

Клеточная инженерия

Вечканов Е. М., Сорокина И. А.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Учебное пособие

Основы клеточной инженерии

Е. М. ВЕЧКАНОВ., И. А. СОРОКИНА

Ростов-на-Дону

2012

Рецензенты:

д.б.н., профессор ФГОУ ВПО ЮФУ А. И. Лукаш.

д.б.н., профессор ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» И. А. Горошинская

Вечканов Е. М., Сорокина И. А. Основы клеточной инженерии: Учебное пособие. – Ростов-на-Дону, 2012. – 136

В настоящее время клеточная инженерия является наиболее перспективной и гармонично развивающейся областью биотехнологии. Именно с клеточной инженерией связаны успехи в различных областях науки, медицины, фармакологии, производства и сельского хозяйства. Применение клеточных культур позволяет преодолеть многие проблемы биоэтики, связанные с применением животных в научных исследованиях. Культуры клеток и тканей, выделенные из природного материала, широко используются при промышленном производстве биологически активных веществ и лекарственных препаратов. На культурах клеток получают разнообразные вакцины. В настоящее время решается вопрос крупномасштабного производства моноклональных антител на основе гибридомных культур. Учебное пособие призвано ознакомить слушателей с основами клеточной инженерии растений и животных, гибридомными биотехнологиями; изучить современные методы культивирования клеточных культур и создания гибридом; сформировать у студентов целостное научное представление о возможностях и путях развития клеточных биотехнологий. Учебное пособие предназначено для магистров, обучающихся по программе «Молекулярная биотехнология», а также для бакалавров и специалистов - молекулярных биологов, биохимиков, цитологов, использующих методы клеточной инженерии.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение в клеточную инженерию	6
Глава 1. Культура животных клеток	13
1.1 История культивирования животных клеток	13
1.2 Введение клеток в культуру, их происхождение	14
1.3 Биология культивируемых животных клеток	16
1.4 Питательные среды и условия культивирования	21
1.5 Системы культивирования клеток	23
1.6 Культуры клеток человека. Стволовые клетки	25
1.7 Проточная цитометрия	29
1.8 Культивирование органов	32
1.9 Культивирование клеток и тканей беспозвоночных	34
1.10 История метода гибридизации животных клеток	34
1.11 Механизм слияния клеток. Получение гибридом. Банки клеточных линий	37
1.12 Практическое использование моноклональных антител	53
1.13 Трансплантация ядер. История и методы клонирования животных	58
1.14 Методы создания химер	66
1.15 Биоэтика в животной клеточной инженерии	67
Глава 2. Культура растительных клеток	69
2.1 История культивирования растительных клеток	69
2.2 Биология культивируемых растительных клеток	70
2.3 Характеристика каллусных тканей	75
2.4 Суспензионные растительные культуры	77
2.5 Растительные культуры гаплоидных клеток	81
2.6 Имобилизованные растительные клеточные культуры	84
2.7 Характеристика протопластов растительных клеток. Получение, культивирование, применение и слияние протопластов	89
2.8 Принципы клонального микроразмножения растений	96
2.9 Перспективы клеточной инженерии растений	107
2.10 Основные принципы криобиологии. Криопротекторы	108
2.11 Криоконсервация животных и растительных клеточных культур	110
Тесты, вопросы и задания по спецкурсу	114
Список литературы	124
Глоссарий	128

Введение в клеточную инженерию

Методы клеточной инженерии получили в последнее время чрезвычайно широкое распространение практически во всех областях современной биологии. Невозможно представить себе молекулярно-биологическую лабораторию или современное биотехнологическое предприятие, где не использовались бы тканевые культуры. Клеточная инженерия и гибридная технология, как неотъемлемая её часть, являются одной из ведущих областей человеческой деятельности. Клеточная инженерия - это технологические процессы с использованием биологических систем: живых организмов и компонентов живой клетки.

Ярким примером важности клеточной инженерии является создание методики гибридной технологии. Разработка методики получения моноклональных антител на основе гибридной технологии принесла учёным в 1984 году Нобелевскую премию. Благодаря своим уникальным свойствам моноклональные антитела успешно используются для решения многих актуальных задач биологии и медицины, например, создание на их основе диагностических средств, разработка препаратов для лечения злокачественных новообразований, вирусных и аутоиммунных заболеваний. Терапия с помощью моноклональных антител эффективна и сравнительно безопасна. Уже сегодня 20% разрабатываемых биофармацевтических препаратов являются продуктами гибридной технологии. Всего в мире на различных стадиях разработки находится свыше 350 лекарственных средств, содержащих моноклональные антитела, 70 из них проходят клинические испытания. По прогнозам, до 2010 г. на рынке появятся более 100 новых препаратов на основе моноклональных антител.

Другой важнейшей сферой деятельности клеточной инженерии являются работы со стволовыми клетками. В настоящее время ведутся крупномасштабные исследования по стволовым клеткам, что позволит в ближайшем будущем получить их чистые линии, и, как следствие, качественный прорыв в лечении нейродегенеративных заболеваний, онкологических заболеваний, поднимет на новый уровень трансплантологию и хирургию.

Получение биологически активных веществ растительного происхождения, таких как токсины, гербициды, регуляторы роста, алкалоиды, стероиды, терпеноиды, имеющих медицинское применение - это неполный перечень возможностей клеточной инженерии.

Развитие современной клеточной инженерии при получении полимеров, позволит надеяться на скорое решение многих проблем, стоящих перед современной медициной. В настоящее время разработаны методики микрохирургии живых клеток с помощью манипуляторов или лазерного луча.

Однако, многие вопросы ещё предстоит решить. Среди них такие как: создание оптимальных питательных сред для разных типов клеток; поиск средств влияния на дифференцировку и пролиферацию клеток; возможность совместного культивирования разных типов клеток с целью получения более жизнеспособной культуры, функционально полноценной *in vivo*, способной полностью заменить утраченную нативную ткань.

Широкое распространение методов клеточной инженерии вызывает потребность в издании соответствующих руководств и учебных пособий. В данном учебном пособии рассмотрены аспекты как клеточной инженерии животных, так клеточной инженерии растений. Пособие содержит 23 рисунка, 10 таблиц, использовано 54 литературных источника.

Клеточная инженерия - это конструирование специальными методами клеток нового типа. Клеточная инженерия включает реконструкцию жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам (и даже относящихся к разным царствам — растениям и животным), с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток и другие операции. Клеточная инженерия используется для решения теоретических проблем в биотехнологии, для создания новых форм растений, обладающих полезными признаками и одновременно устойчивых к болезням и т. п.

Основным объектом и средством исследования в клеточной инженерии является клеточная культура. Как и любой другой метод, метод клеточной культуры обладает рядом преимуществ и недостатков.

Преимущества метода клеточных культур:

1. Прижизненное наблюдение за клетками, их морфологическими и биохимическими особенностями различными методами, в том числе с использованием световой микроскопии.
2. Возможность оценки состояния клетки «прижизненно», а не «post factum», как в случае с опытами на животных.
3. Возможность изменения условий культивирования, что даёт широкие возможности в оценке факторов, влияющих на клеточный метаболизм.
4. Оценка и получение результатов, при использовании небольшого количества клеточного материала, что снимает проблему использования большого количества животных.
5. Использование клеточной культуры снимает множество этических проблем, связанных как с использованием большого количества клинического

материала, так и при тестировании потенциально опасных и токсических веществ.

6. Клеточная культура доступна для различных биохимических манипуляций, в том числе с ядами, гормонами, токсинами, радиоактивными соединениями и т.д.
7. При использовании клеточной культуры оценивается прямое воздействие исследуемого вещества, без опасения, что оно будет метаболизировано печенью или почками.
8. Становится возможным рассчитать точную концентрацию тестируемого вещества, вызываемого тот или иной эффект.

Основными направлениями использования клеточной культуры являются генетика, иммунология, биохимия, молекулярная биология, биотехнология и генная инженерия, вирусология и трансформация клеток, фармакология и токсикология, определение механизмов роста и дифференцировки, и многое-многое другое (табл. 1)

Таблица 1

Основные направления использования клеточных культур

Наука	Направление использования
Генетика	Клонирование. Хранение и слияние клеток. Получение и работа с мутантными клетками.
Иммунология	Гибридная технология: клетки, синтезирующие интересующие ученых антитела, подвергают процедуре слияния с клетками миеломы, которые продуцируют антитела с неизвестной специфичностью. Полученные гибридомы позволили наладить производство моноклональных антител: мышь иммунизируется неочищенным препаратом антигена, затем клетки её селезёнки гибридизуют с клетками миеломы. Среди полученных гибридных клеток найдётся, по крайней мере, одна продуцирующая антитела, специфические к исходному антигену.
Биотехнология	Культуры клеток используются в биотехнологии как источник различных секретируемых веществ: гормонов, интерферона и т. д.
Вирусология	Единственно эффективный метод выращивания вирусов в клеточной культуре, наблюдение за клетками, поражённых

	вирусом, исследование явления клеточной трансформации.
Эмбриология, развитие и дифференцировка клеток	Использование клеточной культуры позволяет изучать дифференцировку клеток <i>in vitro</i> . Поиск корреляции между внешним стимулом на клеточную культуру и морфобиохимическим ответом клеток.
Токсикология и фармакология	Тестирование на клеточной культуре механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов. Использование клеточной культуры позволяет снять ряд этических проблем в области токсикологии и фармакологии.
Биохимия и патобиохимия	Исследование биохимических превращений и патологических путей чрезвычайно эффективно с использованием клеточных культур.

Для успешного проведения исследований с использованием клеточных культур и применением различных методик клеточной инженерии требуется выполнение ряда условий и наличие специального приборного парка. В лаборатории клеточной инженерии должны быть созданы рабочие зоны, предназначенные для каждой стадии работы с клеточными культурами:

1. *Зона работы персонала и обработки данных* предназначена для работы сотрудников, включает письменные столы, книжные шкафы, компьютеры и т. д.
2. *Помещение предбоксника* предназначено для переодевания в стерильную одежду, мытья рук и т.д. Здесь должны располагаться шкафы для сменной одежды и стерильных халатов, мойка и душевая.
3. *Стерильный бокс* предназначен для проведения манипуляций с клеточными культурами в стерильных условиях и культивирования клеточных культур. Здесь должны располагаться ламинарные шкафы, CO₂ – инкубаторы, термостаты, лабораторный стол со световым, инвертированным и люминесцентным микроскопами, шкаф с лабораторной посудой и холодильник.
4. *Кельвинаторная комната* предназначена для длительного хранения клеточных культур, питательных сред и реактивов. Здесь должны располагаться низкотемпературный морозильник на -152 С⁰, сосуды Дьюара для хранения культур клеток в жидком азоте, фармацевтический холодильник 0-- +5 С⁰.

5. *Автоклавная – моечная* предназначена для стерилизации инструментария, питательных сред, «убивки» клеточных культур. Здесь должны располагаться автоклав, сухожаровой шкаф, мойка.

Ниже представлена примерная схема расположения зон в лаборатории клеточной инженерии (рис. 1).

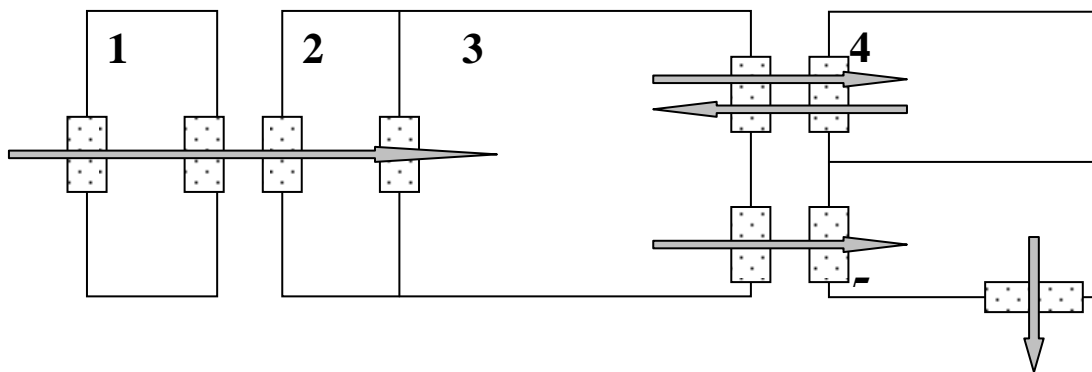


Рис. 1 Схема расположения зон лаборатории клеточной инженерии

Рекомендуемый комплект оборудования для оснащения лаборатории клеточной инженерии:

1. Бокс биологической безопасности 2 или 3 класса защиты.
2. Центрифуга-вортекс до 2000 об./мин.
3. Центрифуга для пробирок 5-100 мл до 5000 об./мин.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф до 12000-16000 об./мин
5. Твердотельный хладотермостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур $-5\text{---}100\text{ C}^0$.
6. Вакуумный насос медицинский с колбой-ловушкой
7. Отдельный набор автоматических микродозаторов переменного объема.
8. CO_2 – инкубатор.
9. Термостат.
10. Световой микроскоп.
11. Инвертированный микроскоп.
12. Люминесцентный микроскоп.
13. Низкотемпературный кельвинатор -152 C^0 .
14. Сосуд Дьюара.
15. Сосуд для хранения и перелива жидкого азота.
16. Фармацевтический холодильник $0\text{---}+5\text{ C}^0$.
17. Паровой автоклав.

18. Сухожаровой шкаф.

19. Набор ультрафиолетовых бактерицидных ламп.

20. Наборы культуральных флаконов, одноразовых наконечников, штативов, одноразовых микроцентрифужных пробирок, ёмкостей с дезинфицирующими растворами и т. д.

Очень важным вопросом в клеточной инженерии является выбор соответствующей лабораторной посуды для культивирования клеточных линий. Здесь необходимо учитывать ряд факторов, таких как: растут ли клетки в суспензии или монослоем, каков будет масштаб эксперимента, допустим ли газовый обмен с атмосферой или флаконы должны быть закупорены. На рисунке 2 представлена посуда, используемая при культивировании клеток.



Рис. 2 Культуральная посуда

1. Флакон культуральный с вентилируемой крышкой.
2. Пробирка культуральная со скошенным дном.
3. Чашка Петри культуральная .
4. Планшет культуральный

Клетки в культуре очень капризны. Они требуют отсутствие любых токсических веществ в среде, поэтому необходимо использовать только сверхчистую воду и одноразовую пластиковую посуду.

Клетки, входящие в состав ткани или клетки, растущие в виде монослоя на пластике или стекле, прикрепляются друг к другу и к субстрату посредством мукопротеидов и коллагена. Многие клеточные монослои и эпителиальные ткани используют для своей

целостности двухвалентные ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} . Для диссоциации клеток и отделения их от монослоя используют растворы различных протеаз с хелатирующими агентами:

1. Трипсин 0,25% раствор. Используется для дезагрегации ткани и отделения клеток от монослоя.
2. Проназа – комплекс. Используется для получения первичных культур. Представляет собой смесь протеолитических ферментов, продуцируемых штаммом *Streptomyces griseus* K-1, содержит эндо-пептидазы, аминопептидазы и карбоксипептидазы, гидролизует 80-85% пептидных связей в казеине и альбумине, катализирует гидролиз сложных эфиров.
3. Коллагеназа. Обладает минимальным повреждающим эффектом на клетки, используется для получения клональных клеточных культур.
4. ЭДТА. Хелатирующий агент, удаляет двухвалентные ионы, что приводит к диссоциации клеточного монослоя и перехода клеток в суспензию без использования протеаз.

Клеточные культуры регулярно проверяются на наличие бактериального загрязнения. Для этого исследуется надосадочная фракция культур клеток.

Глава 1

Культуры животных клеток

1.1 История культивирования животных клеток

В начале 20 века возникает ряд направлений в научных исследованиях, связанных с возможностью выделения из организма животного ряда клеток, с целью их дальнейшего культивирования в условиях *in vitro*. Идея культивирования животных клеток прошла ряд исторических этапов:

1 этап - признание идеи о возможности культивирования животных клеток в условиях *in vitro*.

2 этап - культивирование животных клеток как необходимой среды для роста и размножения фильтрующихся вирусов и практическое получение значимых количеств вирусного материала для нужд вирусологии и практической медицины.

3 этап - возможность влияния на геном животной клетки, с целью получения гибридных клеток с желаемыми свойствами. Возникновение гибридомной технологии и метода получения моноклональных антител.

Для успешной реализации методов клеточной инженерии необходима строгая научная база, основанная на ряде взглядов и концепций крупнейших учёных 19-20 вв. Основной концепцией, находящейся в основе клеточной инженерии является теория Клода Бернара "О постоянстве внутренних условий клетки вне организма", согласно которой:

- 1.) Клетка вне организма животного будет стремиться поддерживать свой внутренний гомеостаз, наряду с живым организмом.
- 2.) Клетка вне организма способна к росту и делению, в случае сходства условий её существования внутри и вне организма.
- 3.) Существует реальная возможность обеспечения животной клетки условиями для её жизнедеятельности, максимально приближенных к условиям *in vivo*. Это достигается путём тщательной разработки питательных сред; подбором ростовых факторов; антибиотиков, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры; условий влажности, газового состава и температуры.

Ниже в таблице представлены основные исторические достижения клеточной инженерии на протяжении 19-20 века (табл. 2).

Исторические этапы культивирования животных клеток

Год	Автор	Суть достижения
1885 год	У. Ру	Сохранение в жизнеспособном состоянии оболочки куриного эмбриона в тёплом физиологическом растворе.
1897 год	Лёб	Поддержание в жизнеспособном состоянии клеток крови и соединительной ткани в пробирках с сывороткой и плазмой крови.
1898 год	Люнгрен	Поддержание эксплантатов кожи человека в жизнеспособном состоянии в кислой среде с сохранением способности к реимплантации.
1903 год	Джолли	Работа с делящимися клетками в висячей капле, содержащей лейкоциты саламандры.
1906 год	Биб и Эвинг	Работы по пересадке лимфосаркомных тканей собаки.
1907 год	Росс Харрисон	Усовершенствование методики «висячей капли». Культивирование кусочков ткани, оторгнутых от медуллярного сосуда лягушки, их внедрение в лимфатический тромб и культивирование на нижней стороне покровного стекла, расположенного над углублением в предметном стекле. Впервые наблюдал рост нервных клеток в течение нескольких недель.
1911 год	Рид	Выращивание эксплантов клеток костного мозга на среде специального химического состава.
1913 год	Алексис Каррель	Применение плазмы крови, обогащённой экстрактом эмбриона, как основы для культивирования тканей. Введение методов асептики в процедуры культивирования тканей. Достижение явного успеха в пересадке клеток, с использованием хирургической техники.
1928 год	Канти	Разработка метода кинофотомикрографии.
1937 год	Симмс и Стилдман	Применение трипсина для высвобождения клеток из тканевой матрицы и пассивирование клеток между культурами плазмы.
1948 год	Эрл с сотр.	Получение клонов клеток из одиночной клетки
1952 год	Джей	Выделение перевиваемой линии карциномы шейки матки, так называемая линия HeLa.
1955 год	Игл	Систематические исследования пищевых потребностей клеток в условиях <i>in vitro</i> .
1961 год	Хейфлик и Мурхед	Выделение линии диплоидных клеток человека (НДС) WI-38. Формирование «Концепции предела Хейфлика» и разработки теории феномена старения.

1.2 Введение клеток в культуру, их происхождение

В настоящее время, в зависимости от поставленных перед исследователем целей и задач, используется два направления в культивировании животных клеток: культура

клеток и культура органов и тканей.

Каждое из направлений характеризуется своим комплексом преимуществ и недостатков (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительная характеристика клеточной и органной культуры

Культуры клеток	Культуры органов и тканей
Отсутствие структурной организации.	Наличие структурной организации.
Потеря характерной гистиотипической архитектуры.	Характерная гистиотипической архитектуры.
Неравновесное состояние биохимических процессов по отношению к условиям <i>in vivo</i> .	Состояние биохимических процессов максимально приближено к условиям <i>in vivo</i> .
Отсутствие контроля динамических свойств.	Контроль динамических свойств.
Невозможность реконструкции <i>in vitro</i> клеточных взаимодействий.	Реконструкции <i>in vitro</i> клеточных взаимодействий.
Отсутствие гомогенности и фиксированного фенотипа. Многие культуры в своем составе содержат клетки-предшественники и стволовые клетки.	Гомогенность культуры тканей.

Для ведения культуры клеток используются различные источники. Таковыми могут являться взрослые или эмбриональные ткани, а также нормальные и опухолевые. Каждая такая культура клеток будет характеризоваться рядом морфологических, биохимических и физиологических особенностей. Свежевыделенные культуры носят название **первичных культур** до начала их **субкультивирования** или **пассивирования**. Клетки первичных культур будут обладать рядом особенностей, таких как низкая пролиферативная активность и гетерогенность клеточного состава. После проведения нескольких **пассажей** (пересевов) таких клеточных культур удаётся получить более однородную популяцию клеток, теряется ряд специализированных клеток и, в результате, первичная культура превращается в постоянную клеточную линию. Таким образом, пассивирование клеточной культуры является важным методом для продления жизни клеток и их конечной трансформации в **постоянную клеточную культуру**.

Образование постоянной клеточной культуры отражается на комплексе морфофизиологических особенностях клеток:

1. Уменьшение размеров клеток.
2. Падение адгезивности клеток..
3. Округление клеток.
4. Увеличение ядерно/цитоплазматического отношения.
5. Снижение времени удвоения клеток с 3 часов до 12 часов, и, как результат, увеличение скорости роста клеток.
6. Снижение зависимости клеток от сыворотки.
7. Увеличение эффективности клонирования.
8. Снижение зависимости от субстрата.
9. Увеличение гетеропloidности и анеупloidности.

Клетки, культивируемые в культуре, обладают комплексом биологических особенностей, изучаемых в одном из подразделов клеточной инженерии – **биологии культивируемых клеток**.

1.3 Биология культивируемых животных клеток

В ранних работах (до 1961 г.) по клеточной инженерии, исследователи *полагали, что при поддержании соматических клеток в условиях, максимально приближенных к условиям in vivo, клетки могут делиться в течение неограниченно долгого времени, сохраняясь в неизменной форме*. Однако, дальнейшие опыты Хейфлика и Мурхеда показали, что это далеко не так. Культуры первичных клеток сравнительно легко получались из разнообразных тканей. Некоторое время клетки экспоненциально размножаются, но примерно через 6 месяцев скорость роста культуры снижается и уже через 10 месяцев клетки дегенерируют и погибают. Это явление наблюдается примерно после 50 генераций, когда из одной первичной клетки образуется примерно 10^{22} клеток. В случае получения первичных культур из взрослых тканей, количество делений ещё меньше и составляет примерно 20. За данным явлением закрепилось название «**Предел Хейфлика**», в честь учёного, занимавшегося исследованиями в этой области и выдвинувшего объяснение данному феномену. Предел Хейфлика связан с сокращением теломерных участков *ДНК* на концах хромосом. Если клетка не имеет активной теломеразы, как преимущественное большинство соматических клеток, при каждом делении клетки теломеры сокращаются, потому что *ДНК*-полимераза неспособна реплицировать концы молекулы *ДНК*. Когда после определённого числа делений теломеры исчезают совсем, клетка обычно становится “арестованной” в определённой стадии клеточного цикла или запускает программу апоптоза.

На ранних стадиях клетки сохраняют правильный диплоидный набор хромосом, но

уже на более поздних этапах большинство клеток становится анеуплоидами. В редких случаях такие анеуплоидные клетки выживают, начинают размножаться и превращаются в **клеточный штамм**.

Клеточные штаммы обладают специфическими свойствами, которые сохраняются в течение длительного культивирования. Многие стабильные клеточные штаммы способны к неопределённо длительному росту и размножению в культуре, причём это связано с анеуплоидным кариотипом.

Особенности в биологии культивируемых клеток *in vitro* заключается в следующем:

1. Клетки животных и, в особенности, млекопитающих способны расти в состоянии клеточной культуры лишь прикрепленными к какому-либо субстрату. В качестве субстрата можно использовать другие клетки, коллаген, желатин (денатурированный коллаген), стекло или пластик. В случае отделения культуральных клеток от субстрата, происходит остановка роста и размножения, быстрая дегенерация такой суспензионной культуры.
2. Клетки растущей клеточной культуры находятся в клеточном цикле деления и делятся с периодичностью примерно 1 раз в 24 часа.

Рассмотрим кривую роста клеток в культуре (рис. 4).

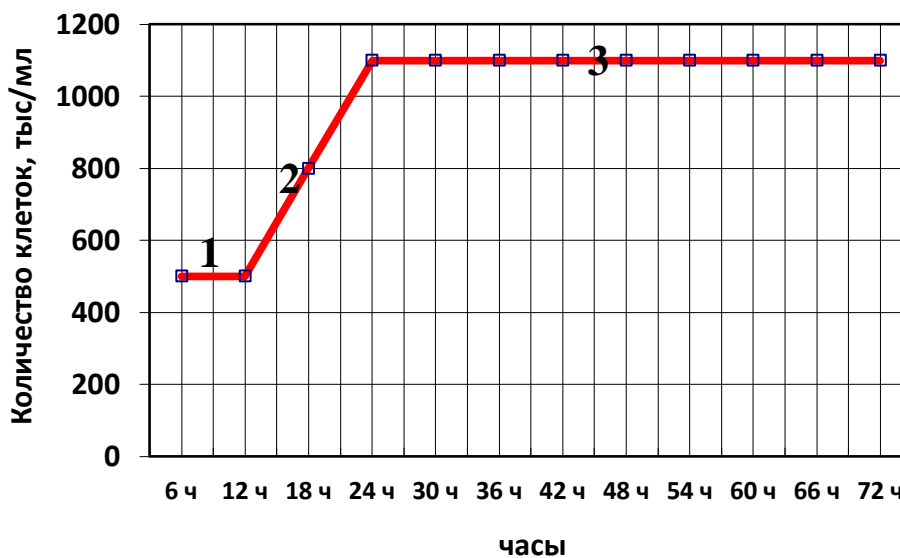


Рис. 3 Кривая роста животных клеток в культуре

1- начальная фаза, 2 – фаза экспоненциального роста, 3 – стационарная фаза роста

При культивировании животных клеток в обычных условиях они удваиваются в равномерные промежутки, и сама культура находится в фазе экспоненциального роста (2). Постепенно, при росте клеточной культуры, один из факторов среды становится

ограничивающим, лимитирующим. Это происходит либо в результате истощения питательного вещества, либо вследствие того, что клетки покроют всё свободное пространство в виде монослоя. Скорость роста культуры замедляется и наступает стационарная стадия роста (3).

3. Клетки в своём жизненном цикле проходят ряд этапов (рис. 4)

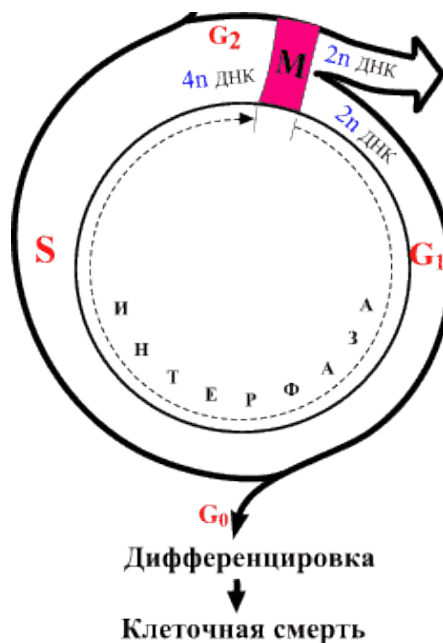


Рис. 4 Клеточный цикл

Клеточные культуры находятся под контролем своего роста, что связано с постоянным действием лимитирующих факторов. Для стимуляции первичной культуры, прежде чем клетки возобновят движение по циклу к фазе деления, следует устранить ограничение роста. В этом случае клетки возвращаются в фазу G₁ клеточного цикла, происходит синтез ДНК, после чего клетка делится (рис. 5)

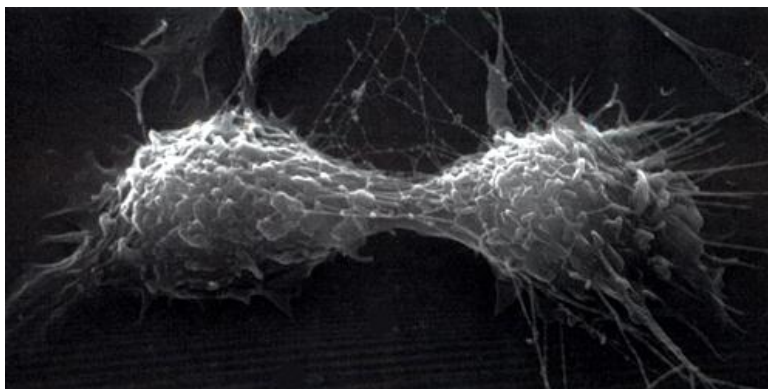


Рис. 5 Цитокинез на завершающей стадии в животной клетке

Клетки некоторых быстрорастущих опухолей утрачивают чувствительность к контролю роста, и, поэтому, полученные из опухолей первичные клетки легко

адаптируются к росту в культуре и могут расти до более высокой плотности по сравнению с клетками из нормальных тканей.

4. Поддержание постоянной плотности популяции клеточной культуры в результате согласования скорости деления. В случае эпителиальных клеток или фибробластов, помещённых в культуральный флакон, будет происходить «приклеивание» к поверхности флакона, «распластывание» клеток и их деление до образования сплошного монослоя из клеток, соприкасающихся друг с другом.
5. Клетки, делящиеся в культуре, претерпевают в процессе своего роста так называемое **контактное торможение**. При достижении клетками плотного монослоя, при котором клетки плотно прилегают друг к другу, происходит остановка деления клеток. Причём даже нормальные клетки могут оставаться в таком состоянии некоторое время. Явление контактного размножения тесным образом связано с функционированием **адгезивных контактов**. Адгезивные контакты обеспечиваются вследствие образования комплексов рецепторов на поверхности мембраны клеток. В мембрану клеток встроены рецепторы адгезии, в основе которых лежит комплекс гликопротеинов. Главным гликопротеидом клеточной поверхности является фибронектин. **Cig** (Cold insoluble globulin-нерастворимый на холоде глобулин) и **SP** (Cell surface protein - клеточный поверхностный белок). Фибронектин характеризуется молекулярной массой 220 000, но может существовать также в форме связанных дисульфидными связями димеров и более высоких олигомеров. Молекулы фибронектина весьма гибки и состоят из нескольких, лабильно связанных доменов. На клеточной поверхности фибронектин образует относительно неподвижную фибриллярную сеть, связанную через мембрану клетки с элементами цитоскелета. Фибронектин отсутствует на поверхности митотических клеток, и его количество резко увеличивается при достижении нормальными клетками полного монослоя, или при остановке клеточной пролиферации при низкой концентрации сыворотки.

При соприкосновении гликопротеиновых комплексов соседних клеток происходит формирование так называемых **бляшек адгезии**. Адгезивные бляшки начинают выделять разнообразные белки, основу которых составляют белки цитоскелета. Белки цитоскелета, встраиваясь в мембрану, уменьшают её «текучесть», клетки не округляются. Таким образом, при контакте клетки с соседней клеткой происходит прекращение движения в этом направлении, так называемое **контактное ингибирование**. При достижении монослойности, клетки культуры прекращают своё движение. Клетки становятся более скученными и менее распластанными, что

приводит к уменьшению доли клеточной поверхности, обращённой к среде. Далее клетки перестают делиться, происходит **торможение пролиферации**. Если монослой клеток поранить иглой до образования свободной зоны от клеток, то в клетках, примыкающих к краю такой "раны", происходит стимуляция синтеза ДНК и делений. В результате клетки быстро занимают поверхность "раны" в монослое (рис. б).



Рис. 6 Пролиферация клеток, после нанесения «раны» клеточному слою

- б. Плотность клеточной популяции регулируется концентрацией **фактора роста**. Обычно фактор роста присутствует в среде в очень низкой концентрации, порядка $10^{-9} - 10^{-10}$ М. Каждая клетка имеет на своей поверхности примерно 80-150 рецепторов для фактора роста, причём каждый рецептор обладает очень высоким сродством к нему. После соединения «фактор роста – рецептор», образовавшийся комплекс поглощается клеткой путём эндоцитоза и расщепляется. Таким образом, между соседними клетками существует жёсткая конкуренция за факторы роста, в результате чего предотвращается рост клеточной популяции выше некоторого уровня её плотности.

В ходе жизнедеятельности клеточной культуры в ряде случаев происходит изменение ростовых свойств культивируемых клеток, так называемая **трансформация**. Как правило, трансформация - процесс необратимый, при котором происходит совокупность генетических изменений, контролирующих неопластический фенотип. Трансформированные клетки характеризуются следующими особенностями:

1. Укорочением клеточного цикла (время удвоения уменьшается с 36 часов до 12 часов).
2. Уменьшением зависимости клеток от добавления сыворотки.
3. Нетребовательностью к качеству субстрата.
4. Увеличением потенции к образованию опухолей.
5. Морфологическими изменениями (мельчание или укрупнение, увеличение ядра).

Можно предположить, что изменение ростовых свойств является формой адаптации трансформированных животных клеток к условиям, при которых ограничивается рост и размножение нормальных клеток. Трансформированные клетки способны расти в

условиях, в которых отношение площади поверхности к объёму менее благоприятны. Трансформированные клетки способны расти в суспензионных культурах. Причинами трансформации клеток являются следующие факторы (рис. 8).

