С. Платоновым в 1985 году был разработан метод переноса ядер методом микроманипуляции. Он протекает в два этапа: сначала тонкой микропипеткой прокалывают зоны пеллюцида и плазматической мембраны и извлекают пронуклеусы, а затем другой пипеткой большего диаметра (12 мкм) в то же отверстие вводят диплоидное ядро донора. В этом случае меньше травмируется цитоплазма зиготы и транспортируемое ядро донора. Трансплантация ядер может осуществляться и другим способом, с использованием цитохалазинов (веществ, синтезируемых грибами).

Цитохалазин разрушает структуру микрофиламентов и способствует уникальному расположению ядра, которое остается соединенным с клеткой тоненьким стебельком цитоплазмы. При центрифугировании этот мостик разрывается, образуются безъядерные клетки (цитопласты) и кариопласты, представляющие собой ядра, окруженные тонким слоем цитоплазмы и цитоплазматической мембраной. Цитопласты отделяют от интактных клеток в градиенте плотности. Они сохраняют способность прикрепляться к поверхности культурального сосуда и могут быть использованы для слияния с кариопластами других клеток с целью получения жизнеспособной клетки.

Методы выделения кариопластов несколько сложнее и включают в себя ряд операций по центрифугированию, разделению в градиенте плотности и т. д. В некоторых случаях к смеси клеток и кариопластов добавляют частицы тантала диаметром 1–3 мкм. Они проникают в клетки и никогда в кариопласт, поэтому более тяжелые клетки осаждаются быстрее кариопластов. Цитопласты содержат все виды органелл, присущие нормальной клетке, сохраняют способность прикрепляться к субстрату, образовывать складчатую мембрану, передвигаться, осуществлять пиноцитоз. Кариопласты окружены тонким слоем цитоплазмы (около 10% от всей клеточной цитоплазмы), содержат компактный эндоплазматический ретикулум, несколько митохондрий и рибосом.

Для реконструкции клеток суспензию кариопластов в солевом буфере добавляют к монослою культуры цитопластов, из пропорции сто кариопластов на один цитопласт. Инкубируют и отмывают раствором Эрла для удаления неслившихся кариопластов. Дальнейший прогресс

человечества во многом связан с развитием клеточной и генетической инженерии. Вместе с тем необходимо помнить, что неконтролируемое распространение генно-инженерных живых организмов и продуктов может нарушить биологический баланс в природе.

4.8. Эмбриотрансферы

Ускорение темпов селекции сельскохозяйственных животных в значительной степени зависит от возможности использования мирового фонда генетических ресурсов. Использование мирового генофонда является задачей большой народно-хозяйственной значимости. Эта работа началась с экспорта импорта животных, затем большее значение приобрел экспорт импорт спермы, что позволило сделать этот процесс более оперативным и экономически обоснованным.

В настоящее время открылась возможность обмена генетическими ресурсами путем экспорта импорта ранних эмбрионов. Этот метод имеет ряд преимуществ, которые состоят в следующем:

- вероятность заражения заболеваниями значительно меньше;
- быстрота реализации ожидаемых потенциальных качеств выдающихся животных.

Наиболее приемлемы для трансплантации эмбрионов малопродуктивные виды животных – коровы, лошади, овцы. В основе метода заключена возможность лабораторного манипулирования со сперматозоидами, яйцеклетками и эмбрионами. При трансплантации эмбрионов взаимодействуют четыре биологические системы (самец, самка-донор, самка-реципиент и эмбрион-плод-новорожденный). А это обуславливает взаимодействие четырех генотипов со своими индивидуальными иммунными системами. Биологические предпосылки метода основаны на способности предимплантационного эмбриона некоторое время сохранять жизнеспособность вне организма матери и физиологических особенностях самок, характеризующихся иммунологической толерантностью слизистых матки после овуляции.

Трансплантацию эмбрионов в молочном скотоводстве проводят с целью увеличения молочной продуктивности стада. На начальном этапе проводят отбор коров-доноров эмбрионов, при этом руковод-

ствуются комплексом селекционных признаков: породность, экстерьер, конституция, морфофункциональные свойства вымени, легкость отелов, жизнеспособность приплода, продуктивность и др.

Предпочтение отдают животным с длительным сроком использования, высокой молочной продуктивностью. В качестве реципиентов можно использовать коров и телок клинически здоровых, без признаков нарушения обмена веществ, с отелами без осложнений, хорошо выраженной охотой. Минимальный возраст телок 16–18 месяцев, с живым весом 350–380 кг. Проведение суперовуляции у доноров. Для проведения мероприятий, направленных на получение эмбрионов, необходимо подготовить животных к осеменению.

Гормональную обработку доноров начинают не ранее 60-го дня после отела. Обычно ее проводят после 2–3 эстральных циклов. Стимуляция и синхронизация охоты осуществляется с помощью прогестерона – женского полового гормона стероидной природы, регулирующего ход эстрального цикла, простагландинов, а также их комбинации. Этот прием позволяет вызывать появление охоты у групп племенных животных в один и тот же период времени.

Существует несколько схем **вызывания суперовуляции** у коров и телок-доноров эмбрионов. Осеменение доноров проводят через 48–54 часа после введения простагландина. Доноров осеменяют 3–4 раза с интервалом 10–12 часов. Для осеменения применяют нативную или криоконсервированную сперму. Эффективность нативной спермы выше, чем криоконсервированной. День первого осеменения донора считается датой оплодотворения. С этого периода следят за развитием эмбрионов и определяют время их извлечения.

Извлечение эмбрионов проводят на 7–8-й день после первого осеменения. Существует два способа извлечения эмбрионов – хирургический и нехирургический. До 70-х годов XX века извлечение производили в основном хирургическим путем, впоследствии он был заменен менее травматичным и трудоемким нехирургическим, основанным на введении в матку особого зонда по естественному каналу.

Перед **пересадкой** реципиенту необходимо оценить качество эмбриона, определить способ его пересадки. Оценивают эмбрионы различными методами:

морфологическая оценка (оценка формы зиготы, состояние зоны пеллюцида, число бластомеров, равномерность дробления, выраженность эмбриобласта и трофобласта);

прижизненное окрашивание (используют флюоресцентную окраску, позволяющую отличить живые эмбрионы от погибших);

интенсивность развития;

культивирование эмбриона;

контроль обмена веществ эмбриона;

цитологический;

комплексный.

Полноценные эмбрионы должны иметь шарообразную форму, неповрежденную прозрачную оболочку, одинаковые бластомеры с четкой плазматической оболочкой и светлую гомогенную цитоплазму.

При оценке качества эмбриона в нашей стране принята 5-балльная шкала с учетом следующих показателей: соответствие стадии развития эмбриона его возрасту; правильность формы прозрачной оболочки и ее целостность; равномерность дробления бластомеров, состояние цитоплазмы; прозрачность перивителлинового пространства.

После оценки пригодные эмбрионы трижды промывают стерильным 20% раствором ФС (фетальная сыворотка), ФСБ (фосфатносолевой буфер Дюльбекко). Эти операции проводят последовательно, пересаживая эмбрионы из капли в каплю.

Интервал времени между получением зародыша и началом следующего технологического этапа (краткосрочного хранения, криоконсервации) не должен превышать двух часов. Краткосрочное хранение целесообразно, если рассинхронизация между стадией развития эмбриона и половым циклом реципиентов не превышает 1,5 суток.

В остальных случаях применяют криоконсервацию. Порядок заправки эмбриона в пайетту для замораживания приведен на рисунке 13.

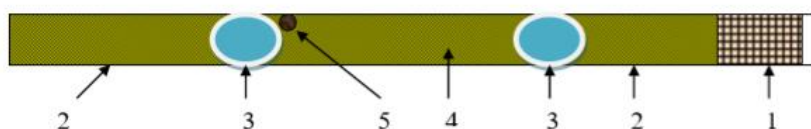


Рис. 13. Порядок заправки эмбриона в пайетту для замораживания: 1 – пробка пайетты; 2 – 0,75 М раствор сахарозы; 3 – воздушный пузырек; 4 – 1 М раствор глицерина в 20% растворе ФС и ФСБ; 5 – эмбрион

Трансплантация эмбрионов в настоящее время является одной из наиболее актуальных проблем в области животноводства. С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить выход числа потомков от высокопродуктивных коров. Применение этого метода также упрощает обмен генофондом сельскохозяйственных животных между странами и континентами. Пересадка эмбрионов может быть использована для получения потомства от ценных, но бесплодных коров, утративших способность к размножению в результате несчастного случая, болезни или по возрасту. Таким образом, в данной теме была изучена краткая история предмета, этапы получения гибридных клеток. Определены возможности метода слияния клеток, клонирования животных, трансплантации эмбрионов. Основные термины и понятия: рестриктаза, химера, клон, гибридома, миеломная клетка, лимфоцит, бластомера, бластоциста, криоконсервация, эмбрион, энуклеированная зигота, пронуклеус, партеногенез, гиногенез, андрогенез.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите этапы получения гибридных клеток.
2. Какие возможности открывает метод слияния клеток филогенетически отдаленных форм живого?
3. Перечислите этапы работы при получении моноклональных антител.
4. Почему в среде ГАТ растут только гибридные клетки миеломы-селезенки, а все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать?
5. Назовите подходы, применяемые в настоящее время для получения моноклональных антител.
6. Кем и когда был разработан метод переноса ядер методом микроманипуляции?
7. Расскажите о предъявляемых требованиях к коровам-донорам при отборе.
8. Назовите способы оценки эмбрионов.
9. Расскажите о способах извлечения эмбрионов.
10. Возможно ли получение химер от объединения частей эмбрионов разных видов? Есть ли успехи в этой области клеточной инженерии?

Глава 5. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

5.1. Представление о нанотехнологиях

В настоящее время происходит формирование и развитие нового научного направления – нанотехнологии. Это вызвано переходом от изучения макрообъектов к изучению частиц размером 1–10 нм.

Нано (от греч. *nanos* – карлик) означает одну миллиардную долю какой-либо единицы измерения. На многих объектах показано, что такие малые размеры частиц приводят к качественным изменениям их физико-химических свойств и получаемых на их основе систем. В них значительно возрастает доля поверхностных атомов и молекул, что и влияет на свойства (электрические, магнитные, механические) такой частицы в целом. Иногда наноматериалы могут приобретать совершенно новые качества. Все это может означать, что наноразмерные объекты имеют такие свойства и особенности строения, которые выделяют их как независимую часть природы, промежуточную между микро- и макромиром. Поэтому нанотехнология как научное направление носит междисциплинарный характер и в одинаковой степени зависит от достижений физики, химии и биологии.

Размеры нанообъектов – миллиардные доли метра, например, размер атомов по порядку величины равен 0,1 нм; длины валентных связей и расстояния между атомами в кристаллических решетках – того же порядка; диаметр двуспиральной молекулы ДНК – 2 нм; толщина клеточной мембраны – 6–10 нм; размеры вирусов – от 20 до 300 нм; характерные размеры молекул белков – от 10 до 100 нм. Минимальный размер углеродных нанотрубок, синтезированных в настоящее время, составляет 0,4 нм. Нижняя граница объектов, которыми занимается нанотехнология, определяется радиусом атома порядка 0,1 нм, верхняя – размерами до 0,1 мкм (100 нм), т. е. размерами молекул, при которых утрачивается специфика свойств и поведения наночастиц.

Таким образом, нанотехнологии – это совокупность научных знаний, способов и средств, направленных на регулируемую сборку (синтез) из отдельных атомов и молекул разных веществ, материалов с линейным размером структурных элементов до 1 нм (миллиардная доля метра). Кроме того, нанотехнологии – это и методы управления нано-

частицами, в результате применения которых создаются новые способы обработки, изготовления, изменения состояния, свойств, формы сырья, материала или полуфабриката.

История использования нанотехнологии уходит корнями в глубокую древность: например, в Древнем Египте смешивали сажу с водой для изготовления чернил, скифы применяли магнитную жидкость Fe_3O_4 (магнетит (магнитный железняк), нанокристаллы размером 42–45 нм, черного цвета) в виде красок. Опалесцирующие красные и рубиново-красные стекла Древнего Египта, Рима и витражей Средневековья можно также считать исторически первыми наноматериалами.

Первое упоминание о методах построения любых материальных объектов «атом за атомом» прозвучало в 1959 году в докладе на тему «Там, внизу, еще много места», сделанного американским физиком-теоретиком, лауреатом Нобелевской премии Р.Ф. Фейнманом на ежегодном собрании Американского физического общества. Он говорил о том, что существует «поразительно сложный мир малых форм, когда-нибудь (например, в 2000 г.) люди будут удивляться тому, что до 1960 года никто не относился серьезно к исследованиям этого мира». Но только в последние несколько лет предположения Фейнмана приблизились к реальности. Научные исследования в области нанотехнологии признаны приоритетными во всем мире.

Основные усилия ученых сконцентрированы на уменьшении размеров вычислительных устройств, создании механических устройств субмикронных размеров (электрических двигателей, трансмиссий и т. д.) и синтезе наноструктур химическими методами.

5.2. Достижения нанотехнологии в медицине и биологии

Отрасль нанотехнологий и наноматериалов находит широкое применение в медицине. На сегодняшний день они применяются практически во всех ее отраслях, и особенно широко в генетике, гематологии, гигиене, токсикологии, микробиологии. Современные приложения нанотехнологий в медицине можно подразделить на несколько групп:

- 1) наноструктурированные материалы, в том числе поверхности с нанорельефом, мембраны с нанотверстиями;
- 2) наночастицы (в том числе фуллерены и дендримеры);
- 3) микро- и нанокапсулы;

- 4) нанотехнологические сенсоры и анализаторы;
- 5) наноинструменты и наноманипуляторы;
- 6) микро- и наноустройства различной степени автономности.

Продукты нанотехнологий используют в диагностике, мониторинге, при создании биосенсоров и сорбентов, а также в качестве протезов, имплантатов, искусственных органов чувств. В хирургии находят применение микро- и наноустройства различной степени автономности, зондовые микроскопы, наноинструменты и наноманипуляторы, в дерматологии – солнцезащитные кремы. Наночастицы предполагается использовать как лекарственные препараты нового поколения, а также как контейнеры для адресной доставки лекарств в клетки-мишени (рис. 14), например, лекарство можно сделать из порошка, состоящего из наночастиц с особыми свойствами. Эти частицы будут проскакивать через стенку сосуда или кишечную стенку и попадать к месту назначения быстрее, что сделает лечение более эффективным. Можно, посадив наночастицу на лекарство, превратить его в средство направленного действия, заставить садиться на ту ткань, которую необходимо разрушить (к примеру, опухоль) или, наоборот, защитить (например, сердце, печень). Таким образом, наночастицы позволят врачам доставлять лекарство точно к проблемному участку, увеличивая тем самым эффективность лечения и минимизируя побочные эффекты. Применение наночастиц открывает также новые возможности для контролируемого вывода терапевтических веществ. Мембраны с нанопорами могут применяться для фильтрации жидкостей организма от вредных веществ и вирусов, а миниатюрные капсулы с нанопорами – для доставки лекарственных средств в нужное место организма. Это дает возможность помещать в капсулы, например, инсулинпродуцирующие клетки животного, которые иначе были бы отторгнуты организмом. Фуллереновые наносферы C₆₀ можно подобрать таким образом, чтобы связываться с заранее выбранными биологическими мишенями.

Аддукт фуллерена с поливинилпирролидоном (ПВП) – это хорошо растворимое в воде соединение, а полости в его структуре близки по размерам молекулам C₆₀. Полости легко заполняются молекулами фуллерена, в результате получается продукт с высокой антивирусной активностью, превышающей таковую у ремантадина.