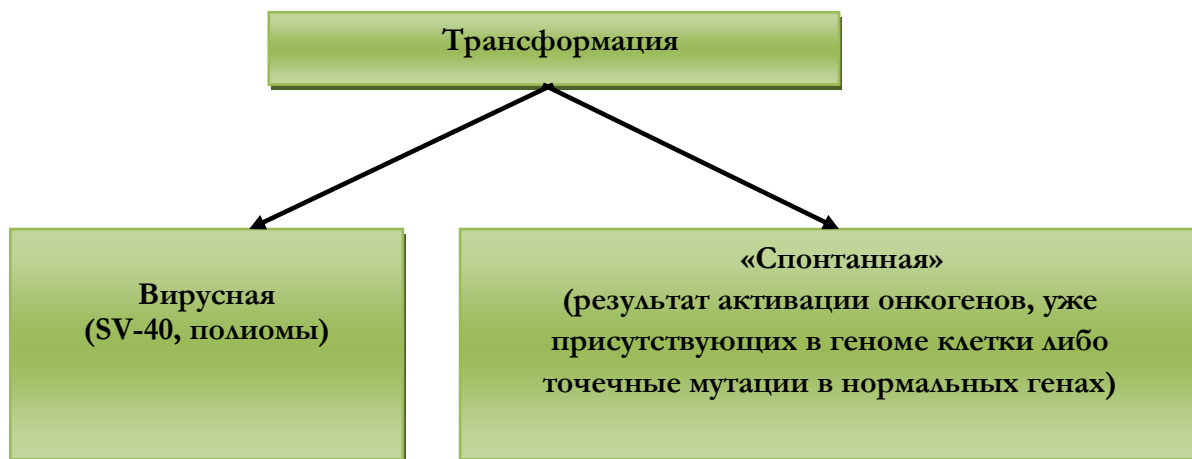


Рис. 7 Причины трансформации клеток в культуре

1.4 Питательные среды и условия культивирования

Для роста и размножения культуры клеток, извлечённой из организма необходимы особые внешние условия, которые должны максимально моделировать условия *in vivo*. Внешние условия могут быть представлены:

1. Жидкой питательной средой строго определённого состава. Основу жидкой среды составляет солевой раствор, минеральные компоненты которого подобраны таким образом, что поддерживается постоянный кислотнощелочной баланс, постоянство рН и определённая буферная ёмкость. К минеральной основе добавляются различные компоненты биологического и фармакологического происхождения – плазма или сыворотка крови, тканевые экстракты, антибиотики, ростовые факторы и др.
2. Газообразной средой, имеющей строго определённый процентный газовый состав, температуру и влажность.
3. Твёрдым субстратом, основой, фазой, поверхностью субстрата. Разные клеточные линии предъявляют различные требования к поверхности субстрата.

Ниже приведены основные среды для ведения культур животных клеток (табл. 4).

Основные питательные среды для культивирования животных клеток

Наименование среды	Область применения	Состав среды
Среда Игла MEM (minimal essential medium) и среда Игла BME	Стандартные среды для ведения культур животных клеток.	Основа среды – раствор Эрла, минеральные вещества, 13 незаменимых аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, холин, инозит. Используется только с сывороткой, отсутствует биотин, витамин В 12, ионы Fe.
Среда Дульбекко DME или DMEM	Используется при культивировании клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридом. Является основой для бессывороточных сред.	Содержит двойную концентрацию аминокислот, глицин, серин, пируват, железо. Необходим инкубатор с 10% концентрацией CO ₂
Среда Искова IMDM – модификация среды Дульбекко	Используется для культивирования лимфоцитов и кроветворных клеток.	Среда бессывороточная. Добавлены незаменимые аминокислоты, биотин, витамин В 12, селенит натрия.. В среду введён NEPES и уменьшены концентрации NaCl и NaHCO ₃
Среда МакКоя 5A	Разработана для поддержания клонального роста клеток карциномы Уолкера 256 в присутствии сыворотки и других первичных культур.	
Среда RPMI	Предназначена для культивирования лейкоцитов в присутствии сыворотки, а также используется для культивирования гибридом.	Характерен широкий спектр питательных веществ.
Среда 199	Разработана для культивирования фрагментов сердца из эмбриона цыпленка.	Характерен широкий спектр питательных веществ и невысокая их концентрация. Обычно добавляется 5-20% фетальной сыворотки.
Сыворотка	Применяется в качестве добавки для питательных сред.	Содержит гормональные факторы, стимулирующие рост клеток и их функции, факторы прикрепления и распластывания клеток и т. д.

1.5 Системы культивирования клеток

Культуры клеток возможно культивировать несколькими основными способами. Ниже приведены основные системы культивирования (Рис. 8).

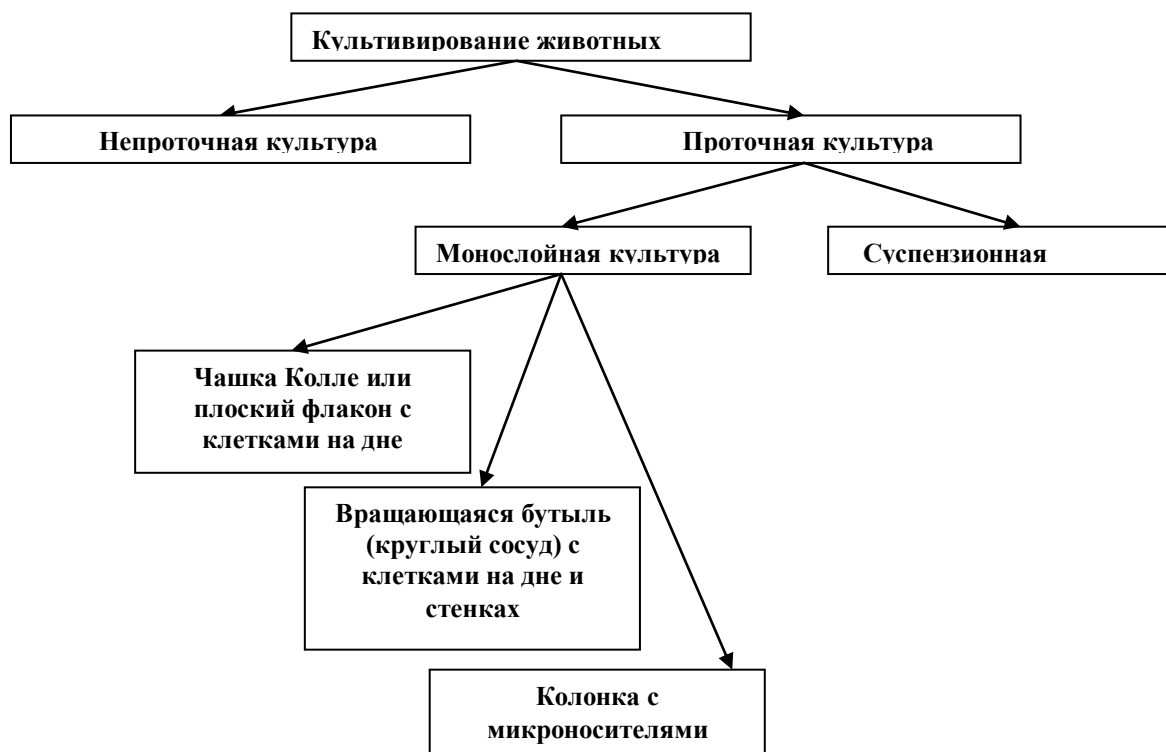


Рис. 8 Основные системы культивирования.

Ниже в таблице 5 приведена Сравнительная характеристика различных систем культивирования

Таблица 5

Сравнительная характеристика различных систем культивирования

Непроточная культура	Проточная культура
Тип клеточной культуры, при котором клетки культивируются в неизменном объёме среды	Тип клеточной культуры, при котором клетки культивируются в объёме среды, при этом происходит постоянная смена среды.
При росте клеток происходит истощение питательных веществ с накоплением метаболитов.	Поддерживаются истинные гомеостатические условия.
Необходима периодическая замена среды на новую, вследствие чего происходят скачки в клеточном метаболизме.	Концентрация питательных веществ и метаболитов остаётся на постоянном уровне, вследствие постоянного вхождения в систему новых питательных веществ и удалением продуктов метаболизма.

	Монослойная культура	Суспензионная культура
С течением времени происходит прекращение пролиферации клеток, вследствие истощения среды.	Тип клеточной культуры, при котором клетки располагаются в один слой на специальной подложке, осуществляя тесные межклеточные контакты.	Тип клеточной культуры, при котором клетки располагаются в виде взвеси в ростовой среде.
	Данный тип культуры может использоваться для любого типа клеток.	Характеризуется высоким выходом клеток
	Обеспечивается высокая плотность клеток на единицу площади пространства.	
	Лёгкая смена среды и промывки клеток, т. к. клетки плотно прикреплены к субстрату.	
	Оптимальна при необходимости культивирования вирусов, для распространения вирусов через межклеточные контакты.	
	Недостатками является сложность определения и контроля pH, O ₂ , требуется большое пространство, трудности отбора клеток.	

1.6 Культуры клеток человека. Стволовые клетки

В настоящее время могут быть культивированы фактически любые культуры клеток человека. Благодаря культивированию клеток человека раскрываются широкие перспективы в оценке морфологических и биохимических особенностей различных нормальных и опухолевых тканей человека. Становится возможной оценка влияния и эффекта тестируемого фармакологического продукта. Возможны исследования в области геномики, протеомики и транскриптомики, с использованием культур человеческих клеток. Спектр клеток, которые в настоящее время можно культивировать, достаточно широк: фибробласты (элементы соединительной ткани), клетки кости и хряща, мышечные клетки, эпителиальные клетки, нервные клетки - (нейроны, глиальные клетки), эндокринные клетки, опухолевые клетки.

Наиболее распространены в практической клеточной инженерии человека культуры фибробластов. Фибробласты обладают комплексом особенностей, позволяющих применять их культуру, как удобный объект исследования:

1. Лёгкость культивирования.
2. Фибробласты являются клеточным элементом соединительной ткани, которая составляет значительную часть массы тела человека.
3. Фибробласты составляют строму многих органов, являются важным участником их морфогенеза.
4. Фибробласты создают все условия для микроокружения, необходимого для дифференцировки и функционирования специализированных клеток.
5. В фибробластах имеется фермент моноаминоксидаза.
6. Фибробласты содержат рецепторы к глюкокортикоидным гормонам, инсулину, нейромедиаторам.
7. Все изменения, возникающие при ведении культуры фибробластов легко контролируются и сводятся к минимуму, при создании соответствующих условий культивирования.
8. Фибробласты *in vitro* сохраняют важнейшие черты, свойственные клеткам в организме человека.

В 1999 году журнал «Science» признал открытие эмбриональных стволовых клеток (рис. 9) третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека». **Стволовые клетки** — это иерархия особых клеток живых организмов, каждая из которых способна впоследствии дифференцироваться особым образом (то есть получать специализацию и далее развиваться как обычная клетка). Стволовые клетки способны асимметрично делиться, из-

за чего при делении образуется клетка, подобная материнской (самовоспроизведение), а также новая клетка, которая способна дифференцироваться. В 1908 году термин «стволовая клетка» был введён в научный обиход русским гистологом Александром Максимовым (1874—1928) на съезде гематологического общества в Берлине. Он постулировал существование стволовой кроветворной клетки. В 1981 году американский биолог Мартин Эванс впервые выделил недифференцированные плюрипотентные линии стволовых клеток — бластоцисты мыши. В 1998 году Д. Томпсон и Д. Герхарт выявили бессмертную линию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).

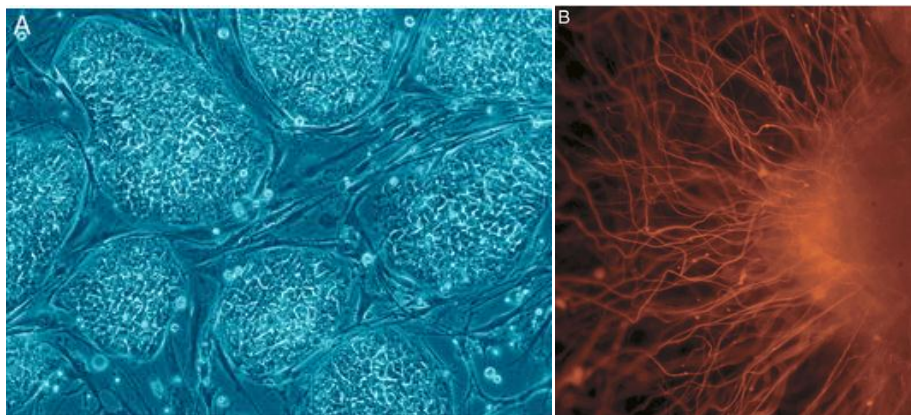


Рис. 9 Фотографии человеческих эмбриональных стволовых клеток

Корнем иерархии стволовых клеток является **тотипотентная зигота**. Первые несколько делений зиготы сохраняют тотипотентность и при потере целостности зародыша это может приводить к появлению монозиготных близнецов. К ветвям иерархии относятся **плюрипотентные** (омнипотентные) и **мультипотентные** (бластные) стволовые клетки. Конечными элементами иерархии являются зрелые **унипотентные** клетки тканей организма. **Нишами стволовых клеток** называются места в ткани, где постоянно залегают стволовые клетки, делящиеся по мере надобности для дальнейшей дифференциации. Стволовые клетки размножаются путём деления, как и все остальные клетки. Отличие стволовых клеток состоит в том, что они могут делиться неограниченно, а зрелые клетки обычно имеют ограниченное количество циклов деления. В организме имеется ряд популяций стволовых клеток различной степени зрелости. В нормальном состоянии, чем более зрелой является клетка, тем меньше вероятность того, что она сможет превратиться в клетку другого типа. Но, всё же, это возможно благодаря феномену **трансдифференцировки клеток**. В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Они называются **бластными клетками**. Например, частично созревшие клетки мозга — это нейробласты, кости — остеобласты и так далее. Дифференцировку могут запускать как внутренние причины, так и внешние.

Стволовые клетки таят в себе невиданные возможности: от регенерации поврежденных органов и тканей до лечения заболеваний, не поддающихся лекарственной терапии. Наиболее универсальны эмбриональные стволовые (*ES - embryonic stem*) клетки. Они были взяты на самой ранней стадии развития плода из той его части, которая в норме дает начало трем разным слоям (зародышевым листкам) более позднего эмбриона и, в конце концов, - всем органам и тканям. Большинство ES-клеточных линий человека, находящихся сегодня в распоряжении ученых, получены от необычных эмбрионов - они были созданы в результате искусственного оплодотворения *in vitro*. Однако, не все они идентичны. Для проверки плюрипотентности предложено два теста, давно апробированных на ES-клетках животных. Первый тест основан на введении предполагаемых ES-клеток в организм какого-нибудь животного. Если у того образуется тератома (опухоль, содержащая клетки всех трех зародышевых листков), то плюрипотентность можно считать доказанной. Второй тест заключается в маркировке клеток-кандидатов и введении их в развивающийся эмбрион. Если клетки оказываются во всех тканях родившегося детеныша, то они скорее всего плюрипотентны. Однако применение подобной методики может привести к появлению животного-химеры, во всех тканях которого присутствует человеческая ДНК, что с этической точки зрения неприемлемо.

Чтобы получить линию ES-клеток, из бластоцисты отбирают внутреннюю клеточную массу и помещают ее в чашку Петри с клетками-кормилицами. Через несколько дней в чашке образуется колония клеток, которые можно отнести к эмбриональным стволовым, если они соответствуют двум условиям: дают положительный результат на стандартные тесты и обладают способностью к самоподдержанию. Характеристика эмбриональных стволовых клеток:

1. **Тотипотентность** — способность образовывать любую из 350 тканей организма.
2. **Хоуминг** — способность стволовых клеток, при введении их в организм, находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию.
3. **Теломеразная** активность.
4. Наличие в цитоплазме мРНК всех 3 тысяч генов, которые отвечают за раннее развитие зародыша.

Ниже на рисунке 10, приведена схема родословного древа клеток крови. Показано, что хранилищем стволовых клеток организма служит костный мозг, где стволовые клетки находятся с своеобразной нише в окружении стромальных клеток, которые участвуют в передаче регуляторных сигналов.

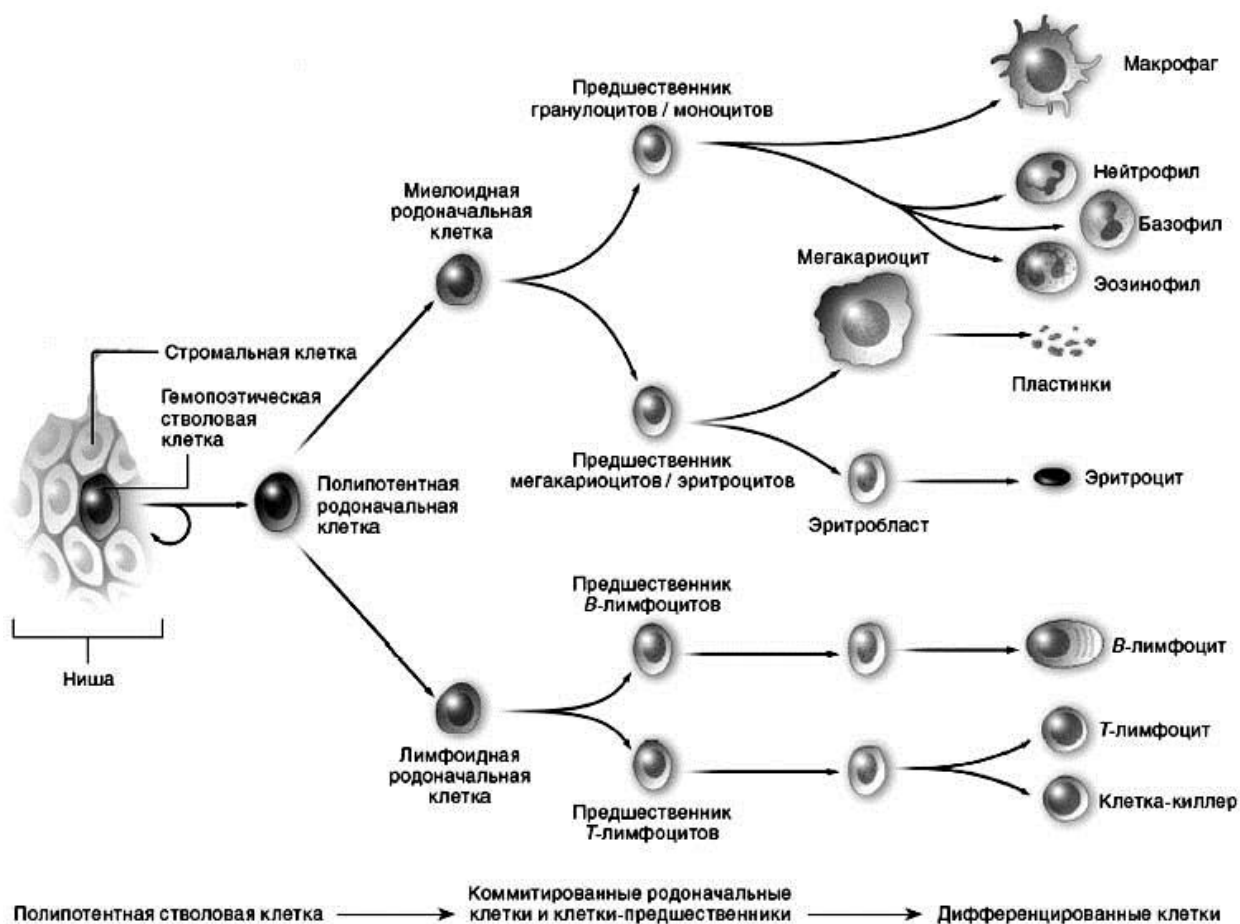


Рис. 10 Родословное дерево клеток крови

Открывающиеся возможности использования стволовых клеток, а также ряд возникающих проблем приведены ниже в таблице 6.

Таблица 6

Перспективы и проблемы использования стволовых клеток

Перспективы	Проблемы
Возможность регенерации повреждённой ткани и органа, при введении в очаг поражения ES стволовых клеток.	Плюрипотентность ES-клеток таит в себе много неожиданностей. Введенные клетки могут инициировать образование тератомы или тканей совсем другого типа чем нужно.
«Омоложение» организма на клеточном уровне.	Клетки-предшественники могут вызвать иммунную реакцию со стороны организма-хозяина. Подобно клеткам трансплантированных органов, они несут на своей поверхности антигены, воспринимаемые иммунной системой как сигнал к атаке.
Терапия нейродегенеративных заболеваний, инфаркта миокарда, дистрофий различного генеза.	Для создания банка клеток, в котором нашлись бы совместимые с организмом больного, потребуются миллионы

	эмбрионов, отбракованных в клиниках по искусственному оплодотворению.
Открытие механизмов образования раковых стволовых клеток и существенный прогресс в области онкологии.	Возможность возникновения мутации в ES-клетках, в результате чего они превратятся в раковые.
	Очень медленный рост стволовых клеток в культуре и сложности их культивирования.
	Количество стволовых клеток у эмбриона составляет 1 клетка на 10 тысяч, у человека в 60-80 лет — 1 клетка на 5-8 миллионов.

Таким образом, пока изучение стволовых клеток породило больше вопросов, чем дало ответов. Однако, результаты первых тестов на возможность применения взрослых стволовых клеток для лечения, в частности, сердечно-сосудистых заболеваний весьма обнадеживают. Проведены успешные эксперименты на животных по применению производных ES-клеток для лечения нейродегенеративных расстройств, что, возможно, подтолкнет соответствующие клинические испытания на человеке.

1.7 Проточная цитометрия

Проточная цитометрия – современный метод, который позволяет оценить некоторые оптические параметры частицы (например клетки), находящейся в суспензии. В качестве оптических параметров выступают: оптическая плотность, флуоресценция и светорассеяние. Определение параметров осуществляется за короткий промежуток времени, что позволяет оценить большой массив клеток. Кроме того, к детектору возможно подключение устройства – *клеточного сортера*, что позволяет отсортировать клетки по одному из вышеприведённых показателей. Анализ клеток с помощью проточной цитометрии имеет ряд особенностей:

1. Особый метод окрашивания клеток, по сравнению с окраской клеток на стёклах.
2. Флуоресцентные зонды должны быть специфичны к клеткам и не вымываться в среду.
3. Флуорохромы должны быть не токсичными для культуры клеток.
4. Флуорохромы должны возбуждаться под действие какого-либо линии лазера.

Ниже представлена типичная схема цитофлуориметра (рис. 11).

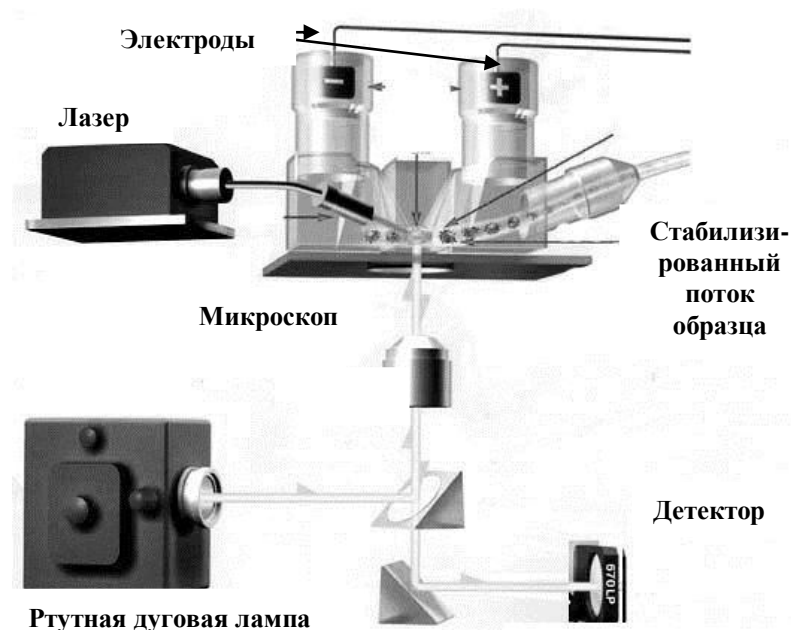


Рис. 11 Общий вид цитофлуориметра и его принципиальная схема.

Один из подходов измерения размера клетки в проточном цитофлуориметре основан на *принципе Культера*. Принцип Культера основан на регистрации изменений электрического сопротивления цепи, индуцированных клетками в растворе электролита. Полученный сигнал проходит цифровую обработку. При прохождении клетки через апертуру проточной ячейки вытесняется электролит в объёме равном объёму клетки. Возникает импульс напряжения, прямо пропорциональный по высоте объёму клетки. Данный метод позволяет обнаружить даже самые незначительные изменения размера клеток и обеспечивает высокую точность анализа.

Области применения проточной цитометрии весьма разнообразны:

1. Анализ жизнеспособности клеток. Проникающие в клетки красители, такие как йодид пропидия (PI) и 7-аминоактиномицин D (7-AAD), можно использовать для дифференциации живых и мёртвых клеток. Цитоплазматическая мембрана

мёртвых клеток становится проницаемой, в результате чего клетки окрашиваются. Также существует различие в объёме между живыми и мёртвыми клетками, которое можно измерить. Идентифицировать мёртвые клетки можно выполнить путём регистрации двух параметров: объёма и светорассеяния в боковом направлении.

2. Исследования в области апоптоза. С помощью двухпараметрического окрашивания Аннексином V-FITC и 7-AAD можно количественно проанализировать клетки, находящиеся на различных этапах запрограммированной гибели (апоптоза). Остатки фосфатидилсерина на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны здоровых клеток на ранних стадиях апоптоза перемещаются во внешний мембранный слой. Аннексином V-FITC связывается с экспонированными молекулами фосфатидилсерина. Клетки с повреждённой плазматической мембраной окрашиваются 7-AAD. На ранних стадиях апоптоза клетки связывают Аннексин V-FITC, но не взаимодействуют с 7-AAD. Мёртвые клетки и клетки на поздних стадиях апоптоза положительны по обоим красителям.
3. Анализ клеток на различных стадиях жизненного цикла. Для этого используется окрашивание ДНК такими красителями, как DAPI или Hoechst. Прибор определяет флуоресценцию клеток на стадиях G₀/G₁, S и G₂/M и позволяет сравнить полученные результаты с данными по размеру клеток.
4. Измерение точного диаметра и объёма клеток в соответствии с мировыми стандартами. Для этого используются специальные калибровочные частицы.
5. Подсчёт и определение жизнеспособности бактерий. Подсчёт живых и мёртвых бактерий выполняется с использованием двухцветного окрашивания красителями Syto9 и PI. Syto9 (проникающий краситель) связывается с ДНК всех клеток. PI окрашивает только повреждённые клетки и клетки с нарушенными функциями мембраны. Концентрация и процентное содержание живых и мёртвых клеток вычисляются с высокой точностью.
6. Исследование пролиферации клеток. Диацетат сложного сукцинимидильного эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) является проникающим красителем, который ковалентно связывается с внутриклеточными аминами и, после расщепления эстеразами клетки, начинает флуоресцировать. После деления клетки, краситель остаётся в дочерних клетках в меньшей концентрации. Клетки, окрашенные CFSE, можно поддерживать в культуре в течение нескольких дней.

Каждый пик флуоресценции соответствует новому циклу деления. Площадь пика соответствует количеству клеток в цикле.

1.8 Культивирование органов

Культивирование *in vitro* органа или части органа, в которых сохраняются анатомическая связь и функционирование тканей, максимально приближенные к таковым в условиях *in vivo*, называется *органной культурой*. Миграция изолированных клеток на периферии экспланта подавляется специальными условиями культивирования, в результате чего могут даже образовываться дифференцированные структуры. Основными особенностями органной культуры является:

1. В органной культуре долгое время сохраняются межклеточные взаимодействия.
2. Клетки органной культуры поддерживают гистологическую и гистохимическую структуру. Различные компоненты ткани сохраняют пространственную взаимосвязь и функциональную активность. Сохраняется строма, которая является незаменимой для поддержания роста и дифференцировки эпителия. Поэтому ткань в органной культуре наиболее приближена к физиологической экспериментальной модели.
3. Приготовление органной культуры является несложной процедурой.
4. Органная культура не способна к размножению.
5. Эмбриональные органы и их зачатки растут *in vitro* также как и *in vivo*, сохраняя при этом чувствительность к гормонам и способны отвечать на их действие.
6. Культивирование органной культуры должно осуществляться в среде чистого O₂.
7. Культивирование органной культуры ограничено по времени и не превышает несколько месяцев.

Существует несколько методов культивирования органной культуры (рис. 12)

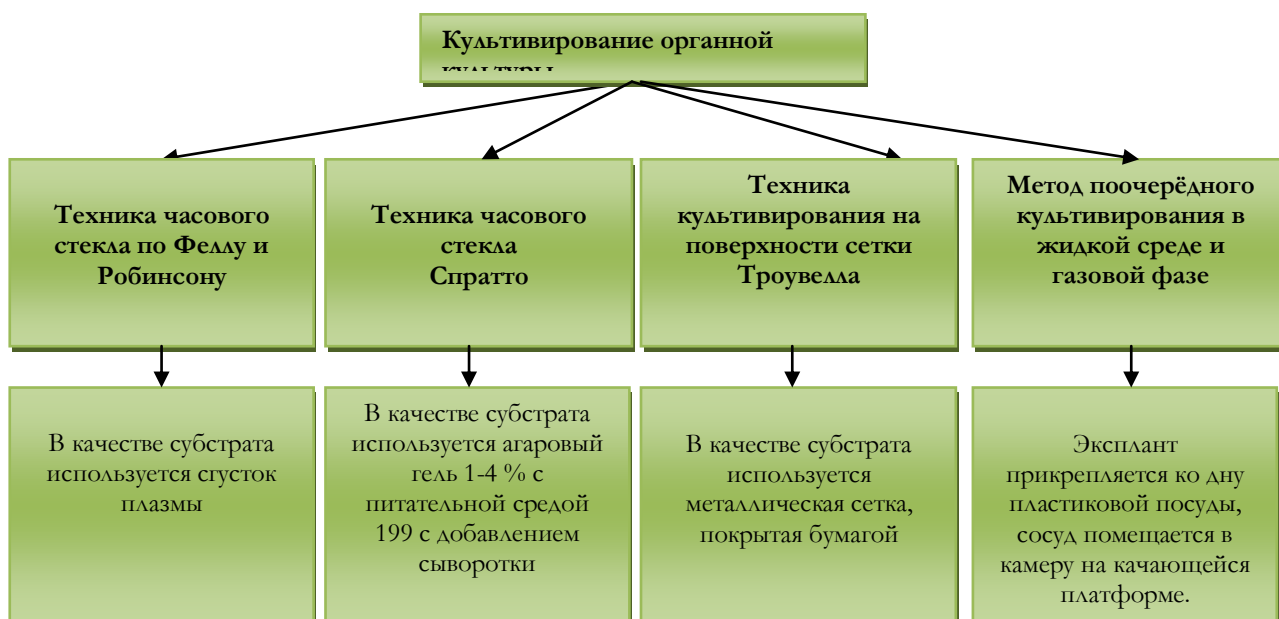
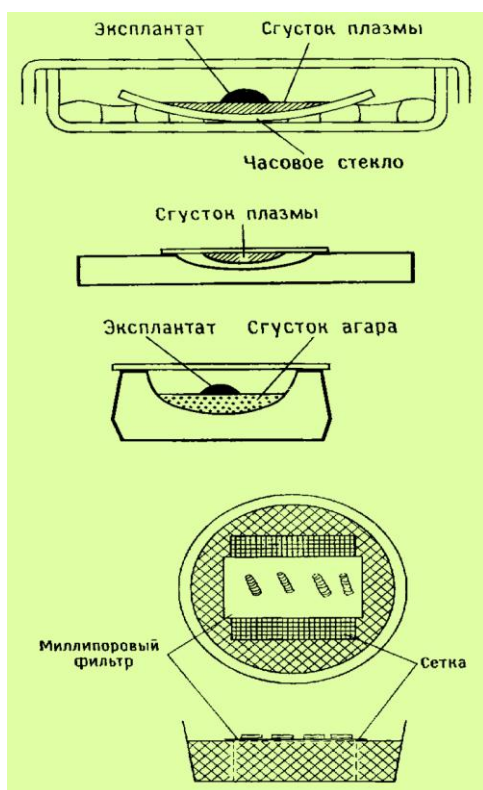


Рис. 12 Методы культивирования органоидной культуры.

Ниже схематично представлены основные методы культивирования органоидных культур (рис. 13).



Метод часовых стёкол, разработанный Феллом и Робинсоном.

Метод висючей капли (Максимов) по Харди, 1978.

Эмбриологическое часовое стекло с агаровым сгустком. Вольф и Хаффен, 1952.

Модифицированный метод Тривелла

Рис. 13 Методы культивирования органоидных культур

1.9 Культивирование клеток и тканей беспозвоночных

Необходимость культивировании клеточных культур беспозвоночных связана с развитием исследований по получению энтомопатогенных препаратов в сельском хозяйстве. Для культивирования энтомопатогенных вирусов необходимо наличие живых клеток насекомых, в связи с чем, для получения вирусных препаратов необходимым условием явилось предварительное разведение насекомых-хозяев. Использование клеточных культур беспозвоночных позволяет решить эту проблему. Однако, культивирование клеток беспозвоночных сопряжено с рядом трудностей и особенностей, что связано, в первую очередь, с разнообразием и оригинальностью роста и метаморфоза, которые могут быть объектом для изучения основных процессов клеточной дифференцировки и регуляции активности генов, и, во вторую очередь, со спецификой культуральных сред. При приготовлении сред исходят из наиболее близкого к гемолимфе состава. Особенности культуральных сред беспозвоночных животных:

1. Наличие органических кислот.
2. Повышенное содержание аминокислот.
3. Высокое осмотическое давление среды.

Источником для клеточной культуры беспозвоночного животного являются имагинальные диски, эмбрионы с удаленной оболочкой, отдельные органы.

1.10 Общее понятие антигенов и антител

Антитела (иммуноглобулины, ИГ, Ig) — это белки, относящиеся к подклассу гамма-глобулинов, находящиеся в крови, слюне, молоке и других биологических жидкостях позвоночных животных. Иммуноглобулины синтезируются В-лимфоцитами в ответ на чужеродные вещества определенной структуры — антигены. Антитела используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов — например, бактерий и вирусов. Антитела выполняют две функции: антиген-связывающую функцию и эффекторную (например запуск классической схемы активации комплемента и связывание с клетками), являются важнейшим фактором специфического гуморального иммунитета (рис. 13).

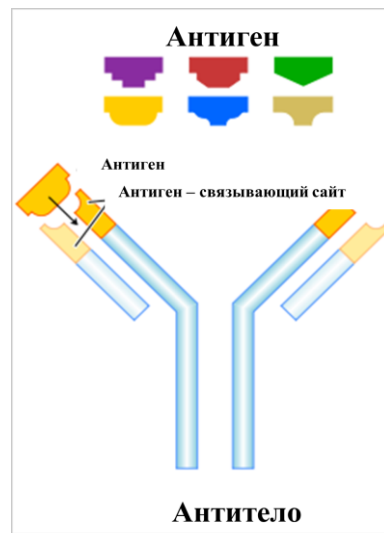


Рис. 13 Общий план строения антитела

Антитела являются относительно крупными (~150 кДа — IgG) гликопротеидами имеющими сложное строение. Состоят из двух тяжёлых цепей (H-цепи, в свою очередь состоящие из VH, CH1, шарнира, CH2 and CH3 доменов) и из двух лёгких цепей (L-цепей, состоящих из VL и CL доменов). К тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахариды. При помощи протеазы папаина антитела можно расщепить на два Fab (англ. *fragment antigen binding* — антиген-связывающий фрагмент) и один Fc (англ. *fragment crystallizable* — фрагмент, способный к кристаллизации). В зависимости от класса и исполняемых функций антитела могут существовать как в мономерной форме (IgG, IgD, IgE, сывороточный IgA) так и в олигомерной форме (димер-секреторный IgA, пентамер — IgM). Всего различают пять типов тяжелых цепей (α -, γ -, δ -, ϵ - и μ - цепи) и два типа легких цепей (κ -цепь и λ -цепь) (рис. 14).