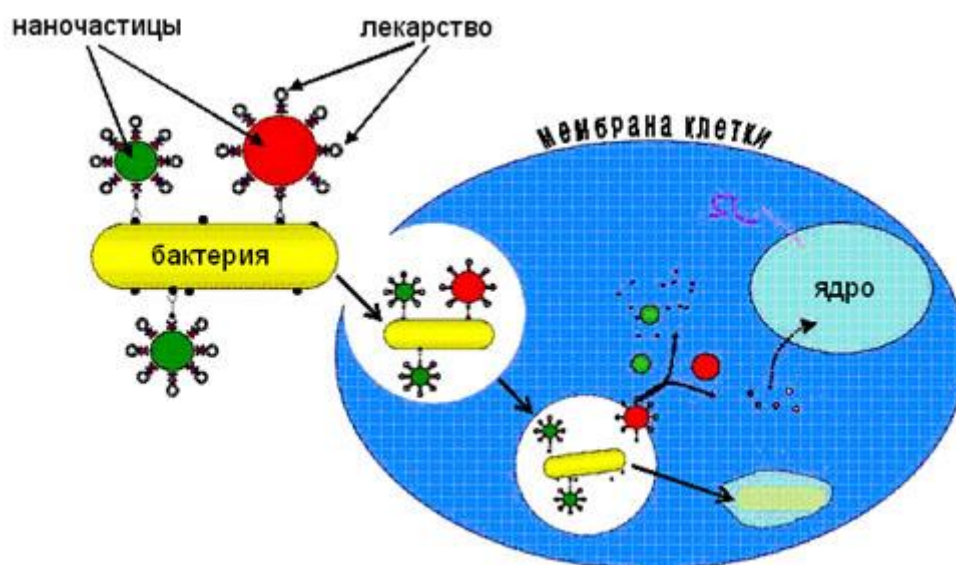


Рис. 14. Доставка наночастиц с лекарствами с помощью бактерии

Микроскопические капсулы имеют простую конструкцию, но могут взять на себя также дублирование и расширение естественных возможностей организма, как респироцит – искусственный носитель кислорода и двуокиси углерода, значительно превосходящий по своим возможностям и эритроциты крови, и существующие кровезаменители. Наносферы применимы и в диагностике, например, в качестве рентген-контрастного вещества, прикрепляющегося к поверхности определенных клеток и показывающего их расположение в организме. Кроме того, с помощью нанотехнологий можно определять даже одну молекулу какого-то вещества, к примеру, антитела или вируса.

Это гарантирует высокую точность проведения диагностики, ее массовость и одновременное определение нескольких (иногда десятков) компонентов, когда за один раз можно сделать много анализов.

Диагностика с применением нанотехнологии поможет врачам идентифицировать заболевание на ранней стадии, благодаря этому лечение будет максимально эффективным. Применяются нанотехнологии и в решении проблем регенеративной медицины. В этом случае материалы с наноструктурированной поверхностью и предварительно заданными свойствами могут быть использованы для замены поврежденных тканей.

Клетки организма опознают такие материалы как свои и прикрепляются к их поверхности. Преимуществами таких препаратов являются

хорошая переносимость, отсутствие побочных эффектов, доступность и низкая цена. В настоящее время достигнуты успехи в изготовлении наноматериалов, имитирующих естественную костную ткань. Нанокость применяется в ортопедии, нейрохирургии, отоларингологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, в том числе в качестве имплантатов для возмещения больших краниальных дефектов. Представляет интерес и разработка наноматериалов, которые, наоборот, не позволяют клеткам прикрепляться к поверхности. Одной из сфер применения таких материалов может стать изготовление биореакторов для выращивания стволовых клеток.

Наночастицы могут использоваться для стимулирования врожденных механизмов регенерации. Основное внимание при этом сосредоточено на искусственной активации и управлении взрослыми стволовыми клетками. Таким образом, применение материалов с наноразмерной структурой поверхности для управления процессами пролиферации и дифференциации стволовых клеток представляет собой огромное поле для исследований, в том числе и в области создания искусственных органов. Ученым предоставлена возможность создания принципиально новых типов перевязочных и клейких материалов с антимикробной, противовирусной и противовоспалительной активностью, дезинфектантов и антисептиков. Например, получены материалы с наночастицами серебра, обладающие антибактериальными свойствами. Они применимы в медицине (в виде красок, бесхлорных средств дезинфекции перевязочных материалов, лака для покрытия катетеров т. д.) для борьбы с бактериями.

Из наноматериалов создаются новые хирургические инструменты с высокими режущими свойствами и износостойкостью. Внедряется в производство получение магнитных жидкостей – коллоидных дисперсий магнитных материалов размером от 5 нм до 10 мкм, которые могут применяться в терапии опухолей. Для этого магнитная частичка покрывается липидной оболочкой с добавлением лекарственного средства, затем вводится в кровь и под контролем магнитного поля направляется в место локализации патологического процесса.

Эффективность действия обеспечивается высокой точностью (прицельностью) и возможностью создавать предельно высокие концентрации препарата в зоне опухоли. Ведутся работы по использованию магнитных наночастиц в лечении прогрессирующих форм рака груди. Эти

частицы крепятся к антителам, которые, попадая в кровеносную систему, распознают раковые клетки и прикрепляются к ним. Затем с помощью магнитного поля происходит их быстрый разогрев, который убивает клетки опухоли, не повреждая соседние ткани. Важным направлением использования нанотехнологий является создание нановакцин для профилактики и терапии инфекционных заболеваний, против которых невозможно разработать вакцины традиционными методами (туберкулез, гепатит В, ковид, вирус папилломы, лептоспироз, туляремия, бруцеллез).

Нановакцины имеют ряд преимуществ:

- безопасны, так как содержат только вакцинные компоненты;
- нетоксичны, биосовместимы и биodeградируемы в организме;
- самосборка компонентов нановакцины решает проблему очистки, иммобилизации и концентрирования компонентов, обеспечивает стандартность получаемого продукта;

- технология нановакцин позволяет получать многокомпонентные препараты, защищающие одновременно от широкого спектра социально значимых или особо опасных заболеваний.

В настоящее время изучается влияние нанодисперсного кремнезема на уменьшение токсичности факторов внешней среды. Доказано, что такой кремнезем понижает токсичность нитрита натрия, фторида натрия, доксорубицина, противотуберкулезных препаратов за счет связывания белков, снижения перекисного окисления, обезвреживания низкомолекулярных токсинов.

На основе нанодисперсного кремнезема создан препарат с адсорбционно-детоксикационным действием, который применим при острых кишечных заболеваниях, вирусных гепатитах, атеросклерозе, острой почечной недостаточности, интоксикациях различного генеза, аллергических реакциях. Местно этот препарат применяют при гнойно-септических процессах, ранах; в стоматологии – для лечения гингивитов, стоматитов, пародонтита; в офтальмологии – в случае ожогов роговицы и воспалительных заболеваний глаз. Выраженные противомикробные свойства проявляют самособирающиеся пептидные нанотрубки, например, кишечная палочка погибает в течение часа. Метод основан на внедрении пептидных колец в мембрану бактерий, где они собираются в трубки, которые затем приводят к гибели бактерий. Про-

гнозируется, что самособирающиеся пептидные нанотрубки станут эффективным средством борьбы с микроорганизмами, устойчивыми к антибиотикам. Мы рассмотрели некоторые приоритетные направления развития наномедицины. Использование нанотехнологий в сельском хозяйстве связано с обеззараживанием воздуха и различных материалов, в том числе кормов и конечной продукции животноводства, а также с обработкой семян и урожая в целях его сохранения. Как и в медицине, оправдали надежды наноэмульсии и антибактериальные нанопрепараты, действие которых значительно пролонгируется за счет наночастиц серебра. Такие материалы используют в доильных аппаратах.

Нанотехнологии применяют при стимуляции роста растений, лечении животных, для улучшения качества кормов. Их активно внедряют в производство с целью уменьшения его энергоемкости, оптимизации методов обработки сырья и увеличения выхода конечной продукции, создания новых упаковочных материалов, обеспечивающих долгую сохранность продукции. Большинство технологий связано с пищевой промышленностью, с использованием наноматериалов для упаковки пищи, определения или нейтрализации опасных токсинов, аллергенов или патогенов. Развиваются проекты по созданию и улучшению пищевых добавок, получению растительного масла с нанодобавками, препятствующими поступлению холестерина в кровь млекопитающих. Отдельные проекты направлены на развитие более эффективных и средосберегающих агротехнологий, например, использование наноматериалов для очистки вод в агроэкосистемах или для переработки отходов растениеводства в этанол.

В животноводстве разрабатывают методы использования нанодобавок в целях уменьшения доз ростовых факторов и гормонов, нейтрализации патогенов на ранних стадиях их контакта с животными. Внедрение нанотехнологий при селекции животных поможет решить такие проблемы, как контроль происхождения, выявление носителей неблагоприятных мутаций или инфекций, а также генов, связанных с хозяйственно ценными признаками, устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Получены и успешно испытаны на животных эмульсии, содержащие нанокapли, которые обладают антивирус-

ной и антимикробной активностью. Они способны обеззараживать поверхности, уничтожая не только сами микроорганизмы, но и споры, при этом оставаясь безвредными для животных.

Потенциально подобные эмульсии могут найти применение не только в медицине, но и в пищевой промышленности, для очистки воды и даже для защиты от бактериологического оружия. Перспективно создание устройств с использованием биологических макромолекул для изучения биологических систем либо управления ими, так как хорошо известна способность биомолекул к самосборке в наноструктуры, например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы. ДНК используется для создания наноструктур и в качестве важного компонента наномеханизмов.

Предполагается, например, замена кремниевой основы микросхем на двухцепочечную молекулу ДНК, особенности которой позволяют объединять атомы в предсказуемой последовательности. Вероятно, что ДНК станет основным компонентом компьютеров следующего поколения. Благодаря микро- и нанотехнологиям повышается возможность обнаружения и анализа сверхмалых количеств различных веществ. Одним из вариантов такого рода устройств является лаборатория на чипе.

Она представляет собой пластинку, на поверхности которой упорядоченно размещены рецепторы к нужным веществам, например, антитела. Такое устройство способно обнаруживать отдельные молекулы и может быть использовано при определении последовательности оснований ДНК или аминокислот для целей идентификации, выявления генетических или онкологических заболеваний, обнаружения инфекционных возбудителей, а также токсических веществ. Биологические наночипы помогут проводить диагностику соматических и инфекционных заболеваний, в том числе видовую идентификацию возбудителей особо опасных инфекций и токсинов.

Устройства, предназначенные для манипуляций с нанообъектами (наночастицами, молекулами и отдельными атомами), можно назвать наноманипуляторами. К ним относятся сканирующие зондовые микроскопы, которые позволяют перемещать любые объекты, вплоть до атомов. Созданы прототипы нескольких вариантов нанопинцетов. В настоящее время применяются такие достижения нанотехнологий, как:

– амфифильные белки, поддерживающие рост клеток для восстановления поврежденного спинного мозга;

– покрытия на опухоли головного мозга из магнитных наночастиц и чувствительных к ферментам частиц;

– зонды из наночастиц для внутриклеточной доставки препарата и экспрессии генов и квантовые точки, которые обнаруживают и определяют количество биомаркеров рака молочной железы человека.

Несмотря на риски и проблемы, связанные с нанотехнологиями, предполагается, что наноустройства смогут полностью заменить существующие промышленные и сельскохозяйственные технологии, во много раз превзойти их по производительности при одновременном снижении затрат.

Ученые прогнозируют возможность встраивания в клетки крови датчиков, реагирующих на появление радионуклидов в окружающей среде и раковых клеток в организме, а также создание сверхчувствительных сенсоров и «умной» косметики, новых видов топлива и материалов для полетов в космос.

5.3. Направления развития нанобиотехнологии

С помощью нанобиотехнологии можно будет осуществлять диагностику и лечение на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Подход сверху вниз. Он заключается в дальнейшем усовершенствовании и миниатюризации существующих микроустройств. Ряд ученых во всем мире занимается созданием таких устройств, которые могли бы работать внутри человеческого организма. Они должны быть оснащены бортовыми системами управления, связи и ориентации, основанными на нанотехнологии. Наносенсоры и наноманипуляторы имеют большие перспективы в будущем. «Мокрая» нанотехнология. Данный подход основан на применении готовых механизмов, существующих в живой природе. В 1967 году Айзек Азимов первым предложил использовать механизмы, состоящие из молекул нуклеиновых кислот. Позднее В. Вайт предложил использовать генетически модифицированные вирусы для «ремонта» клеток. В настоящее время их уже активно применяют для внесения в клетки готового генетического материала. В перспективе появятся разнообразные роботы-вирусы, способные распознавать клетку специфического типа, находящуюся в определенном состоянии. В зависимости от конкретной ситуации такой робот-вирус сможет или убить эту клетку, например, возбудителя заболевания, или

внести в нее необходимые молекулы ДНК или РНК, вплоть до полной замены поврежденного генетического материала. Наномеханизмы. Этот подход наиболее перспективный. Основное внимание уделяется конструкциям из атомов углерода, что обусловлено его способностью образовывать огромное количество разнообразных соединений, а также рекордной прочностью связи между двумя атомами углерода. Примерами углеродных молекул, которые могут послужить прототипами нанотехнологических компонентов, являются фуллерены-шары и нанотрубки из пяти- или шестиугольных колец атомов углерода. Из углерода возможно изготовить молекулы, имеющие форму самых разнообразных деталей – шестеренок, штоков, подшипников и т. д. Устройство для такой сборки наномеханизмов называется ассемблером. Нанороботы. Создание нанороботов – основная задача будущего. Предполагается, что нанороботы будут представлять собой устройства молекулярных размеров, изготовленные из искусственно синтезируемых углеродных цепочек на основе биологических макромолекул, снабженные детекторами, манипуляторами и встроенным компьютером и способные к перемещению в окружающей среде. Принцип их работы будет напоминать механизмы действия белковых молекул. Нанороботы будут оказывать помощь в решении огромного количества задач – в диагностике и лечении любых болезней, включая старение, устранении дефектов в организме больного человека путем управляемых нанохирургических вмешательств, перестройке организма «по заказу», а также в изготовлении сверхпрочных конструкций и т. д.

5.4. Риски, связанные с нанобиотехнологиями

Применение нанотехнологий может принести человечеству значительные выгоды, однако могут быть и некоторые риски. Даже специалисты обращают внимание на отсутствие порога действия наноматериалов и значительные выбросы при их производстве. Существуют также политические и этические аспекты, например, разработка новых видов вооружения, неоправданное применение наноструктур. При создании новых материалов не следует забывать о том, что это еще и риск для здоровья человека и окружающей среды. Так как наночастицы легко проникают через кожу, дыхательные пути, желудочно-кишечный

тракт, взаимодействуют друг с другом, приобретая тем самым неизвестные свойства. Поэтому переход от микро- к нанотехнологиям требует специальных фундаментальных исследований. Наноматериалы могут обладать огромной разрушительной силой: например, ученые проводили опыты с углеродом и наноуглеродом на аквариумных рыбках. При внесении в аквариум угольного порошка рыбки продолжали плавать, а порошок осел на дно. Но после добавления наноуглерода все рыбки погибли, потому что он проник в мозг и заблокировал нервные клетки.

Наномедицина и нанотехнология – новые области, и существует не много экспериментальных данных о непреднамеренных и неблагоприятных эффектах. Недостаток знаний о том, как наночастицы будут встраиваться в биохимические процессы в человеческом теле, вызывает озабоченность мирового научного сообщества. Необходима программа по биобезопасности наноматериалов, которая включала бы в себя основные проблемы, связанные с их разработкой, применением и утилизацией.

Первая проблема – обеспечение безопасности труда при производстве наноматериалов. Предполагается, что на работе во вредных условиях будет занято около 400 тысяч человек, а соответствующие правила техники безопасности пока отсутствуют.