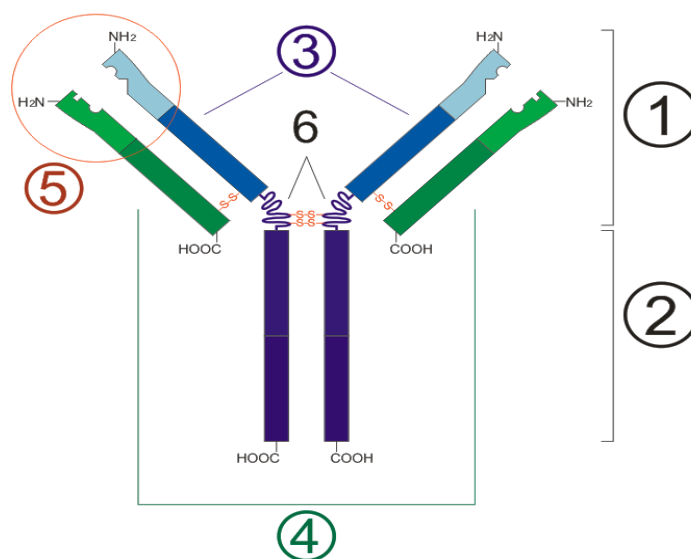


Рис. 14 Строение антитела

1.

У млекопитающих выделяют пять классов иммуноглобулинов — IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающиеся между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей (таблица 7, рисунок 15).

Таблица 7

Общая характеристика основных классов иммуноглобулинов

Название	Функции
Ig G	IgG является основным иммуноглобулином сыворотки здорового человека (составляет 70-75 % всей фракции иммуноглобулинов), наиболее активен во вторичном иммунном ответе и антитоксическом иммунитете. Благодаря малым размерам (коэффициент седиментации 7S, молекулярная масса 146 кДа) является единственной фракцией иммуноглобулинов, способной к транспорту через плацентарный барьер и тем самым обеспечивая иммунитет плода и новорожденного.
Ig E	IgE- связан с мембранами базофилов и тучных клеток, в свободном виде в плазме почти отсутствует. Связан с аллергическими реакциями.
Ig M	IgM представляют собой пентамер основной четырехцепочечной единицы, содержащей две μ - цепи. Появляются при первичном иммунном ответе на неизвестный антиген, составляют до 10 % фракции иммуноглобулинов. Являются наиболее крупными иммуноглобулинами (970 кДа).
Ig D	IgD составляет менее одного процента фракции иммуноглобулинов плазмы, содержится в основном на мембране некоторых В-лимфоцитов. Функции до конца не выяснены, предположительно является антигенным рецептором для В-лимфоцитов, еще не представлявших антигену.
Ig A	IgA сывороточный IgA составляет 15-20 % всей фракции иммуноглобулинов, при этом 80 % молекул IgA представлено в мономерной форме у человека. Секреторный IgA представлен в димерной форме в комплексе секреторным компонентом, содержится в серозно-слизистых секретах (например в слюне, молозиве, молоке, отделяемом слизистой оболочки мочеполовой и респираторной системы).

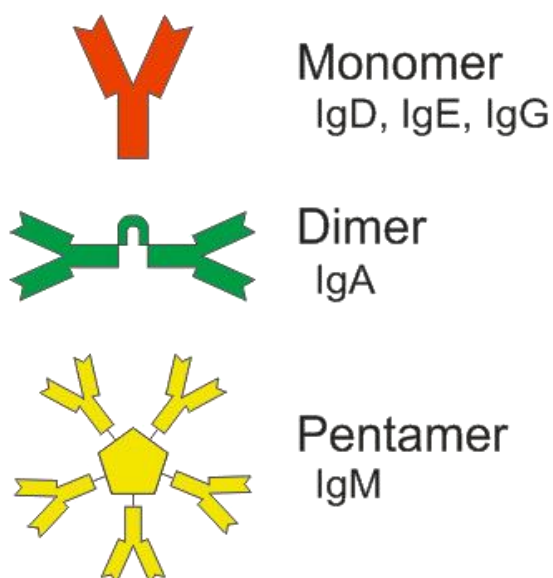


Рис. 15 Структура различных классов иммуноглобулинов

1.11 История метода гибридизации животных клеток

Все обычно используемые методы иммунной клеточной инженерии имеют в качестве первичного звена организм интактного или иммунизированного животного, из крови которого изолируются определенные белки, иммуноглобулины, антитела. Любое производство этого типа предполагает наличие вивария мелких (кролики, мыши, крысы, морские свинки) и крупных (козы, ослы, лошади) животных. При этом следует иметь в виду, что разные животные и, даже одна и та же особь, вырабатывают антитела против того или иного вещества, отнюдь не полностью тождественные. Для достижения их *моноспецифичности* приходится прибегать к серии сложных технологических приемов по адсорбции антисывороток. Это связано не только с индивидуальными особенностями животных или «поливалентностью» иммунизирующего материала, но и с клонированностью клеток иммунной системы организма. Каждый лимфоидный клон иммунной системы вырабатывает особый вариант специфического антитела. В сыворотке иммунизированного животного всегда накапливаются продукты работы многих клонов. Антитела в антисыворотке не моноклональны, это семья очень похожих, но не тождественных антител. Поэтому иммунные реагенты, полученные разными лабораториями или даже одной лабораторией, но в разное время, не совсем идентичны. Несмотря на высокую степень специфичности, это не идеальные реагенты, так как они не моноклональны. В последние годы иммунология решила эту проблему, создав метод наработки моноклональных антител (МКА) в культуре клеток вне организма.

Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером, Сезаром Мильштейном и Ниелсом К. Джерне в 1975 годах (рис. 16).

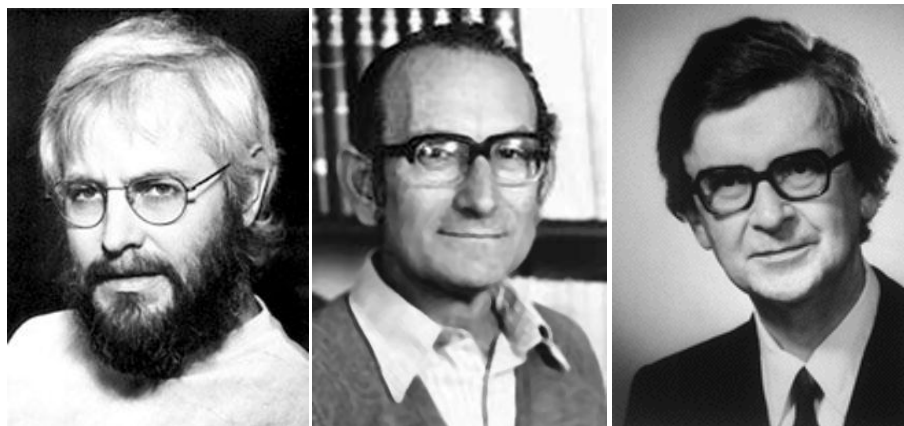


Рис. 16 Фото Жорж Кёлер, Сезар Мильштейн и Ниелс К. Джерне (справа налево)

Они разработали методику получения клеточных гибридов - гибридом, от слияния нормальных лимфоцитов иммунизированных животных с культивируемыми в питательной среде клетками миеломных штаммов. Используются такие штаммы, которые не содержат фермента гипоксантинфосфорибозилтрансферазы, вследствие чего погибают в селективной питательной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ). Лимфоциты в этой среде не гибнут. Слияние лимфоцитов с миеломными клетками осуществляется с помощью полиэтиленгликоля. Слившиеся гибридомные клетки получают от лимфоцита способность синтезировать определенное антитело и выживать в среде с ГАТ. От миеломного партнера они приобретают свойство бесконечно размножаться *in vitro*. Накопившийся гибридомный клон может быть размножен. Синтезируемые им моноклональные антитела можно получить в неограниченном количестве. По всем параметрам антитела, вырабатываемые одним клоном, идентичны по классу молекулы, ее типу, специфичности и авидности. Они взаимодействуют только с одним антигеном, одной антигенной детерминантой. Таким образом, полученный в пробирке, флаконе или клеточном реакторе препарат может служить идеальным по специфичности реагентом на ту или иную органическую субстанцию и идеальным диагностическим или лечебным средством. Набор специфических реагентов, который может быть получен, неограничен. Это могут быть антитела против белков крови и тканей, против специфических антигенов, органов, раковых и нормальных клеток, против вирусов, бактерий, паразитов, против ряда химических соединений и т. д.

В настоящее время получение МКА является одной из ведущих клеточной инженерии. Количество созданных гибридом превышает тысячи и постоянно растет.

Однако, было бы ошибочным считать, что МКА полностью заменят поликлональные сыворотки. Последние могут быть использованы, например, когда определяемый антиген денатурирован или изменен каким-либо другим путем. Было бы неблагоразумно использовать МКА для определения молекул у генетически различающихся видов без тщательного тестирования, гарантирующего, что эти молекулы не “ускользнули” из области специфичности МКА из-за генетического полиморфизма. Поэтому выбор между поликлональными и моноклональными антителами должен определяться их свойствами, необходимыми для решения конкретных задач.

Кроме того, получение МКА является достаточно сложным, длительным и трудоемким процессом, эффективность которого зависит от целого ряда факторов. Это свидетельствует о важности методической части гибридной технологии, которой посвящена чрезвычайно многообразная и многочисленная литература. В связи с этим представляется важным осветить основные принципы техники получения гибридом.

1.11.1 Механизм слияния клеток. Получение гибридом

Процедура получения гибридом, продуцирующих антитела (моноклональные антитела) состоит из следующих основных этапов:

1. Иммунизация животных.
2. Подготовка клеток к слиянию.
3. Слияние клеток.
4. Отбор продуцирующих специфические антитела клонов.
5. Клонирование и реклонирование.
6. Выявление антител, синтезируемых гибридными клетками.
7. Массовая наработка моноклональных антител. Получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела.
8. Выделение и очистка антител.

Ниже представлен рисунок с отображением основных этапов получения гибридом, продуцирующих антитела (рис 17).

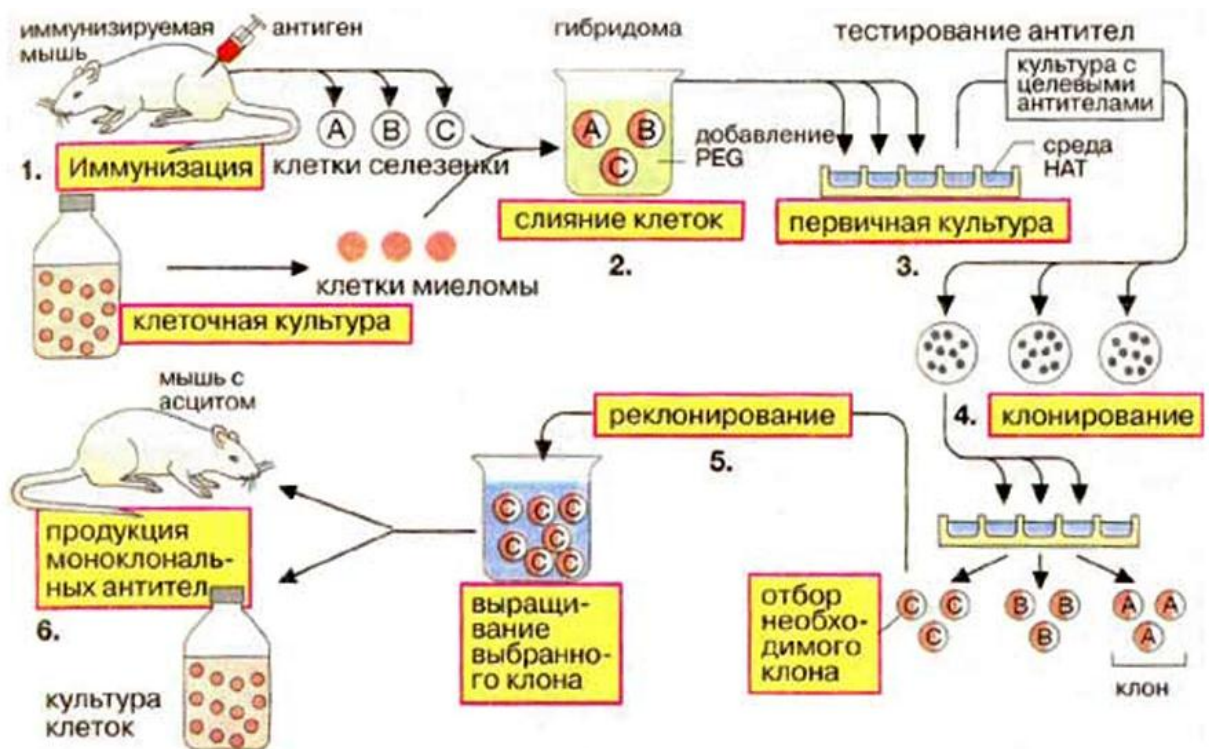


Рис. 17 Схема гибридизации

1 Этап - иммунизация.

Одним из важных этапов техники получения гибридом является подготовка иммунных спленоцитов. Назначение иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности, и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они могут сливаться и образовывать антителообразующие гибридные клетки. Для гибридизации необходимо выделить селезеночные клетки животных через 3 - 4 суток после последнего введения антигена. Конкретная схема иммунизации зависит от природы антигена и его иммуногенности. При иммунизации животных иммунный ответ вырабатывается на все антигенные детерминанты всех компонентов вводимого материала. Это значительно осложняет отбор клонов, продуцирующих антитела к интересующей антигенной детерминанте, так как их доля может быть крайне незначительной. Поэтому, по возможности для иммунизации применяют очищенные антигены, по крайней мере, на последних этапах иммунизации. Необходимость получения иммунного ответа возможно большей интенсивности и специфичности обусловлена наличием прямо пропорциональной зависимости между интенсивностью иммунного ответа животных и количеством гибридом, синтезирующих МКА к данному антигену. Кроме того, необходимо учитывать динамику иммунного ответа. Оптимальным сроком для гибридизации является момент, когда число зрелых антителообразующих клеток (АОК) в лимфоидных органах иммунизированного

животного еще не достигло максимума, так как эффективность слияния предшественников антителопродуцирующих клеток значительно выше, чем зрелых антителопродуцентов. В зависимости от природы антигена и режима иммунизации этот период колеблется между 3-5 сутками после разрешающей инъекции антигена (рис. 18).

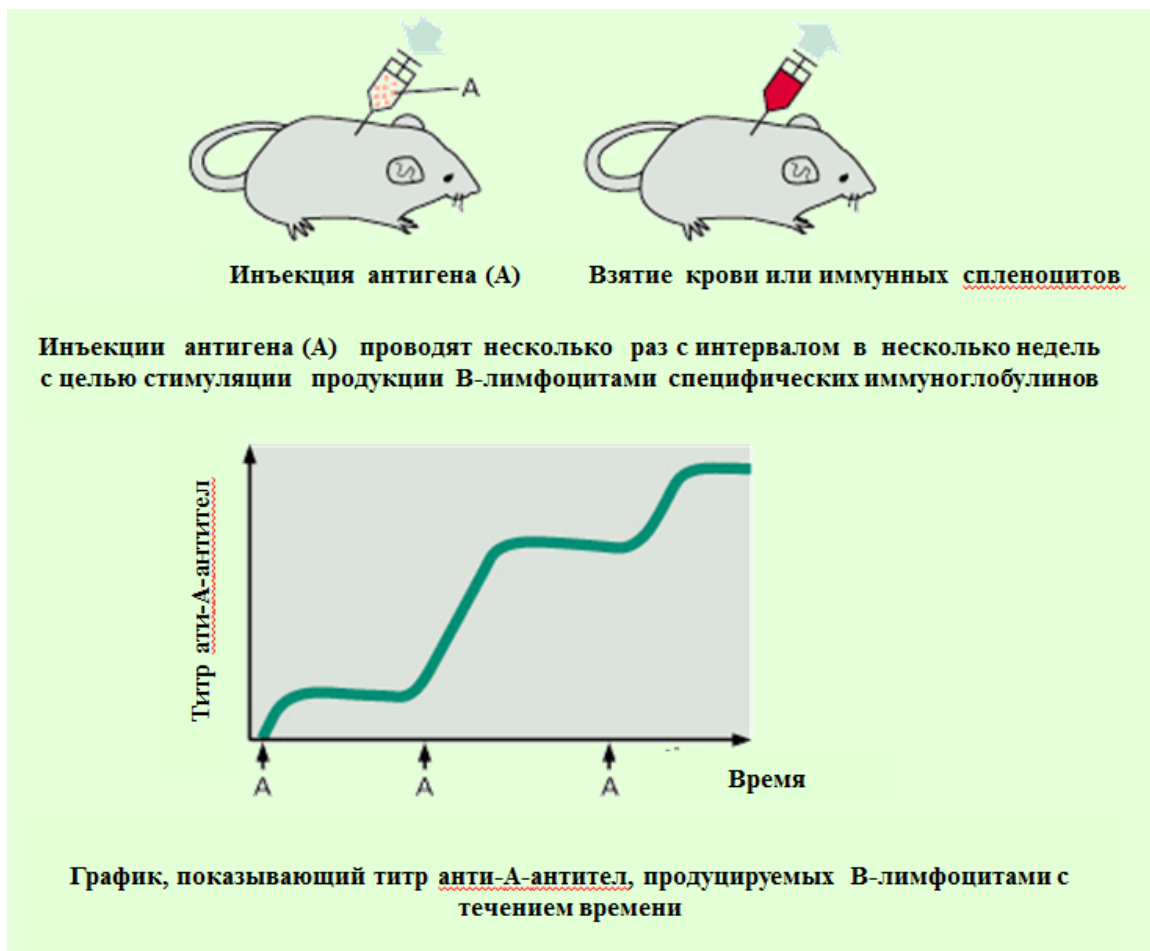


Рис. 18 Иммунизация животных

Для первой иммунизации следует использовать сильно концентрированный антиген, поскольку растворенные антигены в их нативной форме обладают слабой иммуногенностью и могут индуцировать развитие толерантности. В последующих инъекциях могут быть использованы как разведенные, так и концентрированные антигены. Большинство растворимых белков, в отличие от антигенов клеточной поверхности – слабые иммуногены. В этом случае необходимо применять различные адъюванты, усиливающие иммунный ответ. Среди адъювантов наибольшее распространение получил полный адъювант Фрейнда (ПАФ).

В последнее время активно развиваются методы полной иммунизации вне организма с целью получения. Иммунизация *in vitro* имеет ряд существенных преимуществ:

1. укорачивается период иммунизации до 4-5 суток;

2. требуется существенно меньшее количество антигена;
3. ко многим антигенам можно получить более выраженный иммунный ответ (частично за счет снижения вклада толерантности и супрессии);
4. повышается процент отвечающих клеток;
5. легко проверять факторы, влияющие на эффективность иммунизации.

Одним из основных недостатков иммунизации *in vitro* является большая доля IgM-образующих клонов. Это связано с тем, что при иммунизации *in vivo* клетки берут во время вторичного иммунного ответа, при котором образуются в основном антитела G класса, тогда как *in vitro* реакция идет по первичному типу, для которого характерна продукция IgM антител. Эта проблема может быть преодолена после отработки способов получения вторичного иммунного ответа *in vitro*.

Отмечена высокая эффективность однократного введения антигена непосредственно в селезенку за 3-4 дня до гибридизации, что позволяет значительно сократить процедуру иммунизации. Кроме того, этот метод уменьшает необходимое количество антигенного материала и является принципиально важным для получения гибридом к слабоиммуногенным антигенам. Однако, преимущественный синтез иммуноглобулинов класса IgM после внутриселезеночного введения антигена в определенной степени снижает практическую ценность метода.

2 Этап - подготовка клеток к слиянию (рис. 19).

При подготовке клеток к слиянию, как правило, используют следующие компоненты:

А.) Полная среда для культивирования миеломных и гибридомных клеток

- 1 Среда RPMI 1640 или
Среда Игла в модификации Дульбекко
- 2 Пируват натрия
- 3 Растворы антибиотиков
- 4 L- глутамин
- 5 2-меркаптоэтанол
- 6 Буфер HEPES
- 7 Сыворотка плода коровы

В.) Миеломные клетки

В настоящее время получено большое количество перевиваемых миеломных клеточных линий, из которых для получения гибридом используют главным образом следующие линии: NS-1/Ag4.1, SP2/Ag14, P3.X63.Ag8.653, NS0, которые утратили способность к синтезу иммуноглобулинов, отличаются быстрой пролиферацией и хорошей гибридизуемостью.

Два главных требования при отборе опухолевого партнера:

- 1 Отсутствие у клеток миеломы способности к синтезу иммуноглобулинов и, таким образом, исключение возможности контаминации супернатанов, содержащих специфические антитела.
- 2 Дефект какого-либо определенного фермента, поддерживающего рост клеток на селективной среде *in vitro*.

С.) Клетки питающего слоя (*фидерные клетки*)

В качестве фидерных клеток применяют клетки селезёнки, тимоциты, перитонеальные макрофаги, мышечные фибробласты и др.

Функции фидерных клеток

- 1 Обеспечение необходимой плотности клеток
- 2 Синтезирование факторов, стимулирующих пролиферативную активность гибридом.
- 3 Утилизация макромолекулярных компонентов погибших клеток.

Использование фидерных клеток имеет ряд недостатков:

- 1 Трудоёмкость приготовления и ограничения во времени
- 2 Являются потенциальным источником бактериального загрязнения
- 3 Метаболизируют питательную среду
- 4 Клетки питающего слоя могут перерастать и убивать клетки гибридомы
- 5 Препятствуют визуальной идентификации клеток гибридомы

В последнее время вместо фидерных клеток применяют супернатант культуры, в которой росли фидерные клетки, т. н. **кондиционированная среда**. Кондиционированная среда лишена тех недостатков, которые присущи фидерным клеткам.

Д.) Суспензия клеток селезёнки (иммунные спленоциты).

3 Этап - слияние клеток.

Спонтанное слияние соматических клеток происходит чрезвычайно редко. Вскоре после открытия феномена соматической гибридизации были обнаружены агенты, индуцирующие слияние соматических клеток. Широкое распространение получил вирус Сендай, к действию которого оказались чувствительными самые разные типы клеток. Первые гибридомы были получены с помощью этого сливающего агента. Использование вируса Сендай предполагает необходимость его размножения и инактивации, что доступно в основном специализированным вирусологическим лабораториям. Процедура слияния значительно упростилась после того, как было показано, что полиэтиленгликоль

(ПЭГ) вызывает слияние соматических клеток различного происхождения. Предполагают, что он уменьшает заряд клеточной поверхности и сорбирует на себе воду, облегчая тем самым взаимный контакт плазматических мембран соседних клеток. В настоящее время ПЭГ является наиболее распространенным агентом, позволяющим получить клеточные гибриды. Обычно используются 30-50% растворы препаратов с молекулярной массой 1000-4000. В этих интервалах молекулярной массы и концентрации ПЭГ относительно слабо токсичен для клеток и проявляет максимальный сливающий эффект. Добавление к раствору ПЭГ 5-10% диметилсульфоксида (ДМСО) повышает эффективность слияния, вероятно, за счет осмолярности концентрированных растворов ПЭГ. Процедура слияния клеток с помощью ПЭГ относительно проста и, вместе с тем, достаточно эффективна. Для получения гибридом используют также метод электрослияния. Выход гибридом в этом случае может быть на порядок выше, чем при классическом способе гибридизации.

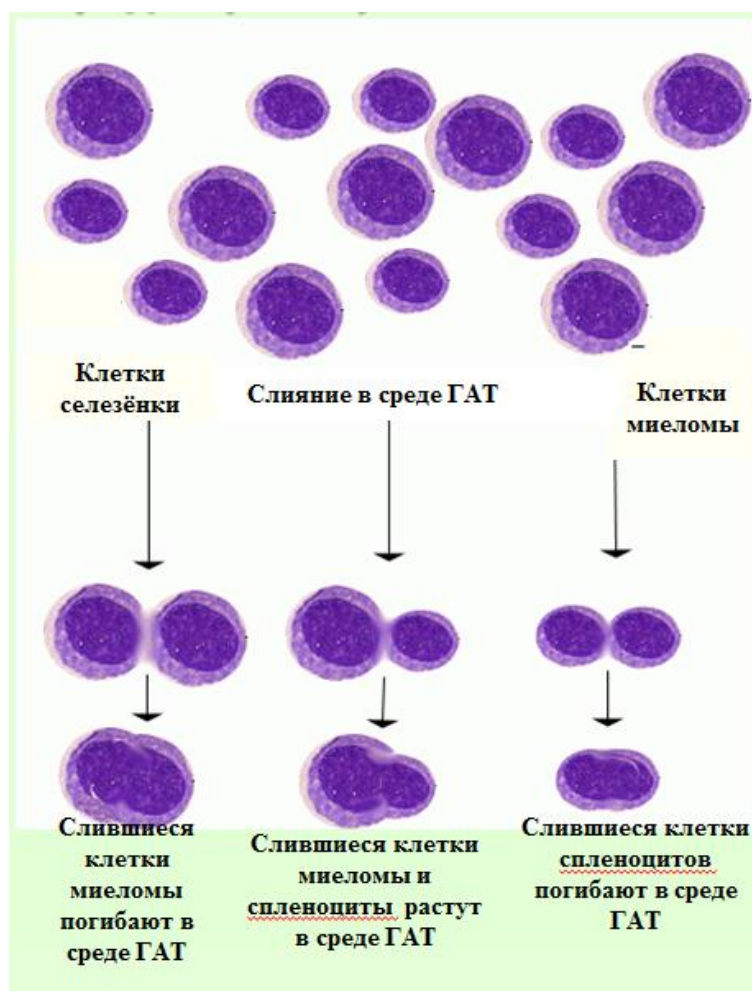


Рис. 19 Слияние клеток

На многих клеточных моделях установлено, что истинные гибриды, или синкарионы, то есть одноядерные гибридные клетки, образуются не сразу в процессе слияния родительских клеток, а лишь через 24-48 часов после завершения этого процесса, существуя все это время в виде гетерокарионов – двуядерных гибридных клеток. По

существующим представлениям, одно ядро, объединяющее хромосомные наборы обеих родительских клеток, формируется в результате синхронного митоза, наступающего после полной интеграции слившихся цитоплазм и стабилизации гибридом. Причем эффективность образования гибридных клеток составляет примерно – 1 гибрид на 500 тыс. клеток селезенки.

Одной из наиболее часто используемых селективных систем является ГАТ-среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Аминоптерин является антагонистом фолиевой кислоты. Тетрагидрофолиевая кислота является коферментом, необходимым для превращения рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-карбоксамид (АИКР) в рибонуклеотид формамидоимидазол-4-карбоксамид (ФАИКР) в биосинтезе пуринов и превращения дезоксимонофосфата уридина (дУМФ) в дезоксимонофосфат тимидина (дТМФ) в синтезе пиримидинов. Аминоптерин, аналог фолиевой кислоты, предотвращает образование тетрагидрофолата, конкурентно ингибируя гидрофолатредуктазу, и таким образом блокирует процессы биосинтеза как пуринов, так и пиримидинов на стадиях, указанных на схеме (рис. 20).

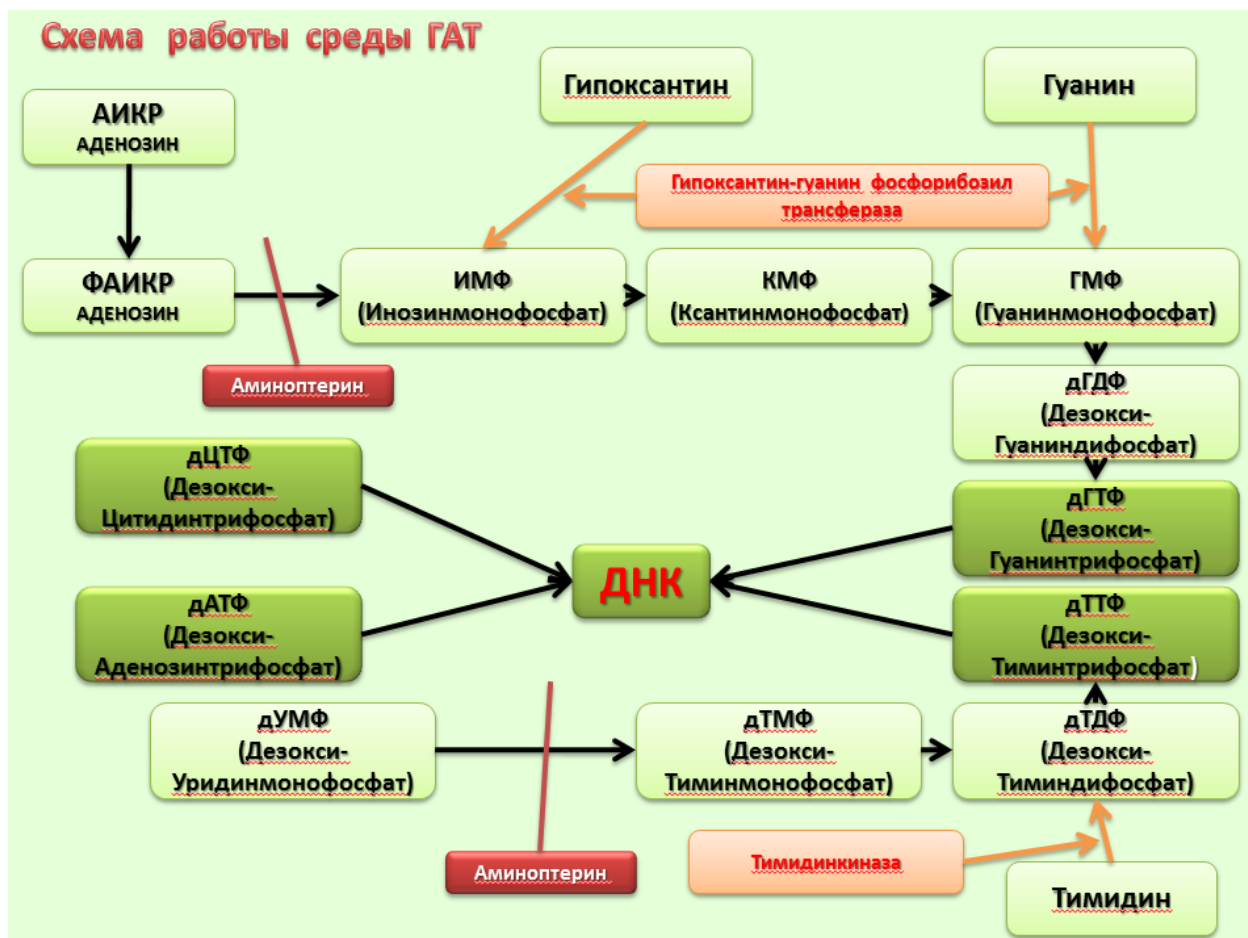


Рис. 20 Схема работы системы ГАТ

(монофосфаты инозина (ИМФ), ксантина (КМФ), гуанина (ГМФ); дезоксимонофосфаты уридина (дУМФ), тимидина (дТМФ); дезоксидифосфаты гуанина (дГДФ), тимидина

(δTDF); дезокситрифосфаты гуанина (δGTF), цитидина (δCTF), аденина (δATF), тимидина (δTTF); тимидинкиназа (*ТК*); гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансфераза (*ГГФРТ*.)

В клетках существуют обходные пути биосинтеза нуклеотидов, в которых происходит реутилизация гипоксантина и тимидина. Эти пути зависят от двух ферментов: *тимидинкиназы* (ТК), катализирующей трансформацию тимидина в дезокситимидинтрифосфат, и *гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы* (ГГФРТ), катализирующей трансформацию гипоксантина в инозинмонофосфат и гуанина в гуанозинмонофосфат. При добавлении в среду гипоксантина и тимидина клетки могут нормально синтезировать ДНК в условиях, когда основной путь биосинтеза нуклеотидов блокирован аминоптерином. Если клетка имеет дефект по этим ферментам, то в присутствии аминоптерина она погибает, но способна выжить, если ее слить с другой клеткой, в которой эти ферменты имеются. Двойной или полной системой является такая система, когда происходит слияние двух клеток, в одной из которых отсутствует компенсация этих ферментов, и они выживают в среде ГАТ, тогда как родительские клетки погибают.

Для получения и отбора мутантных клеток, не имеющих ТК или ГГФРТ, используют токсические аналоги пуринов и пиримидинов, добавляемые на фоне действия мутагенных агентов. Эти аналоги включаются в ДНК с помощью указанных ферментов. В присутствии токсических аналогов выживают только те клетки, в которых отсутствует фермент, способствующий включению этого аналога (например, 8-азагуанина, 6-тиогуанина, 5-бромдезоксиуридина) в ДНК.

4 Этап - отбор продуцирующих специфические антитела клонов.

Для определения синтезируемых гибридами антител применяются различные серологические и иммунологические методы: иммуноферментный, радиоиммунный, иммунофлюоресцентный, агглютинация с белком А стафилококка Cowan 1, РПГА, локальный гемолиз в геле, цитологический метод и некоторые другие. Выбор системы детекции определяется характером антигена. Основными требованиями к методам детекции МКА являются высокая чувствительность, быстрота проведения анализа и высокая продуктивность. Не все методы обнаружения сывороточных антител пригодны для тестирования гибридом, поскольку МКА могут не вызывать преципитации или агглютинации антигена, не связывать комплемент, не обладать цитотоксическими свойствами. Желательно использовать методы, обеспечивающие выявление всех МКА, независимо от иммунобиологических и эффекторных свойств. Наибольшее распространение получил твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). Метод

пригоден для выявления МКА как к растворимым антигенам, так и к бактериальным и соматическим клеткам.