Вторая проблема – охрана наносубстанций. Как и в случае с любыми экологически опасными и потенциально опасными веществами, возникает проблема их утилизации, в том числе утилизации nanoотходов, просроченных лекарств и гигиенических средств, созданных с применением нанотехнологий. Третья проблема – необходимость контроля качества продукции, особенно лекарств и биоактивных добавок. Таким образом, очень важно изучить фундаментальные закономерности проявления биологических и токсических эффектов наночастиц, в зависимости от их формы, размера, исходного материала, площади поверхности, заряда и других физико-химических особенностей строения, а также от дозы, путей введения, концентрации в области органа-мишени и продолжительности воздействия. Необходимо правильно оценить возможные отдаленные риски и эффекты нанотерапии. Нано-биотехнология – одно из наиболее спорных, но и едва ли не наиболее многообещающих направлений в современной науке.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите размеры объектов, используемых в нанотехнологиях.
2. Расскажите, какие виды нанотехнологии являются самыми древними.
3. Расскажите об использовании нанотехнологии в медицине.
4. Расскажите о нанотехнологиях, используемых в сельском хозяйстве.
5. Объясните, что представляет собой лаборатория на чипе.
6. Расскажите об использовании наноманипуляторов.
7. Расскажите о возможных рисках, связанных с использованием нанотехнологий.

Глава 6. ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ И ИХ ИММОБИЛИЗАЦИЯ

6.1. Значение ферментов и их применение

Ферменты (или энзимы) катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки. При помощи ферментов получают ряд продуктов: фруктозный сироп, L-аминокислоты, медикаменты. Ферменты используются в пищевой промышленности и медицине. Например, в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введение фенилаланин-аммиак-лиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени. Имеются данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований.

Протеолитические ферменты – плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах; коллагеназу – для рассасывания рубцовых образований; эластазу – для задержки развития атеросклероза; лизоцим – для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) – для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза. Ферменты широко используют в тестировании патологии того или иного органа человека по уровню активности фермента или соотношению его множественных форм и изоферментов. Например, аспартатаминотрансфераза, изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и альдолаза служат для выявления инфаркта миокарда; аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа – для диагностики заболеваний печени; глутамилтрансфераза – для блокировки отторжения органов при их пересадке и т. д.

На сегодняшний день самыми крупными производителями ферментов являются США, Япония и Франция. Для пищевой промышленности предназначалось около 26%, текстильной – 23% и сельского хозяйства – 38%, 37% – остальное потреблению. В России расширяется выпуск ферментных препаратов разных наименований. Основными сфе-

рами их использования являются пищевая, мясная, текстильная, кожаная промышленность и сельское хозяйство, фармакология и медицина. Ферменты – это биологические молекулы, синтезируемые живыми клетками. В каждой клетке имеются сотни различных ферментов. Они сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко применяют в практике. С их помощью осуществляются многочисленные химические реакции. Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств:

1. Все ферменты представляют собой глобулярные белки.
2. Ферменты нетоксичны.
3. Информация о них, как и о других белках, закодирована в ДНК.
4. Они увеличивают скорость реакции, но сами в этой реакции не расходуются.
5. Их присутствие не влияет ни на природу, ни на свойства конечного продукта (или продуктов) реакции.
6. Очень малое количество фермента вызывает превращение больших количеств субстрата, в среднем ферменты способны катализировать около 1 000 реакций в секунду.
7. Активность ферментов меняется в зависимости от кислотности, температуры, давления, а также от концентрации как субстрата, так и самого фермента.
8. Ферменты снижают энергию активации катализируемой реакции.
9. В молекуле фермента есть активный центр, который вступает в контакт с субстратом. Этот активный центр имеет особую форму.
10. Катализируемая ферментами реакция обратима.
11. Ферменты высокоспецифичны, т. е. один фермент катализирует обычно только одну реакцию.

По характеру катализируемых реакций ферменты делят на шесть основных классов:

1. Оксидоредуктазы – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, т. е. перенос атомов водорода и кислорода от одного вещества к другому (глюкозооксидаза, каталаза, алкогольдегидрогеназа).
2. Трансферазы – ферменты, катализирующие перенос определенной группы атомов – метильной, ацильной, фосфатной или аминокислотной группы – от одного вещества к другому (протеинкиназа, гликогенфосфоорилаза, пируваткиназа).

3. Гидролазы – ферменты, катализирующие реакции гидролиза, при которых из субстрата образуются два продукта (протеазы, амилазы, целлюлазы).

4. Лиазы – ферменты, катализирующие присоединение групп к двойным связям, или, например, присоединение химической группы по двойной связи. При этом могут разрываться связи C-C, C-N, C-O, C-S (аспартаза, фумараза).

5. Изомеразы – ферменты, катализирующие реакции изомеризации (глюкозоизомераза, триозофосфатизомераза).

6. Лигаза (синтетаза) – ферменты, катализирующие реакции соединения двух молекул в результате образования новых связей C-N, C-O, C-S или C-C, сопряженные с распадом АТФ (ДНК-лигаза, триптофан-синтетаза).

Ферменты синтезируются, как все белки, на рибосомах и локализируются в цитоплазме и различных субструктурах, встроенных в мембраны; находятся на поверхности клетки или в окружающей клетку среде. Совокупность анаболических (реакции синтеза) и катаболических (реакции распада) реакций в живой клетке или живом организме называется метаболизмом. В клетке одновременно работает несколько метаболических путей. Реакции протекают согласованно, подчиняясь строгой регуляции, что объясняется специфической природой ферментов. Таким образом, ферменты служат для регулирования происходящих в клетке реакций и обеспечивают надлежащую их скорость. Для каждого фермента существует свой оптимум кислотности, при котором его катаболическое действие максимально. При резком изменении кислотности сред ферменты могут инактивироваться в результате необратимой денатурации (изменение конфигурации, раскручивание). Температура на действие ферментов влияет так же, как и на все химические процессы. Однако ускорение реакции с повышением температуры наблюдается в ограниченных пределах, поскольку многие ферменты уже при температуре 40–50 °C денатурируют.

Ферменты широко используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Источниками ферментов могут быть животные, растения и микроорганизмы. К настоящему времени установлено наличие более двух тысяч ферментов, а несколько сотен из них получены как индивидуальные вещества. Микроорганизмы в качестве продуцентов ферментов представляют

особый интерес, поскольку их метаболизм, а следовательно, и работа ферментных систем осуществляется с очень большой интенсивностью. Кроме высокой интенсивности метаболизма они обладают большой скоростью прироста биомассы. Это позволяет в течение коротких промежутков времени (иногда за 24–72 часа) получать такие количества сырья для выделения ферментов, которые не могут сравниться с тем, что дают растения и животные. Важное свойство микроорганизмов – способность расти, используя различные дешевые субстраты, в том числе не имеющие пищевого значения (целлюлоза, углеводы нефти, метан, метанол и т. д.). Выделение ферментных препаратов из клеток микроорганизмов проще и экономичнее, чем из растительных и животных тканей. Свойства микроорганизмов можно улучшить с помощью генетической инженерии или путем получения разнообразных мутантов. Рассмотрим некоторые группы ферментов, которые используются в промышленности наиболее широко. Аминолитические ферменты – для расщепления полисахаридов и белков в солоде применяют α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу. При производстве сахара из крахмала применяют амилазы, для снижения уровня белка в муке при приготовлении печенья используют протеазы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, в хлебопечении. Протеолитические ферменты. Ускоряют гидролиз пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность – выборочный, селективный характер действия на пептидные связи в молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами; трипсин – только на связь между аргинином и лизином. Ферментов этого класса очень много. По месту атаки молекулы субстрата протеолитические ферменты делятся на два класса – эндопептидазы (протеиназы) (расщепляют пептидную связь внутри пептидной цепи) и экзопептидазы (пептидазы) (гидролизующие (расщепляющие) преимущественно внешние пептидные связи в белках и пептидах).

Применяют протеолитические ферменты:

– в мясной промышленности – для умягчения мяса (мясо можно сделать более мягким, предварительно расщепив некоторые из белков соединительной ткани и некоторые из мышечных волокон. При этом волокна укорачиваются, легче отделяются друг от друга и поэтому легче разрушаются. Для размягчения мяса чаще всего используют папаин, который получают из сока растения папайя. Этот фермент используют

в домашних условиях. Для этого мясо маринуют в соке из фермента. Когда мясо начинают готовить, фермент разрушается. В некоторых странах папаин вводят в кровь животным перед убоем или сразу после забоя. В погибающих клетках разрушаются лизосомы и высвобождаются содержащиеся в них ферменты, которые начинают процесс расщепления. Этот процесс известен как автолиз);

– кожевенной промышленности – при обезволивании и мягчении шкур, ферменты в пять раз сокращают длительность процессов очистки, обезволивания и мягчения кожи, на 25–30% увеличивается выход шерсти и улучшается ее качество; – кинопроизводстве – для растворения желатинового слоя на пленках при их регенерации; – парфюмерной промышленности – при создании добавок в зубную пасту, крема, лосьоны; – промышленности синтетических моющих средств – при применении моющих добавок для удаления загрязнений белковой природы;

– медицине – при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов.

Пектолитические ферменты (пектин, пектиновые кислоты, пропектин) объединены в одну группу по внешнему проявлению своего действия – уменьшению молекулярной массы и снижению вязкости пектиновых веществ – представителей полисахаридов. Они содержатся во фруктах, в корнеплодах, стеблях растений (лен). Все пектиназы делятся на два вида – гидролазы и трансэлимилазы. Гидролазы отщепляют метильные остатки (пектинэстеразы) или разрывают α -1,4-гликозидные связи (полигалактуроназы). Трансэлимилазы ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей.

Применяют:

– в текстильной промышленности – вымачивание льна перед его переработкой;

– виноделии, пивоварении, приготовлении фруктовых соков, осветлении вин, уничтожение мутности (пектины образуют коллоидную суспензию, которая придает мутность сокам и винам. Если к соку или вину добавить ферменты – пектиназы, то они частично расщепляют пектины до полисахаридов и сахаров. Напиток становится более прозрачным. Источником пектиназ являются бактерии. Для разрушения белков и снижения мутности пива при охлаждении к нему добавляют

протеиназы). Целлюлолитические ферменты. Очень специфичны, их действие проявляется лишь в деполимеризации молекул целлюлозы. Обычно они действуют в виде комплексов, которые в целом доводят гидролиз до глюкозы.

Использование их очень перспективно:

- в гидролизной промышленности – получение глюкозы из целлюлозы;
- медицинской – выделение лекарственных веществ (стероидов) из растений;
- пищевой – улучшение качества растительных масел;
- сельском хозяйстве – как добавки в комбикорма для жвачных животных. На скорость ферментативных реакций оказывает влияние множество факторов.

6.2. Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций

На скорость ферментативных реакций оказывает влияние концентрация фермента, концентрация субстрата, температура, рН среда и катионы металлов или анионы и некоторые другие вещества.

Концентрация фермента. При высокой концентрации субстрата и при постоянстве других факторов, таких, например, как температура и рН среда, скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента. Катализ осуществляется всегда в условиях, когда концентрация фермента гораздо ниже концентрации субстрата. Поэтому с возрастанием концентрации фермента растет и скорость ферментативной реакции.

Концентрация субстрата. При данной концентрации фермента скорость ферментативной реакции возрастает с увеличением концентрации субстрата.

Температура. С повышением температуры ускоряется движение молекул, вследствие чего у молекул субстрата и фермента оказывается больше шансов столкнуться друг с другом. В результате увеличивается вероятность того, что реакция произойдет. Температура, обеспечивающая максимальную активность, называется оптимальной температурой. Если температура поднимается выше этого уровня, скорость ферментативной реакции снижается, несмотря на увеличение частоты столкновения. Температурный оптимум для большинства ферментов

лежит в пределах 37–40 °С. Существуют, однако, ферменты с более высоким температурным оптимумом – 70 °С.

pH среда. При постоянной температуре любой фермент работает наиболее эффективно в узких пределах pH. Оптимальным считается то значение pH, при котором реакция протекает с максимальной скоростью. При более высоких и более низких pH активность фермента снижается. При слишком резких сдвигах pH фермент денатурирует.

6.3. Белковая инженерия

Получение измененных белков, отличающихся от белков-прототипов заменой лишь одного аминокислотного остатка в строго заданном положении. Этот метод позволяет целенаправленно изменять структуру ферментов, а значит, их каталитические свойства и стабильность.

Суть метода состоит в следующем:

- для белков с установленной первичной и третичной структурой (известно более сотни таких белков) выбирают сайт мутации, т. е. тот аминокислотный остаток, который подлежит замене;

- затем ищут или создают искусственным путем кольцевую генетическую структуру – плазмиду, в состав которой входит ген, кодирующий нужный белок;

- химическим путем синтезируют олигодезоксирибонуклеотид длиной 12–18 оснований. Его химический состав должен быть таков, чтобы соответствовать небольшому участку первичной структуры выбранного белка (длиной 4–6 аминокислотных остатков), включающего сайт мутации. Однако в процессе химического синтеза вместо нуклеотидного триплета, кодирующего «нативную аминокислоту», в состав нуклеотидной последовательности вводят другой триплет, который кодирует новый аминокислотный остаток. На основе однонитевой плазмиды и синтезированного олигонуклеотида ферментным путем создают гетеродуплексную двунитевую плазмиду, в состав которой входит мутантный ген, несущий информацию о структуре белка с заменой аминокислотного остатка в определенном положении;

- получают клетки, которые осуществляют биосинтез мутантного запрограммированного белка. Этот метод дорог, и поэтому наиболее эффективным будет его использование в случае тех ферментов, кото-

рые, во-первых, сами достаточно дорого стоят, и, во-вторых, инактивация которых связана с химической модификацией какой-то ключевой группы (например, окислением Н-группы вблизи активного центра или дезаминированием остатков аспаргина).

Ферменты как класс биологических молекул обладают очень низкой стабильностью. Поэтому даже при небольших отклонениях внешних условий от тех, которые характерны для микроокружения ферментов в клетке, может оказаться достаточно, чтобы нарушить структуру и функцию ферментов, т. е. инактивировать их. Однако для практических целей часто требуется, чтобы ферменты работали при повышенных температурах, экстремальных значениях рН среды, в присутствии высоких концентраций органических растворителей или поверхностно-активных веществ и т. п. В связи с этим возникает проблема существенного увеличения стабильности ферментов. Стабилизацию ферментов можно осуществить разными способами.

6.4. Иммобилизация ферментов

Наибольшие успехи в стабилизации ферментов связаны с применением метода иммобилизации. Иммобилизованными называются такие ферменты, которые выделены из клетки, искусственно связаны с нерастворимым носителем и сохраняют свою каталитическую активность. Впервые иммобилизованные ферменты были получены в 1916 году Дж. Нельсоном и Е. Гриффином. Они показали, что инвертаза, иммобилизованная на угле посредством адсорбции, сохраняет каталитическую активность. В 1971 году на первой конференции по инженерной энзимологии был утвержден термин «иммобилизованные ферменты». Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.
2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.
3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного

субстрата), зависимость каталитической активности от рН, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук.

6.5. Носители для иммобилизованных ферментов

Для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей. К носителям предъявляются следующие требования:

- высокая химическая и биологическая стойкость;
- нерастворимость;
- высокая механическая прочность;
- достаточная гидрофильность, которая обеспечивает связывание фермента с носителем в водной среде;
- проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран);
- легкая активация;
- невысокая стоимость.

Органические полимерные носители

1. Природные полимерные носители:

а) белковые – в качестве носителей используют структурные протеины, такие как кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена – желатин. Данные белки доступны в значительных количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента, способны к биодеградации. К недостаткам белков как носителей в этом случае следует отнести их высокую иммуногенность;

б) полисахаридные – наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные;

в) липидные – модель «фермент-липид» в виде монослоя или биослоя сферической формы – липосома.

2. Синтетические полимерные носители

- а) полиметиленовые;
- б) полиамидные;
- в) полиэфирные.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул. Существенным недостатком большинства полимерных носителей является их способность накапливаться в организме.

В этом отношении предпочтение отдается природным полимерам, которые гидролизуются ферментами. Поэтому в состав лекарственных препаратов часто входит декстран, а из синтетических носителей – полимеры на основе N-винилпирролидона.

В настоящее время ведутся эксперименты по созданию синтетических полимеров, расщепляющихся с образованием нетоксичных продуктов обмена. К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам – биodeградируемость и достаточно высокую стоимость. Носители неорганической природы. В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силохромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации. Основное преимущество неорганических носителей – легкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

6.6. Методы иммобилизации ферментов

Существует два метода иммобилизации ферментов: физическая и химическая. Физическая иммобилизация, т. е. иммобилизация, при которой фермент не соединен с носителем ковалентной связью. В свою очередь в этой группе выделяют четыре подгруппы: – адсорбция на нерастворимых носителях; – включение в поры геля; – пространственное отделение фермента от остального объема реакционной смеси с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны); – включение в двухфазную реакционную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из этих фаз. Способы физической иммобилизации ферментов представлены на рисунке 15.

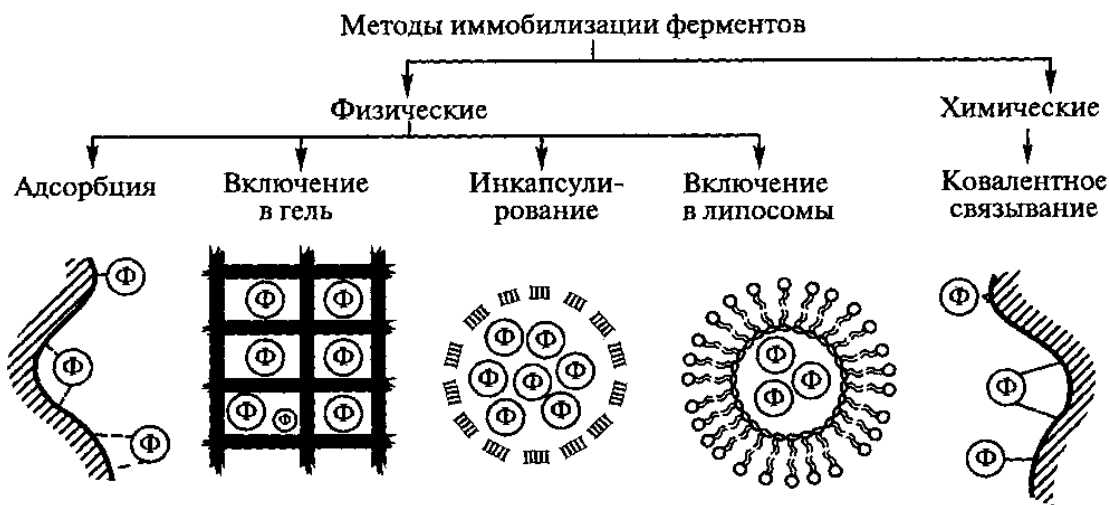


Рис. 15. Способы физической иммобилизации ферментов

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из существующих способов иммобилизации ферментов, начало ей было положено еще в 1916 году. Этот способ достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмывки неадсорбировавшегося белка иммобилизованный фермент готов к использованию. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка. Взаимодействия с носителем могут оказаться настолько сильными, что сорбция биокатализатора может сопровождаться разрушением его структуры. Например, при адсорбции некоторых растительных клеток на гранулах цитодекса клеточная стенка деформируется, повторяя рельеф поверхности частиц носителя. Преимуществами адсорбционной иммобилизации являются:

- небольшие или вовсе отсутствующие повреждения ферментов;
- простота, дешевизна и быстрота;
- отсутствие необходимости проведения химических модификаций носителя или фермента.

Недостатки метода:

- утечка, вымывание, десорбция ферментов из носителя и как следствие загрязнение продукта;

- неспецифическое связывание;
- возможная перегрузка носителя;
- стерическое препятствие со стороны носителя.

Включение в гели. Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т. е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты в зависимости от концентрации полимера и его природы содержат от 50 до 90% воды. Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами:

1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента (используют полиакриламид, поливиниловый спирт, силикагель).

2. Фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние (используют гели крахмала, агар-агара, агарозы, фосфата кальция).

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение молекул в объеме носителя. Все гели обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивают возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру.

Общий принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента.

Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный раствор фермента можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование).

При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора фермента. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом.

Если вместо водонерастворимого отвердевающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называется иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получают нити) и включение в липосомы. Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента.

Основной недостаток мембранных систем – невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов. При иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Химическая иммобилизация, при которой путем химического воздействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем. В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима. Этот способ получения промышленных биокатализаторов наиболее распространен.

Процесс ковалентного связывания ферментов с носителем состоит в основном из двух этапов. На первом этапе функциональные группы, находящиеся на поверхности материала носителя, активируются специфическим реагентом, на втором – ферменты добавляются в реакцию связывания для образования ковалентной связи с материалом носителя. Химическое присоединение энзима к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Однако химические методы иммобилизации достаточно сложны и дорогостоящи, но они незаменимы в научных исследованиях при создании ферментов с контролируемыми свойствами. Рассмотрим некоторые из этих методов.

Иммобилизация на носителях, несущих гидроксигруппы. В этой группе наиболее распространен бромциановый метод, который позволяет связывать фермент с полисахаридным или синтетическим носителем.

Иммобилизация на носителях, несущих аминогруппы. Аминогруппы носителей превращаются в соли диазония, к которым впоследствии присоединяют молекулы ферментов за счет взаимодействия с фенольными, аминными, имидазольными, тиольными, гуанидиновыми группами этих ферментов.

Иммобилизация на носителях, несущих сульфгидрильные группы. Если носитель и фермент несут сульфгидрильные группы, то под воздействием кислорода воздуха эти группы легко окисляются с образованием дисульфидных связей.

6.7. Применение иммобилизованных ферментов

Особенно ощутимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, анализ, медицину, процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленность. В будущем важную роль в контроле окружающей среды и клинической диагностике должны сыграть такие методы, как биолюминесцентный анализ и иммуноферментный анализ. В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью.

Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме. Проблемы биоконверсии массы и энергии в настоящее время пытаются решить микробиологическим путем. Тем не менее иммобилизованные ферменты вносят ощутимый вклад в осуществление фотолиза воды и биоэлектрокатализ. Заслуживает внимания и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Иммобилизованные ферменты могут использоваться и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента можно подействовать через носитель, подвергая последний ультразвуковой обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям.

Это позволяет регулировать каталитическую активность системы фермент-носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии. Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены прежде всего в пищевую и фармацевтическую промышленность.

В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др. Примером процесса, в котором успешно используются иммобилизованные ферменты, является производство кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы.

Он широко используется в США и Японии в качестве подсластителя. Например, во фруктовых напитках, так как он значительно дешевле сахарозы. Сироп готовят из дешевого источника углеводов – крахмала, получаемого из кочерыжек кукурузных початков. Процесс осуществляется с участием трех ферментов. Сначала получают крахмальную массу путем перемалывания (растирания) кукурузы, затем две амилазы превращают крахмал в глюкозный сироп.

Обесцвеченный и сконцентрированный сироп добавляют в различные пищевые продукты и напитки. С помощью фермента глюкозоизомеразы можно превратить этот сироп в смесь, содержащую равное количество глюкозы и фруктозы. Для этого сироп пропускают через колонку, в которой содержится фермент, иммобилизованный путем адсорбции на целлюлозном ионообменнике.

Активность фермента со временем постепенно снижается, поэтому обычно используют несколько колонок, работающих одновременно. Фруктоза слаще глюкозы, хотя обе содержат одинаковое число калорий на единицу массы. Это означает, что, используя кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы, можно получить такой же сладкий продукт, как с глюкозой, но с меньшим содержанием калорий. Ежегодно в США производится около 4 млн т сиропа.

В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, именно на этом пути медицину ждет создание новых высокоэффективных методов лечения. Примером использования иммобилизованных ферментов может служить производство полусинтетических пенициллинов из природных пенициллинов. Иммобилизованный фермент химически модифицируют в одну из боковых групп молекулы пенициллина, что приводит к повышению антибиотической активности пенициллинов.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные классы ферментов.
2. Охарактеризуйте класс ферментов – оксидоредуктазы, назовите представителей данного класса.
3. Охарактеризуйте класс ферментов – трансферазы, назовите представителей данного класса.
4. Охарактеризуйте классы ферментов – гидролазы и лиазы, назовите представителей данного класса.
5. Охарактеризуйте класс ферментов – изомеразы и лигазы, назовите представителей данного класса.
6. Какие группы ферментов используются в промышленности наиболее широко? Приведите примеры их применения.
7. Какие факторы и как влияют на скорость ферментативных реакций?
8. Перечислите носители для иммобилизованных ферментов.
9. Назовите достоинства метода химической иммобилизации.
10. Расскажите о физической иммобилизации ферментов.

Глава 7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ

7.1. Биотехнологические методы в растениеводстве

Повышение биологической продуктивности в сельском хозяйстве является предметом активных исследований комплекса различных биологических наук. Биотехнологические методы традиционно используются в сельском хозяйстве для повышения плодородия почв, борьбы с вредителями и возбудителями болезней культурных растений и животных, приготовления продовольственных продуктов, их консервирования и улучшения питательных свойств. При этом удельный вес биотехнологии для развития и повышения эффективности традиционных сельскохозяйственных технологий постоянно возрастает.

В настоящее время особые перспективы в создании и распространении новых культивируемых сортов растений обещает применение новейших методов биотехнологии – клеточной и генетической инженерии. Усилия биотехнологов направлены на увеличение выхода продукции и повышение ее питательности, усиление устойчивости культивируемых биологических видов к неблагоприятным условиям внешней среды, патогенам и вредителям.

При этом остается актуальной проблема поддержания разнообразия среди культивируемых видов и сохранения генетических ресурсов в целом. Микроорганизмы играют большую роль в повышении плодородия почвы, так как в процессе роста и развития улучшают ее структуру, обогащают питательными веществами, способствуют более полному использованию удобрений. Интенсивное растениеводство обедняет почву азотом, так как значительная его доля ежегодно выносится из почвы вместе с урожаем.

С древних времен для восстановления и улучшения почв существует практика использования бобовых растений, способных в симбиозе с азотфиксирующими микроорганизмами восполнять почвенные запасы азота в результате diazotрофности. Большой положительный эффект от возделывания бобовых вызвал постановку исследований явления diazotрофности.

Культивирование бобовых положительно влияет на азотный баланс почв, также облегчает борьбу с эрозией и помогает восстанавливать истощенные земли.

7.2. Технология получения азотных биоудобрений

Наиболее простой способ инокуляции основан на использовании почвы после выращивания на ней бобовых растений. Этот метод разработан в конце XIX века и применяется до настоящего времени. Недостаток метода – необходимость перемещения достаточно больших объемов почвы (100–1000 кг/га), а также возможность распространения болезней.

Более эффективным оказалось применение для инокуляции семян специальных препаратов азотфиксирующих бактерий. Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, развиваясь в корневой системе бобовых растений, в симбиозе с ними фиксируют атмосферный азот, обеспечивая этим азотное питание растений. Процесс азотфиксации протекает только в клубеньках на корнях бобовых растений, которые образуются в результате проникновения бактерий через корневые волоски в корень.

Взаимоотношение бактерий с растениями зависит от комплекса условий, включая физиологическое состояние и условия роста растений, а также физиологическую активность и вирулентность бактерий. Под вирулентностью понимают способность бактерий проникать внутрь корня растений и вызывать образование клубенька. Первая коммерческая разновидность культуры для инокуляции семян (товарное название «Nitragin») была запатентована в Великобритании Ноббе и Хилтнером в 1896 году.

Для разных бобовых в то время выпускали 17 вариантов культуры. В 20-е годы выпускалось много разновидностей инокулятов, среди них были чистые культуры азотфиксирующих микроорганизмов, смеси бактерий с песком или торфом, а также культуры, выращенные на агаре или в жидкой среде. В качестве носителя для бактерий были опробованы различные композиции: смеси торфа с почвой, добавки люцерны и соломы, перегнившие опилки, бентонит и активированный уголь.

В настоящее время для поддержания жизнеспособности симбиотических азотфиксирующих бактерий используют разнообразные носители, но лучшим считается торф. Сухие препараты азотфиксаторов, приготовленные на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и предназначенные для повышения урожайности бобовых растений (гороха, фасоли, сои, клевера, люцерны, люпина и др.) в настоящее время выпускаются под товарным названием «Нитрагин». Помимо почвенного нитрагина, выпускают также сухой нитрагин – препарат бактерий с содержанием в 1 г не менее 9 млрд. жизнеспособных клеток, в качестве наполнителя используют мел, каолин, бентонит. Препараты сухого нитрагина с остаточной влажностью 5–7 % фасуют по 0.2–1.0 кг и хранят при 15 °С в течение 6 месяцев.

Аналог азотных удобрений – другой препарат азотфиксирующих бактерий – «Азотобактерин», который выпускается промышленностью в нескольких вариантах. Бактерии рода *Azotobacter* являются свободноживущими азотфиксирующими микроорганизмами и обладают высокой продуктивностью азотфиксации (до 20 мг/г использованного сахара). Помимо связывания атмосферного азота, эти бактерии продуцируют биологически активные соединения (витамины, гиббериллин, гетероауксин и др.).

В результате этого инокуляция азотобактерином стимулирует прорастание семян и ускоряет рост и развитие растений. Более того, *Azotobacter* способен экскретировать фунгицидные вещества. Этим угнетается развитие в ризосфере растений микроскопических грибов, многие из которых тормозят развитие растений. Однако бактерии рода *Azotobacter* весьма требовательны к условиям среды, особенно концентрации в почве фосфатов и микроэлементов, и активно развиваются в плодородных почвах. В последние годы для изучения биологической азотфиксации стали применять методы молекулярной биологии и новейшие методы генетики.

Установлена возможность с помощью колифага P1 размножить свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Klebsiella pneumoniae* M5 и с ее помощью трансдуцировать *nif*-гены (гены азотфиксации). Также доказано, что перенос *nif*-генов возможен с помощью плазмид от штамма-азотфиксатора к штамму, не обладающему диазотрофно-

стью. Обнаружены конъюгативные плазмиды, несущие гены азотфиксации, относительно легко передающиеся при конъюгации от штамма к штамму.

После этого появились надежды на получение методами клеточной и генной инженерии растений, способных фиксировать атмосферный азот. Однако перенос генов азотфиксации и их экспрессия является чрезвычайно сложной задачей.

7.3. Снабжение растений фосфатами

Фосфатные ионы в почве, как известно, не очень подвижны, поэтому вокруг корневой зоны растений часто возникает дефицит фосфора.

Для улучшения питания сельскохозяйственных культур фосфатами эффективен метод применения фосфоробактерина. Препарат получают на основе спор культуры *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Эти бактерии превращают трудно усвояемые минеральные фосфаты и фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды) в доступную для растений форму. Следует отметить, что фосфоробактерин не заменяет фосфорные удобрения и не действует без них. Положительный эффект от применения фосфоробактерина не только связан с доставкой усвояемых фосфатов к растениям, но обусловлен также действием биологически активных веществ (тиамина, биотина, никотиновой и пантотеновой кислот, витамина B12 и др.).

Данные биологически активные вещества, попадая на поверхность семян при инокуляции, а затем в ткани растения, стимулируют фосфорное и азотное питание, то есть благоприятно действуют на развитие растений на первых этапах.