Стабильность антителопродуцирующей функции первичных гибридных культур относительно невысока. Уже в течение трех первых недель после слияния, по крайней мере, 40% позитивных культур могут прекратить вырабатывать антитела. Зачастую, из нескольких десятков и даже сотен позитивных культур, удается выделить лишь несколько относительно устойчивых антителопродуцентов. Даже в лучших случаях потери антителопродуцентов могут достигать 70%. Потеря способности к синтезу специфических иммуноглобулинов может объясняться утратой структурных или регуляторных генов в связи с сегрегацией хромосом, изменением регуляции дифференцированной функции. Наиболее вероятной и, по-видимому, часто встречающейся причиной потери продукции антител считается утрата хромосом, несущих гены иммуноглобулинов.

Наиболее интенсивно процесс потери антителопродукции происходит в первые дни и недели после слияния. В дальнейшем хромосомный состав гибридом относительно стабилизируется. Интенсивность элиминации хромосом в разных клетках неодинакова, поэтому с помощью раннего клонирования и реклонирования можно выделить относительно устойчивые субклоны. Утратой хромосом объясняется и потеря частью гибридом способности к непрерывной пролиферации. Остановка роста в большинстве случаев происходит на стадии 17-23 генераций. Следует отметить, что, как правило, делиться перестают продуцирующие клоны, среди которых повышенное число сильных продуцентов. Непродуцирующие клоны в подавляющем большинстве случаев характеризуются высокой скоростью роста и неограниченным потенциалом размножения.

В гибридах между неопухолевыми и опухолевыми клетками других типов было обнаружено как подавление злокачественных свойств (в одних случаях), так и их проявление (в других). Это позволило выдвинуть две гипотезы. Согласно одной из них, онкогенный фенотип доминантен. Сторонники другой гипотезы считают, что генетические дефекты, вызывающие злокачественность, могут компенсироваться в гибридных клетках в результате комплементации с нормальными генами. Таким образом, вопрос о проявлении свойств родительских клеток в гибридах требует дальнейших исследований.

Однако, даже в случае образования стабильных антителообразующих гибридом, выявленные при первичном скрининге иммуноглобулины необязательно являются моноклональными. Это обусловлено тем, что в ячейке, где культивируются клетки, может оказаться две или более гибридом, каждая из которых синтезирует свой тип антител. Поэтому следующим шагом после селекции является клонирование гибридом.

5 Этап - клонирование и реклонирование.

Целью данного этапа является разделение клеток и наращивание отдельных клонов из одной клетки. Образующиеся гибридные клетки характеризуются высокой нестабильностью, связанной с утратой хромосом. При культивировании появляются клетки, потерявшие способность к продукции антител. Для выделения стабильных клеточных клонов применяют следующие методы:

- 1.) Клонирование методом лимитирующих разведений.
- 2.) Клонирование в полужидком агар-агаре.
- 3.) Клонирование с помощью проточного цитофлуориметра.

Наиболее распространённым является метод лимитирующих разведений. Если клетки посеяны довольно редко в 96-луночные планшеты, то доля клеток, в которых наблюдается рост подчиняется распределению Пуассона. Поэтому, чтобы получить разумную вероятность одного клона в лунке, в более чем 37% лунок не должно наблюдаться роста клеток. Эффективность клонирования никогда не бывает 100% и поэтому клетки необходимо засеивать 10, 3 и 0,5 клеток на лунку. В тех планшетах, на которых наблюдается рост в половине лунок, содержатся изолированные клоны. Для клонирования гибридом можно применять полужидкий агар (рис 15). Рост колоний происходит через 7-14 суток, которые извлекают из агара пастеровской пипеткой и переносят в жидкую культуру.

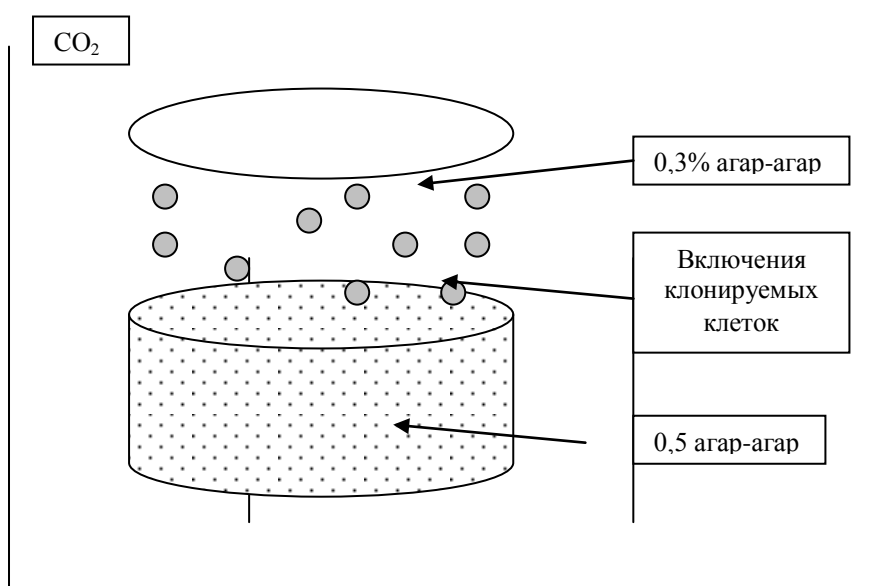


Рис. 21 Клонирование в полужидком агар-агаре

Важной особенностью клонирования является то, что оно позволяет не только избавляться от клеток, потерявших способность синтезировать антитела, но и позволяет отобрать клоны нужной специфичности со стабильными наследственными свойствами.

6 Этап - выявление антител, синтезируемых гибридными клетками.

Основными методами скрининга культуральных жидкостей с целью выявления антител к иммунизирующему антигену являются иммуферментный, радиоиммунологический и иммунофлюоресцентный. В иммуферментном методе (ИФА) используются антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, меченные ферментом, и о результате реакции судят по появлению цветной окраски. Принципы и этапы метода следующие (рис 22):

1. Антиген в солевом растворе инкубируют на пластиковой подложке, в результате чего небольшое его количество адсорбируется на поверхности пластика.
2. Лигандом служит молекула, способная выявить антитела и ковалентно связанная с ферментом, например пероксидазой.
3. Лиганд соединяется с тестируемыми антителами и после предварительного удаления несвязавшегося лиганда отмыванием, связанный лиганд можно визуализировать путём добавления хромогена – бесцветного субстрата, который под влиянием связанного с лигандом фермента превращается в окрашенный продукт реакции.

Фотография «проявленного» планшета. Количество тестируемых антител определяют по содержанию окрашенного продукта реакции путём сканирования оптической плотности.

ELISA

Рис. 22. Ферментный иммуносорбентный анализ

1. Растворимый антиген или клетки связывают с лунками 96-луночного планшета для микротитрования.
2. Отмывка от несвязавшегося антигена.
3. После связывания антигена (клеток) с планшетом, приливают культуральную жидкость, в которой могут быть антитела.
4. Инкубируют полученную смесь, для прохождения реакции антиген-антитело.
5. Отмывка от несвязавшихся антител.

6. После инкубации добавляют конъюгированные с ферментом антитела против иммуноглобулинов мыши.
7. Отмывка от несвязавшихся антител.
8. Инкубируют полученную смесь и промывают несвязавшиеся иммуноглобулины.
9. Добавляют раствор хромогена – бесцветного субстрата, который под влиянием связанного с лигандом фермента превращается в окрашенный продукт реакции.

Если в культуральной жидкости были антитела против антигена, то они адсорбируются на антигене. На них, в свою очередь, адсорбируются конъюгированные с ферментом вторичные антитела и под действием фермента происходит разложение субстрата и переход его в окрашенный продукт. В ИФА применяют щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена, β – галактозидазу.

7 Этап - массовая наработка гибридных клеток.

Важной задачей гибридной технологии является разработка способов массового производства МКА. Концентрация МКА в культуральной жидкости (КЖ) обычно составляет 10-100 мкг/мл. Для получения препаративных количеств МКА “in vitro” необходимы большие количества питательных сред, специальное дорогостоящее оборудование. Альтернативным методом получения больших количеств МКА является культивирование гибридом в организме сингенных мышей. Этот способ чрезвычайно прост и основан на важнейшем свойстве гибридом, унаследованном от миеломных клеток, – способности давать **асцитные опухоли** при введении мышам. В результате от одной мыши может быть получено до 10 мл асцитической жидкости (АЖ). Концентрация МКА в АЖ и сыворотках мышей достигает 5-20 мг/мл. Однако в АЖ содержится значительное количество “нормальных” иммуноглобулинов, что еще в большей степени усложняет очистку МКА. В настоящее время разработаны достаточно эффективные и воспроизводимые методы, позволяющие получать гибридомы (рис. 23).



Рис. 23 Массовая наработка гибридных клеток

8 Этап - выделение и очистка антител.

Грубую иммуноглобулиновую фракцию можно получить высаливанием белков сульфатом аммония (45% насыщения) с последующим диализом. Для выделения антител конкретного класса применяется метод Ухтерлони. Выделение чистых антител лучше всего проводить на иммуносорбентах, представляющих собой ковалентно сшитый с носителем антиген. Обычно носителем является сефароза. Также выделить иммуноглобулины можно с помощью аффинной и ионообменной хроматографии (рис. 24).

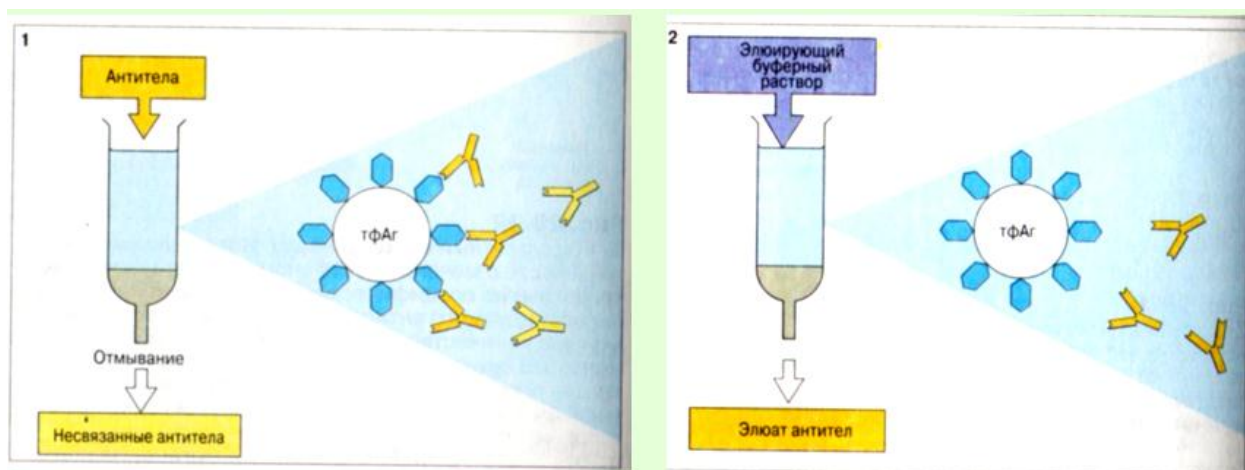


Рис. 24. Очистка антител с помощью аффинной хроматографии.

С помощью аффинной хроматографии можно выделить чистую популяцию антител.

1. Готовят твердофазный иммуносорбент (тфАг), представляющий собой антиген, ковалентно связанный с инертной основой (например, частицами перекрестношитого декстрана). Иммуносорбентом заполняют колонку, через которую пропускают смесь антител при физиологических условиях. Антитела к данному антигену связываются с иммуносорбентом, тогда как несвязавшиеся белки свободно проходят через колонку.
2. На следующем этапе связанные антитела элюируют с поверхности сорбента буферным раствором [например, ацетатным буфером (рН 3,0), диэтиламином (рН 11,5) или 3 М гуанидином-НС1], разрушающим связи в комплексе антиген-антитело. Этим методом можно получить и очищенные препараты антигенов, если использовать иммуносорбент, содержащий антитела.

В настоящее время в банках клеток и в отдельных лабораториях хранится большое количество линий клеток. Во многих случаях данные о доступности и специфических свойствах этих линий не находят широкого распространения. Между тем, информация подобного рода особенно нужна в случае гибридом: во-первых, из-за важности новых

технологий для развития гибридных исследований; во-вторых, при каждом слиянии клеток можно получать большое количество, возможно, уникальных гибридом.

Любой организации, будь то институт или банк клеток, трудно характеризовать, систематизировать и распространять все линии существующих гибридом. Поэтому были выбраны группы заинтересованных ученых и организаций для создания компьютеризованных банков соответствующей информации о тысячах клеточных линий, которые могут быть использованы научными и образовательными учреждениями. Роль этих информационных банков клеточных источников (**CSIB —cell source information bank**) состоит в систематизации потока информации, касающейся происхождения и уникальных свойств специализированных линий клеток и гибридом. В большинстве случаев клетки поставляются индивидуальными учеными или организациями, участвующими в программе.

CSIB организовано а 1977 году. Известны и другие национальные клеточные банки, такие как хранилище генетически мутантных клеток человека при Институте медицинских исследований в Кэмдене, Нью Джерси, и коллекция культур клеток животных при Лаборатории службы общественного здоровья в Портон Даун, Солсбери, Великобритания. Эти национальные банки снабжают информацией не только о линиях клеток в их коллекциях, но и о доступности линий определенных клеток, хранящихся в других банках.

Банк данных по гибридомам CODATA-IUIS.

Основателями банка данных о клонированных линиях клеток и их иммунореактивных продуктах явились Комитет по сбору научных и технологических данных (**CODATA**) и Международный союз иммунологических обществ (**IUIS**). В создании этого банка участвовали также Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). В настоящее время в работе этого банка принимают участие и другие научные организации, включая Межведомственную комиссию по сбору информации в области науки и техники (**MIDST**) во Франции, Институт физических и химических исследований (**RIKEN**) в Японии, Национальный швейцарский фонд научных исследований в Швейцарии, Совет медицинских исследований Великобритании и Национальные институты здоровья (**NIAID, NIDR, NIGMS, NCI, DDR**), а также Управление по контролю пищевых продуктов и лекарств США. Этот банк предназначен для использования научными организациями, и его работа планируется и управляется тактической группой «CODATA Гибридома».

Банк микробиологических данных (**MIRDAB**).

Был основан **Excerpta Medica**. Целью работы этого банка является хранение и выдача данных о клетках животных и растений, микроорганизмах, вирусах, бактериофагах, плазмидах, генах и векторах генов.

Выработаны отдельные формы получения информации о клетках животных и растений, вирусах, и в настоящее время они могут быть получены от издательства **Elsevier Science**. По договоренности может быть получена информация о фамилии и адресе создателей линий клеток, истории получения линии клеток.

1.12 Некоторые аспекты практического использования МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Благодаря своим уникальным свойствам моноклональные антитела успешно используются для решения многих актуальных задач биологии и медицины, например, создание на их основе диагностических средств, разработка препаратов для лечения злокачественных новообразований, вирусных и аутоиммунных заболеваний (рис. 25).

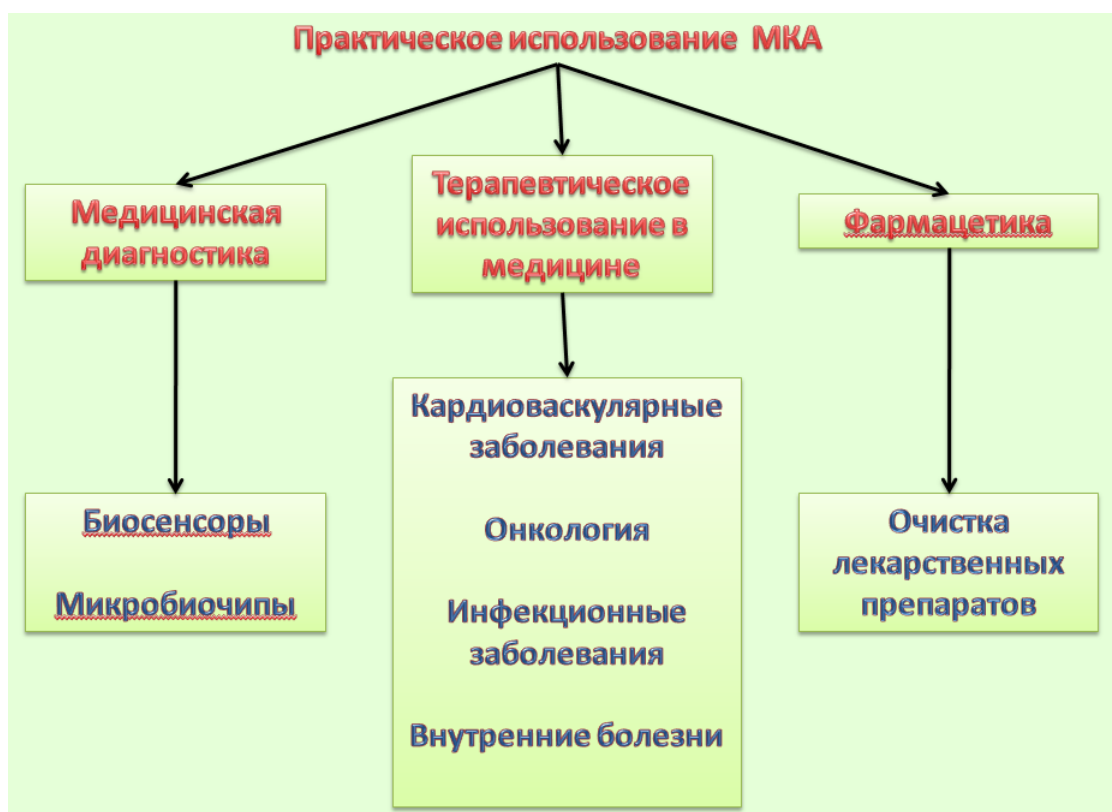
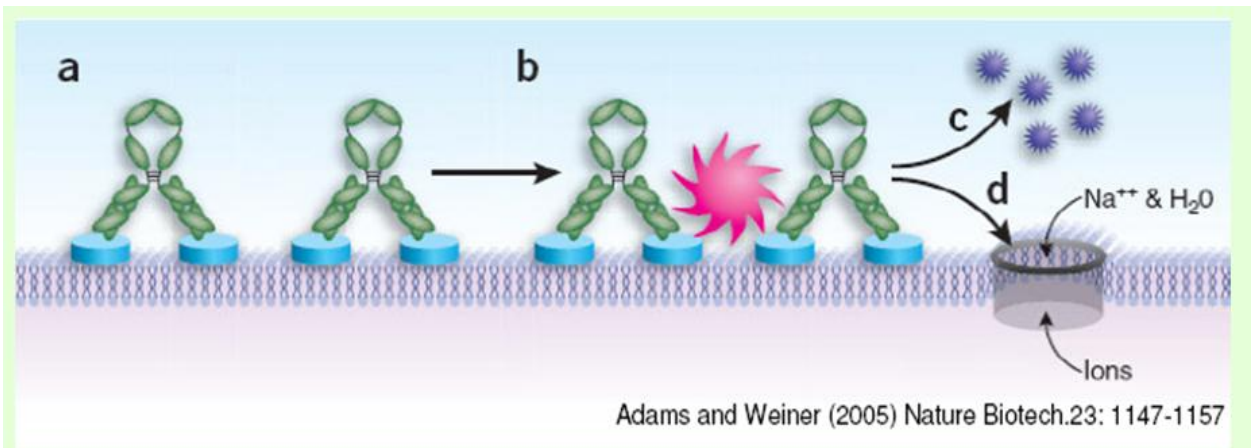


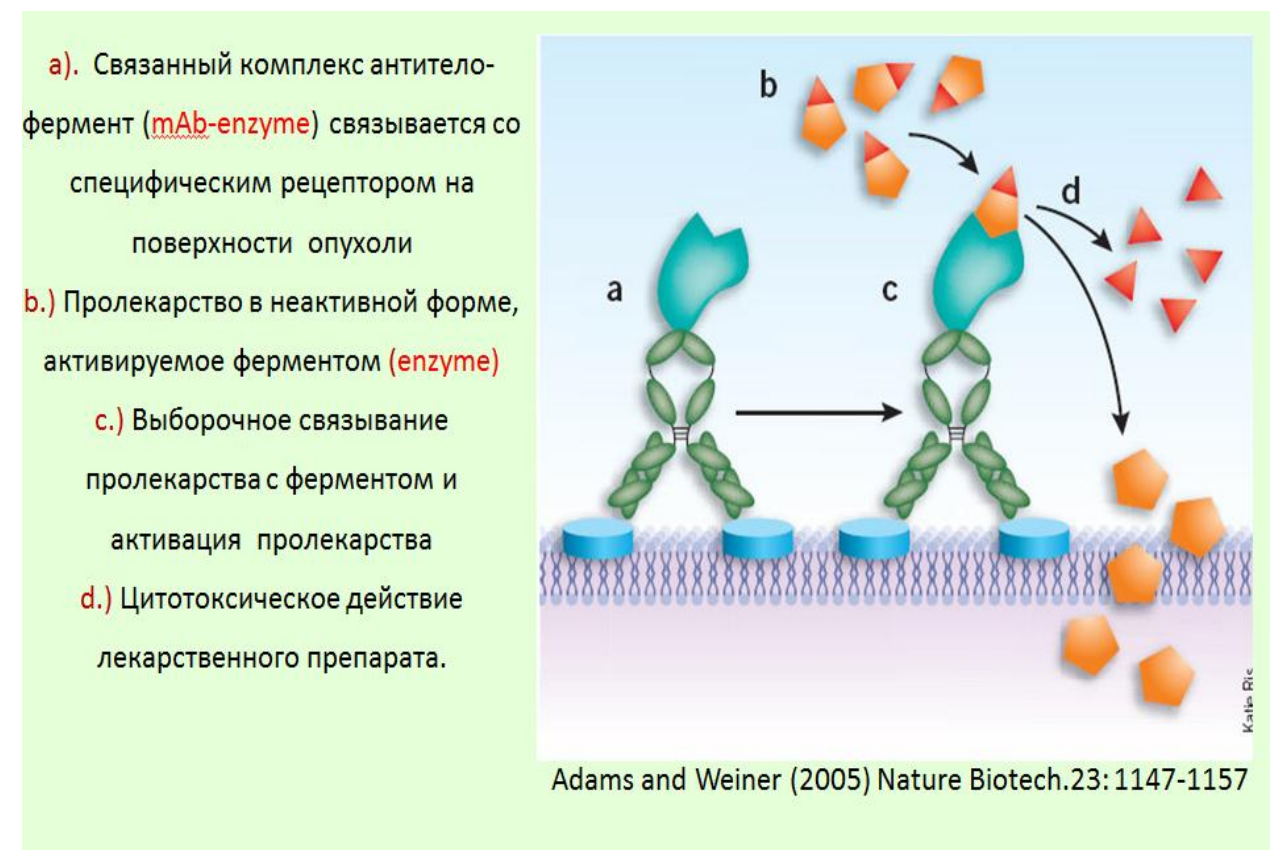
Рис. 25. Практическое использование моноклональных антител

Ниже на рисунках 26-29 приведены некоторые примеры использования моноклональных антител для лечения злокачественных новообразований.



- a.) Связывание МКА со специфическим рецептором на поверхности опухолевой клетки.
- b.) Экспозиция сайта прикрепления на МКА для протеинов, инициирующих каскад комплемента.
- c.) Запуск триггерного механизма факторов хемотаксиса
- d.) Формирование клеточного канала, возникновение ионного дисбаланса и гибель клетки..

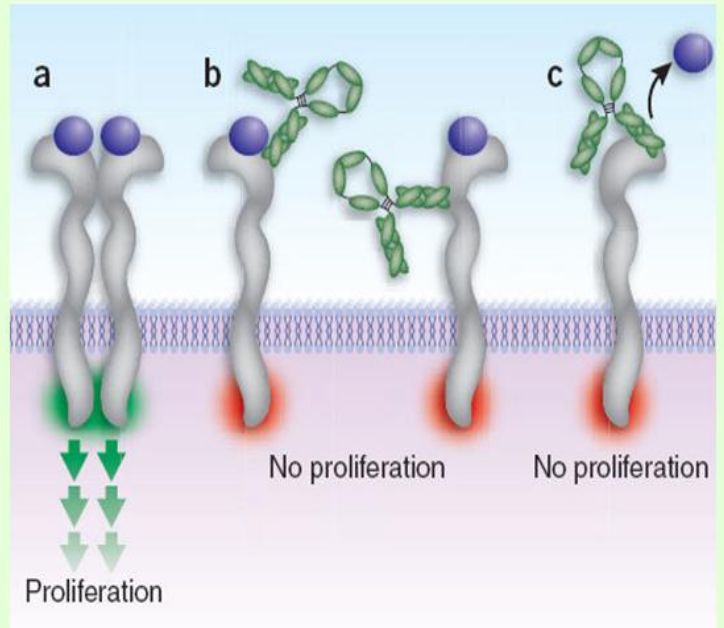
Рис. 26 Комплемент-обусловленная цитотоксичность



- a.) Связанный комплекс антитело-фермент (**mAb-enzyme**) связывается со специфическим рецептором на поверхности опухоли
- b.) Пролекарство в неактивной форме, активируемое ферментом (**enzyme**)
- c.) Выборочное связывание пролекарства с ферментом и активация пролекарства
- d.) Цитотоксическое действие лекарственного препарата.

Рис. 27 Терапевтическое действие комплекса МКА-фермент в онкологии

- a). Прикрепление лиганда к рецептору фактора роста опухоли и активирование сигнального каскада пролиферации.
- b.) Связывание МКА препятствует димеризации рецептора фактора роста опухоли и блокирует каскад пролиферации.
- c.) Связывание МКА препятствует связыванию лиганда с рецептором и блокирует каскад пролиферации.



Adams and Weiner (2005) Nature Biotech.23: 1147-1157

Рис. 28 Терапевтическое действие комплекса МКА-фермент в онкологии

Прикрепление радиоактивного изотопа к МКА (как правило иттрия-90, технеция-99 и индия-111).
 Когда несущее радиоактивную метку антитело связывается с опухолевым эпитопом, расположенные рядом клетки подвергаются локальному облучению.
 Это гораздо менее вредно для пациента, чем внешнее облучение.

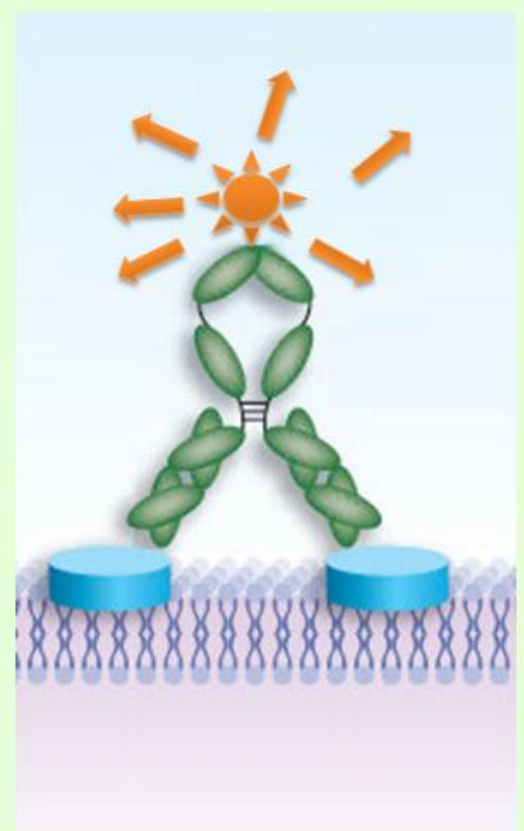


Рис. 29 Радиоиммунотерапия с помощью комплекса МКА-изотоп

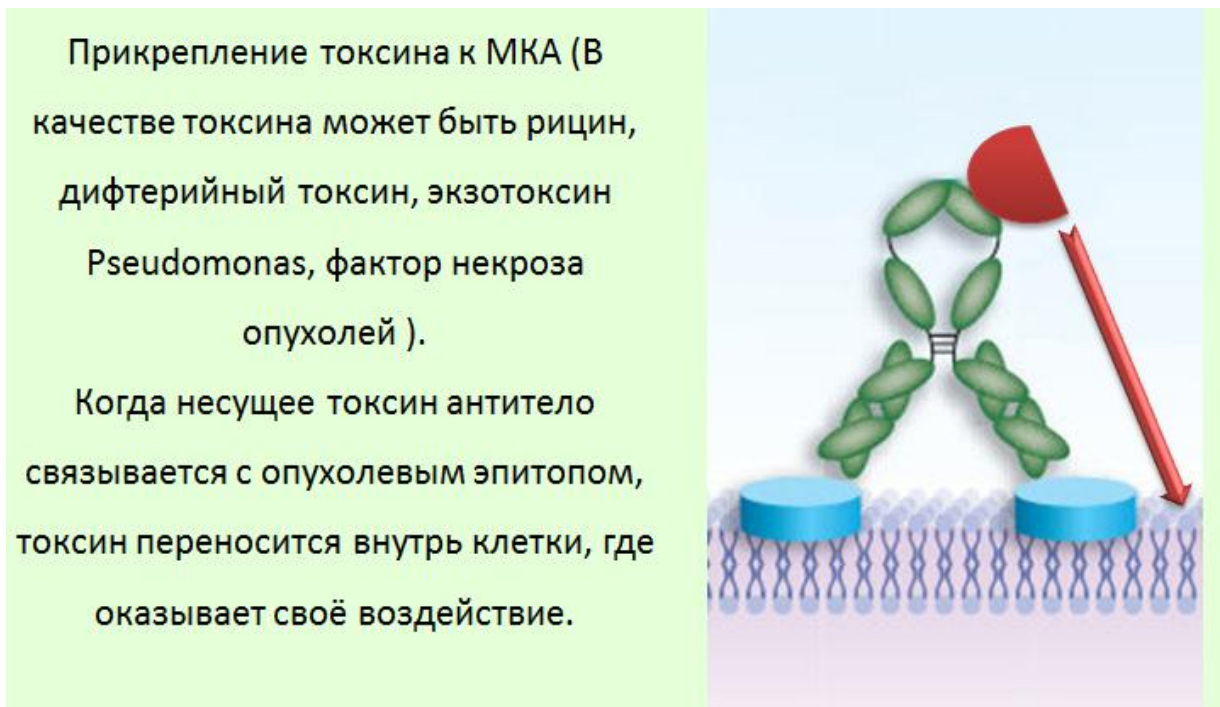


Рис. 30 Цитотоксическая иммунотерапия с помощью конъюгата МКА-токсин

Излучение комплекса МКА-изотоп достаточно сильное, чтобы обнаруживать его вне тела с помощью специальной камеры. Этот метод известен как гамма-сцинтиграфия и может быть использован для точной локализации опухолей (рис. 31).

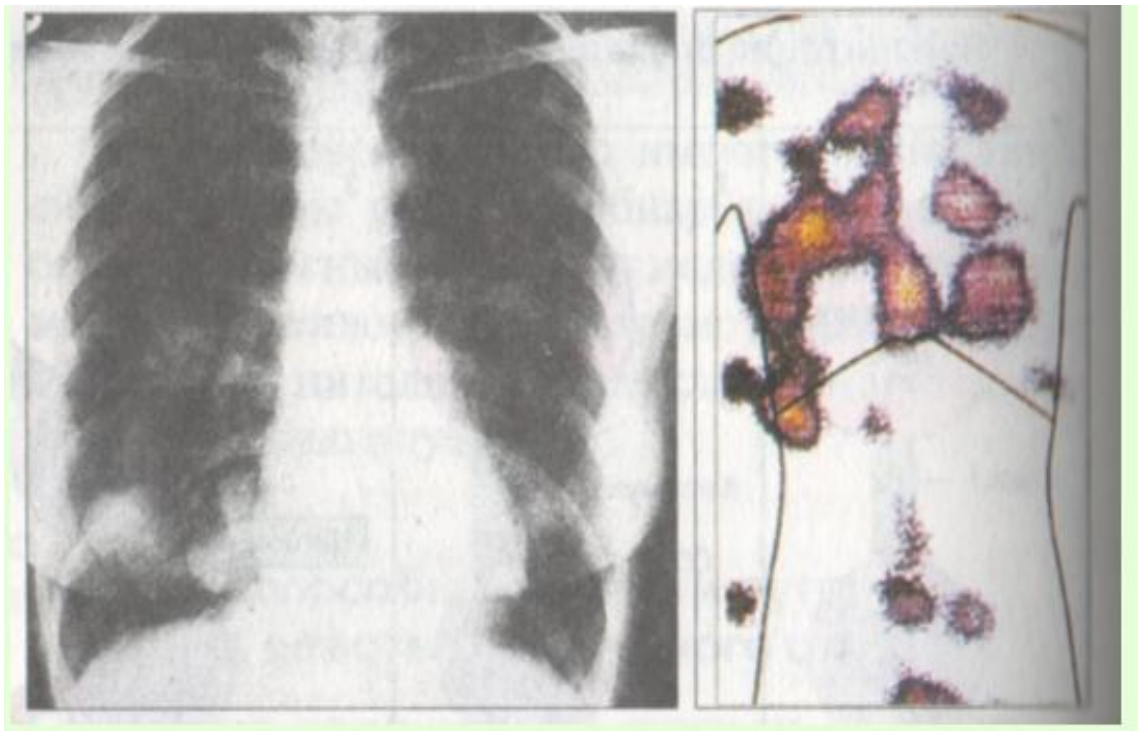


Рис. 31 Радиоиммунотерапия с помощью комплекса МКА-изотоп

Моноклональные антитела широко применяются в научных исследованиях, в частности в высокочувствительном методе иммуноблоттинга (рис. 32-33).

- 1.) Исследуемые антигены сначала разделяют методом электрофореза в геле.
- 2.) Полученные фракции переносят электрофоретически на лист нитроцеллюлозы (блот), помещенный в специальную камеру.
- 3.) Блоты обрабатывают МКА к специфическому антигену, отмывают и добавляют радиоактивно меченный конъюгат для определения связавшихся с антигеном антител.
- 4.) После повторного отмывания лист нитроцеллюлозы помещают в кассету с рентгеновской пленкой для радиоавтографии. На проявленной пленке видны полосы локализации антигена, связавшего меченые антитела.