7.4. Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений и животных

Практически одновременно с развитием животноводства и растениеводства возникла проблема защиты культурных растений и домашних животных от вредителей и болезней. Бурное развитие химии и пе-

переход сельского хозяйства на интенсивные технологии привели к появлению и применению огромного разнообразия химических веществ для борьбы с вредителями и болезнями культивируемых видов. Первоочередное место заняли пестициды – ядовитые химические вещества, используемые для борьбы с вредителями, болезнями и сорняками. Однако только небольшая часть (около 10 %) применяемых и вносимых в окружающую среду пестицидов достигает цели; основная же масса этих веществ вызывает гибель полезных организмов, аккумулируется в биологических объектах, нарушает равновесие в природных экосистемах и биоценозах, загрязняет почвы, водоемы, воздух. Более того, вредители приобретают резистентность к пестицидам. Таким образом, применение пестицидов вступило в явное противоречие с глобальной проблемой защиты окружающей среды. Большие перспективы среди разрабатываемых подходов имеют биологические методы. Использование микроорганизмов в качестве биопестицидов – сравнительно новое направление биотехнологии, но уже имеющее существенные достижения. В настоящее время бактерии, грибы, вирусы находят все более широкое применение в качестве промышленных биопестицидов. Технология производства этих препаратов весьма различна, как различна природа и физиологические особенности микроорганизмов-продуцентов.

Однако имеется ряд универсальных требований, предъявляемых к биопестицидам, основные из них: селективность и высокая эффективность действия, безопасность для человека и полезных представителей флоры и фауны, длительная сохранность и удобство применения, хорошая смачиваемость и прилипаемость. В настоящее время для защиты растений и животных от насекомых и грызунов применяются, помимо антибиотиков, около 50 микробных препаратов, относящихся к трем группам: это бактериальные, грибные и вирусные препараты.

Бактериальные препараты. К настоящему времени описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая их часть принадлежит к семействам *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Bacillaceae*. Большинство промышленных штаммов принадлежит к роду *Bacillus*, и основная масса препаратов (свыше 90 %) изготовлена на основе *Bacillus thuringiensis* (Bt), имеющих свыше 22 серотипов. Штаммы Bt используют для борьбы с

различными вредителями – гусеницами, комарами, мошкой. Препараты на основе *Vt* относятся к токсинам кишечного действия. Типичными последствиями их воздействия являются паралич кишечника, прекращение питания, развитие общего паралича и гибель насекомого. Бактерии группы *Bacillus thuringiensis* эффективны в отношении 400 видов насекомых, включая вредителей полей, леса, садов и виноградников.

Технология получения биопестицидов на основе энтомопатогенных бактерий представляет собой типичный пример периодической гомогенной аэробной глубинной культуры, реализующейся в строго стерильных и контролируемых условиях. Цель процесса – получение максимального урожая бактерий и накопление токсина. Первый отечественный препарат получен на основе *Bac. thuringiensis var. dalleriae* – энтобактерин. Эффективен против чешуекрылых насекомых (капустной белянки, капустной моли, лугового мотылька, пяденицы, шелкопряда, боярышницы и др.). Дендробациллин является препаратом для защиты леса от сибирского шелкопряда на основе *Bac. thuringiensis var. dendrolimus*. Бактерия была выделена из гусениц сибирского шелкопряда – вредителя хвойных лесов. Этот препарат также эффективен для защиты овощных, плодовых и технических культур от разных насекомых (совок, белянок, молей, пядениц и др.).

Инсектин – по действию аналогичен дендробациллину, предназначен для борьбы, главным образом, с сибирским шелкопрядом. Получен на основе *Bac. thuringiensis var. insectus*. БИП – биологический инсектицидный препарат, изготавливается в виде сухого порошка и пасты на основе *Bac. thuringiensis var. Darmstadiensis*, эффективен против вредителей плодовых (от яблочной и плодовой молей, пядениц, листоверток, шелкопрядов) и овощных культур (белянок, молей).

Бактулоцид – бактерия, на основе которой выпускается данный препарат, выделена из водоема. Применяется в жидком виде разбрызгиванием по поверхности водоема. Высоко токсичен для личинок комаров и мошек, но совершенно безопасен для других насекомых и гидробионтов, обитающих в одном водоеме с комарами. Новейшие биотехнологические методы могут способствовать повышению эффективности бактериальных препаратов в результате изменения плазмид в бактериях, контролирующих синтез белка. Производство аспорогенных штаммов может упростить технологию ферментации и снизить

стоимость препаратов. Возможно получение биоинсектицидов с более специфичными мишенями.

Грибные препараты. Многочисленные виды энтомопатогенных грибов широко распространены в природе; они поражают широкий круг насекомых, обладая для этого различными механизмами, включая контактный, что облегчает их применение. Грибы хорошо сохраняются в виде спор и продуцируют разнообразные биологически активные вещества, усиливающие их патогенность. Однако грибные препараты не применяются пока достаточно широко. Это связано, во-первых, с определенными технологическими трудностями, возникающими при их культивировании, и во-вторых, обусловлено жесткими требованиями к факторам окружающей среды (высокая активность грибных препаратов проявляется только в условиях высокой и стабильной влажности).

Известны сотни видов энтомопатогенных грибов, но наиболее перспективными считаются две группы грибов – мускаринные грибы из *Euascomycetes* и энтомтрофные из семейства *Entomophthoraceae*. Основное внимание привлекают следующие грибные патогены: возбудитель белой мускардины (род *Beauveria*), возбудитель зеленой мускардины (род *Metarhizium*) и *Entomophthora*, (поражающий сосущих насекомых). Грибы, в отличие от бактерий и вирусов, проникают в тело насекомого не через пищеварительный тракт, а непосредственно через кутикулу. При прорастании конидий на кутикуле насекомого ростовые трубки могут развиваться на поверхности или сразу начинают прорастать в тело, часто этот процесс сопровождается образованием токсина. Заражение насекомых грибными патогенами в отличие от других микроорганизмов может происходить на различных стадиях развития (в фазе куколки или имаго).

Грибы быстро растут и обладают большой репродуктивной способностью. Для того чтобы применение грибных препаратов было эффективным, надо применять их в определенное время сезона и в оптимальной концентрации. *Metarhizium anisopliae* – наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный более 100 лет назад как зеленый мускаринный гриб. Этот гриб поражает многие группы насекомых, включая слюнного пастбищного клопа и вредителя сахарного тростника. Есть данные о том, что с его помощью можно бороться с корич-

невой цикадой – вредителем риса. *Verticilium lecanii* является единственным грибным энтомопатогеном, на основе которого на западе успешно выпускают препараты в промышленных масштабах.

Этот организм способен контролировать в оранжереях численность тлей и алейроцид в течение нескольких месяцев. Для инфицирования саранчи используют австралийский микроскопический гриб *Entomophthora praxibuli*. Саранча погибает в течение 7–10 дней после применения препарата. В Японии выпущен в продажу инсектицид на основе гриба *Aspergillus* для защиты лесов от вредителей; препарат вносят в почву, он поглощается корнями деревьев, распространяясь по сосудистой системе дерева, защищает его от насекомых.

Боверин является отечественным грибным препаратом, который изготавливают на основе конидиоспор *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. После заражения насекомого *B. bassiana* выделяет боверицин, циклодепсипептид-токсин. Боверин безопасен для человека и теплокровных, не вызывает ожогов у растений. Перспективы грибных препаратов очевидны. Достижения последних лет свидетельствуют о принципиальной применимости методов генной инженерии для изучения физиологии, генетики и биохимии грибов. Это может привести к большему интересу к грибам как возможным продуцентам биопестицидов и, следовательно, к созданию более стойких и эффективных препаратов на их основе.

Вирусные препараты. Весьма перспективны для защиты растений энтомопатогенные вирусы. Вирусы чрезвычайно контагиозны и вирулентны, узко специфичны по действию, хорошо сохраняются в природе вне организма-хозяина. Эти препараты вследствие высочайшей специфичности практически полностью безопасны для человека и всей биоты. Заражаются насекомые вирусами при питании. Попавшие в кишечник тельца включения разрушаются в щелочной среде. Вирусы способны размножаться только в живой ткани организма-хозяина. Это обстоятельство делает очень трудоемкой процедуру получения вирусного материала в значительных количествах. Получают вирусный материал при размножении вирусов в насекомых. После гибели насекомых их массу измельчают, затем выделяют вирусный материал и подвергают очистке. Особое внимание при изучении вирусов было обращено на одну группу вирусов – бакуловирусы.

В этой группе отсутствуют вирусы, патогенные для позвоночных. Однако другие группы – вирусы цитоплазматического полигедроза, энтомопатогенные вирусы и иридовирусы – содержат потенциальные биопестициды против насекомых, поэтому сейчас рассматриваются как перспективные биопестициды. Первый вирусный инсектицид был выпущен компанией «Сандоз» в 70-е годы. Препарат предназначен для борьбы с коробочным червем хлопчатника.

Производство вирусных препаратов основано на массовом размножении насекомого-хозяина на искусственных средах. На определенной стадии развития насекомое заражают, добавляя суспензию вирусов в корм. Спустя 7–9 суток погибших гусениц собирают, высушивают и измельчают. В измельченную массу добавляют физиологический раствор (1 мл на 1 гусеницу), взвесь фильтруют. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и заливают глицерином. Препарат стандартизируют и разливают во флаконы.

Существует два метода применения вирусных препаратов: интродукция вирусов в плотные популяции насекомых на сравнительно небольших площадях и обработка зараженных участков путем опрыскивания или опыления на ранних стадиях развития личинок. Видовое название энтомопатогенных вирусов состоит из группового названия и поражаемого хозяина (например, «полиэдроз непарного шелкопряда» или «полиэдроз американской бабочки»).

Отечественной промышленностью выпускается несколько вирусных препаратов; в том числе «вирин-ГЯП» (против гусеницы яблоневой плодовой гусеницы), «вирин-КШ» (против кольчатого шелкопряда), «вирин-ЭНШ» (против непарного шелкопряда), «вирин-ЭКС» (против капустной совки). В США усовершенствован процесс производства нескольких вирусных препаратов для защиты лесов («ТМ-Биоконтроль» и «Циптек»). Вследствие достаточной трудоемкости производства эти препараты пока не нашли массового применения. Специалисты считают, что потребуются годы, чтобы вирусные препараты смогли занять значительное место на рынке биопестицидов. Биогербициды.

К последним относятся микроорганизмы-патогены растений, ферменты, а также полупродукты, получаемые биоконверсией. Для борьбы с отдельными видами сорняков, устойчивых к химическим препаратам, применяют специфические и токсичные для них микроорганизмы.

Наиболее часто используют грибные фитопатогены и грибные фитотоксины. США и Япония совместно разрабатывают получение биогербицидов на основе природных микроорганизмов для борьбы с сорняками сои, арахиса, риса. *Phytophthora palmivora* - для борьбы с повиликой. Начали производство биогербицида на основе билафоса, продуцируемого штаммом *Streptomyces hydroscopicus*. Препарат обладает широким спектром действия, нарушает азотный обмен в листьях и стеблях сорняков. Наряду с биогербицидами, для защиты растений все шире применяют биологические препараты для борьбы с возбудителями заболеваний. На основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* получен препарат «Р-2-79», подавляющий развитие свыше 40 видов микроорганизмов, поражающих пшеницу, ячмень, рожь.

На основе *Pseudomonas* проводят защиту семян сорго и кукурузы от антрактоза и ризоктониоза; хлопчатника и сои – от вилта и ряда других заболеваний. Для борьбы с фитопторозом яблонь предложен способ применения почвенной бактерии *Enterobacter aerogenes*. Защита многих овощных культур от заболеваний, вызываемых некоторыми видами микроскопических грибов, обеспечивается применением препарата на основе культур *Trichoderma polysporum*, *T. viride*.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие азотные биоудобрения используются в сельском хозяйстве?
2. Какие биологические методы существуют для борьбы с вредителями и болезнями?
3. На какие группы делятся микробные препараты?
4. Что такое биогербициды?

Глава 8. БИОРЕМЕДИАЦИЯ

8.1. Понятие биоремедиации, ее принципы

Биоремедиация – комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов – растений, грибов, насекомых, червей и других организмов. Первые простейшие методы очистки сточных вод – поля орошения и поля фильтрации – были основаны на использовании растений.

Использование растений.

Растение воздействует на окружающую среду разными способами. Основные из них:

ризофильтрация – корни всасывают воду и химические элементы необходимые для жизнедеятельности растений;

фитоэкстракция – накопление в организме растения опасных загрязнений (например, тяжёлых металлов);

фитоволатилизация – испарение воды и летучих химических элементов (As, Se) листьями растений;

фитотрансформация: фитостабилизация – перевод химических соединений в менее подвижную и активную форму (снижает риск распространения загрязнений)

фитодеградация – деградация растениями и симбиотическими микроорганизмами органической части загрязнений

фитостимуляция – стимуляция развития симбиотических микроорганизмов, принимающих участие в процессе очистки

Использование микроорганизмов и грибов.

Главную роль в деградации загрязнений играют микроорганизмы. Растение является своего рода биофильтром, создавая для них среду обитания (обеспечение доступа кислорода, разрыхление грунта).

В связи с этим, процесс очистки происходит также вне периода вегетации с несколько сниженной активностью.

8.2. Биоремедиация атмосферы

Биоремедиация атмосферы – комплекс методов очистки атмосферы с помощью микроорганизмов. Все методы очистки делятся на регенеративные и деструктивные. Первые позволяют возвращать в

производство компоненты выбросов, вторые трансформируют эти компоненты в менее вредные.

Электрические методы. При этом способе газовый поток направляется в электрофильтр, где проходит в пространстве между двумя электродами – коронирующим и осадительным. Частицы пыли заряжаются, движутся к осадительному электроду, разряжаются на нем. Таким методом можно удалять не только пыли, но и туманы.

Адсорбция – поглощение твердым веществом газового компонента. В качестве адсорбентов применяют активные угли различных марок, силикагель и др. Позволяет достигать высокой степени очистки, кроме того способ регенеративный, то есть уловленный ценный компонент можно вернуть обратно в производство. Абсорбция – поглощение газов жидкостью. Метод основан либо на процессе растворения газовых компонентов в жидкости, либо на растворении вместе с химической реакцией. Является регенеративным.

Термические методы. Являются деструктивными. При достаточной теплотворной способности выбросного газа его можно сжечь напрямую. Получающиеся в результате термического разложения компоненты должны быть менее опасными для окружающей среды, чем исходный компонент.

Химические методы. Как правило, с использованием катализаторов.

Биологическая очистка. Для разложения загрязняющих веществ используются специально подобранные культуры микроорганизмов. Микроорганизмы размножаются сами, используя загрязнения в качестве субстрата. Биофильтрация является наиболее выгодной с экономической точки зрения и наиболее отработанной технологией очистки отходящих газов. Может быть успешно использована для защиты атмосферы на предприятиях пищевой, табачной, нефтеперерабатывающей промышленности.

Аэроионы - мельчайшие жидкие или твердые частицы, заряженные положительно или отрицательно. Особенно благоприятно действие отрицательных (легких аэроионов). Их справедливо называют витаминами воздуха. Механизм действия отрицательных аэроионов на взвешенные в воздухе частицы состоит в следующем. Отрицательные аэроионы воздуха заряжают (или перезаряжают) пыль и микрофлору,

находящиеся в воздухе, до определенного потенциала, пропорционально их радиусу. Заряженные пылевые частицы или микроорганизмы начинают двигаться вдоль силовых линий электрического поля по направлению к противоположно (положительно) заряженному полюсу, т.е. к земле, к стенам и потолку. Если выразить в длинах силы гравитации и силы электрические, действующие на тонкодисперсную пыль, то легко можно увидеть, что электрические силы превосходят силы гравитации в тысячи раз. Это дает возможность по желанию строго направлять движение облака тонкодисперсной пыли и очищать, таким образом воздух в данном месте. При отсутствии электрического поля и диффузном движении отрицательных аэроионов между каждым движущимся аэроионом и положительно заряженной землей (полом) возникают силовые линии, вдоль которых движется данный аэроион вместе с частичкой пыли или бактерией. Осевшие на поверхности пола, потолка и стен микроорганизмы могут периодически удаляться.