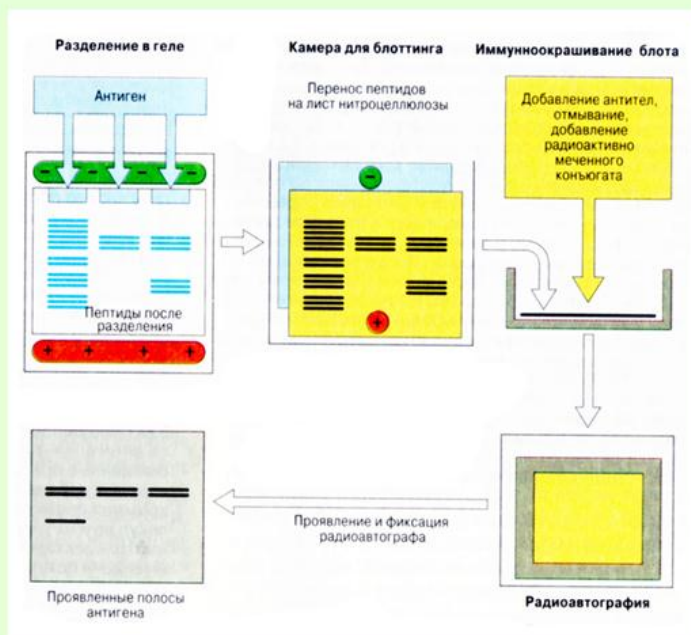


Рис. 32 Иммуноблоттинг с использованием МКА

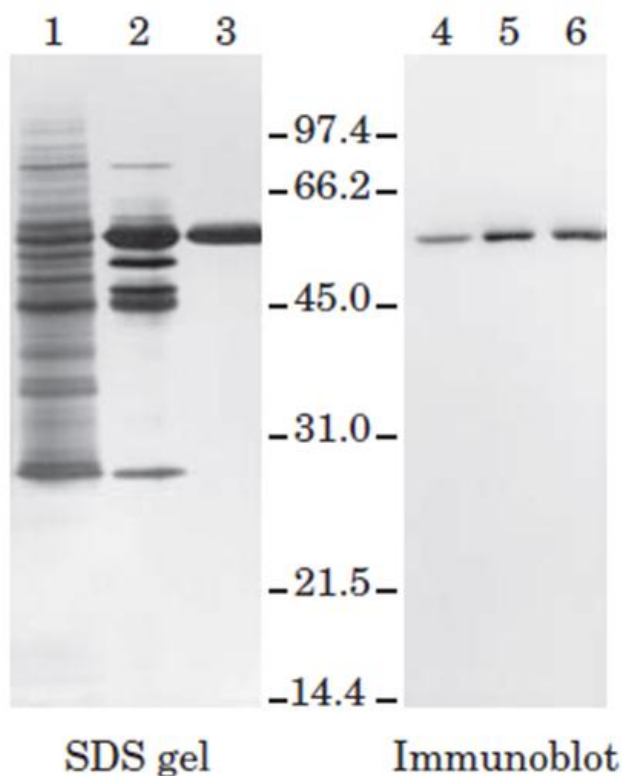
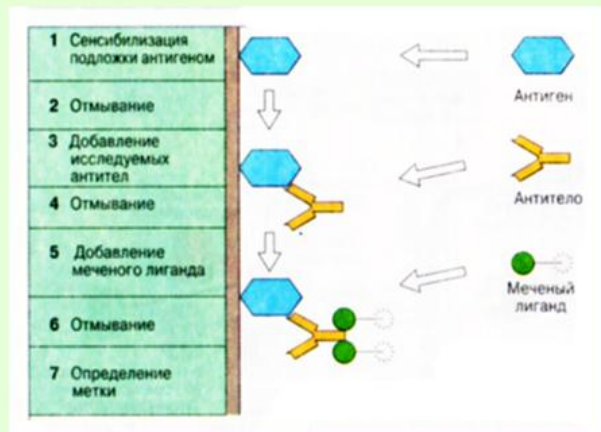


Рис. 33 Фотография SDS-полиакриламидного геля и иммуноблотта с использованием МКА

Моноклональные антитела широко применяются в диагностике инфекций, определения гормонов и других соединений (рис. 34)

1. Антиген в солевом растворе инкубируют на пластиковой подложке или в пробирках, в результате чего небольшое его количество адсорбируется на поверхности пластика.
2. Свободный антиген удаляют путем отмывания. (Подложку затем можно обработать избытком постороннего белка, чтобы предотвратить последующее неспецифическое связывание белков.)
3. Добавляют исследуемые антитела, которые связываются с антигеном.
4. Не связавшиеся белки удаляют отмыванием.
5. Антитела определяют при помощи меченого лиганда. Лигандом может служить, например, стафилококковый белок А, который связывается с Fc-областью IgG.



6. Несвязанные антитела удаляют отмыванием.
7. Определяют связавшуюся метку.

Чувствительность метода обычно составляет приблизительно 1-50 нг специфических антител в 1 мл.

Рис. 34 Метод иммуноанализа антигенов с использованием МКА

1.13 Трансплантация ядер. История клонирования животных

Трансплантация ядер является центральной методикой, от которой зависит успех в проведении клонирования. В 1985 г. Б. В. Конюховым и Е. С. Платоновым был разработан метод переноса ядер путём микроманипуляции. Он состоит из двух этапов: сначала тонкой микропипеткой прокалывают зоны пеллюциды и плазматической мембраны, 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 с использованием цитохалазинов (веществ, синтезируемых грибами). Цитохалазин В разрушает структуру микрофиламентов и способствует уникальному расположению ядра. Ядро 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.

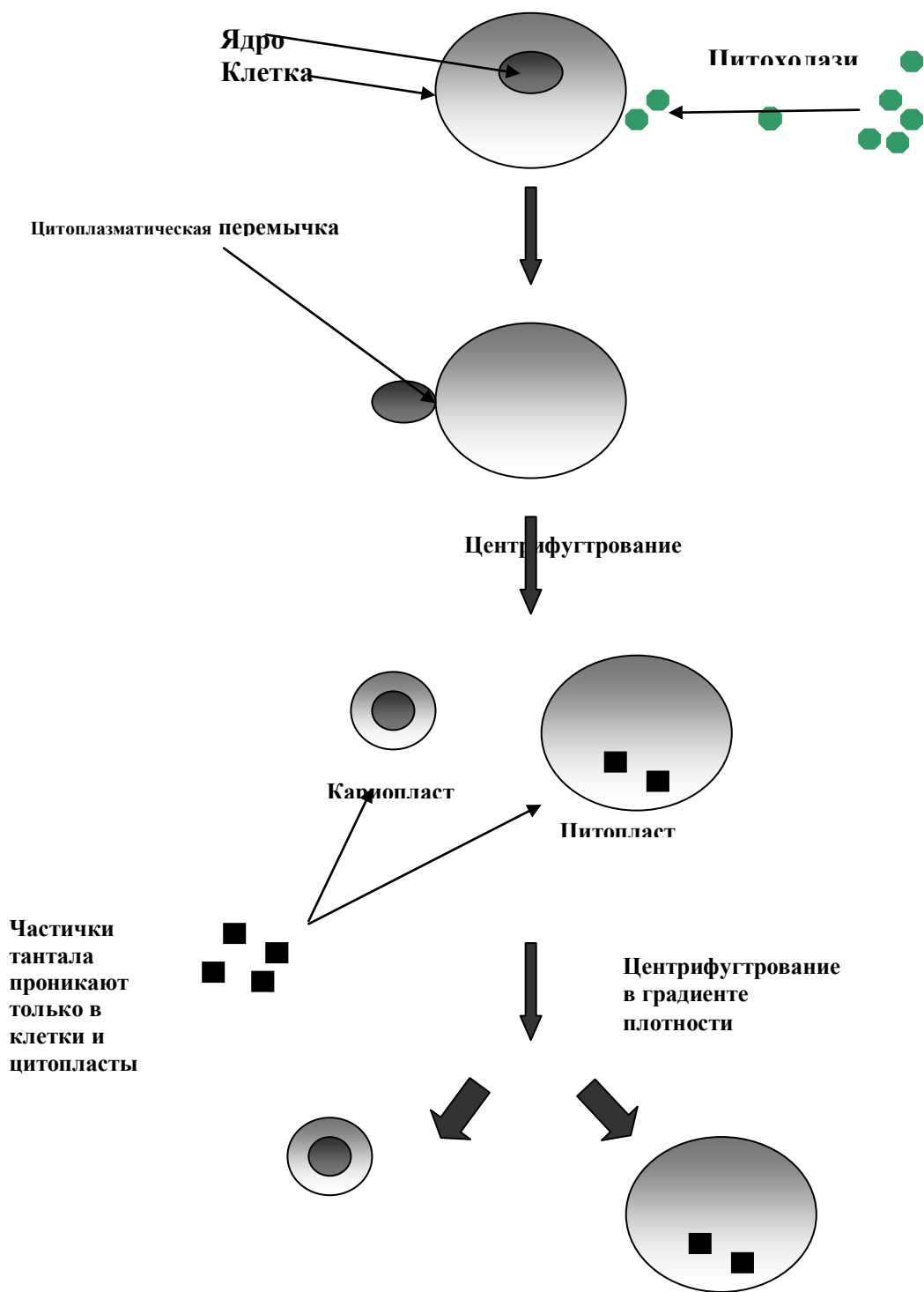


Рис. 25 Получение цитопластов и кариопластов

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. У некоторых клеточных линий 1/10 кариопластов способна восстановить весь утраченный объем цитоплазмы и восстановиться в жизнеспособные клетки.

Для реконструкции клеток суспензию кариопластов в солевом буфере добавляют к монослою культуры цитопластов из пропорции 100 кариопластов на 1 цитопласт. Цитопласты должны быть уже покрыты инактивированными вирусными частицами. Инкубируют при температуре 4°C 45 минут, а затем еще 45 минут при температуре 37°C. Отмывают раствором Эрла для удаления не слившихся кариопластов. Выше на рисунке 35 приведена схема получения кариопластов и цитопластов.

Сам процесс клонирования известен человечеству вот уже более 5 тысяч лет, когда люди древних цивилизаций размножали растения, используя разнообразные органы растения: клубни, почки, веточки, черенки и т. д. Сам же термин «*клон*» использовали ещё в Древней Греции, где под этим словом понимали веточку или побег.

В чём же основной смысл термина клонирования? Главной особенностью клонирования является отсутствие сортировки генов, которое в случае полового размножения имеет место в мейозе. Отсутствие сортировки генов, приводит к тому, что при клонировании состав генов остаётся неизменным в долгом ряду поколений и, соответственно, фенотип организмов остаётся неизменным. В чём же основная трудность клонирования животных, по отношению к растениям? Клетки животного организма *дифференцируются*, лишаясь *тотипотентности*, в отличие от клеток растений, клетки которых не теряют тотипотентных свойств и практически любая растительная клетка может дать начало взрослому организму. Ниже приведены основные исследования, в области клонирования животных (табл. 7).

История клонирования животных

Год	Автор	Достижение
1952 год	Р. Бриггс и Т. Кинг	Исследователи разработали микрохирургический метод пересадки ядер эмбриональных клеток с помощью тонкой стеклянной пипетки в лишенные ядра (<i>энуклеированные</i>) яйцеклетки. Они обнаружили что, если брать ядра из клеток зародыша на ранней стадии его развития - бластуле, то примерно в 80% случаев зародыш благополучно развивается дальше и превращается в нормального головастика. Если же развитие зародыша, донора ядра, продвинулось на следующую стадию - гастролу, то лишь менее чем в 20% случаев оперированные яйцеклетки разовьются нормально (рис. 36).
1962 год	Дж. Гордон	Первым в опытах с южноафриканскими жабами <i>Xenopus laevis</i> в качестве донора ядер использовал не зародышевые клетки, а уже вполне специализировавшиеся 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.
1970 год	Герд и Ласки	Культивировали <i>in vitro</i> клетки почки, легкого и кожи взрослых животных и использовали эти клетки в качестве доноров ядер. Примерно 25% первично реконструированных яйцеклеток развивались до стадии бластулы. При серийных пересадках они развивались до стадии плавающего головастика.
1983 год	Ди Берардино и Хофнер	Исследователи использовали для трансплантации ядра эритроцитов лягушки <i>Rana ripiens</i> . После серийной пересадки таких ядер 10% реконструированных яйцеклеток достигали стадии плавающего головастика. Однако, даже с помощью многократных серийных пересадок реконструированные яйцеклетки дальше стадии головастика не развивались.

1983 год	МакГрат и Солтер	Значительно усовершенствовали методы извлечения ядер и введения их в яйцеклетку мыши.
1983- 1985 гг.	Сурани	Обнаружил, что при добавлении женского пронуклеуса из зиготы мыши к гаплоидному набору хромосом яйцеклетки нормального развития не происходит, добавление же мужского ядра приводит к нормальному развитию. С другой стороны, рекомбинации мужского и женского пронуклеусов из разных оплодотворенных яйцеклеток мышей обеспечивает нормальное развитие, а комбинация двух мужских или двух женских пронуклеусов останавливает развитие эмбриона. Гибель партеногенетических (гиногенетических) и андрогенетических зародышей у млекопитающих связана с различной активностью в онтогенезе материнского и отцовского геномов. Механизм, регулирующий эти функциональные различия, был назван геномным импринтингом .
	Уиладсин с сотр.	Разработал методику клонирования для крупных домашних животных. Яйцеклетки крупных домашних животных сначала культивируют <i>in vivo</i> - в перевязанном яйцевом овец - промежуточного (первого) реципиента. Затем их оттуда вымывают и трансплантируют в матку окончательного (второго) реципиента - коровы или овцы соответственно, где их развитие происходит до рождения детеныша. Исследователь предложил заключать реконструированные яйцеклетки в агаровый цилиндр, который он затем трансплантировал в перевязанный яйцевод овцы.
	Робл с сотр.	Извлекали ядра без прокалывания мембраны яйцеклетки и пересаживали в зиготы так называемые карิโอпласты - мужской и женский пронуклеусы вместе с окружающей их цитоплазмой, а также ядра 2-, 4- или 8-клеточных эмбрионов коровы. Сначала зиготы центрифугировали, чтобы освободить пронуклеусы от окружающих их гранул желтка, после чего ядра были хорошо видны под микроскопом, что значительно облегчало их удаление. При помощи манипулятора и заостренной стеклянной микропипетки извлекали один из бластомеров вместе с ядром из ранних зародышей и переносили его в энуклеированную зиготу.

		<p>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.</p>
--	--	--

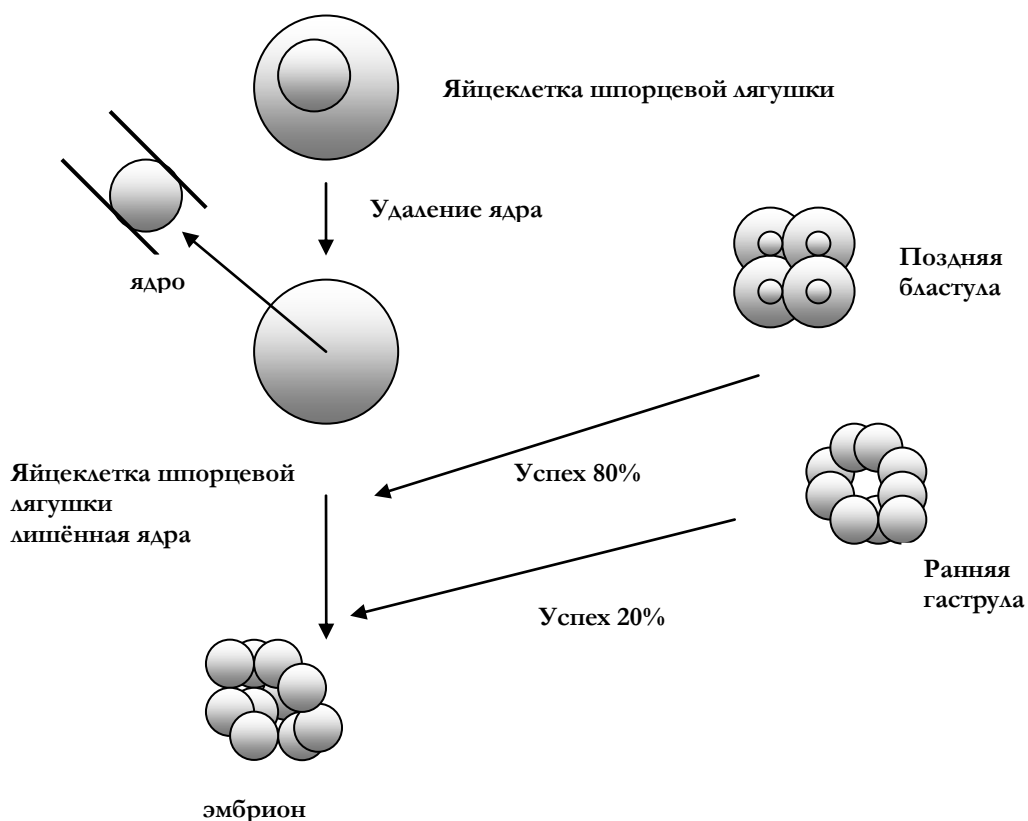


Рис. 36 Первые опыты Р. Бриггс и Т. Кинг по клонированию

Опыты Смита и Уилмута в 1993-1995 годах

В 1993-1995 годах, группа исследователей под руководством Я. Уилмута из Рослинского института получила клон овец - 5 идентичных животных, донорами ядер которых была культура эмбриональных клеток. Клеточную культуру получали следующим образом: выделяли микрохирургически эмбриональный диск из 9-дневного овечьего эмбриона (бластоцисты) и культивировали клетки *in vitro* в течение многих

пассажей. Эта линия клеток из 9-дневного зародыша овцы была обозначена как TNT4. Чтобы донорское ядро и реципиентная цитоплазма находились на сходных стадиях клеточного цикла, останавливали деление культивируемых клеток TNT4 на определенной стадии (G_0) и ядра этих клеток пересаживали в энуклеированные яйцеклетки (соответственно на стадии метафазы II). Реконструированные эмбрионы заключали в агар и трансплантировали в перевязанные яйцеводы овец. Через 6 дней эмбрионы вымывали из яйцевода первого реципиента и исследовали под микроскопом. Отбирали те, которые достигли стадии морулы или бластоцисты и пересаживали их в матку овцы - окончательного реципиента, где развитие продолжалось до рождения. Родилось 5 ягнят (самок) из них 2 погибли вскоре после рождения, 3-й в возрасте 10 дней, а 2 оставшихся нормально развивались и достигли 8-9-месячного возраста. Фенотипически все ягнята были сходны с породой овец, от которой получали исходную линию клеток TNT4. Это подтвердил и генетический анализ.

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 Уилмута 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. Клетки молочной железы получали от шестилетней овцы породы финн дорсет, находящейся на последнем триместре беременности. Эмбриональные клетки использовали в качестве доноров ядер на 7-9-м пассажах культивирования, фибробластоподобные клетки плода - на 4-6-м пассажах и клетки молочной железы - на 3-6-м пассажах. Деление клеток всех трех типов останавливали на стадии G_0 и ядра клеток пересаживали в энуклеированные ооциты (яйцеклетки) на стадии метафазы II. Был использован метод электрослияния. Большинство реконструированных эмбрионов сначала культивировали в перевязанном яйцеводе овцы, но некоторые и *in vitro* в химически определенной среде. Коэффициент выхода морул или бластоцист при культивировании *in vitro* в одной серии опытов был даже вдвое выше, чем при культивировании в яйцеводе.

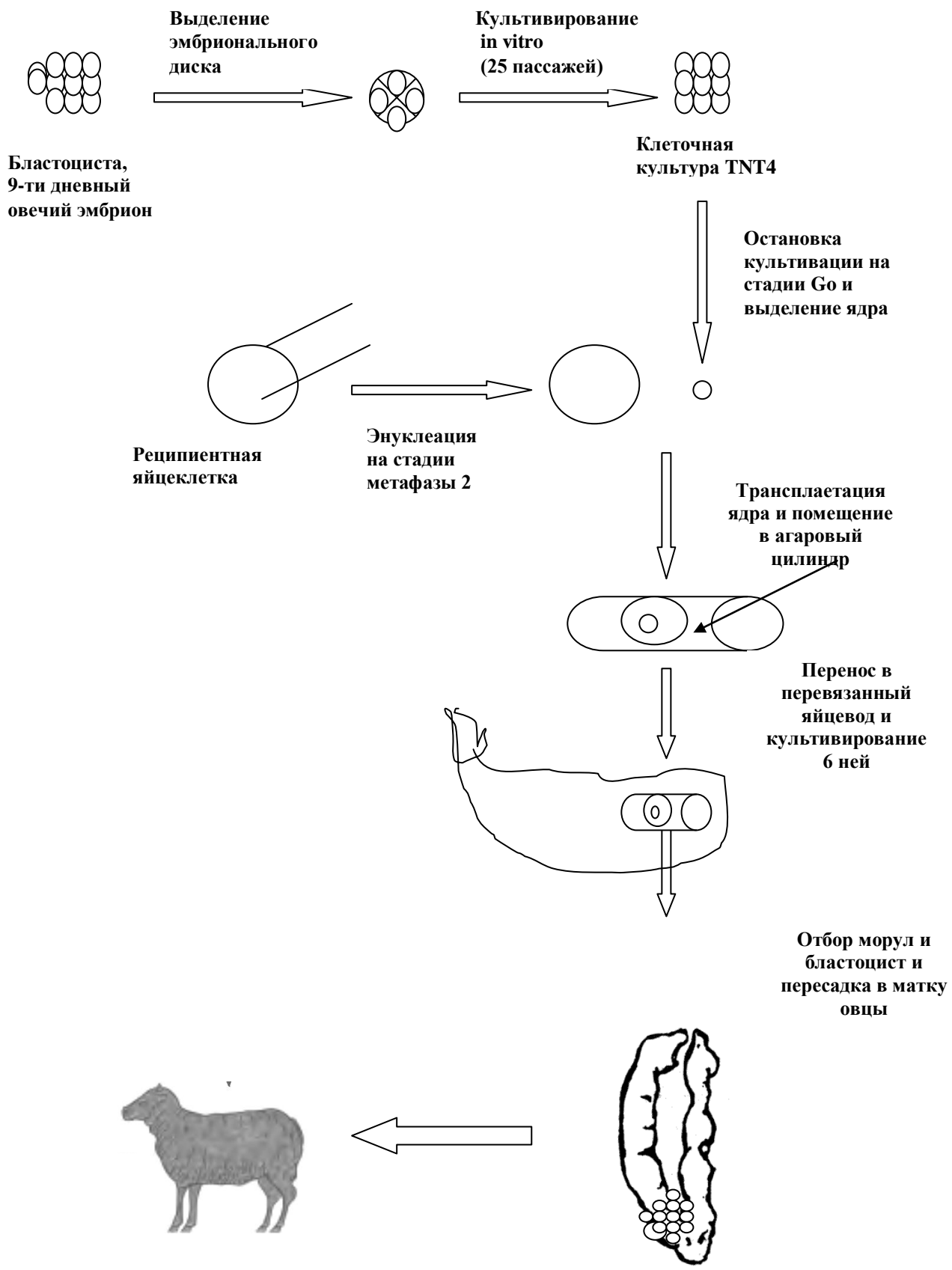


Рис. 37 Опыт Смита и Уилмута по клонированию овец

Выход морул или бластоцист в серии опытов с культурой клеток молочной железы был примерно втрое меньше, чем в двух других сериях, когда в качестве доноров ядер использовали культуру фибробластов плода или эмбриональных клеток. Число живых ягнят в сравнении с числом пересаженных в матку окончательного реципиента морул или бластоцист было также в два раза ниже. В серии опытов с клетками молочной железы из 277 реконструированных яйцеклеток был получен только один живой ягненок, что говорит об очень низкой результативности такого рода экспериментов (0,36%). Анализ генетических маркеров всех семи родившихся в трех сериях экспериментов живых детенышей показал, что клетки молочной железы были донорами ядер для одного, фибробласты плода - для двух и эмбриональные клетки - четырех ягнят. Овца по кличке Долли развилась из реконструированной яйцеклетки, донором ядра которой была культивируемая клетка молочной железы овцы породы финн дорсет и фенотипически не отличается от овец этой породы, но сильно отличается от овцы-реципиента. Анализ генетических маркеров подтвердил этот результат.

В данной работе использовались длительные клеточные культуры, также проводилась синхронизация стадии клеточного цикла яйцеклеток реципиентов и клеток доноров (рис. 37).

1.14 Методы создания химер

Выше были рассмотрены методы слияния клеток. В естественных условиях слияние соматических клеток происходит чрезвычайно редко. Способны к слиянию миофибриллы поперечно-полосатых мышц. Слияние же опухолевых клеток довольно обычное явление. В случае слияния клеток животных, имеющих разный генотип, получают так называемые «химерные» или *аллофенные* животные.

Возможно искусственное получение аллофенных животных. Для создания химерных животных было предложено два метода: агрегационный и инъекционный.

Агрегационный метод.

Агрегационный метод был разработан Тарковским в Варшаве и Минц в Филадельфии (1961-1962 гг.). Принцип метода заключается в следующем: из матки беременных самок животного извлекают зародыши, достигшие стадии 8 бластомеров. Бластомеры, полученные от двух животных с различными генотипами помещают в условия, способствующие их агрегации и образованию 16-ти клеточного зародыша. Такие составные зародыши развиваются *in vitro* до стадии бластоцисты, после чего их вводят в матку приемной матери, у которой предварительно вызывают ложную беременность путем введения соответствующих гормонов. В результате получают аллофенные

животные. Агрегационные химеры можно получать не только между двумя эмбрионами, но и между различным числом изолированных бластомеров или отдельными частями эмбрионов. Масса химерных эмбрионов не больше обычной и подвержена действию механизмов эмбриональной регуляции. Преимущество метода состоит в том, что он не требует вмешательства микрохирургической техники, поэтому широко используется в эмбриогенетике.

Инъекционный метод.

Был разработан Р. Гарднером в 1968 г. Методика его заключается в следующем: бластоцисту фиксируют и, используя микроманипуляторы, вводят путем инъекции клетки внутриклеточной массы бластоцисты доноров в бластоцель эмбриона - реципиента. Этим методом можно инъецировать не только внутриклеточную массу ранних эмбрионов, но и более дифференцированные клетки. Благодаря этому методу возможно получение межвидовых химер.

Таблица 8

История получения химер

70-е годы	Первое получение химер между двумя ближайшими видами мышей <i>M. musculus</i> и <i>M. caroli</i> . Химерные эмбрионы, полученные инъекционным методом, нормально развивались только при пересадке их в матку того вида, чья бластоциста была использована в качестве реципиента.	
1973 год	Р. Гарднер и М. Джонс	Получение межвидовых химерных зародышей между мышью и крысой путем агрегации.
1984 год	С. В. Фехилли	Получение межвидовых химер между овцой и козой – овцекозы, с использованием обоих методов. Половым путем овцы и козы не скрещиваются, так как имеют разный набор хромосом: коза $2n = 60$, овца $2n = 54$.
1985 год	Г. Брем и др	Получение химерных телят после агрегации половинок 32-клеточных эмбрионов от коров швицкой (бурой) и голштино - фризской пород. В фенотипе химер сочетались обе масти - бурая и черно - пестрая.

Химерные животные не передают потомкам генетическую мозаичность. У них происходит расщепление, как у гетерозигот, поэтому ценные генетические комбинации нарушаются. Но на протяжении 1 поколения хозяйственно ценные признаки поддерживаются.

1.15 Биоэтика в животной клеточной инженерии

Биоэтика – комплексное понятие, которое в широком смысле относится к исследованию социальных, экологических, медицинских и социально-правовых проблем,

касающихся не только человека, но и любых живых организмов, включенных в экосистемы, окружающие человека. Первоначально биоэтика представляла собой попытку выработать стандарты поведения медицинских профессионалов и юристов в спорных вопросах современной медицины. Со временем содержание нового термина расширилось, и в настоящее время биоэтика – область междисциплинарных исследований этических, философских и антропологических проблем, возникающих в связи с прогрессом биомедицинской науки и внедрением новейших технологий в практику здравоохранения.

Основными проблемами биоэтики клеточной инженерии являются:

1. Новые репродуктивные технологии, в том числе искусственное оплодотворение, оплодотворение «в пробирке» с последующей имплантацией эмбриона в матку, суррогатное материнство.
2. Манипуляции со стволовыми клетками человека.
3. Клонирование, как терапевтическое, так и репродуктивное.
4. Вопросы трансплантологии.

ГЛАВА 2.

КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

2.1 История культивирования растительных клеток.

Таблица 9

Исторические этапы культивирования животных клеток

Год	Автор	Суть достижения
1876- 1893 год	Блоцишевский, Браун, Моррис, Боннэ, Сакс.	Первые учёные, кто занимался изолированными культурами, растительных клеток. Они выделяли зародыши из семени и выращивали их в искусственных условиях.
1893 год	Карл Ррехингер	Впервые установил минимальный размер экспланта. В нестерильных условиях он выращивал тонкие срезы корня свеклы и одуванчика и сегменты стебля тополя на песке с использованием водопроводной воды. Его исследования показали, что каллус образуется при толщине среза не менее 1,5 мм
1902 год	Г. Габерланд	Впервые начал культивировать отдельные клетки. Для культивирования он использовал зеленые клетки, изолированные из клеток палисадной паренхимы <i>Lamium purpureum</i> и волосков традесканции вирджинской и медуницы мягкой. Габерланд ошибочно полагал, что содержащие хлорофилл клетки полностью обеспечивают себя необходимыми питательными веществами. Ему так же принадлежит гипотеза о тотипотентности любой живой клетки растения. Несмотря на неудачные исследования Габерландта с фотосинтезирующими клетками, было положено начало поиску новых питательных смесей и условий, необходимых для роста органов, тканей и клеток растений.

1903 -1939 год	Ф. Уайт Р. Готре	<p>Работы учёных показали, что изолированные органы и ткани могут расти в культуре неограниченно долго, если их пересаживать на свежую питательную среду. Такую же способность наблюдал Ф. Уайт для клеток опухолевого происхождения. Уайт стал автором монографии «Культура растительных тканей».</p> <p>В 1959 году выходит монография Готре, включающая 142 вида, выращиваемых <i>in vitro</i>.. Были разработаны составы питательных сред, изучено значение микро- и макроэлементов для нормального роста тканей, определено влияние витаминов и стимуляторов роста.</p>
1960- 1975 год	Э. Коккинг. Такебе	<p>Является основоположником нового метода получения изолированных протопластов из тканей корня и плодов томатов путем обработки их смесью пектолитических и целлюлолитических ферментов.</p> <p>Такебе удалось определить условия культивирования изолированных протопластов, при которых они образуют клеточные стенки, делятся и дают начало клеточным линиям, способным к морфогенезу. Ему удалось определить условия культивирования изолированных протопластов, при которых они образуют клеточные стенки, делятся и дают начало клеточным линиям.</p>

2.2 Биология культивируемых растительных клеток

В растительной клетке есть ядро и все органоиды, свойственные животной клетке: эндоплазматическая сеть, рибосомы, митохондрии, аппарат Гольджи. Вместе с тем, она отличается от животной клетки следующими особенностями строения:

1. Растительная клетка, как и животная, окружена цитоплазматической мембраной, но, кроме нее, ограничена толстой состоящей из целлюлозы **клеточной стенкой**. Наличие клеточной стенки — специфическая особенность растений. Она определила малую подвижность растений. Вследствие этого питание и дыхание организма стали зависеть от поверхности тела, контактирующей с окружающей средой, что привело в процессе эволюции к большей расчлененности тела, гораздо

более выраженной, чем у животных. Клеточная стенка имеет поры, через которые каналы эндоплазматической сети соседних клеток сообщаются друг с другом.

2. В растительной клетке имеются особые органоиды – пластиды. В них происходит первичный синтез органических веществ из минеральных за счет энергии света - фотосинтеза. Различают три вида пластид: *лейкопласты* - бесцветные пластиды, в которых из моносахаридов и дисахаридов синтезируется крахмал (есть лейкопласты, запасующие белки или жиры); *хлоропласты* - зеленые пластиды, содержащие пигмент хлорофилл; *хромoplastы*, включающие различные пигменты из группы каротиноидов, обуславливающих яркую окраску. Пластиды могут превращаться друг в друга.
3. В растительной клетке имеется развитая система вакуолей, в значительной мере обуславливающая осмотические свойства клеток.
4. В растениях синтетические процессы преобладают над процессами освобождения энергии. Это одна из наиболее характерных особенностей обмена веществ растительных организмов. Первичный синтез углеводов из неорганических веществ осуществляется в пластидах.
5. Вакуоли окружены мембраной и развиваются из эндоплазматической сети. Вакуоли содержат в растворенном виде белки, углеводы, низкомолекулярные продукты синтеза, витамины, различные соли. Осмотическое давление, создаваемое растворенными в вакуолярном соке веществами, приводит к тому, что в клетку поступает вода, которая обуславливает тургор напряженное состояние клеточной стенки. Толстые упругие стенки обеспечивают прочность растений к статическим и динамическим нагрузкам.

Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению. Переход специализированных неделящихся клеток к пролиферации связан с их дедифференциацией (утратой специализации). В основе этого процесса лежит дифференциальная активность генов. Структура и функции клеток определяются активностью генов, и если клетки различаются по своей структуре и функциям, то это обусловлено различиями в экспрессии их генов, то есть специализация обеспечивается «включением» разных генов в разных клетках. Обычно активна небольшая часть (5%) всего пула генов, свойственных данному виду. В этот состав активных генов входят,

кроме видоспецифичных и обязательных для поддержания клеточного метаболизма, гены, активные только в данном органе, ткани, клетке, а также гены, активные лишь в определенном возрасте или начавшие работать только под влиянием изменившихся внешних условий.

Возникновение физиологических и структурных различий между клетками и тканями растений, связанное с их функциональной специализацией, называют процессом **дифференциации**. Понятие «дифференциация» отражает превращение эмбриональной, меристематической клетки в специализированную. Меристематические клетки, однотипные по структуре и функции, начинают развиваться различными путями, создавая ткани разных органов. Между геномами в клетках, которые приобретают разную форму и функцию нет качественных различий, и клетки эти начинают различаться только вследствие разной экспрессии генов. Вновь возникшая клетка обладает широкими потенциями и может развиваться по любому из многих путей в морфологическом и физиологическом смысле.

Детерминация (определение) пути развития каждой клетки является основой физиологии развития. Вступление на тот или иной путь развития определяется особым набором белков, т. е. каждая специализированная клетка вырабатывает только ей свойственные белки, что является следствием дифференциальной активности генов — экспрессии одной группы генов при одновременной репрессии других. Способность одной-единственной зрелой соматической клетки дать начало целому организму (тотипотентность) показывает, что в процессе нормальной клеточной дифференциации у растений не происходит утраты или необратимой инактивации каких-либо генов.

У растений почти всякая дифференциация обратима при условии, если дифференцированная клетка живая, в протопласте сохранилось ядро и не образовалась вторичная оболочка. После деления дочерняя клетка может оставаться эмбриональной и вновь вступить в клеточный цикл с последующим митозом, либо может оказаться как бы «вне цикла» (G_0), перестав делиться, и наконец, приобретя компетенцию, постепенно детерминироваться и вступить на путь дифференцировки (специализации). **Компетенция** — способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития. Индуцирующее воздействие могут оказывать различные факторы: гормоны, продукты жизнедеятельности соседних клеток, других тканей, электрофизиологические сигналы и т. д.

Скугом и Мурасиге была выдвинута концепция, согласно которой можно получить образование стеблей, корней или недифференцированный рост каллуса, изменяя относительное содержание ауксинов и цитокининов. В самом простом случае (табак)

индукция и образование каллуса наблюдается при сбалансированном отношении ауксинов к цитокининам, стеблевые почки образуются при повышении уровня цитокининов по отношению к ауксинам, корни формируются при высоком содержании ауксинов в среде. В большинстве случаев формирование органов в культуре клеток можно объяснить гормональной теорией регуляции, но для некоторых видов она оказывается несостоятельной. Одни и те же физиологически активные вещества регулируют и деление клеток при недифференцированном росте каллуса, и клеточные деления, связанные с дифференциацией. Если дифференциация включает изменения в экспрессии генов на уровне транскрипции, тогда должны существовать и другие специфические вещества, определяющие компетентность клетки к обработке экзогенными фитогормонами.

Появляются многоядерные клетки, отмечается полиплоидизация в результате нарушения митоза. Характерное несинхронное течение митотических циклов является одним из условий морфологической гетерогенности клеток ткани. Важно, что при выращивании *in vitro* наблюдается генетическая гетерогенность клеток, появление мутантов с отличительными особенностями органогенеза. В основе лежат изменения состояния хромосом в виде транслокаций, делеций, другие нарушения связаны с полиплоидизацией.

Клетка, введенная в культуру, претерпевает последовательные изменения: переход к недифференцированному состоянию, эмбриональному росту и, благодаря способности каллуса к вторичной дифференциации, формообразованию. Взаимодействие между клетками выступает как решающий фактор их дифференциации и специализации. Процесс дифференциации клеток обусловлен различной степенью репрессии и дерепрессии генетической информации.

В ассоциации клеток каллусной ткани одни клетки занимают определенное положение и осуществляют посредством физико-химических контактов влияние на другие, чем определяется их структурно-функциональное состояние. Межклеточные взаимодействия осуществляются с помощью соответствующих донорно-акцепторных молекул цитоплазматической мембраны. Этими молекулами могут быть низкомолекулярные белки, комплексы углеводов с белками, фитогормоны, ингибиторы, полярные соединения и другие. Но во всех случаях на основе нуклеиново-белкового, белково-углеводного и иного типа узнавания они будут способствовать слипанию или отталкиванию клеток, будут выступать как эффекторы или апорепрессоры. В клетке реципиента с помощью специальных рецепторов эти молекулы будут связываться и изменять в эпигенезе реакцию генетической информации. Таким образом, в основе дифференциации клетки лежат процессы репрограммирования, репрессии, дерепрессии генетической информации. Это

приводит к образованию специализированных клеток, которые становятся способными к взаимодействию, ассоциации, образованию геометрических форм, к органо- и морфогенезу.

Важнейшим условием морфогенеза является адгезия клеток, в результате которой образуется ткань и орган. Поверхностные рецепторы, а также различные структуры типа микротрубочек обуславливают узнавание, сближение, слипание клеток в процессе дифференциации, ткане- и формообразования. Вещества, активные в процессах структуро- и формообразования, синтезируются под контролем ядра при поступлении сигналов из цитоплазмы клетки, а также экзогенных импульсов, эффекторов. При этом связующим звеном между генетической информацией, ее реализацией и эффектором выступают аллостерические белки, которые собирают, накапливают внешнюю информацию и преобразуют ее, в результате чего изменяют свою конформацию и вступают во взаимодействие с опероном.

Генетическая обусловленность процессов морфогенеза отражается в изменении синтеза и-РНК, белков, активных ферментов, то есть в комплексе скоординированных во времени и пространстве реакций, обуславливающих дифференциацию активности генов. Появление некоторых белков свидетельствует об их участии в морфогенезе и запуске морфогенетических реакций. Установлен специфический фактор пептидной природы, стимулирующий морфогенез. Изучая генетический контроль каллусообразования и органогенеза, ученые предположили, что интенсивность образования каллуса находится под генетическим контролем.

О генетической обусловленности признака регенерации в условиях *in vitro* свидетельствуют следующие факты:

1. Отсутствие определенных плеч хромосом (например, в клетках *Triticum timopheevii* при длительном культивировании теряются плечи хромосом генома *At*) может приводить к снижению выхода регенерантов.
2. С помощью гибридизации можно повысить интенсивность регенерации в каллусной ткани.
3. Использование разных по составу питательных сред для регенерации способствует разному уровню экспрессии генов, которые определяют этот признак.
4. В основе генетического контроля таких признаков, как частота каллусообразования, частота образования морфогенных каллусов и количество зон регенерации для озимой пшеницы основными являются сверхдоминирование, неполное доминирование и эпистаз; для озимой твердой – эпистаз, неполное доминирование и сверхдоминирование; для яровой твердой – эпистаз.

2.3 Характеристика каллусных тканей

Каллус - ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений. **Культура каллусных тканей** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

Выделяют два типа культивируемых растительных клеток: нормальные и опухолевые. Опухолевые клетки морфологически мало отличаются от каллусных. Физиологическим отличием является гормонезависимость опухолевых клеток, поэтому опухолевые клетки делятся и растут на питательных средах без добавок фитогормонов. Эти клетки не могут дать начало нормально организованным структурам. Иногда они образуют тератому - опухоль, состоящую из тканей нескольких типов, производных одного, двух или трех зародышевых листков, присутствие которых не свойственно тем органам и анатомическим областям организма, в которых формируется опухоль.

Нормальные клетки в культуре могут существовать в двух видах: в виде суспензии в жидкой питательной среде и на поверхности твердой питательной среды в виде каллуса. Культура каллусных тканей выращивается поверхностным способом на полужидкой агаризованной среде (концентрация агар-агара 0.6-1%), среде с добавлением других желирующих полимеров, на дисках из полиуретана, на мостиках из фильтровальной бумаги, полупогруженных в жидкую питательную среду.

Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенной анатомической структуры. Цвет массы может быть белым, желтоватым, зеленым, красным. В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают:

1. Рыхлые, сильно оводненные, легко распадающиеся на отдельные клетки.
2. Средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами.
3. Плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов. Как правило, в длительной культуре на средах, содержащих ауксины, каллусные ткани теряют пигментацию и становятся рыхлыми.

В цикле выращивания каллусной ткани клетки после ряда делений приступают к росту растяжением, дифференцируются как зрелая каллусная ткань и деградируют. Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную

среду через 28 - 30 дней, то есть проводят *пассирование* или *субкультивирование каллусной ткани*.



Рис. 38 Бесформенные кусочки растительной ткани (каллус)

Неорганизованно растущая каллусная ткань содержит три типа клеток: мелкие, средние и крупные. При пассировании ткани на среду, содержащую индукторы органогенеза, мелкие клетки приступают к делению и формируют меристематические очаги. Деление клеток меристематического очага приводит либо к формированию почек и последующему развитию из них побегов (*геммогенез*), либо к *ризогенезу*.

Клетки меристемы с самых ранних стадий развития отличаются от каллусных высоким содержанием РНК и белка. При образовании соматических эмбриоидов каллусная клетка средних размеров обособляется, ограничивается плотной оболочкой, теряет крупные вакуоли. Она содержит крупное структурированное ядро с ядрышком. Клетка делится митотически, в результате чего возникают 2 клетки проэмбрио. Последующие деления клеток приводят к формированию шаровидного зародыша, а также органа, аналогичного суспензорам в зародышевом мешке семечки. Дальнейшее развитие соматического эмбриона через ряд стадий ведет к регенерации целого растения с корнями и побегами.

Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно матовые, компактные, структурированные, имеют зеленые хлорофиллсодержащие участки, которые

представляют собой зоны морфогенеза. Впоследствии там формируются побеги или растения-регенеранты. В культуре также встречаются каллусы рыхлые, не имеющие глобулярного характера. Такие каллусы либо совсем не способны к органогенезу, либо формируют только корни. Появление корней свидетельствует о сдвиге гормонального баланса в сторону ауксинов, что препятствует образованию побегов. Эти каллусы могут остаться ризогенными, и регенерировать из них растения не удастся. Неморфогенные каллусы могут быть переведены в суспензионную культуру для получения вторичных метаболитов.

2.4 Суспензионные растительные культуры

Суспензионные культуры - отдельные клетки или небольшие группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание (рис. 39). Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов, деградации чужеродных соединений, цитологических исследований и др.

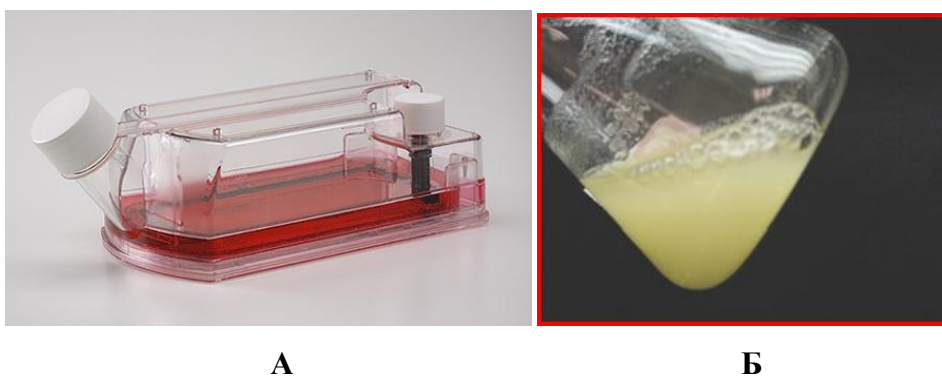


Рис. 39 Выращивание суспензионных культур

А. Флакон для выращивания суспензионной клеточной культуры

Б. Суспензионная клеточная культура

Признаком "хорошей" линии служит способность клеток к перестройке метаболизма и высокая скорость размножения в конкретных условиях культивирования.

Морфологические характеристики такой линии:

1. Высокая степень дезагрегации (5-10 клеток в группе).
2. Морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или овальная форма, плотная цитоплазма).
3. Отсутствие трахеидоподобных элементов.

Клеточную суспензию получают, помещая каллусную ткань в колбу с жидкой питательной средой. Суспензия перемешивается в колбе на качалке, имеющей скорость перемешивания 100 - 120 об/мин. При первом переносе на свежую среду удаляют крупные кусочки исходного каллуса и крупные агрегаты, фильтруя через 1 - 2 слоя марли, нейлоновые сита, шприц с соответствующим отверстием. Для инициализации суспензионной культуры необходимо 2 - 3 г свежей массы каллусной культуры на 60 - 100 мл жидкой питательной среды. Для каждой линии культуры клеток существует минимальный объем инокулята, при меньшем размере которого культура не растет.

Параметры оценки роста суспензионной культуры:

1. *Объем осажденных клеток (ООК).* Переносят небольшой объем суспензионной культуры в мерную пробирку объемом 15 мл, лучше всего коническую. Центрифугируют 5 минут при 200 g. ООК - величина, которую составляет объем осадка от объема суспензии, обычно в %.
2. *Число клеток.* Подсчитывается в камере Фукса-Розенталя.
3. *Сырая и сухая масса.* Суспензия клеток фильтруется через смоченный и взвешенный фильтр, вложенный в воронку Бюхнера под слабым вакуумом. Клетки промывают дистиллированной водой, оттягивают воду под вакуумом и взвешивают снова вместе с фильтром. Сухая масса – определяется аналогично, но взвешивается сухой фильтр, а клетки сушат вместе с фильтром в термостате при 60°C до постоянной массы.
4. *Содержание белка.* Для определения белка клетки собирают на фильтре из стекловолокна, дважды промывают кипящим раствором 70% этанола, сушат ацетоном, гидролизуют 1М NaOH при температуре 85°C полтора часа. Затем фильтруют и определяют белок по Лоури.
5. *Проводимость среды.* Определяют с помощью кондуктометра. Она обратно пропорциональна свежей массе клеток.
6. *Жизнеспособность клеток.* Оценивают по движению цитоплазмы под микроскопом, а также по окрашиванию клеток красителями (флюоресцеиндиацетат, соли тетразолия, синий Эванса). Живые клетки не окрашиваются вследствие непроницаемости клеточной мембраны.

Хорошо растущая суспензия имеет S-образную кривую роста, которая состоит из нескольких участков: 1- латентная, или лаг-фаза, где видимый рост не наблюдается ни по одному из критериев; 2 - экспоненциальная, рост с ускорением; 3 - линейная, где скорость роста постоянна; 4 - фаза замедленного роста; 5 - стационарная фаза; 6 - фаза деградации клеток. Реальная ростовая кривая может несколько отличаться от модельной. На форму

ростовых кривых влияют и генетическая характеристика популяции (вид растения), и количество инокулята, и условия выращивания (состав среды, начальное значение pH, состав газовой фазы, скорость перемешивания).

. Различают два вида систем культивирования: открытую и закрытую.

Для **закрытой системы** характерен периодический режим выращивания. Клеточная масса (инокулят) помещается в определенный объем среды. Система закрыта по всем параметрам, кроме газов, до конца выращивания. Периодически подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания.

Открытые (проточные) культуры характеризуются поступлением свежей питательной среды, при котором отбирается не только старая питательная среда, но и часть урожая клеточной массы.

Наиболее изучено и распространено закрытое глубинное культивирование. Для аэрации и перемешивания используют различную аппаратуру: роллеры, качалки, магнитные мешалки и т.д.

Мягкое перемешивание и аэрацию обеспечивает пневматический способ перемешивания потоком сжатого стерильного воздуха, подаваемого в ферментер с восходящим током воздуха. Этот способ имеет свой недостаток, потому что в культуральной среде возникает избыток воздуха, приводящий к кислородному голоданию. От концентрации кислорода в среде зависят рост и вторичный метаболизм клеток. В микробиологических системах изучена взаимозависимость роста биомассы, выхода искомого продукта и снабжения кислородом. Для растений таких данных нет.

На рост клеток, кроме кислорода, могут влиять и другие газы. Например, углекислый газ может существенно влиять на длину лаг-фазы. Высокая степень аэрации может оказывать негативное действие на рост и синтез продуктов вторичного метаболизма, поскольку удаляются углекислый газ и летучие соединения. Клетки растений *in vitro* по сравнению с микроорганизмами имеют низкую интенсивность дыхания, что тоже должно учитываться при конструировании сосуда для культивирования.

Отличительная особенность суспензионных культур клеток растений — высокая плотность, необходимая для роста. Поэтому другим осложнением при культивировании клеток растений является увеличение вязкости, что замедляет рост биомассы. Это ведет к адгезии. Адгезия (прилипание) клеток друг к другу, на поверхностях культурального сосуда и погруженных в него мешалок и датчиков вызывает затруднения. В верхней части сосуда постепенно может образовываться пена, состоящая из выделяемых клетками белков и полисахаридов. В процессе культивирования клетки

слипаются и часть из них скапливается в этой пене, образуя «корку», или «безе». С увеличением биомассы клеток увеличивается и эта «корка», снижая интенсивность перемешивания, что в конце концов может привести культуру к гибели.

Клетки растений обладают меньшей физиологической и метаболической активностью по сравнению с микроорганизмами. Время генерации (интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями) растительной клетки в 60—100 раз превосходит время генерации микробной клетки. Пул пролиферирующих клеток не превышает 50—60%, многие клетки быстро прекращают деление и переходят в фазу покоя.

Все эти обстоятельства определяют продолжительный рост популяции клеток при накопительном, или периодическом, выращивании. Поддержание стерильности длительное время также является одной из технических проблем, особенно при непрерывном культивировании.

Периодическое, или накопительное, культивирование — это самый простой способ выращивания клеток, являющийся пока традиционным. Суспензионные культуры используют для промышленного получения вторичных метаболитов. Вещества, продуцируемые растительными клетками, используются в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и других отраслях промышленности. К ним относятся: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены (платтецин, харрингтонин), пептиды (ингибиторы фитовирусов). В настоящее время в разных странах около ста видов растений используется в биосинтетической промышленности для получения экономически важных веществ, среди них — женьшень, раувольфия змеиная, наперстянка шерстистая и пурпурная, диоскорея дельтовидная, воробейник, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, мак снотворный и др.

Получение вторичных метаболитов имеет свои особенности. Деление клеток, приводящее к увеличению клеточной биомассы, и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Накопление вторичных метаболитов возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции и достигает максимума в стационарной фазе. Некоторые алкалоиды активно синтезируются в фазе максимальной митотической активности (экспоненциальный рост), что является исключением. Знание таких закономерностей позволяет регулировать процессы получения ценных веществ. Механизмы и условия, блокирующие активный рост клеток и клеточную пролиферацию, одновременно активируют ферменты вторичного метаболизма. Неспецифические

стрессовые условия, воздействующие на клетки в конце экспоненциальной фазы, могут стимулировать переход к синтезу вторичных метаболитов и увеличивать их выход.

2.5 Растительные культуры гаплоидных клеток.

Гаплоид (от греч. haploos- одиночный, простой и eidos- вид)- организм (клетка, ядро) с одинарным (гаплоидным) набором хромосом. Гаплоиды получают двумя способами:

1. Классический – отдаленная гибридизация, когда в зиготе отдаленного гибрида хромосомы одного из видов элиминируют.
2. Культивирование *in vitro*, где из неоплодотворенных половых клеток с редуцированным набором хромосом можно регенерировать целые растения. Обычно у них нарушено формирование мужских и женских гамет. При культивировании *in vitro* может произойти спонтанное удвоение хромосом. Дигаплоиды фертильны и вполне жизнеспособны.

Преимущества гаплоидов и дигаплоидов:

1. Гаплоидные растения имеют один набор хромосом, характерный для гамет, что дает селекционерам возможность наблюдать мутации сразу же в ходе осмотра гаплоидных растений, поскольку все рецессивные генные мутации в гаплоидных организмах не маскируются доминантными аллелями.
2. Если гаплоидные клетки подвергнуть полиплоидизации с помощью колхицина, то возникнут дигаплоиды, характеризующиеся абсолютной гомозиготностью. Скрещивание гомозиготных линий дает, как правило, высокопродуктивное потомство.
3. Возможность количественного генетического анализа, изучение взаимодействия генов, изучение генетической изменчивости, определение групп сцепления, установление числа генов, действующих на количественные признаки, определение локализации полигенов.
4. Гаплоидные растения лишены летальных или сублетальных мутаций, ведущих к гибели или ослаблению потомства.

Методы индуцирования гаплоидов:

1. Селективная элиминация хромосом в гибридном зародыше. Этот метод чаще всего используется в селекции злаковых.
2. Индуцированный андрогенез.

3. Псевдогамия - развитие гаплоидного зародыша после оплодотворения инородной пыльцой без оплодотворения яйцеклетки или же развитие изолированной семечки (гиногенез).

В клеточной инженерии чаще применяется индуцированный андрогенез. Впервые гаплоидные растения были получены в 1964 году индийскими исследователями С. Гуха и С. Махешвари при культивировании пыльников дурмана. Таким методом получены гаплоидные растения более чем у 200 видов, в том числе у пшеницы, ячменя, ржи, риса, картофеля и других культур. Для культуры пыльников используют целые пыльники, стерильно выделенные из бутонов в определенной фазе развития. Их помещают на твердую питательную среду, либо на поверхность жидкой питательной среды. Гаплоидные растения из изолированных пыльников можно получить путем *прямой регенерации* соматических зародышей и *косвенной* - через каллусогенез. В первом случае внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, которые при определенных условиях культивирования развиваются в эмбриониды, дающие начало гаплоидным растениям. Эмбриониды - зародышеподобные структуры. Во втором - пыльца делится, но клетки, возникшие в результате делений, быстро увеличиваются в размерах и, разрывая оболочку пыльцевого зерна, образуют каллус. В результате дальнейшего морфогенеза из этих каллусных клеток регенерируют растения. При этом растения могут иметь разную степень пloidности - ди, поли, анеуплоидные. Последние часто стерильны, но после обработки растений колхицином происходит удвоение числа хромосом, в результате чего можно получить фертильные гомозиготы.

Культура пыльцы представляет собой культивирование микроспор, освобожденных от соматических тканей пыльника, в жидкой среде. Пыльцу от соматической ткани пыльника отделяют несколькими способами:

1. Гомогенизация и фильтрация. Пыльники, культивируемые в жидкой среде, разрушают, надрезая скальпелем и осторожно надавливая, затем фильтруют (поры фильтра 50 -100 мкм) и центрифугируют. Осадок промывают и суспендируют в жидкой среде.
2. Спонтанное высвобождение (пассивный способ) - пыльники определенным образом обрабатываются, инкубируются на жидкой среде, где лопаются, а пыльца высвобождается и всплывает наверх.
3. Разрезание - разрезают стенку пыльника. Используется редко в связи с трудоемкостью и длительностью.

Пыльцевой эмбриогенез обусловлен функциональной и структурной детерминацией пыльцевого ядра и клеток гаметофита, поэтому в развитии могут принимать участие:

1. Только вегетативные клетки.
2. Только генеративные клетки.
3. Оба типа клеток, если вегетативные и генеративные клетки сольются, при этом образуется диплоидный эмбриоид.

Для пасленовых характерен только эмбриогенез, для злаковых - образование как каллусов, так и эмбриоидов. Среди гаплоидов много альбиносов (особенно у злаков), возможно, это результат мутаций в микроспорах при культивировании.

При отдаленной гибридизации некоторых видов установлено явление селективной элиминации хромосом одного из родителей на ранней стадии развития гибридного зародыша. Это явление хорошо изучено у ячменя. При скрещивании диплоидных ячменей *Hordeum vulgare* (культурный) и *H. bulbosum* (многолетний луковичный дикий) на стадии роста зародыша и эндосперма (через 5 дней после оплодотворения) происходит выпад хромосом дикого вида. Возникает гаплоид с набором хромосом *H. vulgare*. Через 15 суток после оплодотворения рост гибридного зародыша на материнском растении прекращается, но при культивировании *in vitro* из таких зародышей развиваются проростки. Частота и количество образовавшихся растений при этом способе очень высоки. Кроме того, растения-альбиносы не образуются. С помощью этого метода были выведены сорта Исток и Одесский-115 – за 4 года вместо 10 - 12 лет обычной селекции. Элиминация хромосом встречается и у других родов. Если в качестве опылителя использовать дикий ячмень, то можно индуцировать гаплоиды у ржи и пшеницы.

Работы по получению гаплоидов в культуре женского гаметофита начались в 50-е годы. В последнее время интерес к ним возрос. У растений с мужской стерильностью культивирование неоплодотворенных семяпочек является единственной возможностью получения гаплоидов. Женский гаметофит может быть источником получения гаплоидов и у растений с низким морфогенетическим потенциалом каллусной ткани, либо если каллусная ткань регенерирует растения-альбиносы. У некоторых растений, например у ячменя и риса, индукция зеленых растений намного выше при гиногенезе по сравнению с андрогенезом.

В зависимости от того, какая клетка зародыша даст начало новому организму, различают *партеногенез* и *апогамию*. Партеногенез – развитие яйцеклетки без оплодотворения. При апогамии зародыш развивается из синергиды или антиподы. Впервые гаплоидный каллус из неоплодотворенной семяпочки был получен в 1964 году Тулеком в культуре гинго. А органогенез удалось индуцировать лишь в 1976 году, когда

Сан Ноум при работе с культурой неоплодотворенных завязей ячменя получил нормальные зеленые гаплоидные растения.

Гиногенез может идти двумя путями – через эмбриогенез и через каллусогенез. В работах Сан Наума с ячменем было показано, что гаплоидные эмбриониды преимущественно образовывались из антипод, а каллус – из синергид. У риса и эмбриогенез, и каллусогенез давали синергиды, а антиподы в итоге дегенерировали. У табака гаплоидный эмбриогенез характерен для яйцеклеток, у скерды – для антипод.

2.6 Иммуобилизованные растительные клеточные культуры

Культуры клеток и тканей растений являются источником вторичных метаболитов, таких как алкалоиды, стероиды, масла и пигменты. Многие из этих веществ получают путем экстракции из растений.

Метод иммуобилизации клеток и тканей растений позволяет увеличивать выход вторичных метаболитов. Первая удачная попытка иммуобилизации клеток была осуществлена в 1966 г. Мосбахом. Он зафиксировал клетки лишайника *Umbilicaria pustulata* в полиакриламидном геле. На следующий год Ван Вецель выращивал клетки эмбрионов животных, иммуобилизованных на микрошариках ДЭАЭ (диэтиламиноэтил сефадекса, на основе декстрана). После этого клетки были иммуобилизованы на разных субстратах. В основном это были клетки микроорганизмов.

Методы иммуобилизации клеток:

1. Иммуобилизация клеток или субклеточных органелл в инертном субстрате. Например, *Digitalis lanata* в альгинатных, агарозных шариках, в желатине и т.д. Производится обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред – альгинат, агар, коллаген, полиакриламид.
2. Адсорбция клеток на инертном субстрате. Клетки прилипают к заряженным шарикам из альгината, полистирола, полиакриламида. Метод применялся в экспериментах с животными клетками, а также клетками *Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *E. coli*.
3. Адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул (лектин). Применяется редко, эксперименты проводились с различными линиями клеток человека, эритроцитами крови барана, адсорбированными на покрытой белком агарозе.
4. Ковалентное связывание с другим инертным носителем типа КМЦ. Очень редко применяется, известна удачная иммуобилизация для *Micrococcus luteus*. В основном

проводились эксперименты по иммобилизации клеток животных и микроорганизмов.

Преимущества иммобилизованных растительных клеток перед традиционными способами культивирования:

1. Клетки, иммобилизованные в или на инертном субстрате, образуют биомассу гораздо медленнее, чем растущие в жидких суспензионных культурах. Рост определяет степень агрегации клеток, оказывая косвенное влияние на синтез вторичных метаболитов. Организация в данном случае является результатом агрегации клеток, а достаточная степень агрегации может быть получена только в медленно растущих культурах. Предполагает, что «первичный» и «вторичный» пути метаболизма по-разному конкурируют за предшественники в быстро и медленно растущих клетках. Если условия среды благоприятны для быстрого роста, то в первую очередь синтезируются первичные метаболиты. Если быстрый рост блокирован, то начинается синтез вторичных метаболитов. Таким образом, низкая скорость роста иммобилизованных клеток способствует высокому выходу метаболитов.
2. Иммобилизация клеток позволяет им расти в тесном физическом контакте друг другом, что благоприятно отражается и на химических контактах. В растении любая клетка окружена другими клетками, но ее положение меняется в ходе онтогенеза в результате деления как этой, так и окружающих клеток. От положения клетки в растении зависит степень и тип дифференциации этой клетки. Т.е., физическое окружение клетки влияет на ее метаболизм. Регуляция синтеза вторичных метаболитов находится как под генетическим, так и под эпигенетическим (внеядерным) контролем, то есть любые изменения в цитоплазме могут привести к количественным и качественным изменениям в образовании вторичных метаболитов. В свою очередь, цитоплазма представляет собой динамическую систему, находящуюся под влиянием окружающей среды. Из внешних условий на метаболизм существенное влияние оказывают 2 важных фактора: концентрация кислорода и углекислого газа, а также уровень освещения. Свет играет роль и в процессе фотосинтеза, и в таких физиологических процессах, как деление клеток, ориентация микрофибрилл, активация ферментов. Интенсивность и длина световой волны определяется положением клетки в массе других клеток, то есть зависят от степени организованности ткани.
3. Возможность регулирования выхода вторичных метаболитов путем изменения химического состава окружающей среды. Изменение состава среды для каллусной

и суспензионной культуры сопровождается определенными физическим манипуляциями с клетками, что может привести к повреждению или загрязнению культур. Этого можно, используя циркуляцию больших объемов питательной среды вокруг физически неподвижных клеток, что позволяет осуществлять последовательные химические воздействия.

4. Иммобилизация клеток способствует легкой изоляции идиолинов.

Культивирование иммобилизованных клеток осуществляется двумя способами:

1. Система культуры с плоской основой, при этом клетки выращиваются в горизонтально расположенном сосуде.
2. Система колоночной культуры, где клетки выращиваются в вертикальном сосуде. В обеих системах жидкая среда циркулирует вокруг физически неподвижных клеток.

В системе культуры с плоской основой питательная среда капает под действием силы тяжести из цилиндрического сосуда объемом 70 мл в стеклянный сосуд для культивирования объемом 350 мл, где находятся клетки (40 – 50 г сырой массы), посаженные на субстрат – подстилку из нетоксичной полипропиленовой ткани. Питательная среда проникает сквозь ткань под действием капиллярных сил, снабжая клетки. Затем питательная среда откачивается из сосуда для культивирования с помощью перистальтического насоса обратно в резервуар и используется повторно (рис. 40А).

Исследования, проведенные с этой системой, показали, что клетки *Solanum niger*, культивируемые на плоской основе (среда Мурасиге-Скуга с добавлением 2,4-Д и кинетина) способны потреблять питательные вещества и быстро реагируют на недостаток ортофосфата. Увеличение сырой массы идет гораздо медленнее, чем в суспензионных культурах. Количество жизнеспособных клеток такое же и достигает 70 – 80%. Количество алкалоидов через 7 суток культивирования достигает 12 мг/г сухой массы, в суспензии же через 18 дней культивирования оно составляет 10 мг/г сухой массы. В местах, где питательная среда капает прямо на клетки, через 3 – 4 дня культивируемая ткань становится темной и отличается от остальной, которая у *S. niger* окрашена в светло-бежевый цвет. Клетки в зонах капания часто бывают более компактны, содержат больше алкалоидов. Если клетки изолировать из зон капания и поместить в чашки Петри с агаром, содержание алкалоидов падает, при возвращении в прежние условия культивирования вновь аккумулируются высокие количества метаболитов.

В клетки также вводились предшественники вторичных метаболитов. При этом синтез капсацина клетками *Capsicum frutescens* увеличивается в тысячи раз при добавлении в среду 5 мл изокаприновой кислоты. При этом капсацин не накапливается внутри клеток, а секретруется в питательную среду. Установлено, что клетки, иммобилизованные на

плоской основе, способны потреблять питательные вещества из среды, в том числе и кислород, имеют низкую скорость роста, каллусоподобное расположение, способны к тесному межклеточному контакту. В целом, они имеют более высокий уровень синтеза вторичных метаболитов.

Несмотря на эти преимущества, промышленное культивирование имеет существенный недостаток: горизонтальная конструкция аппарата создает неудобства при работе и требует большой площади.

В системе колоночной культуры возрастает число клеток, на которые капает среда, что увеличивает “зону капания”, где происходит накопление больших количеств вторичных метаболитов.

Сосуд для культивирования из горизонтального превращается в вертикальный. В сосуде с питательной средой 50 мл жидкой среды, которая под действием силы тяжести капает в вертикальную стеклянную колонку, содержащую иммобилизованные клетки. Среду собирают со дна колонки и вновь используют в цикле, перекачивая с помощью перистальтического насоса в резервуар со средой (рис. 40Б).

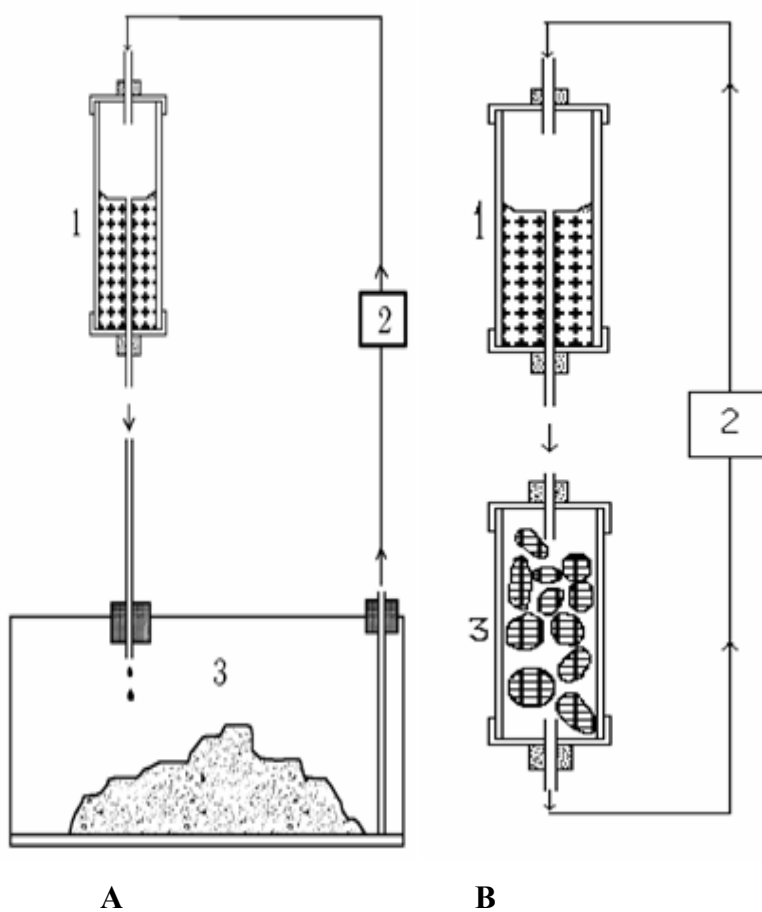


Рис. 40 Различные системы иммобилизованных культур

А - Система культуры с плоской основой, **В** - Система культуры в колонке.

Для размещения клеток используются нейлоновые мочалки. Материал нетоксичен, легко режется, выдерживает автоклавирование. В качестве субстратов для погружения клеток используют агар и альгинат кальция.