8.3. Биоремедиация почвы

Биоремедиация загрязнённых почв и грунтов представляет собой набор техник, основанных на применении биологических агентов для очистки почв и грунтов от поллютантов. Чаще всего для биоремедиации почв используются микроорганизмы, обычно бактерии и грибы; реже – растения. Выбор определенной технологии биоремедиации основывается на основе таких критериев как природные условия места очистки, свойства почвы, концентрация и уровень токсичности поллютанта и т.д. Применяемые в биоремедиации почв технологии можно объединить в две группы: методы *in situ* и методы *ex situ*.

Биоремедиация *in situ*. Основана на очистке среды от поллютанта без удаления загрязнённой почвы из района загрязнения. Поскольку технологии этого типа не требуют проведения земляных работ, они являются более дешёвыми, создают меньше запыления воздуха и высвобождают меньше летучих поллютантов, чем технологии *ex situ*. Один из подходов биоремедиации *in situ* заключается во введении в загрязнённую почву кислорода с помощью специального оборудования, с тем, чтобы стимулировать рост микроорганизмов и аэробную биodeградацию поллютантов. Данная техника чаще всего применяется для очистки от различных нефтепродуктов. Помимо кислорода

стимуляция биодegradации может осуществляться путём введения в почву питательных веществ для стимуляции роста и метаболизма микроорганизмов, осуществляющих деградацию поллютанта. Чаще всего для этих целей используют азот- и фосфорсодержащие удобрения. Другим распространённым подходом является введение в почву микроорганизмов (в том числе генетически модифицированных) или ферментов для ускорения деградации органических поллютантов, присутствующих в почве.

Биоремедиация ex situ. Основана на снятии слоя загрязнённой почвы и очистке её от поллютантов за пределами места загрязнения, что делает этот подход более дорогостоящим, чем биоремедиация in situ. Тем не менее, у технологий данного типа есть ряд преимуществ: они требуют меньше времени и обеспечивают полный контроль процесса очистки. Одним из типов, применяемых при биоремедиации in situ технологий является использование биореакторов. Перед помещением в биореактор из почвы удаляются крупные камни, грунт подвергается перемешиванию, что делает его более однородным; после добавления воды образуется глинистая суспензия. В данную суспензию вносятся проводящие очистку от поллютанта почвы микроорганизмы, для которых в реакторе создаются оптимальные условия. После завершения процесса очистки почва высушивается и возвращается в окружающую среду. Другой подход биоремедиации in situ заключается в том, что удалённая с места загрязнения почва размещается на определённой территории, её обеспечивают аэрацией, питательными веществами и водой для стимуляции роста и метаболизма микроорганизмов, осуществляющих биоремедиацию. По сравнению с очисткой с помощью биореакторов, данная технология требует много места и занимает больше времени. Можно выделить несколько различных вариантов такого подхода. В одном из вариантов загрязнённую почву удаляют с места загрязнения и распределяют тонким слоем на площади, специально огороженной по периметру для предотвращения распространения загрязнения за её пределы. Почву вспахивают для обеспечения доступа кислорода почвенным микроорганизмам и добавляют стимулирующие их рост вещества. Также над почвой разбрызгивают воду, что позволяет поддерживать оптимальную влажность и понижает запыленность воздуха. Загрязнённую почву можно также складывать

толстым слоем высотой 1-3 метра. При этом аэрация путём вспахивания заменяется аэрацией с помощью системы труб, доставляющих в почву воздух для стимуляции биодegradации.

В данном случае почву обычно смешивают с каким-нибудь рыхлым веществом (например, соломой), чтобы облегчить аэрацию. В процессе ремедиации из-за продувки воздуха происходит испарение из грунта различных веществ, в том числе самого поллютанта, поэтому система обязательно снабжается датчиком состава почвенных испарений. Также в грунт добавляют удобрения и поддерживают на определённом уровне влажность. При смешивании грунта с большим количеством разрыхлителей (сена, кукурузных кочерыжек, соломы) аэрацию можно осуществлять с помощью вакуумных насосов или вентиляторов. Такую смесь также можно аэрировать путём перемешивания в специальных резервуарах. Ещё один вариант – размещение загрязнённой почвы с разрыхлителем в длинные кучи, регулярно перемешиваемые тракторами. Во всех этих трёх случаях соотношение разрыхлитель/почва составляет примерно 1/3. После каждого перемешивания почва укрывается, что позволяет поддерживать нужную температуру и влажность. Очистка таким способом занимает недели вместо обычных для биоремедиации почв месяцев.

8.4. Биоремедиация нефтяных загрязнений

Самым распространённым в водной среде является загрязнение нефтью и различными нефтехимическими продуктами. Существует ряд технологий обработки загрязнённых грунтов. Наиболее распространены сжигание, захоронение и биоокисление. По имеющимся сравнительным оценкам, биоокисление является наиболее дешёвым, экологически безопасным и перспективным методом. В литературе для обозначения этого процесса используются термины «биодegradация», «биовосстановление», «биорекультивация» и «биоремедиация».

В основу очистки нефтяных загрязнений методами биоокисления положена биохимическая деятельность нефтеокисляющих микроорганизмов, которые довольно широко распространены в природе. При этом очевидно, что для эффективной очистки нефтяных загрязнений необходимо использовать быстрорастущие штаммы микроорганизмов, интенсивно потребляющих углеводородные субстраты. Технология

проведения работ по очистке различных объектов от нефтяных загрязнений может быть различной в зависимости от конкретных условий. В случае аварийных разливов нефти на почву при благоприятной гидрогеологической обстановке её очистка производится на месте загрязнения. Производится обваловка участка, перемешивание и структурирование грунта, обработка биопрепаратом. При внесении биогенных компонентов создаются благоприятные условия для развития микрофлоры – как естественной, так и внесённой с биопрепаратом. Для этого почва рыхлится, увлажняется, поддерживается необходимый уровень содержания в почве компонентов питания микроорганизмов. При неблагоприятной гидрогеологической обстановке (если существует опасность просачивания загрязнений в водоносные горизонты) грунт для биовосстановления вывозится на специально подготовленные гидроизолированные площадки. Наиболее удобным методом очистки загрязнённых грунтов, в особенности имеющих организационный характер (например, осадки ливневой канализации, загрязнения автозаправочных станций и др.), является создание специальных установок биокомпостирования.

Эти установки представляют собой площадки, оборудованные устройствами для распределения осадка на площади карты, рыхления, орошения и дренажа, а также системой внесения биогенных элементов. Желательно также обеспечить условия для поддержания плюсовых температур в холодное время года. На этих площадках в загрязнённый грунт вносятся биогенные элементы и биопрепарат, производится мониторинг нефтяных загрязнений, периодическое рыхление, увлажнение и подкормки. Это позволяет в течение теплого времени года довести содержание углеводородов в грунте до уровня ниже 1000 мг/кг.

Сказанное выше касается в основном нерастворимых в воде нефтепродуктов, для которых характерным является поверхностное загрязнение грунта, если только оно не является результатом многолетнего складирования и захоронения нефтезагрязнённых почв и осадков (например, в амбарах). Более трудная ситуация возникает в случаях, когда загрязнитель относительно хорошо растворяется в воде. Тогда загрязнённая вода проходит в нижние горизонты почвы, поражая грунт и вызывая длительные загрязнения грунтовых вод. К таким веществам относится, в частности, фенол. Штамм *Aureobacterium saepidae* 6–204 наиболее активен с точки зрения скорости биodeградации фенола.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы принципы биоремедиации?
2. Назовите способы биоремедиации атмосферы.
3. Какие группы методов применяют при биоремедиации почв?
4. Что лежит в основе метода биоокисления?

Глава 9. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕТОКСИКАЦИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОЧВ

9.1. Почва, ее микрофлора

Основа почвы – почвенные минералы составляют 80-90% веса. Они, как правило, содержат почти всю таблицу Д.И. Менделеева, но в форме не доступной растениям. Другая составляющая часть почвы – органическое вещество, причем наиболее ценная его часть – гумус – мельчайшие коллоидные частицы органики, имеющие еще большую поверхность и удерживающие ионы элементов, в доступной для питания растений форме. Гумус является хранилищем основных элементов питания. Гумус – аморфное органическое вещество, которое образуется в почве в результате микробиологического и физикохимического преобразования органических соединений растительного и животного происхождения.

Процесс образования гумуса называют гумификацией. Третья составляющая почвы – ее живой компонент – сообщество разных почвенных микроорганизмов: бактерий, грибов, инфузорий, водорослей, микроскопических червей и др. Их биомасса в верхнем слое почвы может достигать 1-1,5 кг/м² и более. Почвенным микроорганизмам принадлежит основная роль в формировании плодородия почвы. Почвенные микроорганизмы – совокупность разных групп микроорганизмов, для которых естественной средой обитания служит почва.

Это основной компонент, трансформирующий почву и участвующий в процессах кругооборота всех химических элементов. В 1г чернозема содержится до 10 млрд. живых микроорганизмов. Они представлены как прокариотами (бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли), так и эукариотами (грибы, микроскопические водоросли, простейшие).

Благодаря использованию современных методов (электронная и капиллярная микроскопия) ежегодно открывают много новых почвенных микроорганизмов. Среди них есть гетеротрофы и автотрофы, аэробы и анаэробы. Большинство бактерий почвы способны развиваться при нейтральном рН, температуре 25-45°С, относительной влажности выше 95%. Характеристика некоторых видов микроорганизмов

1) Почвенные бактерии образуют три основных класса: Класс Eubacteria включает разнообразные по форме и функциям почвенные микробы:

- сапрофиты-аутотрофы (для питания используют минеральные вещества);

- сапрофиты-метатрофы (используют простые органические вещества);

- паратрофы (питаются сложными органическими ВМС).

Также встречаются некоторые патогенные для человека возбудители токсикоинфекций, дизентерии, бруцеллеза и др. Класс Actinomycetes являются аэробами и мезофилами. Они принимают активное участие в синтезе органических и минеральных веществ. К этому классу относят возбудителей туберкулеза, проказы и дифтерии человека. Класс Myxobacteriae имеют палочковидную или кокковую форму, обладают высокой подвижностью. Они способны разлагать клетчатку и хитин, выделяют большое количество слизи, которая может превращаться в гумусоподобное вещество.

2) В почве очень много различных видов плесеней и грибов. Их качественный состав сильно зависит от типа почвы, температуры, влажности, pH и т. д. Грибы принимают активное участие в почвообразовательных процессах, они способны разлагать остатки растений и других органических веществ.

3) Почва может обильно населяться водорослями, если в ней содержится большое количество азота. Водоросли активно принимают участие в почвообразовательном процессе, способны заселять субстраты не пригодные для других организмов и накапливать органические вещества.

4) Количество простейших в почве колеблется в широких пределах – от 500 до 500 тыс. в 1 г почвы. Особенно богаты ими окультуренные почвы. Это жгутиковые и реснитчатые, вирусы и бактериофаги.

Население почвы постоянно изменяется не только благодаря размножению и трансформации микрофлоры, но и за счет экзогенного внесения микроорганизмов (навоз, компост). Срок жизни почвенных организмов – от нескольких часов до нескольких дней. Важное значение в повышении урожайности растений и улучшения плодородия почвы имеют микробы-антагонисты. Это особая группа, которая выра-

батывает различные БАВ, в первую очередь, антибиотические вещества, подавляющие рост и развитие патогенной микрофлоры. Почва обладает разнообразными, мощными системами самоочищения. Однако этого иногда бывает недостаточно и происходит загрязнение почвы.

9.2. Экологическая оценка состояния почв

Наблюдаемая в последние десятилетия концентрация промышленности на локальных территориях, формирование агроурболовандшафтов, наносит ущерб природным системам, отрицательно воздействуя на почву, растительность, водоемы, атмосферу и человека. При этом почвы являются своеобразным накопителем выбросов, ингредиенты которых в зависимости от природных условий поступают в компоненты окружающей среды. Например, формирование качества поверхностных вод во многом определяется диффузными загрязнениями, состав которых, в свою очередь, непосредственно связан с состоянием почвенного покрова. Почва принимает участие в формировании стока больших и малых рек и трансформации поверхностных вод в грунтовые. В почвах, подвергнутых антропогенному воздействию, нарушаются газообмен, и они снижают свою протекторную и продуктивную способности. Это приводит к увеличению смыва загрязнений с их поверхности, что в итоге ведет к повышенному выносу взвешенных (минеральных и органических) веществ, нефтепродуктов и ПАУ в водоемы и в грунтовые воды. Поэтому восстановление протекторных свойств почвы по существу является технологическим методом защиты окружающей среды, в т. ч. и гидросферы.

Для устранения загрязнений геологической среды применяются три принципиально различающихся подхода.

Первый - собственно очистка, предусматривающая полное извлечение вредных компонентов из объекта вместе с почвой (грунтом), обезвреживание с дальнейшей утилизацией их вне массива каким-либо известным способом.

Второй – основан не на удалении, а на подавлении активности (детоксикации) вредного компонента на месте, непосредственно в массиве, например, путем его нейтрализации, разложения (деструкции), связывания и т. п.

Третий – основан на локализации загрязнителей в массиве за счет создания вокруг аномалии защитного экрана, препятствующего дальнейшему распространению загрязнений. При этом сами загрязнители не разрушаются и не удаляются, а остаются законсервированными внутри массива и изолированными от экосферы экранами. При разной стоимости ни один из известных способов не является технологически универсальным. Оптимальным будет компромиссное сочетание технологических и организационных решений, обеспечивающих приемлемое соотношение «качество очистки – цена» с позиций охраны гидросферы и инвестиций.

9.3. Микробное выщелачивание и биогеотехнология металлов

Биогеотехнология металлов – это процессы извлечения металлов из руд, концентратов, горных пород и растворов вод воздействием микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности при нормальном давлении и физиологической температуре (от 5 до 90 °С).

Составными частями биогеотехнологии являются:

- 1) биогидрометаллургия, или бактериальное выщелачивание;
- 2) биосорбция металлов из растворов,
- 3) обогащение руд.

Важность применения биогеотехнологии металлов связана с исчерпаемостью доступных природных ресурсов минерального сырья и с необходимостью разработки сравнительно небогатых и трудноперерабатываемых месторождений.

При этом биологические технологии не обезображивают поверхность Земли, не отравляют воздух и не загрязняют водоемы стоками в отличие от добычи ископаемых открытым способом, при котором значительное количество земельных площадей разрушается.

Биогеотехнологические методы, микробиологическая адсорбция и бактериальное выщелачивание, позволяют получить дополнительное количество цветных металлов за счет утилизации «хвостов» обогатительных фабрик, шламов и отходов металлургических производств, а также переработки так называемых забалансовых руд, извлечением из морской воды и стоков. Применение биологических методов интенсифицирует процессы добычи минерального сырья, удешевляет их, при

этом исключает необходимость применения трудоемких горных технологий; позволяет автоматизировать процесс.

Несмотря на давность существования биотехнологических процессов извлечения металлов из руд и горных пород, только в 50-е годы была доказана активная роль микроорганизмов в этом процессе. В 1947 году в США Колмер и Хинкли выделили из шахтных дренажных вод микроорганизмы, окисляющие двухвалентное железо и восстанавливающие серу. Микроорганизмы были идентифицированы как *Thiobacillus ferrooxidans*. Вскоре было доказано, что эти железобактерии в процессе окисления переводят медь из рудных минералов в раствор. Затем были выделены и описаны многие другие микроорганизмы, участвующие в процессах окисления сульфидных минералов.