Агар традиционно используется в работе с культурами клеток и тканей. 2% (масса к объему) раствор агара в дистиллированной воде автоклавируют при 1 атмосфере в течение 20 минут и охлаждают на водяной бане до 35 – 40°C. Клетки суспензионной культуры в стационарной фазе роста пропускают через сито с диаметром пор 1 мм и смешивают в пропорции 1:1 (V:V) с незастывшим агаром. Стерильные кусочки мочалки 2-3 * 1 * 1 см с помощью стерильного пинцета опускают в смесь клеток с агаром, а когда агар начинает застывать, помещают в стерильные колонки с внутренним диаметром 15 * 2,5 см. В каждую колонку помещают примерно 10 сеточек, таким образом, на колонку приходится 5 – 7 г сырой массы клеток.

Аналогично иммобилизуют клетки с использованием альгината кальция. В этом инертном субстрате, например, успешно были иммобилизованы А. Альферманном с сотрудниками клетки наперстянки шерстистой (*Digitalis lanata*). 2% раствор альгината натрия автоклавируют, охлаждают до комнатной температуры, смешивают с клетками и переносят в стерильный раствор 0,05 М CaCl₂ в дистиллированной воде на 10 минут, чтобы образующийся альгинат кальция затвердел внутри и вокруг кусочков мочалки, обволакивая клетки. Молекулы альгината поперечно сшиваются катионами кальция, при этом происходит его стабилизация. Затвердевший материал трижды промывают в стерильной дистиллированной воде и вносят в стеклянные колонки.

Рост клеток в альгинате был лучшим, чем в агаре, что связано с негативным действием расплавленного агара, температура которого составляет около 40°C, на клетки в процессе иммобилизации.

Скорость потребления ортофосфата, нитратов, аммония и сахарозы в клетках колоночной культуры ниже, чем в горизонтальной системе. Жизнеспособность клеток, по сравнению с суспензионными культурами, заметно не снижается (60 – 65%), содержание алкалоидов через 8 – 10 суток составляет 12 – 13 мг/г сухой массы клеток, алкалоиды в питательную среду не выделяются, а pH среды после 8 суток культивирования снижается на 0,4 единицы, до 5,4. Определение скорости потребления кислорода показывает предположительную нехватку его на 4 – 8 сутки культивирования.

Общие рекомендации к культивированию клеток:

1. Клетки должны выращиваться физически стационарно, в тесном контакте друг с другом, чтобы стимулировалось развитие физических и химических градиентов и

обеспечивалась частичная дифференцировка культуры. Некоторые виды растений необходимо культивировать при освещении.

2. Состав питательной среды и уровень кислорода необходимо регулировать для замедления роста культуры.
3. Клетки необходимо снабжать предшественниками, но в низких концентрациях. Предшественники должны быть максимально близки в цепочке превращений к исходному продукту.
4. Желательно использовать клетки, которые секретируют необходимые метаболиты в питательную среду или клетки, у которых такую секрецию можно индуцировать.

2.7 Характеристика протопластов растительных клеток. Получение, культивирование, применение и слияние протопластов

Протопласт (от греч. protos- первый и platos- вылепленный, образованный) - клетка, лишенная целлюлозной оболочки, окруженная цитоплазматической мембраной, способная осуществлять активный метаболизм, выполнять биосинтез и трансформировать энергию (рис. 41). Впервые термин использовал Д. Ханстеин в 1880 г.

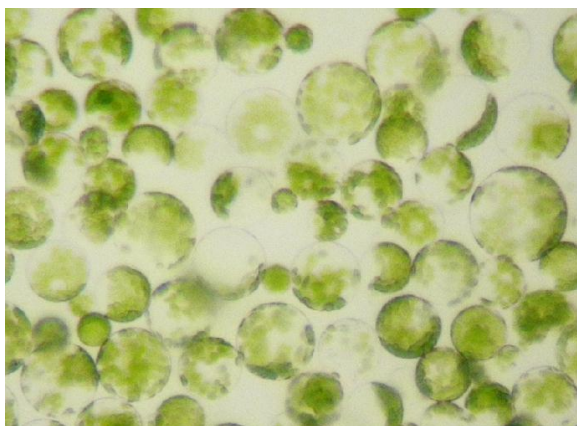


Рис. 41 Фотография растительных протопластов

В 1892 г. Дж. Клеркер первым выделил протопласты. Он плазмолизировал (плазмолиз- отделение пристеночного слоя цитоплазмы от твердой оболочки растительной клетки) ткани листа водного растения телорез (*Stratiotes aloides*) и затем удалял клеточную стенку. Это был механический способ. Метод имеет ряд ограничений:

1. Невысокая производительность.
2. Можно использовать ткани только с экстенсивным плазмолизом.
3. Трудоемкость и длительность.

Другой метод выделения протопластов - энзиматический, с использованием ферментов. В 1952 году Салтон с помощью фермента лизоцима впервые разрушил

клеточную стенку бактерий. В 1960 году Коккинг обработал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов (*Myrothecium verrucaria*) и впервые получил изолированные протопласты высших растений энзиматическим способом.

Преимущества энзиматического метода :

1. Одновременно выделяется большое количество протопластов (до 10 млн. из грамма ткани или клеток).
2. Клетки не подвергаются сильному осмотическому стрессу.
3. Клетки не повреждаются.
4. Метод сравнительно быстрый.

Для удаления клеточной стенки используют ферменты трех типов: целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Комбинация ферментов и их соотношение специфично для каждого типа клеток.

Три этапа выделения протопластов:

1. Обработка ферментами.
2. Выделение протопластов из клеточных стенок.
3. Отделение интактных протопластов от клеточных осколков.

Стандартная методика выделения протопластов (по Такебе) (рис. 42) из тканей листа *Nicotiana tabacum*: Зрелый, сформировавшийся лист отделяют от взрослого растения в возрасте 60 - 80 дней, окунают в 70% этанол, а затем помещают на 15 - 20 минут в 10% раствор гипохлорита кальция и многократно промывают дистиллированной водой. С помощью пинцета нижний эпидермис снимают, очищенные от эпидермиса листья разрезают скальпелем на небольшие кусочки площадью 4 кв. см. Для лучшего снятия эпидермиса листья должны немного подвянуть, можно также ограничить снабжение водой перед срезанием листьев.

Далее ткань обрабатывают последовательно или одновременно пектиназой, вызывающей мацерацию, и целлюлазой, разрушающей клеточные стенки. Оптимальная концентрация ферментов, как и время обработки, индивидуальны для разных тканей. Протопласты должны находиться в растворе ферментов минимальное количество времени, после чего следует тщательная промывка. Ферменты стерилизуют через бактериальные фильтры.

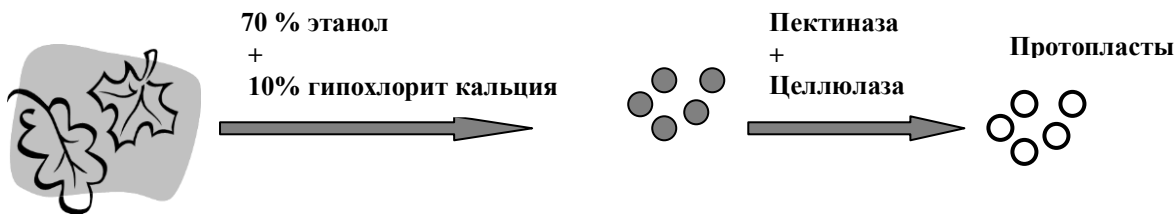


Рис. 42 Схема получения протопластов по Такебе.

Регуляция водообмена клетки связана с наличием клеточной стенки. Когда протопласт "голый", один из компонентов регуляции водообмена теряется, поэтому важное значение приобретают осмотические свойства среды выделения и культивирования. Среда должна быть немного гипертонической, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии. Эти условия тормозят метаболизм и регенерацию клеточной стенки. В качестве осмотических стабилизаторов используют сахара (глюкозу, маннит, сорбит, ксилозу), ионные осмотики (CaCl_2 , KCl) в концентрации 0,3 - 0,8 моль/литр. Концентрации подбираются индивидуально для каждого растительного объекта.

Удобнее обрабатывать ткани ферментами в чашке Петри, которую держат под углом 15° . Смесь ферментов с протопластами переносят в центрифужные пробирки. Отделить протопласты от ферментативной смеси можно двумя способами: либо фильтрация с центрифугированием, либо флотация.

При фильтрации смесь пропускают через фильтры с размерами пор 40 мкм. На фильтре при этом остаются комки клеток и их большие осколки. При дальнейшем центрифугировании оседают протопласты, осколки остаются в супернатанте. При повторном центрифугировании идет отмывка от фермента, после чего протопласты переносятся в среду для культивирования.

Метод флотации предложен О. Гамборгом с сотрудниками в 1981 году, и предназначается для ослабленных протопластов. Он основан на том, что протопласты имеют более низкую плотность, чем органеллы или остатки клеточных стенок. К исходной смеси добавляют раствор сахарозы и центрифугируют при скорости от 40 – 80 до 350 g. Чистые протопласты плавают, осколки оседают на дно.

Протопласты можно выделять также из суспензионных и клеточных культур. Лучше всего - в поздней стадии логарифмического роста, когда клеточные стенки легче поддаются разрушению, протопласты наиболее жизнеспособны.

Далее протопласты культивируют в тех же условиях, что и клетки. Состав солей может быть несколько изменен. Среда состоит из осмотического стабилизатора, неорганических соединений, источника углерода, азота, витаминов, фитогормонов. Условия культивирования: pH среды 5,4 - 5,8, температура 22 - 28°C, невысокая освещенность (не более 2000 лк).

Существуют два способа культивирования протопластов: метод жидких капель и метод платирования:

1. В первом случае суспензию протопластов в виде капель помещают на пластиковые чашки Петри. Вариацией этого способа является культивирование единичных изолированных протопластов в микрокаплях объемом 1 мкл, предложенное Ю. Глебой в 1978 г.
2. Во втором - суспензию протопластов наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же среды с 1% агаром при температуре не выше 45°C. После остывания чашки Петри переворачивают и культивируют при 28°C. В данном случае протопласты фиксированы в одном положении и физически отделены друг от друга. Это дает возможность наблюдать за развитием интактного протопласта: формированием клеточной стенки, делением, ростом и развитием растения.

Вариантом этой техники является использование кормящих протопластов или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или γ -излучения, что блокирует их способность к делению. Такие протопласты или клетки смешивают с жизнеспособными протопластами и они поддерживают и стимулируют их рост.

Сразу после удаления раствора фермента начинается образование клеточной стенки. Труднее добиться деления клеток и регенерации растений. Регенерация растений осуществляется либо через эмбриогенез, либо через развитие каллуса с дальнейшей индукцией морфогенеза. Добиваются этого добавлением в среду ауксинов или сочетания ауксинов с цитокининами.

На пролиферацию клеток, возникших из протопластов, влияет 4 фактора:

1. Видовая специфичность и физиологическое состояние исходной ткани растения.
2. Способ и условия выделения протопластов.
3. Плотность посева протопластов.
4. Состав питательной среды.

Применение протопластов.

Протопласты являются уникальной моделью для изучения фундаментальных физиологических проблем у растений. Они незаменимы при изучении состава, структуры и функционирования плазмалеммы в норме и при воздействии на нее гормонами, ингибиторами, фитотоксинами, а также при взаимодействии самих протопластов в популяции. Кроме того, протопласты могут использоваться для определения состава и архитектоники первичной клеточной стенки и изучения механизма ее репарации после разрушения.

Области применения изолированных протопластов:

1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «de novo»).
2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.
3. «Мягкое» выделение органелл.
4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.
5. Введение чужих органелл.
6. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).

Слияние протопластов.

Изолированные протопласты, еще не образовавшие клеточной стенки, могут сливаться между собой. Слияние протопластов - своеобразный метод гибридизации, так называемая **парасексуальная**, или **соматическая гибридизация**. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки растений. Внеядерные генетические детерминанты у большинства высших растений наследуются в половом процессе строго одноядерно и матерински. Техника парасексуальной гибридизации может позволить:

1. Скрещивание филогенетически отдаленных видов растений (организмов).
2. Получение асимметричных гибридов, несущих генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами, органеллами или цитоплазмой другого.
3. Слияние трех и более клеток.
4. Получение гибридов, представляющих сумму генотипов родителей.
5. Перевод мутаций в гетерозиготное состояние, что позволяет получать жизнеспособные формы при слиянии протопластов, поскольку мутагенез довольно часто дает дефектное по морфогенезу растение.
6. Получение растений, гетерозиготных по внеядерным генам и др.

Парасексуальная гибридизация важна для анализа ядерных генов и внеядерных геномов. Цитоплазматический геном кодирует ряд признаков - скорость фотосинтеза, устойчивость к патогенам, абиотическим факторам и т. д. Наличие косегрегации генов (признаки, контролируемые внеядерным геном, сегрегируют совместно) свидетельствует о физическом сцеплении генов.

Слияние бывает спонтанным (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и индуцированным. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов, как физических, так и химических.

В 1981 году Г. Циммерманом был разработан физический способ слияния протопластов, при котором протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2 - 3 протопластов, либо цепочки из 5 - 6 протопластов между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в сильно сжатых мембранах, происходит перетекание цитоплазмы, так как переменный ток удерживает протопласты вместе некоторое время, и протопласты в таких агрегатах сливаются. Затухающий ток приводит к возвращению сферической формы у слившихся протопластов.

В основе слияния лежит различное действие постоянного и переменного электрического тока на плазмалемму. Постоянное электрическое поле сжимает мембраны, ведя к их локальному разрушению, а переменное электрополе вызывает латеральную диффузию белков мембраны, образуя свободные от гликопротеидов липидные области, где противоположные мембраны могут установить контакт.

Чаще для индукции слияния протопластов используют методику ПЭГ - высокие значения рН - высокая концентрация Ca^{2+} , которая дает до 50% слившихся протопластов (рН 9 - 11, концентрация Ca^{2+} 100 - 300 ммоль/л). В присутствии полиэтиленгликоля наблюдается сильная адгезия протопластов, после удаления полиэтиленгликоля и добавления кальция - их слияние. Предполагают, что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран, что связано с их жидкостно-мозаичной структурой.

При слиянии протопластов различных растений, например, А и В, могут с равной вероятностью образовываться комбинации АА, ВВ и АВ. Желаемый продукт слияния - АВ, поэтому разрабатываются способы увеличения частоты слияния именно такого типа и избирательного выделения только продукта слияния АВ. Один из таких методов заключается в следующем. Поверхность протопласта обычно несет отрицательный заряд. Путем обработки ее фосфолипидом, несущим положительный заряд, можно временно придать поверхности протопласта положительный заряд. Если теперь протопласты А, имеющие положительный заряд, смешать с необработанными протопластами В, несущими отрицательный заряд, то будут в основном образовываться комбинации АВ в результате притяжения разноименных зарядов.

Разработаны также методы маркирования протопластов того или иного растения с помощью разных флуоресцентных красителей. Если обработать протопласты одного растения флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), а протопласты другого растения

родаминизотиоцианатом (RITC), то можно, не изменяя активности клеток, пометить их желто-зеленой (FITC) или красной (RITC) флуоресценцией. Гибриды, образовавшиеся путем слияния разных типов клеток, будут иметь оба цвета флуоресценции - желто-зеленый и красный.

Протопласты могут сливаться как попарно, так и в большем количестве. Многоядерные продукты слияния, как правило, разрушаются. Первое сообщение о получении соматических гибридов на уровне растений появилось в 1972 году (Карлсон и коллеги), в нашей стране подобное осуществили в лаборатории Бутенко Р.Г. в 1975 году.

Судьба геномов (ядерного и цитоплазматического) после слияния протопластов может быть различной:

1. Ядерные генетические детерминанты наследуются как дву-, так и однородительски. В последнем случае ядра не сливаются и впоследствии сегрегируют в процессе клеточных делений.
2. Внеядерные генетические детерминанты наследуются двуродительски. При этом в межвидовых комбинациях прослеживается тенденция к соматическому выщеплению и элиминации одного из родительских цитоплазматических геномов.
3. Возникновение гибридных клеток и растений в результате слияния более чем двух родительских клеток.

Таким образом, слияние протопластов приводит либо к образованию гибрида, либо к образованию цибрида. Соматический гибрид - продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов. Цибрид (цитоплазматический гибрид) - растение-регенерант, содержащее цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов γ -лучами для разрушения ядра. Скрининг таких клеток проводится по генам – маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов.

При слиянии могут образовываться и так называемые асимметричные гибриды – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клетки, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, 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. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная

обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос в клетку нужной хромосомы.

Гибриды могут быть получены путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут выращены растения – регенеранты.

2.8 Принципы клонального микроразмножения растений

В природе существует два способа размножения растений: половой (семенной) и вегетативный. Оба эти способа имеют как свои преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения относятся генетическая пестрота семенного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении генотип материнского растения сохраняется, а также сокращается длительность ювенильного периода. Однако большинство видов плохо размножается вегетативным способом, к ним относятся многие древесные породы. Например, эффективность размножения, даже на ювенильной стадии, дуба, сосны, ели, орехоплодных не очень высока. Кроме того, с помощью черенкования невозможно размножить многие виды древесных растений в возрасте старше 10-15 лет. Трудно получить стандартный посадочный материал, так как существует возможность накопления и передачи инфекции. Операции по размножению с помощью прививок сложны и трудоемки.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения - клонального микроразмножения. Клональное микроразмножение - получение *in vitro*, неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность.

Преимущества клонального микроразмножения:

1. Получение генетически однородного посадочного материала.
2. Освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры.
3. Высокий коэффициент размножения (10^5 - 10^6 - для травянистых, цветочных растений, 10^4 - 10^5 - для кустарниковых древесных растений и 10^4 - для хвойных).
4. Сокращение продолжительности селекционного процесса.
5. Ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития.
6. Размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами.
7. Возможность проведения работ в течение всего года.
8. Возможность автоматизации процесса выращивания.

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х гг 20 века французским ученым Жоржем Морелем, которому удалось получить первые растения - регенеранты орхидей. Его успехам способствовала, уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальных меристем *in vitro*. Морель использовал верхушку цимбидиума (сем. Орхидные), состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которых при определенных условиях наблюдал образование сфер-протокормов, которые можно было делить и культивировать самостоятельно на новой питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате он обнаружил, что этот процесс бесконечен и можно получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный посадочный материал. В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 30-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза ИФРа. Под руководством Р.Г.Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы и др. растений и предложены промышленные технологии. В дальнейшем исследования по клональному микроразмножению охватили и древесные растения (рис. 43).



Рис. 43 Клональное микроразмножение растений

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов 20 века и связаны с именем Готре, который показал, что камбиальные ткани некоторых растений способны к каллусогенезу *in vitro*. Но первые растения - регенеранты осины, доведенные до почвенной культуры, были получены лишь в середине 60-х годов Матесом.

Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время редко использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования тканей, изолированных из растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные растения характеризуются медленным ростом, трудно укореняются,

изолированных тканях активируются. Окисленные фенолы обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или уменьшению способности тканей древесных растений к регенерации адвентивных почек, которая с возрастом растения-донора исчезает практически полностью. В настоящее время, несмотря на перечисленные трудности, насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, сосна, ель, секвойя и др.).

На эффективность микрклонального размножения влияют: физиологические особенности вводимого в культуру растения, химические и физические условия культивирования. Наиболее важным моментом является выбор материнского растения и экспланта.

При выборе материнского растения необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Исходные растения должны быть здоровы, не поражены грибными, бактериальными и вирусными болезнями. Кроме того, они должны находиться в состоянии интенсивного роста (выход из фазы покоя и переход к активному росту). Луковицы, корневища и клубни в состоянии покоя непригодны, перед введением в культуру их предварительно обрабатывают высокими или низкими температурами. Способность к размножению также детерминирована генетически. Например, земляника размножается всеми способами, облепиха – ни одним, хотя в природе черенкуется. Двудольные обладают большей регенерационной способностью, чем однодольные и древесные.

При выборе экспланта необходимо учитывать его возраст, строение и происхождение. Для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала, во избежание появления аномальных растений в качестве экспланта желательно использовать молодые, слабодифференцированные ткани. Кроме того, эксплянты от ювенильных растений лучше укореняются, чем от зрелых, особенно это касается древесных пород. Лучше всего использовать кончики стеблей, пазушные почки, зародыши, молодые листья, черенки, соцветия, чешую луковиц, то есть эксплянты, содержащие меристемы. Чем меньше размер экспланта, тем меньше его регенерационная способность. С другой стороны, в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению тканей.

Длительность культивирования также влияет на эффективность микроразмножения. Физиологическое состояние экспланта меняется в течение пассажей, при длительном культивировании частота укореняемости побегов возрастает. Возможно, что при этом

эксплант приобретает признаки ювенильности, что ведет к повышению его морфогенетического потенциала.

Успех введения в культуру часто определяется эффективностью стерилизации. Выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта. Для нежных тканей концентрация стерилизующего агента должна быть снижена, чтобы сохранить жизнеспособность экспланта. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций. Хорошие результаты дает обработка растений бензоатом натрия.

Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений. На клональное микроразмножение влияют гормоны, минеральные соли, витамины и углеводы.

К физическим факторам выращивания относятся температура и условия освещения. На первых двух этапах освещенность колеблется от 1000 до 3000 Лк, фотопериод 14 – 16 часов, но эти параметры зависят от культуры. Высокая интенсивность света может вызывать хлорозы и задерживать развитие, но при переносе в почву эти растения чувствуют себя лучше и растут энергичнее. Спектральный состав также играет немаловажную роль. Некоторые исследователи указывают на синий свет как основной компонент морфогенеза. Красный свет стимулирует образование почек у табака, у салата – образование побегов, у березы – укоренение, синий свет усиливает закладку вегетативных почек у побегов табака в условиях *in vitro*, а красный стимулирует развитие цветочных почек. Важное значение играет также сочетание спектрального состава света и гормональных факторов среды. Температура культивирования обычно варьирует в интервале 22 – 26°C днем и 18 – 22°C ночью. В некоторых случаях понижение температуры ведет к повышению эффективности размножения. Для повышения коэффициента размножения необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования. Относительная влажность воздуха – 65 – 70%

Этапы клонального микроразмножения.

1. Выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры.
2. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.

3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°C, +10°C).
4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

На первом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Если трудно получить исходную стерильную культуру экспланта, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрацилин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100—200 мг/л. Это в первую очередь относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции.

На первом этапе используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. Если наблюдается ингибирование роста первичного экспланта, за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ, используются антиоксиданты (омывка в течение 4–24 часов, или добавление в питательную среду). В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту (1 мг/л), глутатион (4—5 мг/л), дитиотриэтол (1—3 мг/л), диэтилдитиокарбомат (2—5 мг/л), поливинилпирролидон (5000—10000 мг/л). Продолжительность первого этапа может колебаться от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

Второй этап — собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно наблюдать образование растений-мутантов. Используют питательную среду по рецепту Мурасига и Скуга, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов—ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л.

Третий и четвертый этапы — укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5—1% и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК.

Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

1. Выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2—24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20—50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка).
2. Непосредственное культивирование микропобегов в течение 3—4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1—5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта). В последнее время предложен метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — весна или начало лета.

Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85—90° С в течение 1—2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1).

Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20—22° С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65—90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или

полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20—30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. Эти явления связаны, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем или четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных), учитывая их положительную роль в снабжении растений минеральными и органическими питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов.

Индийскими учеными предложен простой метод предотвращения быстрого обезвоживания листьев растений, выращенных *in vitro*, во время их пересадки в полевые условия. Метод заключается в том, что листья в течение всего акклиматизационного периода следует опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина, или жира в диэтиловом эфире (1:1). Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100%-ную их приживаемость.

Методы клонального микроразмножения (классификация Мурасиге 1977 г.)

1. Активация пазушных меристем.
2. Образование адвентивных побегов тканями экспланта.
3. Возникновение адвентивных побегов в каллусе.
4. Индукция соматического эмбриогенеза в клетках экспланта.
5. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани.
6. Формирование придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (деление первичных эмбриоидов).

Н. В. Катаева и Р. Г. Бутенко (1983) выделяют два принципиально различных типа клонального микроразмножения:

1. Активация уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).
2. Индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*:
 - а) образование адвентивных побегов непосредственно тканями экспланта.
 - б) индукция соматического эмбриогенеза.
 - в) дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Основной метод, использующийся при клональном микроразмножении растений - активация развития уже существующих в растении меристем. Он основан на снятии апикального доминирования

Этого можно достичь двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин) и зеатин.

Полученные таким образом побеги отделяют от первичного экспланта и вновь самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

Часто в качестве экспланта используют верхушечные или пазушные почки, которые изолируют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Образующиеся пучки побегов делят, при необходимости черенкуют и переносят на свежую питательную среду. После нескольких пассажей, добавляя в питательную среду ауксины, побеги укореняют *in vitro*, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений.

В настоящее время этот метод широко используется в производстве посадочного материала сельскохозяйственных культур, как технических, так и овощных, а также для размножения культур промышленного цветоводства, тропических и субтропических растений, плодовых и ягодных культур, древесных растений.

Второй метод - индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при

благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения. Можно добиться образования адвентивных почек почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковиц, сегментов корней и зачатков соцветий). Этот процесс происходит на питательных средах, содержащих цитокинины в соотношении с ауксинами 10:1 или 100:1. В качестве ауксина используют ИУК или НУК. Таким способом были размножены многие представители семейства лилейных, томаты, древесные растения (из зрелых и незрелых зародышей).

Достаточно хорошо разработана технология клонального размножения земляники, основанная на культивировании апикальных меристем. Меристематические верхушки изолируют из молодых, свободных от вирусных болезней растений, и выращивают на питательной среде МС, содержащей БАП в концентрации 0,1 - 0,5 мг/л. Через 3 - 4 недели культивирования меристема развивается в проросток, в основании которого формируются адвентивные почки, быстро растущие и дающие начало новым почкам. В течение 6-8 недель образуется конгломерат почек, связанных между собой соединительной тканью и находящихся на разной стадии развития. Появляются листья на коротких черешках, в нижней части которых формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют и пересаживают на свежую питательную среду. На среде без регуляторов роста за 4 - 5 недель формируются нормальные растения с корнями и листьями. От одного материнского растения таким образом можно получить несколько миллионов растений-регенерантов в год.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название соматического эмбриогенеза. В отличие от развития *in vivo*, соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. Согласно Стеварду, соматические зародыши проходят 3 стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную и в конечном итоге, имеют тенденцию развития в проросток.

Наиболее впечатляющим применением метода соматического эмбриогенеза стало размножение гвинейской масличной пальмы (*Elaeis guineensis*), масло которой широко используется при производстве маргарина и пищевого масла. Масличная пальма в природе не образует побегов и боковых ростков, что затрудняет ее вегетативное размножение. Культивирование черенков *in vitro* также невозможно. Было решено

получить скопления клеток недифференцированной ткани (калусы) путем дедифференцировки специфических тканей, а затем культивировать их до регенерации целых проростков. В первой культуральной среде калусы из фрагментов листьев развивались в течение 90 дней, при переносе во вторую и третью культуральные среды превращались в "эмбриониды". Эмбриониды размножались самопроизвольно, в течение месяца число эмбрионидов возрастало втрое, а за год из 10 эмбрионов можно было получить потомство численностью 500000 растений.

Формирование эмбрионидов в культуре тканей осуществляется в несколько этапов. Сначала происходит дифференциация клеток под влиянием ауксинов, добавленных в питательную среду (2,4-Д) и превращение их в эмбриональные. Получить эмбриониды из этих клеток можно уменьшая концентрацию ауксинов или исключая их из питательной среды. Соматические зародыши представляют собой полностью сформированные зародыши, из которых путем соответствующего капсулирования можно получить искусственные семена.

Четвертый метод клонального микроразмножения - дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Практически он мало используется с целью получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при частом пассировании каллусной ткани может изменяться ploидность регенерируемых растений, наблюдаются структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций. Наряду с генетическими изменениями отмечаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев, образование укороченных междоузлий, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. В то же время, некоторые недостатки этого метода в селекционной работе оборачиваются преимуществами. Кроме того, в некоторых случаях он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. Через каллусную культуру успешно размножаются сахарная свекла, злаковые, представители рода Brassica, подсолнечник и другие культуры.

Исключение вирусов из посадочного материала.

Основное преимущество клонального микроразмножения - получение генетически однородного, безвирусного посадочного материала. Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений: дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм. В нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы.

Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от меристематического экспланта. При этом отмечается закономерность: чем больше листовых зачатков и тканей, тем легче идут процессы морфогенеза, заканчивающиеся образованием целого растения. Вместе с тем, при таком развитии конуса нарастания увеличивается риск быстрой транспортировки вируса по проводящей системе. Кроме того, даже небольшой меристематический эксплант может содержать вирусы, проникшие в клетки в результате медленного распространения через плазмодесмы.

В целом, эффективность применения апикальной меристемы в качестве метода оздоровления зараженных вирусами растений может оказаться довольно низкой. Снизить риск попадания вирусов в здоровые ткани можно путем применения предварительной термо- или химиотерапии исходных растений.

Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* и предусматривает использование горячего сухого воздуха. Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы. Согласно одной из них при высоких температурах разрушаются белковая оболочка и нуклеиновая кислота вируса. Вторая гипотеза предполагает действие высоких температур на вирусы через метаболизм растений. При такой температуре начинает преобладать деградация вирусных частиц, а синтез их, наоборот, уменьшается. Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в термокамеры, где температура в течение первой недели повышается с 25 до 37°C путем ежедневного увеличения температуры на 2 градуса. Все остальные режимы обязательно поддерживаются в оптимальном состоянии: освещенность, высокая относительная влажность воздуха, определенный фотопериод. Продолжительность термостатирования зависит от состава вирусов и их термостойкости. Если для гвоздики достаточно 10 - 12 недельного воздействия теплом, то для хризантемы этот период превышает 12 недель.

Помимо положительного действия высоких температур на освобождение от вирусов, выявлено аналогичное влияние их на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздики, фрезии) в условиях *in vitro*. Высокие температуры увеличивают коэффициент размножения на 50 - 60%, повышая адаптацию пробирочных растений к почвенным условиям и позволяют получить больше безвирусных маточных растений.

Другой способ оздоровления - химиотерапия. В питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, добавляют препарат вирозол в концентрации 20 - 50 мг/л. Это противовирусный препарат широкого спектра действия. Применение его позволяет увеличить число безвирусных растений с 40% до 80 - 100%.

2.9 Перспективы клеточной инженерии растений

В будущем благодаря расширению сферы своего применения биотехнология сделает весомый вклад в повышение уровня жизни. Самый большой экономический эффект будет получен от применения биотехнологии в сельском хозяйстве и химической промышленности.

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

Кроме того, благодаря развитию клеточной инженерии, возможно:

1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения: традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение), синтез новых необычных соединений. Культивируемые в суспензии клетки могут применяться как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксирования, метилирования, деметилирования, гликолизирования, изомеризации). В результате биотрансформации получают уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений других видов.
2. Ускоренное клональное микроразмножение растений, позволяющее из одного экпланта получать от 10000 до 1000000 растений в год, причем все они будут генетически идентичны.
3. Получение безвирусных растений.
4. Эмбриокультура и оплодотворение *in vitro* часто применяются для преодоления постгамной несовместимости, для получения растений после отдаленной гибридизации. При этом оплодотворенная яйцеклетка вырезается из завязи с

небольшой частью ткани перикарпа и помещается на питательную среду. В таких культурах можно также наблюдать стадии развития зародыша.

5. Антерные культуры – культуры пыльников и пыльцы используются для получения гаплоидов и дигаплоидов.
6. Клеточный мутагенез и селекция. Тканевые культуры могут производить регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала в результате соматонального варьирования. При этом в некоторых случаях можно обойтись без мутагенной обработки.

2.10 Основные принципы криобиологии. Криопротекторы.

Криобиология - раздел биологии, изучающий действие на живые системы низких и сверхнизких температур (от 0°C до близких к абсолютному нулю). Основными задачами криобиологии являются: изучение жизни в условиях холода, выяснение причин устойчивости организмов к переохлаждению и замерзанию, исследование повреждающего действия отрицательных температур и способов защиты клеток и тканей при замораживании. Проблемы криобиологии имеют большое теоретическое значение, т. к. связаны с выяснением нижних температурных границ жизни, механизмов адаптации в естественных условиях к холоду, сущности анабиоза и т.п. Научные основы криобиологии заложены в конце 19 века русским учёным П. И. Бахметьевым, изучавшим явление переохлаждения у насекомых и анабиоз у летучих мышей. П. Беккерель (1904—36) и австрийский учёный Г. Рам (1919—24) установили способность различных организмов, а также спор и семян переносить в высушенном состоянии глубокое охлаждение (до —269 и —271°C), т. е. до температур, близких к абсолютному нулю. В дальнейшем было показано, что некоторые растения и животные выживают при замерзании содержащейся в них воды. Одна из основных проблем криобиологии это выяснение процессов, сопровождающих охлаждение живых систем и ведущих к необратимым повреждениям. Причин, вызывающих повреждения при охлаждении и замерзании, много. Большое значение имеет скорость охлаждения и отогревания. При медленном охлаждении сначала переходит в лёд вода окружающей клетку жидкости. Это приводит к потере клеткой воды, нарушению солевого равновесия между вне- и внутриклеточной жидкостью, повышению концентрации электролитов в клетке. Некоторые клетки вследствие этого погибают. Для того чтобы сохранить живыми клетки растений и некоторые ткани животных, требуется очень медленное охлаждение, при котором не происходит резкого изменения концентрации веществ в клетке. Для

неадаптированных к холоду клеток особенно опасно обезвоживание, т. к. возникают контакты внутриклеточных компонентов, которые при нормальных условиях разобщены; при этом происходят разрывы одних межмолекулярных связей и образование других, повреждения клеточных мембран и т. д. Подобные явления могут возникать и в случае образования кристаллов льда внутри клетки. Последние образуются обычно при быстром охлаждении (свыше 10 градусов в 1 мин). После окончания процесса охлаждения, при температурах выше -120°C , начинается рост кристаллов (перекристаллизация, рекристаллизация). Увеличение их размеров особенно значительно при отогревании. Считают, что во время отогревания и оттаивания происходят основные повреждения в клетках. Как правило, при образовании внутри клетки кристаллов льда она погибает; однако клетки некоторых закалённых насекомых и злокачественных опухолей переносят внутриклеточную кристаллизацию воды (рис. 44).