Спустя несколько лет, в 1958 году, в США был зарегистрирован первый патент на получение металлов из концентратов с помощью железобактерий *Thiobacillus ferrooxidans*. Бактерии *Thiobacillus ferrooxidans* очень широко распространены в природе, они встречаются там, где имеют место процессы окисления железа или минералов. Они в настоящее время наиболее изучены. Помимо *Thiobacillus ferrooxidans*, широко известны также *Leptospirillum ferrooxidans*. Первые окисляют сульфидный и сульфитный ионы, двухвалентное железо, сульфидные минералы меди, урана. Спириллы не окисляют сульфидную серу и сульфидные минералы, но эффективно окисляют двухвалентное железо в трехвалентное, а некоторые штаммы окисляют пирит.

Сравнительно недавно выделены и описаны бактерии *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *T. acidophilus*. Окислять S^0 , Fe^{2+} и сульфидные минералы способны также некоторые представители родов *Sulfolobus* и *Acidianus*. Среди этих микроорганизмов – мезофильные и умеренно термотолерантные формы, крайние ацидофилы и ацидотермофилы. Для всех этих микроорганизмов процессы окисления неорганических субстратов служат источником энергии. Данные литотрофные организмы углерод используют в форме углекислоты, фиксация которой реализуется через восстановительный пентозофосфатный цикл Кальвина.

Несколько позднее было установлено, что нитрифицирующие бактерии способны выщелачивать марганец из карбонатных руд и разрушать алюмосиликаты. Среди микроорганизмов, окисляющих NH_4^+

→ NO₂⁻, это представители родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* и др. Бактериальное выщелачивание, называемое также биогидрометаллургией или биоэкстрактивной металлургией, в промышленных масштабах довольно широко применяют для перевода меди и урана в растворимую форму. Существуют несколько способов проведения бактериального выщелачивания металлов.

Все они основаны на стимуляции роста железоокисляющих бактерий, способных окислять двухвалентное железо и серу. Эти методы весьма экономичны и чисты в экологическом плане; отличаются достаточной простотой и способны к самоподдерживанию, благодаря образованию агента-растворителя металлов в виде раствора Fe³⁺.

Все полученные при бактериальном выщелачивании продукты реакции находятся в растворах, которые легко можно нейтрализовать; какие-либо вредные побочные газообразные продукты отсутствуют; процесс не зависит от масштабов его проведения. К трудностям реализации биологических методов относится необходимость поддержания активной микробной культуры в строго контролируемых и заданных условиях, низкие в сравнении с химическими процессами скорости реакций, взаимосвязанность процессов выщелачивания со скоростями роста микроорганизмов.

К перспективным направлениям биогидрометаллургии металлов относят направление, ориентированное на обогащение руд и концентратов. Весьма эффективным представляется применение для этих целей сульфатредуцирующих бактерий, с помощью которых можно разработать принципиально новые процессы и значительно улучшить существующие. При проведении процессов флотации окисленных минералов свинца и сурьмы применение сульфатредуцирующих бактерий повышает на 6–8 % извлечение минералов в результате сульфидизации окислов; в процессах флотации церуссита (PbCO₃) извлечение свинца возрастает на 20–25 %.

Применение сульфатредуцирующих бактерий для десорбции ксантогената с поверхности некоторых минералов после флотации позволяет селективно разделить некоторые минералы. Таким образом, биологические методы активно дополняют и частично позволяют заменить традиционные методы горнодобывающей отрасли. Многие во-

просы биогeотехнологии в настоящее время успешно решены. Это получение меди, никеля, кобальта, марганца, мышьяка и ряда других металлов. Медь и уран получают в больших масштабах в процессах кучного и подземного выщелачивания.

С помощью чанового выщелачивания удастся перерабатывать многие концентраты и получать цинк, медь, олово, серебро, золото и др. Разрабатываются и находят все большее применения процессы биосорбции металлов из растворов и сточных вод; намечены подходы и начинают применяться биологические методы в процессах обогащения руд и концентратов. Применение биотехнологических методов позволяет увеличивать сырьевые ресурсы, обеспечивает комплексное извлечение металлов, не требует сложной горной техники; процессы легко поддаются регулированию и автоматизации и позволяют решать многие природоохранные задачи.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие группы микроорганизмов встречаются в почве?
- 2) Каковы источники питания почвенных микроорганизмов?
- 3) Способы детоксикации почв?
- 4) Каковы составные части биогeотехнологии?
- 5) Виды микроорганизмов, используемых для биовыщелачивания?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сельскохозяйственная биотехнология представляет собой ряд инструментов, включающих как традиционные методы селекции, так и последние достижения в области клеточной и генетической инженерии. Биотехнологии предоставляют инструменты, которые позволяют сделать производство более дешевым и управляемым, улучшать растения и животных, чтобы сделать их более устойчивыми к неблагоприятным условиям среды, возбудителям болезней и вредителям, чтобы продуктивность росла, а продукция обладала лучшими вкусовыми и другими характеристиками, чтобы сделать возможным использование микроорганизмы для конкретных сельскохозяйственных целей. При этом использование современных биотехнологий позволяет уменьшить использование синтетических пестицидов, а значит, снизить негативное воздействие на окружающую среду и организм человека.

В результате рассмотрения ключевых аспектов применения биотехнологий в сельском хозяйстве можно сформулировать следующие основные выводы:

1. Биотехнологии играют решающую роль в современном сельском хозяйстве, обеспечивая устойчивое развитие, повышение урожайности и улучшение качества сельскохозяйственной продукции. Они способствуют решению глобальных проблем, таких как продовольственная безопасность, изменение климата и деградация окружающей среды.
2. Использование ГМО-культур позволяет существенно повысить устойчивость растений к вредителям, болезням и неблагоприятным климатическим условиям. ГМО-культуры также могут быть разработаны для улучшения питательной ценности продуктов, что имеет важное значение для здоровья населения.
3. Биотехнологии позволяют создавать экологически безопасные биофертилизаторы и биопестициды, которые уменьшают негативное воздействие химических веществ на окружающую среду и здоровье человека. Эти инновационные решения помогают поддерживать плодородие почв и устойчивость сельскохозяйственных систем.

4. Применение молекулярных и клеточных технологий в сельском хозяйстве открывает новые возможности для селекции и разведения растений и животных. Это включает создание трансгенных растений, использование маркерной селекции и клеточных культур для повышения эффективности и точности селекционного процесса.
5. Биотехнологии способствуют экономическому развитию сельских регионов, повышая конкурентоспособность и устойчивость аграрного сектора. Они также оказывают положительное влияние на социальную сферу, улучшая качество жизни фермеров и сельского населения через повышение продуктивности и доходов.
6. Внедрение биотехнологий требует внимательного рассмотрения этических и регуляторных аспектов. Важно обеспечить безопасность и прозрачность процессов, связанных с использованием биотехнологий, а также учитывать мнения и интересы различных социальных групп.

Биотехнологии – неотъемлемая часть будущего сельского хозяйства. Они предоставляют эффективные инструменты для решения современных вызовов и достижения устойчивого развития. Важно продолжать исследования и разработки в этой области, внедрять инновационные решения и обеспечивать их безопасное и ответственное использование. Подготовка специалистов, обладающих глубокими знаниями в области биотехнологий, играет ключевую роль в реализации потенциала этих технологий для улучшения качества жизни и сохранения окружающей среды.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бабилова, А.В. Растение как объект биотехнологии / А.В. Бабилова, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлев // Комаровские чтения. – Вып. LV 2007. – С. 184–206.
2. Баженова, И.А. Основы молекулярной биологии. Теория и практика: учебное пособие / И.А. Баженова, Т.А. Кузнецова. – СанктПетербург: Лань, 2018. – 140 с.
3. Бакай, А.В. Генетика: учебное пособие / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – Москва: КолосС, 2007. – 448 с.
4. Биотехнология: теория и практика: учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина [и др.]. – Москва: Оникс, 2009. – 496 с.
5. Биотехнология: учебник / И.В. Тихонов [и др.]; под ред. Е.С. Воронина. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2005. – 792 с.
6. Биотехнология: учебник и практикум для вузов / под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва: Юрайт, 2022. – 381 с.
7. Бирюков, В.С. Основы промышленной биотехнологии: учебное пособие / В.С. Бирюков. – Москва: КолосС, 2004. – 296 с.
8. Варфоломеев, С.Д. Биосенсоры / С.Д. Варфоломеев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 1. – С. 45–49.
9. Воробьева, А.И. Промышленная микробиология: учебное пособие / А.И. Воробьева. – Москва: Московский университет, 1989. – 294 с.
10. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.
11. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии: учебное пособие / Г.Г. Гончаренко. – Москва: Высшая школа, 2005. – 183 с.
12. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – 4-е изд., стер. – Москва: Академия, 2008. – 208 с.
13. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие / И.Ф. Жимулев; отв. ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьев. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2003. – 478 с.
14. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – Москва: Дрофа, 2004. – 640 с.

15. Кони́чев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Кони́чев, Г.А. Севастьянова, И.Л. Цветков. – 5-е изд. – Москва: Юрайт, 2021. – 422 с.
16. Сазонова, И.А. Биотехнология защиты окружающей среды: краткий курс лекций / И.А. Сазонова, А.А. Щербаков; Саратовский ГАУ. – Саратов, 2016. – 51 с.
17. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха [и др.] / под ред. В.С. Шевелухи. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Высшая школа, 2003. – 468 с.
18. Тейлор, Д. Биология в 3-х т. Т. 2: пер. с англ. / под ред Р.Сопера. – 3-е изд. / Д. Тейлор, Н. Грин, У. Стаут. – Москва: Мир, 2005. – 436 с.
19. Четверакова Е.В. Введение в биотехнологию: учебное пособие/ Е.В. Четверакова – Красноярск: ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», 2023. – 194 с.

СПИСОК ТЕРМИНОВ И ПОНЯТИЙ

F-фактор – фактор фертильности – эписома, контролирующая способность бактерий к конъюгации.

R-фактор – эписома, обеспечивающая устойчивость бактерий к лекарственным препаратам.

Акроцентрическая хромосома – хромосома, у которой центромера находится вблизи одного из концов, при этом одно из плеч хромосомы длинное, другое короткое.

Активный ил – сообщество бактерий и простейших, обитающих колониями в виде взвешенных в воде хлопьев. В присутствии кислорода микроорганизмы поглощают и окисляют органические вещества. После переработки порции этих веществ активный ил надо отделить от очищенной воды и вернуть в загрязненные стоки, где процесс поглощения и значит очистки продолжится. Недостаток или избыток активного ила замедлит процесс.

Аллостерические ферменты – ферменты, изменяющие свою активность в результате присоединения к их регуляторному (аллостерическому) центру вещества-эффектора.

Аминокислоты – строительные блоки белков. Известны сотни аминокислот, но в белках обнаружено только 20.

Амплификация (amplification) – процесс увеличения (размножения) количества нитей ДНК, числа копий гена.

Анафаза – третья стадия митоза или мейоза, во время которой хромосомы расходятся к противоположным полюсам клетки.

Анаэроб(ы) – организм, способный жить в бескислородной среде.

Анаэробные бактерии – используют для дыхания связанный кислород, входящий в состав нитратов, а не кислород воздуха. В результате высвобождается азот, метан и двуокись углерода в виде газов.

Антибиотик – вещество биологического происхождения, способное убивать микроорганизмы или угнетать их рост, а также рост злокачественных опухолей.

Антикодон – группа из трех оснований, комплементарная кодону в иРНК. Занимает фиксированное положение в молекуле тРНК.

Аутосома – любая неполовая хромосома.

Аэробные бактерии дышат свободным кислородом. Обеспечивают превращение аммиака (после гидролиза азотосодержащих загрязнений) в нитриты (бактерии *Nitrosomonas*) и нитраты (бактерии *Nitrobacter*).

Аэробы – организмы, способные жить лишь в среде, содержащей свободный молекулярный кислород.

Аэротенк – емкость с активным илом и устройством распыления воздуха. Обеспечивает очистку сточных вод от органической фракции и ее разложение. **Биофильтр** – емкость для очистки стоков с помощью биопленки из микроорганизмов. Биопленка образуется на так называемой загрузке (пористый или сетчатый материал). При орошении стоками и вентилировании на биопленке происходит адсорбция и окисление органических веществ.

Аэрофильтры – биологический фильтр для очистки сточных вод со значительной высотой (толщиной) фильтрующего слоя и устройством для принудительной вентиляции, обеспечивающим большую окислительную мощность аэрофильтра.

Биогаз – горючий газ, получаемый из твердых и жидких отходов (животноводческих отходов, городских сточных вод и т. д.), а также при сбраживании специально выращенных водорослей и других организмов с быстрорастущей биомассой.

Биологически активные вещества (БАВ) – вещества, вырабатываемые живыми организмами и стимулирующие их развитие или функции.

Биологический фильтр – сооружение для биологической очистки сточных вод, построенное на принципе постепенного прохождения очищенных масс через толщу фильтрующего материала, покрытого активной микробиологической пленкой.

Биоочистка – удаление посторонних или вредных агентов из вод и почв с помощью живых организмов.

Бластомеры (blastomere) – дробящиеся клетки, образующиеся при митотических делениях яйцеклетки (зиготы), которые обладают потенциалами, реализуемыми в процессе развития. Бластомеры не растут, поэтому уменьшаются в размерах при последовательных делениях.

Бластула (blastula) – зародыш многоклеточных животных, образующийся в процессе последовательных дроблений яйца (зиготы).

Блоттинг (blotting – промокание) – этап процесса Саузерн-блот гибридизации, в результате которой весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

Брожение – анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, посредством которого многие организмы получают энергию, необходимую для их жизнедеятельности.

Вектор – молекула ДНК, способная к автономной репликации и включению чужеродной ДНК; является инструментом генной инженерии, обеспечивающим включение чужеродной ДНК в клетку и ее клонирование.

Веретено – структура в клетках эукариот, состоящая из ахроматических (не содержащих ДНК) нитей, которая осуществляет движение хромосом в метафазах и анафазах митоза и мейоза.

Вирус(ы) – неклеточные формы жизни, способные проникать в определенные живые клетки и размножаться только внутри клеток.

Витамин(ы) – низкомолекулярное органическое вещество различной химической природы, образующееся в животном организме или поступающее с пищей.

Гаметы – гаплоидные половые клетки (яйцеклетки и сперматозоиды), при слиянии которых в процессе оплодотворения образуется диплоидная зигота.

Ген – структурная, функционально неделимая единица наследственной информации, представляющая собой участок молекулы ДНК (реже РНК), кодирующий синтез одной макромолекулы (полипептидов, тРНК либо рРНК). Большинство генов имеют фиксированную локализацию на хромосоме, однако известны и перемещающиеся (мигрирующие, мобильные) гены.

Генетический код – система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот, основанная на соответствии образующих кодоны чередований последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК аминокислотам белков.

Генная инженерия – занимается изучением вопросов выделения и переноса генов от одного организма к другим, созданием новых или реконструкцией существующих организмов.

Геном – полный гаплоидный набор генов или хромосом клетки или организма.

Геномная библиотека (genomic library) – набор клонированных фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном. У млекопитающих (в т. ч. у человека) геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки.

Ген-оператор – ген, контролирующий функционирование структурных генов.

Генотип – совокупность имеющих фенотипическое проявление генов, локализованных в хромосомах.

Ген-промотор – ген, определяющий начальный участок синтеза, контролирует транскрипцию с ДНК на РНК.

Ген-регулятор – ген, кодирующий структуру репрессора, функцией которого является контроль транскрипции оперона.

Ген-супрессор – ген, способный подавлять фенотипическое проявление других генов.

Гибридизация соматических клеток – метод получения гибридных организмов и гибридных клеточных линий путем слияния неполовых клеток.

Гибридная (рекомбинантная) ДНК – новая последовательность ДНК, образованная *in vitro* путем лигирования двух или более негомологичных молекул ДНК.

Гидролазы – класс ферментов, катализирующих реакции гидролиза – расщепление молекул органического вещества на мономеры с помощью воды.

Гистон – любой из основных белков, образующих комплекс с ДНК в хромосоме эукариот.

Гиф – одноклеточные (у низших грибов) или многоклеточные (с общим движением цитоплазмы) нити, образующие вегетативное тело гриба.

ДДТ (дуст) – дихлордифенилтрихлорэтан.

Денатурация ДНК – 1. Процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, рН среды и др.). 2. Первая стадия ПЦР, в ходе которой происходит нагревание температуры в реакционной смеси *in vitro* до 90 °С, в течение 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы ДНК образуются две одноцепочечные.

Денитрификация – преобразование нитритов и нитратов в бескислородной среде с выделением газообразного азота

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов, чередованием которых кодируется генетическая информация.

ДНК-зонд (проба) – определенная (известная) радиоактивно- и нерадиоактивно меченая последовательность нуклеиновой кислоты, используемая в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих комплементарные последовательности. Для этого используется радиоавтография или какая-либо другая система детекции (обнаружения) нерадиоактивно меченого зонда.

ДНК-полимеразы (DNA-polymerases) – ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У *E. coli* были выделены 3 типа ДНК-п.: pol I, pol II и pol III. Pol III является основным ферментом, ответственным за репликацию ДНК в клетке бактерий. Два других фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-полимераз, находящихся в разных частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие как репликация, репарация и рекомбинация.

Escherichia coli, *E. coli*, кишечная палочка – грамотрицательная кишечная бактерия. Ее геном (хромосома) включает около 4 500 кб ДНК, организованных в 50 независимых топологических доменов, и содержит серию инсерций. В настоящее время практически весь геном секвенирован и более 1 000 генов картированы. *E. coli* имеет большое значение для экспериментальных исследований рекомбинантной ДНК, так как она служит хозяином для большого числа разных вирусов, плазмид и космидного клонирования векторов.

EcoRI – одна из широко применяемых рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз, извлекаемая из *Escherichia coli*, которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ГААТТЦ и разрезает ее между Г и А, образуя липкие концы. В настоящее время выделено 7 рестриктаз группы EcoR – от EcoRI до EcoRVII.

Загрязнитель – любой физический агент, химическое вещество и биологический вид, попадающий в среду жизни или возникающий в ней в количествах, выходящих за рамки обычного своего наличия.

Изомеразы – класс ферментов, катализирующих в клетках внутримолекулярные перестройки.

Изоферменты – ферменты с одинаковой или сходной функцией, которые кодируются разными локусами одного и того же хромосомного набора.

Ил – тонкозернистый осадок в водоемах и водостоках, состоящий из смеси минеральных и органических веществ, часто с подавляющим преобладанием одного из них.

Ингибиторы – вещества различной химической природы, подавляющие каталитическую активность отдельных ферментов или ферментных систем.

Инсулин – универсальный анаболический гормон белковой природы, вырабатываемый поджелудочной железой, регулирует углеводный обмен и поддерживает нормальный уровень сахара в крови.

Интерфероны – группы белков, образующихся в клетках при вирусных инфекциях и обеспечивающих неспецифический противовирусный иммунитет.

Интроны – последовательности внутри структурного гена, которые не участвуют в кодировании белкового продукта гена. После транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам, удаляются из мРНК в процессе сплайсинга.

Кариотип – хромосомный набор клетки или организма: характеризуется числом, размером и конфигурацией хромосом.

Картирование (mapping) – установление позиций генов или каких-то определенных сайтов вдоль нити ДНК.

Кб, килобаза (kb, kilobase) – единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот, 1 кб = 1 000 нуклеотидов, или пар оснований (п. о.), в двухцепочечной ДНК.

Катабализм – совокупность ферментативных реакций в живом организме, направленных на расщепление сложных органических веществ – белков, нуклеиновых кислот, жиров, углеводов, поступающих с пищей или запасенных в организме.

Катализатор – вещество, изменяющее (как правило, ускоряющее) скорость химической реакции.

Клон – группа генетически идентичных клеток или особей, образующихся в результате вегетативного размножения одного общего предка.

Клональное микроразмножение – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.

Клонирование ДНК (DNA cloning) – использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, например, гена, в клонирующий вектор и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, например, в клетки кишечной палочки.

Кодирующая цепь – цепь ДНК, последовательность которой идентична иРНК.

Кодон – группа из трех смежных нуклеотидов в молекуле мРНК, либо кодирующая одну из аминокислот, либо обозначающая конец синтеза белка.

Комплементарность – свойство нуклеотидов образовывать парные комплексы при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.

Конъюгация – 1. Попарное временное сближение гомологичных хромосом, при котором возможен обмен гомологичными участками (в цитогенетике). 2. Один из способов обмена генетическим материалом у бактерий (в микробиологии).

Космиды – плазмиды, содержащие встроенный сос-участок фага λ , благодаря чему плазмидная ДНК может быть упакована *in vitro* в оболочку фага.

Коферменты – низкомолекулярные органические соединения небелковой природы, способные связываться с ферментом постоянно или временно для участия в катализируемой реакции.

Ксенобиотики (греч. xenos – чужой, bios – жизнь) чужеродные химические вещества, как правило, органические соединения, поступающие в живой организм извне.

Лигаза – фермент, способный устранять разрывы в молекуле ДНК, восстанавливая ковалентные связи между 5'- и 3'-концами молекул.

Лигирование (ligation) – 1. Процесс ковалентного соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемый с участием фермента лигазы. 2. Прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы.

Липиды – жироподобные вещества, входящие в состав живых клеток и играющие важную роль в физиолого-биохимических процессах.

Липкий конец – свободный одноцепочечный конец двуцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

Маркер для селекции (селективный маркер) – специальный ген, кодирующий устойчивость к какому-либо антибиотику, который вводят в вектор для последующего отбора трансформантов.

Мезофил(ы) – организмы, нормально существующие и размножающиеся при средних температурных условиях (20–40 °C). К мезофильным микроорганизмам относят большинство бактерий, микроводорослей и других микроорганизмов, обитающих в почве, воде, телах животных и человека.

Метантенк – емкость для преобразования азотосодержащих загрязнений в минеральные соли с помощью анаэробных бактерий, осуществляющих метановую ферментацию органики.

Миелома – линия опухолевых клеток, произошедшая из лимфоцита, обычно продуцирует один тип неполноценных иммуноглобулинов.

Микроорганизм(ы) – мельчайшие, преимущественно одноклеточные организмы, видимые только в микроскоп. Способны существовать в самых различных условиях. Играют важную роль в круговороте веществ в природе.

Минисателлиты (minisatellites) – короткие (9–64 н. п.), среднеповторяющиеся, тандемно организованные, высоковариабельные последовательности ДНК (обычно богатые ГЦ-последовательностями), распространенные по геному человека (встречаются также у растений и животных). Они имеют одну общую

короткую последовательность в 10–35 н. п. М.-с. проявляют значительный полиморфизм по длине, который возникает в результате неравного кроссинговера. В итоге в М.-с. изменяется число коротких тандемных повторов, что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб (килобаз). Короткий, тандемно повторяющийся М.-с., являясь хорошим генетическим маркером для анализа сцепления, может использоваться в качестве гибридизационного зонда для одновременного обнаружения высокополиморфных М.-с. в пределах рестриктов ДНК. Вероятность идентичности того же набора фрагментов ДНК у двух человек теоретически настолько мала, что каждый человек считается уникальным по набору полос, выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

Митоз – деление ядра, следующее за репликацией хромосом, в результате чего дочерние ядра содержат то же число хромосом, что и родительские.

Мицелий – многоклеточная структура; сильно разветвленная система жестких трубочек, заполненных цитоплазмой.

Моноклональные антитела – глобулярные белки, синтезируемые гибридомами, которые получены путем слияния В - лимфоцитов с клетками миеломы.

Мутаген – физический, химический или биологический агент, увеличивающий частоту возникновения мутаций.

Мутант – клетка или отдельный организм, характеризующийся изменением, вызванным мутациями.

Нитрификация – процесс удаления из сточных вод аммонийного азота. Происходит за счет жизнедеятельности бактерий, путем постепенного образования азотистой и азотной кислот и их солей – нитритов и нитратов.

Обратная транскриптаза – РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий синтез ДНК на матрице.

Онкогены – гены, кодирующие белки, способные вызвать злокачественную трансформацию клеток эукариот.

Оперон – единица генетической экспрессии, состоящая из одного или нескольких связанных между собой генов, а также из промотора, оператора и других регулярных участков, контролирующих транскрипцию оперона.

Отжиг (annealing) – процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двухцепочечную молекулу сводородной связью между комплементарными нуклеотидами двух цепей. Может происходить между комплементарными цепочками ДНК или РНК, в результате образуются гибридные двухцепочечные молекулы. Название обусловлено тем, что процесс отжига связан с первоначальным нагреванием образца и последующим его охлаждением.

Пенициллин – антибиотик, нарушающий биосинтез клеточной стенки бактерий.

Плазида – кольцевая молекула ДНК, способная стабильно существовать в автономном, не связанном с хромосомами состоянии.

Поллютанты (от англ. pollutant – загрязнитель) – вещества техногенного происхождения, которые наносят вред живым организмам и нарушают стабильность биогеоценозов.

Праймер, затравка (primer) – короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-концу ДНК-полимераза может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'–3'-направлении.

Продуценты – организмы, служащие источником получения каких-либо веществ, используемых человеком.

Прокариоты – простейшие одноклеточные организмы (бактерии и синезеленые водоросли), не имеющие ядерной мембраны и окруженные элементарными мембранами органелл; генетический материал прокариот расположен в нуклеотиде – примитивном эквиваленте ядра эукариот.

Пронуклеус – каждое из двух гаплоидных ядер в яйцеклетке в период между проникновением в него сперматозоида и слияния ядер.

Протеиды – сложные белки, содержащие небелковый компонент (соединение белка и углевода – гликопротеиды).

Протеины – простые белки, состоящие из остатков аминокислот.

Протеолитические ферменты (протеазы) – ферменты класса гидролаз, катализируют расщепление пептидных связей в белках и пептидах.

Протопласт – клетка (у растений), полностью лишенная клеточной стенки и имеющая только клеточную мембрану.

Процессинг – совокупность реакций, ведущих к превращению первичных продуктов транскрипции и трансляции в функционирующие молекулы.

Редуценты – организмы, главным образом бактерии и грибы, в ходе жизнедеятельности превращающие органические остатки в неорганическое вещества.

Рекомбинация – перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.

Репрессор – белок, подавляющий транскрипцию одного или нескольких генов, тесно сцепленных между собой в составе оперона, либо разбросанных на хромосоме.

Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) – группа прокариотических эндонуклеаз, специфически узнающих определенные короткие последовательности в ДНК и расщепляющих ДНК.

Рестрикционные карты – диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания рестриктазами.

Ровные (тупые) концы – термин, относящийся к двухцепочечным фрагментам ДНК, у которых ни одна нить на концевых участках не выступает за другую в отличие от липких концов. Образуются в результате действия рестриктаз (рестрикционных эндонуклеаз) Alu I, EcoR V, Hpa I, Nac I, Pvu II, Sma I и др., а также путем удаления однонитчатых концов с помощью S1-нуклеазы или достройки их с помощью ДНК-полимеразы I.

Рибосома – органоид клетки, осуществляющий биосинтез белка.

РНК-полимеразы – ферменты, синтезирующие РНК (мРНК, тРНК, рРНК и РНК других классов) на матрице ДНК.

Сайт клонирования – место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости.

Сайт рестрикции – последовательность пар оснований в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее.

Сайт узнавания – специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания.

Саузерн-блот анализ – анализ молекул ДНК и их фрагментов при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

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

Сбраживание – анаэробное расщепление молекул питательного вещества, например, глюкозы, сопровождающееся выделением энергии.

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК или РНК.

Селективные среды – твердые и жидкие питательные среды, на которых могут расти клетки лишь с определенными свойствами.

Соматическая гибридизация – получение гибридов соматических клеток, при этом сливаются их ядра (возможна между филогенетически отдаленными видами, половое спаривание между которыми невозможно).

Соматические клетки – клетки тканей многоклеточных организмов, не являющиеся половыми.

Cos-сайты (cos-sites) – однонитчатые, комплементарные участки на обоих концах ДНК фага лямбда, состоящие из 12 нуклеотидов. Обеспечивают фагу образование кольцевых структур путем соединения водородными связями комплементарных концов и упаковку ДНК в фаговые частицы. Используются для конструирования космид.

Сплайсинг – ферментативное удаление интронов и соединение экзонов при синтезе мРНК.

Тетрациклин – антибиотик, нарушающий биосинтез белков у бактерий.

Тотипотентность – свойство клеток реализовывать генетическую информацию ядра, обеспечивающую их дифференцировку.

Точковая мутация – мутация, в результате которой происходит замена одной нуклеотидной пары на другую.

Трансдуцирующие фаги – фаги, переносящие в своем геноме гены бактерии-хозяина.

Транскрипция – биосинтез молекулы РНК на матрице ДНК.

Трансляция – биосинтез полипептидных цепей белков.

Транспозон – перемещающийся генетический элемент – фрагмент ДНК, который может менять свое положение в геноме.

Фермент(ы) – биологические катализаторы, присутствующие во всех клетках живого организма.

Химера – организмы-мозаики, отдельные клетки и ткани которых генетически отличаются от остальных типичных для нормы, или организмы, состоящие из тканей двух или более особей, имеющих соматические клетки с различными генотипами.

Химерные плазмиды – плазмиды, содержащие вставку (фрагмент) чужеродной ДНК.

Хромосомная библиотека (chromosome specific library) – один из видов геномной библиотеки, используемый для анализа геномов больших размеров, например, человека.

Хромосома – нитевидная структура в ядре клетки, состоит из генов, расположенных в линейной последовательности, геном прокариотической клетки может содержать единичную молекулу ДНК, в эукариотических клетках молекула ДНК образует комплекс с гистонами и другими белками.

Хромосомный набор – совокупность хромосом в ядре нормальной гаметы или зиготы.

Центромера – область хромосомы, к которой прикрепляются нити веретена при митотическом или мейотическом делении клетки.

Цианобактерии – группа фототрофных прокариотических организмов (традиционное название – синезеленые водоросли).

Штамм – чистая одновидовая культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника или полученная в результате мутации и обладающая специфическими физиолого-биохимическими признаками.

Экспрессия гена – проявление функционирования генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

Эписомы – генетические элементы (плазмиды), которые могут существовать в клетке либо независимо от хромосомы, либо встраиваться в нее.

Эукариоты – организмы, клетки которых имеют четко выраженное деление на ядро и цитоплазму. Эукариоты могут быть как одноклеточными, так и многоклеточными. К ним относятся высшие растения и животные.

Ядро – органелла эукариотической клетки, окруженная мембраной и содержащая хромосомы.

Ядрышко – органелла ядра эукариот, связанная с участком хромосомы, содержащим гены рРНК.

Яйцеклетка – гамета женского типа.

Учебное электронное издание

БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Учебное пособие

Автор-составитель
РОЖКОВА Анастасия Николаевна

Издается в авторской редакции

Системные требования: Intel от 1,3 ГГц; Windows XP/7/8/10; Adobe Reader;
дисковод CD-ROM.

Тираж 25 экз.

Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
Изд-во ВлГУ
rio.vlgu@yandex.ru

Институт биологии и экологии
кафедра почвоведения, агрохимии и лесного дела
k.vlgu@yandex.ru