Рис. 44 Механизмы повреждения клетки при охлаждении

При сверхбыстром охлаждении со скоростью нескольких сот градусов в 1 сек большая часть воды превращается в аморфный лёд, структура которого мало отличается от структуры воды. Благодаря этому клетки не повреждаются и выживают независимо от своего происхождения. Но после сверхбыстрого глубокого охлаждения клетки сохраняют

жизнеспособность лишь при очень быстром отогревании (за 3—10 сек), при котором можно избежать рекристаллизации. На практике этот метод сохранения клеток почти не применим ввиду невозможности сверхбыстрого охлаждения и отогревания более или менее крупных объектов.

Для сохранения живых систем в условиях низких температур применяют защитные вещества — криопротекторы. Среди них наиболее известны глицерин, диметилсульфоксид, сахара, гликоли, которые способны проникать в клетку, и некоторые полимерные соединения (поливинилпирролидон, полиэтиленоксид и др.), не проникающие в неё. Криопротекторы ослабляют эффект кристаллизации, изменяя её характер, препятствуют слипанию и денатурации макромолекул, способствуют сохранению целостности мембран клеток (табл. 10).

Таблица 10

Механизм действия криопротектора

Наименование криопротектора	Механизм действия.
Пролин	Связывания воды в клетке
Аспарагин	
γ-аминомасляная кислота	
2-6% маннит или сорбит	Уменьшение размера вакуолей в растительных клетках.
Диметилсульфоксид (ДМСО) 2,5 - 10%	Увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны

Криопротекторы получили широкое применение в медицине и животноводстве для длительного хранения при низких температурах крови, тканей, органов, а также спермы домашних животных, используемой для искусственного осеменения.

2.11 Криоконсервация животных и растительных клеточных культур

При культивировании клеточных линий перед исследователями довольно часто возникает задача сохранения клеток в течение длительного времени. При долгом культивировании клеточной линии в клетках возникают разнообразные мутации, которые приводят в, конечном итоге, либо к гибели клеток, либо их превращению в злокачественные. При этом теряются характерные для клеток биохимические свойства,

способность к продукции вторичных метаболитов и т. д. При исследовании совокупности морфофизиологических и биохимических особенностей клеток также необходимы стандартные клеточные линии. В связи с этими проблемами становится особенно важным метод криосохранения клеточных линий. **Криосохранение** - замораживание биологического материала при сверхнизких температурах. Обычно его проводят в жидком азоте, при температуре -196°C . Успех криосохранения зависит от множества факторов:

1. Типа замораживаемых клеток
2. Особенности биохимического метаболизма клеток.
3. Составы среды при культивировании клеток и криоконсервации.
4. Вида клеточной культуры: суспензионная или монослойная.
5. Качества, концентрации и вида криопротектора.
6. Особенности охлаждения.
7. Режима хранения клеток.
8. Способа и скорости оттаивания замороженной клеточной культуры.

Основные принципы криоконсервации, хранения и размораживания:

1. Криоконсервированию подвергают клетки, находящиеся в виде суспензии, в концентрации $10^5 - 10^6$ клеток / 1 мл.
2. Клетки для замораживания отбирают в середине экспоненциальной фазы ростовой кривой, так как клетки в стационарной фазе менее устойчивы к повреждающему действию криоконсервации.
3. Процесс замораживания животных клеток отличается от процесса заморозки растительных клеток. Так в случае растительных клеток применяется предварительное культивирование в специальных условиях, с добавлением различных добавок (криопротекторов).
4. В обязательном порядке применяются криопротекторы.
5. Процесс замораживания культуры клеток осуществляется по определённой программе. В результате замораживания возникают две противоречивые проблемы: с одной стороны медленное замораживание приводит к образованию внеклеточного льда и, как результат, к обезвоживанию и гибели клетки, с другой стороны, быстрая заморозка приводит к образованию кристаллов льда внутри клетки и к массивному повреждению внутриклеточных структур. Как правило, замораживание проводят в два этапа: на первом этапе производят охлаждение от

- + 37⁰ С до – 28⁰ С со $v = 1^0$ С/мин, затем производят погружение в жидкий азот – 196 С (мгновенная заморозка).
6. При температуре жидкого азота (– 196⁰ С) клетки можно хранить в течение ряда лет без существенной потери жизнеспособности.
 7. При размораживании следуют принципу как можно более быстрой разморозки клеточной культуры при температуре +37⁰ С в культуральной среде для роста.

ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛЬНЫХ ВОПРОСОВ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Клеточные технологии и генетическое разнообразие.
2. Научные задачи и роль клеточной инженерии в практической деятельности человека.
3. Социальные, этические и научные проблемы, порождаемые клеточными технологиями микроорганизмов, растений, животных и человека.
4. История и перспективы развития клеточных биотехнологий.
5. Логика становления клеточных технологий как неотъемлемой части современной биотехнологии. Экономические, коммерческие и правовые аспекты развития клеточных биотехнологий. Клеточные технологии и рынок.
6. Перспективы развития клеточной инженерии для теории и практического применения.
7. Роль тотипотентности половых и соматических клеток.
8. Гибридизация соматических клеток как основа клеточной инженерии. Возможности и ограничения метода гибридизации клеток.
9. Моноклональные антитела. Применение. Преимущества и недостатки.
10. Гибридомы (история открытия, способы получения и культивирования).
11. Особенности культивирования клеток высших организмов применительно к гибридным и реконструированным клеткам.
12. Специфика, преимущества, возможности и проблемы клеточной инженерии растений по сравнению с инженерией животных клеток.
13. Эмбриоинженерия домашних животных. Биотехнологии на основе трансплантации эмбрионов. Научные, этические и экономические проблемы эмбриоинженерии.
14. Преждевременная конденсация хромосом и ее практическое использование. Элиминация и сегрегация хромосом в клеточных гибридах.
15. Клонирование высших организмов. Технологии и биоэтика.

16. Тотипотентность соматических и половых клеток и ее значение для получения гибридных организмов.
17. Сомаклональные варианты и клеточная селекция.
18. Морфогенные культуры клеток и регенерация растений.
19. Соматический эмбриогенез, регенерация растений и их использование.
20. Органогенез растений *in vitro*.
21. Андроклиния и ее использование в практической селекции растений.
22. Культуры микроспор и пыльников.
23. Парасексуальное и половое скрещивание с использованием изолированных клеток.
24. Культуры клеток высших организмов и их использование.
25. Специфическая терминология клеточной инженерии. Типы гибридных клеток. Понятие о гетерокарионах, дикарионах, синкарионах.
26. Гибридные и реконструированные клетки.
27. Получение клеточных фрагментов (цитопластов, кариопластов, капель цитоплазмы и др.) и особенности их использования в клеточной инженерии. Энуклеация клеток. Особенности строения клеточных гибридов.
28. Пересадка (трансплантация) ядер и других органелл. Дедифференцирующий эффект цитоплазмы.
29. Биотехнологии на основе изолированных протопластов. Выделение, культивирование и использование протопластов. Способы фракционирования клеток и протопластов.
30. Методы селекции парасексуальных гибридов (механическая изоляция, инактивация биохимическими ядами и облучением, физиологическая комплементация, генетическая комплементация).
31. Методы генетической трансформации растений с использованием клеточных технологий.
32. Трансгенные организмы и способы их создания.
33. Теоретические и технологические предпосылки конструирования и использования искусственных аналогов клеток.
34. Клеточные технологии и клеточная селекция.
35. Явление соматической изменчивости и его использование в практике.
36. Сохранение генофонда организмов (коллекции и генные банки). Банки зародышевой плазмы и проблема сохранения биоразнообразия.

37. Кробиология как наука. Крбоконсервация клеток и тканей. Крбоконсервация организма. Крбоника. Крбоника и биоэтика. Крбоника и религия. Крбоника и наука.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Тест рубежного контроля к главе 1			
Тест содержит задания, на выполнение которых отводится 20 минут. Выберите один или несколько правильных, по вашему мнению, вариантов ответа и отметьте их любым значком в бланке ответов.			
1. Основным объектом клеточной инженерии является:			
1	Органная культура	3	Клеточная культура
2	Микробная культура	4	Растительная культура
2. Клеточная инженерия основана на:			
1	скрещивании растений	3	культивировании клеток вне организма
2	отборе растений и животных	4	синтезе генов и внедрении их в клеточные культуры.
3. Первые эксперименты, показавшие, что животные ткани возможно некоторое время культивировать в физиологическом растворе <i>in vitro</i> провел:			
1	У. Ру (Роукс)	3	К. Бернард
2	Р. Харрисон	4	Г. Келер
4. Для клеточной культуры характерно:			
1	Контроль жинамических свойств.	3	Характерная гистиотипическая структура.
2	Состояние биохимических процессов в клеточной культуре максимально приближено к условиям <i>in vivo</i> .	4	Отсутствие структурной организации.
5. Концепция "Предела Хейфлика" и разработка теории феномена старения была осуществлена в:			
1	1955 год	3	1937 год
2	1961 год	4	1968 год
6. Образованию постоянной клеточной культуры соответствуют следующие морфофизиологические особенности клеток:			
1	Увеличение гетероплоидности и анеуплоидности	3	Уменьшение эффективности клонирования.
2	Увеличение времени удвоения клеток.	4	Увеличение зависимости от субстрата.

7. Переход клеточной культуры в стационарную фазу связан с:			
1	нарушением цитокинеза.	3	истощением питательных веществ.
2	вирусной инфекцией.	4	укорочением теломер.
8. Одной из причин контактного торможения роста клеток в клеточной культуре является:			
1	накопление в питательной среде продуктов метаболизма клеток.	3	образование фибронектина на клеточной поверхности.
2	увеличение доли клеточной поверхности обращённой к среде	4	уменьшение продукции SP-белка (клеточного поверхностного белка)
9. Трансформация клеток это:			
1	Слияние соседних клеток, находящихся в клеточной культуре.	3	Обратимое изменение ростовых и морфологических свойств клеток.
2	Необратимое изменение ростовых и морфологических свойств клеток.	4	Адаптация клеток находящихся в культуре к факторам окружающей среды.
10. Для суспензионной культуры клеток характерно:			
1	Прекращение пролиферации клеток, вследствие истощения среды.	3	высокая плотность клеток на единице площади пространства.
2	расположение клеток в виде взвеси в ростовой среде.	4	скачкообразное изменение клеточного метаболизма, вследствие периодической замены среды.
11. Основной процесс, происходящий во время интерфазы:			
1	синтез РНК	3	увеличение числа органоидов клетки: рибосом, ЭПС, митохондрий
2	синтез белка	4	удвоение ДНК
12. Стволовым клеткам свойственна:			
1	Анеуплоидность	3	Дедифференциация
2	Тотипотентность	4	Хоуминг
13. Впервые методику получения гибридом разработали:			
1	Биб и Эвинг	3	Симмс и Стидлман
2	Кохлер и Милштейн	4	Хейфлик и Мурхед

14. Одной из наиболее часто используемых селективных систем, для создания гибридом является:			
1	ГАТ-среда	3	Среда МакКоя
2	Среда Игла	4	Среда Дульбекко
15. Для первого этапа слияния клеток характерно:			
1	высвобождение гликопротеидов	3	слияние мембран
2	сближение клеток	4	образование липидных мицелл
16. Примером спонтанного слияния клеток не является			
1	плазмогамия у грибов	3	слияние опухолевых клеток
2	слияние миоцитов	4	образование зиготы
17. Воздух над питательной средой при культивировании фрагментов органов и тканей:			
1	близок к атмосферному воздуху	3	содержит 20% углекислого газа
2	содержит 10% CO ₂	4	насыщен кислородом
18. Остановка деления нормальных клеток после образования монослоя объясняется:			
1	конкуренцией за факторы роста и питательные вещества	3	контактным торможением
2	формой клеток	4	организацией цитоскелета
19. Культивирование органов на столике из металлической сетки предложил:			
1	Леб	3	Спратт
2	Троувелл	4	Чен
20. Чувствительность индикации биоорганических соединений с помощью МКА составляет в г/литр:			
1	10-3	3	10-6
2	10-18	4	10-12
21. Химерность у растений проявляется фенотипически при мутациях:			
1	ДНК митохондрий	3	ДНК пластид
2	ДНК ядер	4	РНК
22. Достоинством фетальной сыворотки является			
1	содержание большого количества не установленных биомолекул	3	простота получения
2	вариабельность состава	4	недостаток специфичных ростовых факторов

23. Постоянное поступление свежей питательной среды с одновременным удалением равного –объема среды с клетками характерно для культуры:			
1	прерывистой	3	проточной
2	постоянной	4	перфузионной
24. Культивирование органов на агаровом сгустке впервые предложил:			
1	Леб	3	Спратт
2	Троувелл	4	Чен
25. Для индукции слияния клеток не используют:			
1	глицин	3	лектины
2	вирус Сендай	4	лизолецитин
26. При выделении протопластов из суспензионных культур оптимальна стадия роста :			
1	стационарная	3	латентная
2	деградации клеток	4	поздняя логарифмическая
27. Суспензионные культуры характеризуются:			
1	высокой агрегированностью	3	одиночными клетками
2	образованием групп из 5-10 клеток	4	
28. Более устойчивы к повреждающему действию низкотемпературной консервации клетки в стадии роста:			
1	латентной	3	экспоненциальной
2	стационарной	4	терминальной
29. Для уменьшения размера вакуолей в среду предкультивирования перед замораживанием добавляют.			
1	маннит	3	диметилсульфоксид
2	аминокислоты	4	глицерин
30. Для увеличения проницаемости мембран перед замораживанием в среду добавляют :			
1	маннит	3	диметилсульфоксид
2	аминокислоты	4	глицерин
31. К гормональным ингибиторам роста относится:			
1	сорбит	3	полиэтиленгликоль
2	хлорхолинхлорид	4	колхицин
32. Цитопласт это:			
1	Клетка, лишённая митохондрий.	3	Безъядерная клетка

2	Клетка, лишённая плазматической мембраны	4	Клетка с ядром, окружённая тонкой оболочкой.
Тест рубежного контроля к главе 2			
Тест содержит задания, на выполнение которых отводится 20 минут. Выберите один или несколько правильных, по вашему мнению, вариантов ответа и отметьте их любым значком в бланке ответов.			
1. Протопласты растительных клеток энзиматическим путем впервые выделил:			
1	Сэлтон	3	Клеркер
2	Коккинг	4	
2. При механическом выделении протопластов клетки погружают в			
1	плазмолитик	3	воду
2	фермент	4	
3. Для разрушения клеточной стенки растений используют фермент			
1	пектиназу	3	гиалуронидазу
2	лецитиназу	4	целлюлазу
4. После фильтрации инкубационной смеси на фильтре остаются			
1	протопласты	3	клеточные осколки
2	кусочки растительной ткани	4	
5. Для индукции слияния растительных клеток не используют			
1	лизолецитин	3	ПЭГ
2	моноолеат глицерина	4	вирус Сендай
6. При физическом методе слияния протопластов действующей силой служит			
1	полиэтиленгликоль	3	переменное электрополе
2	постоянное электрополе	4	
7. При выделении протопластов из суспензионных культур оптимальна стадия роста			
1	деградации клеток	3	стационарная
2	латентная	4	поздняя логарифмическая
8. При косвенной регенерации в культуре пыльников образуется:			
1		3	
2		4	каллус
9. Для растительных клеток оптимальна рН среды культивирования			
1	3,0-5,0	3	6,5-7,0
2	5,0-5,5	4	9,0-10,0

10. Впервые успешное культивирование растительных тканей на синтетических питательных средах осуществили			
1	Хеллер и Нич	3	Роббинс и Котте
2	Мурасиге	4	Уайт и Готье
11. Для создания кормящего слоя используют:			
1	суспензию клеток	3	богатую питательную среду
2	каллусную ткань	4	сыворотку
12. Пионером метода клонального микроразмножения является:			
1	Матес	3	Морель
2	Уэбстер	4	Мосбах
13. Причиной гибели первичного экспланта обычно является накопление в тканях:			
1	ауксинов	3	цитокенинов
2	фенолов	4	углеводов
14. Снять апикальное доминирование можно добавляя в питательную среду:			
1	ауксины	3	абсцизовую кислоту
2	цитокенины	4	гиббереллины
15. Гаплоидные растения:			
1	фертильны	2	стерильны
16. Нормальные клетки растений от опухолевых морфологически:			
1	отличаются	2	неотличаются
17. Каллусная ткань :			
1	гомогенна	2	гетерогенна
18. В качестве экспланта при микроразмножении лучше использовать органы, содержащие:			
1	паренхиму	3	продящие пучки
2	меристему	4	паренхиму с проводящими пучками
19. Для вегетативного размножения больше пригодны растения в фазе развития:			
1	ювенильной	2	сенильной
20. Нормальные клетки растений от опухолевых морфологически:			
1	отличаются	2	не отличаются
21. Протопластом является клетка:			
1	лишённая клеточной оболочки	3	лишённая ядра
2	лишённая цитоплазматической мембраны	4	лишённая ядерной мембраны

22. Первая удачная попытка иммобилизации клеток была осуществлена:			
1	Ван Вецелем	3	Мосбахом
2	Сан Наумой	4	Мурасиге
23. При косвенной регенерации в культуре пыльников образуется:			
1	каллус	2	эмбриониды
24. Детерминация это:			
1	Способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.	3	Превращение эмбриональной клетки в специализированную.
2	Приобретение клеткой состояния готовности к реализации определённых наследственных свойств.	4	Способность клетки к неорганизованной пролиферации.
25. Время генерации растительной клетки:			
1	в 60-100 раз превосходит время генерации микробной клетки	2	в 60-100 раз меньше времени генерации микробной клетки
26. Гаплоид получают:			
1	отдалённой гибридизацией	2	с помощью близкородственного скрещивания
27. Протопласты растительных клеток энзиматическим путем впервые выделил:			
1	Сэлтон	3	Клеркер
2	Коккинг	4	Готре
28. В культуре пыльцы появление диплоидных растений:			
1	возможно	2	невозможно
29. Нормальные клетки в культуре к органогенезу:			
1	способны	2	не способны
30. Методом клонального размножения не является метод:			
1	снятия апикального доминирования	3	соматического эмбриогенеза
2	индукции возникновения адвентивных почек	4	прямой регенерации соматического зародыша

ПЕРЕЧЕНЬ ЗАДАНИЙ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Культивирование животных клеток Алексисом Каррелем.
2. Классические опыты Хейфлика и Мурхеда. «Предел Хейфлика» и «феномен старения».
3. Культура клеток человека.
4. Органная культура.
5. Химеры. Методы создания химер.
6. Гибридная технология.
7. Методы получения моноклональных антител.
8. Клонирование животных. Клонирование млекопитающих.
9. Биоэтические проблемы, связанные с клонированием.
10. Каллусная культура.
11. Культура отдельных клеток.
12. Суспензионная культура.
13. Культуры гаплоидных клеток.
14. Использование культуры растительных клеток, как источника вторичных метаболитов.
15. Протопласты. Получение. Слияние. Использование.
16. Конструирование растительных клеток.
17. Ассоциаты клеточных культур растений с различными микроорганизмами.
18. Криоконсервация клеточных культур. Проблемы и задачи криобиологии. Спорность крионики.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ЗАЧЁТУ ПО СПЕЦИАЛЬНОМУ КУРСУ.

1. Исторические этапы клеточной инженерии по культивированию животных клеток.
2. Классические опыты Хейфлика и Мурхеда по выделению линии диплоидных клеток человека WI-38. «Предел Хейфлика» и «феномен старения» на линии WI-38.
3. Особенности культуры животных клеток. Гетерогенность клеточной популяции.
4. Характеристика первичных культур животных клеток. Пассивирование. Трансформация в постоянную клеточную линию.

5. Взаимодействие клеток друг с другом в культуре животных клеток. Скорость деления клеток. «Социальный контроль» плотности популяции.
6. Трансформация клеток животной культуры. Причины трансформации.
7. Питательные среды и условия культивирования животных клеток.
8. Непротоchnая культура животных клеток. Способы увеличения продолжительности жизни непротоchnых культур.
9. Монослойные культуры. Преимущества и недостатки монослойных культур.
10. Культура клеток человека. Особенности культуры клеток человека.
11. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных.
12. Органная культура. Особенности органной культуры. Методы органной культуры.
13. Гибридизация животных клеток.
14. Химеры. Методы создания химер.
15. Моноклональные антитела. Функциональная структура, получение, использование.
16. Дифференцировка клеток и репрессия генома. Закономерность связи специализации клетки и её тотипотентности.
17. Клонирование животных. Технология клонирования. Пересадки ядер млекопитающих.
18. Методы трансплантации ядер млекопитающих. Цитопласты и карิโอпласты.
19. Регулирование воспроизводства сельскохозяйственных животных.
20. Исторические этапы клеточной инженерии по культивированию растительных клеток.
21. Сферы применения культур растительных клеток. Специфические особенности популяции клеток растительной культуры.
22. Культуры соматических клеток растений. Требования растительных клеток к условиям культивирования.
23. Каллус. Основные функции выполняемые каллусной тканью. Ауксины и образование каллусной ткани. Этапы образования каллусной ткани, дедифференцировка тканей экспланта.
24. Фитогормоны. Нормальные и опухолевые растительные клетки. Морфологические особенности опухолевых растительных клеток. Тератома.
25. Суспензионная и каллусная растительная клеточная культура. Виды каллусных тканей. Особенности культивирования каллусных тканей.
26. Дифференциация клеток растения. Различная экспрессия генов - основа клеточной дифференциации. Детерминация клетки. Обратимость дифференциации растительных клеток в клеточных культурах.

27. Суспензионная культура растительной ткани. Суспензионная культура как модельная система. Степень дезагрегации. Морфологическая выравненность клеток.
28. Открытые, проточные культуры растительных клеток. Закрытое глубинное культивирование. Особенности роста суспензионных культур. Периодическое культивирование.
29. Культивирование отдельных растительных клеток. Этапы выращивания отдельных клеток. метод «ткани – няньки по Мьюиру, Хильденбранту и Райкеру. Метод «кормящего слоя».
30. Культуры гаплоидных клеток. Способы получения гаплоидов. Дигаплоиды, их получение. Преимущества гаплоидов.
31. Методы индуцирования гаплоидов. Индуцированный андрогенез в культуре пыльников и пыльцы. Селективная элиминация хромосом в гибридном зародыше. Псевдогамия. Эмбриоид.
32. Культура растительных тканей как источник вторичных метаболитов. Методы иммобилизации растительных клеток. Генетический и эпигенетический уровни контроля вторичного метаболизма.
33. Системы культивирования иммобилизованных клеток.
34. Протопласты как уникальная модель для изучения фундаментальных физиологических проблем у растений. Способы получения и культивирования протопластов.
35. Способы слияния протопластов. Конструирование растительных клеток.
36. Клеточная селекция.
37. Клональное микроразмножение растений.
38. Ассоциации клеточной культуры высшего растения с микроорганизмом.
39. Способы сохранения клеточных культур: криоконсервация, лиофильное высушивание, замедление роста. Предкультивирование растительных культур в различных условиях.
40. Криоконсервация клеточных культур. Криопротекторы. Программы охлаждения. Принципы размораживания клеток.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ СПЕЦКУРСА

Основная литература:

1. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни; пер. 5-го англ. Изд.- М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.- 691 с: ил., [24] с. цв. вкл.
2. Артамонов В.И. Биотехнология - агропромышленному комплексу. М.: Наука, 1989. 160 с.
3. Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. 334 с.
4. Биотехнология. / Под ред. А.А. Баева. М.: Наука, 1984. 309 с.
5. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С.241 - 244.
6. **Бутенко Р.Г. и др. Клеточная инженерия. - М.: Высшая школа, 1987.**
7. Валиханова Г. Ж. Биотехнология растений. Алматы: Конжык, 1996. 272 с.
8. Валиханова Г.Ж., Рахимбаев И.Р. Культура клеток и биотехнология растений. Учебное пособие. Алма-Ата: изд. КазГУ, 1989. 80 с.
9. **Герасименко В.Г. Биотехнология. Киев: Выща школа, 1989. 343 с.**
10. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М.: Мир, 2002. 589 с.
11. Какпаков В.Т. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 241 - 250.
12. **Кефели В.И., Дмитриева Г.А. Биотехнология: курс лекций. Пушино, 1989. 96 с.**
13. Кузьмина Н. А. Основы биотехнологии / Учебное пособие для студентов биологического факультета: Издание Омского педагогического университета, 2005.
14. Методы клеточной биотехнологии растений. Киев, 1987. 53 с.
15. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.: Под ред. В. С. Шевелухи. М.: Высш. школа, 1998. 416 с.
16. **Спир Р.Е., Адамс Г.Д., Гриффитс Дж.Б. и др. Биотехнология клеток животных. М.: Агропромиздат, 1989. Т. 1, 2.**
17. **Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. М.: Мир, 1989. 318 с.**

Дополнительная литература:

1. Артамонов В.И. Сельские профессии биотехнологии. М.: Изд-во МСХА, 1992. 127 с.

2. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 1. М.: Мир, 1994.
3. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИЦ и Г СО РАН, 1993. 241 с.
4. Блинов А.Г. Бесклеточные белоксинтезирующие системы. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии. Новосибирск: Наука, 1990. С. 80 - 86.
5. Борнман Х. Реконструкция клеток растений: Brassica в качестве объекта изучения. // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 85 - 95.
6. Бутенко Р. Г. Изолированные протопласты растений - объект и модель для физиологических исследований. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 69 - 84.
7. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3 - 20.
8. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
9. Высоцкий В. А. Клональное микроразмножение растений. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 91 - 102.
10. Глеба Ю. Ю. Гибридизация соматических клеток растений. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 85 - 91.
11. Глеба Ю. Ю., Зубко М.К. Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений // Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. М., 1988. Т. 9. С. 3 - 72.
12. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. Киев: Наук. думка, 1982. 104с.
13. Дмитриева Н. Н. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С.113-123.
14. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. Киев: Науковадумка, 1980. 488 с.
15. Катаева Н. В., Аветисов В. А. Клональное размножение в культуре ткани. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С.137-149.
16. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.

17. Корженевская Т. Г., Бутенко Р.Г., Гусев М.В. Ассоциации цианобактерий с культивируемыми клетками и тканями высших растений. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 225 - 242.
18. Кучко А. А. Гибридизация соматических клеток растений методом слияния изолированных протопластов. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 144 - 159.
19. Мамаева С. Е. Хромосомный анализ культивируемых клеток. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 78-98.
20. Методы молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии растений. Алма-Ата: Наука, 1988. 168 с.
21. Новак Ф. Й. Индукция гаплоидов в культуре тканей и их значение в селекции растений. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 171 - 195.
22. Носов А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений. // Биология культивируемых клеток и биотехнология. М.: Наука, 1991. С. 5 - 19.
23. Попов А. С. Криоконсервация клеток растений. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 70 - 77.
24. Родин А. Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. Учебное пособие. М.: МГУЛ, 1993. 90 с.
25. Смоленская И. Н., Носов А.В. Методы получения и культивирования протопластов. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 164 - 175.
26. Урманцева В. В. Культивирование каллусных тканей на твердых средах. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 232 - 241.
27. Цуцаева А. А., Петренко Т.Ф. Криоконсервация культивируемых клеток животных. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 63 - 69.
28. Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990. Т.2. 463 с.
29. Гринберг К. Н., Кухаренко В. И., Ляшко В. Н., Терехов С. М., Пичугина Е. М., Фрейдин М. И., Чериков В.Г. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 251 - 260.
30. Завертляев Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Л.: Агропромиздат, 1989. 255 с.
31. Какпаков В. Т. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 241 - 250.

32. Конюхов Б. В. Долли – случайность или закономерность? // Человек. 1998. № 3
33. Крыжанов М. А., Залесских А. Ф., Троицкая М. В., Соловьев В. В., Тихомиров А. И. Культивирование клеточной линии НЕР-2 на микроносителях с целью получения вируса полиомиелита. // Биотехнология и генетика. Н.Новгород, 1991. С. 87 – 92.
34. Прудовский И. А., Сухарев С.И. Гибридизация клеток животных. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 176 – 193
35. Рингертц Н., Сэвидж Р. Гибридные клетки. М.: Мир, 1979. 412 с.
36. Тартаковский А. Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 44 - 63.
37. Фридлянская И. И. Получение моноклональных антител (гибридомная технология). // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 194 - 205.
38. Цуцаева А. А., Петренко Т.Ф. Криоконсервация культивируемых клеток животных. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 63 - 69.

ГЛОССАРИЙ

Аллель (Allele) Одна из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм гена.

Антибиотик (Antibiotic) Вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и оказывающее ингибирующее действие на другие микроорганизмы, и раковые клетки.

Антиген (Antigen) Вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ — выработку антител.

Антисыворотка (Antiserum) Жидкая составляющая крови, содержащая антитела.

Антитело (Antibody) Белок (иммуноглобулин), синтезируемый В-лимфоцитами в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующий.

Аутологичные клетки (Autologous cells) Клетки, взятые от данного организма, культивированные, возможно, генетически измененные и вновь введенные в организм-донор.

Аутосома (Autosome) Любая хромосома, не являющаяся половой. В соматических клетках человека присутствуют 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом

Аутосомное наследование (Autosomal inheritance) Не сцепленное с полом наследование какого-либо признака.

Arabidopsis thaliana Растение с очень небольшим геномом, использующееся в качестве модельной системы для изучения процессов роста и развития.

Бактериоцин (Bacteriocin) Вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и убивающее клетки другого микроорганизма.

Бинарное деление (Binary fission) Прямое, не связанное с половым процессом деление прокариотической клетки на примерно одинаковые по размерам дочерние клетки.

Биоконтроль (Biocontrol) Процесс, в котором используются живые организмы для ограничения роста и развития патогенных микроорганизмов.

Биомасса (Biomass) Клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов.

Биореактор, ферментер (Bioreactor) Устройство, в котором протекают биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов. Часто этот термин относится к сосуду, в котором растут микроорганизмы.

Время генерации клетки — интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Время удвоения популяции — интервал времени, за который число клеток в популяциях увеличивается вдвое.

Вторичный метаболит (Secondary metabolite) Вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от тех или иных воздействий).

Гамета (Gamete) Репродуктивная гаплоидная клетка многоклеточного организма.

Гаплоидный (Haploid) Термин, характеризующий организм (клетку), у которого имеется один набор хромосом.

Гаплотип (Haplotype) Комбинация аллелей на одной хромосоме диплоидного организма.

Ген (Gene) Транскрибируемый участок хромосомы, кодирующий функциональный белок либо тРНК или рРНК.

Генетический полиморфизм (Genetic polymorphism) Наличие двух или более аллельных форм отдельных генов.

Геном (Genome) Совокупность генов гаплоидного набора хромосом данного организма.

Гетерозигота (Heterozygote) Организм, в геноме которого имеются одна или несколько пар различающихся аллелей.

Гибридный белок, химерный белок (Fusion protein) Продукт клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей из разных генов. Представляет собой одну полипептидную цепь.

Гибридома (Hybridoma) Гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.

Гомозигота по доминантному гену (Homozygous dominant) Организм, у которого оба аллеля данного локуса доминантны.

Гомозигота по рецессивному гену (Homozygous recessive)

Организм, у которого оба аллеля данного локуса рецессивны.

Гомозиготность (Homozygosis) Наличие идентичных аллелей в одном или нескольких локусах. Клетка или организм с такими аллелями называется гомозиготой.

Гомологичные хромосомы (Homologous chromosomes)

Хромосомы, включающие идентичные наборы генов, одинаково расположенных друг относительно друга. Образуются в результате дупликации пар родительских хромосом.

Дедифференциация — переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

Дифференциация — комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Дифференцировка — состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Животное-основатель (Founder animal) Организм, несущий чужеродный ген в клетках зародышевой линии, который при спаривании дает начало чистой линии трансгенных организмов.

Изолированный протопласт — растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Инокулюм (трансплант) — часть суспензионной (калусной) культуры, используемая для пересадки в свежую среду.

В-клетки (B cells) Лимфоциты, продуцирующие антитела и происходящие из клеток костного мозга.

Каллус — ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

Клетки зародышевой линии (Germ line cells) Клетки, постепенно превращающиеся в гаметы (от первичных половых клеток до собственно гамет).

Клеточная селекция — метод выделения мутантных клеток и соматональных вариаций с помощью селективных условий.

Клеточная линия (Cell line) Группа клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов.

Клон (Clone) Популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

Клонирование (Cloning) Совокупность процедур, использующихся для получения клонов. Клонирование многоклеточных организмов, например, включает пересадку ядер соматических клеток в оплодотворенное яйцо с удаленным пронуклеусом.

Культивирование изолированных протопластов — выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок у изолированных протопластов культура превращается в культуру клеток.

Культура клеток (суспензионная культура) — выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Культура (Culture) Популяция клеток или микроорганизмов, выращиваемых в контролируемых условиях *in vitro*.

Культура каллусных тканей — выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов (пыльники, семяпочки и т. д.) растений.

Культура опухолевых тканей — выращивание в длительной культуре сегментов, изолированных из растительных опухолей разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

Культура отдельных клеток — выращивание одиночных клеток при низкой плотности посева: 1) на очень богатых питательных средах, 2) с помощью культуры «няньки» или 3) питающего слоя.

Культура эксплантов — инкубация в стерильных условиях на питательных средах, либо вызывающих, либо не вызывающих пролиферацию сегментов, изолированных из разных органов растений.

Культуральная среда (Culture medium) Твердая или жидкая среда, используемая для выращивания микроорганизмов *in vitro*.

Линия — культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Меристема (Meristematic tissue) Ткань растений, обладающая способностью к активному делению. У молодых растений обычно находится у кончиков корней и побегов.

Метаболизм (Metabolism) Совокупность физических и химических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его существование. Продукты метаболизма называются метаболитами.

Микроинъекция (Microinjection) Введение в изолированную эукариотическую клетку ДНК или других молекул с помощью тонкой иглы.

Мишень (Target) В самом широком смысле — биологический объект (ткань, молекула, клетка, микроорганизм), которая интересует исследователя.

Моноклональные антитела (Monoclonal antibodies) Однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридомами — клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных

антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту. Некоторые миеломные клетки синтезируют моноклональные тела самостоятельно.

Мутант (Mutant) Организм, измененный в результате мутации; как правило, отличается от исходной формы (дикого типа).

Пакующая клеточная линия (Packaging cell line) Клеточная линия, созданная для продуцирования вирусных частиц, не содержащих инфекционной нуклеиновой кислоты.

Первичная культура (Primary culture) Культура клеток или тканей, взятых непосредственно от организма.

Популяция клеток — совокупность культивируемых клеток.

Прокариоты (Procarvotes) Организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и органелл. К прокариотам относятся все бактерии.

Протопласт (Protoplast) Бактериальная, дрожжевая или растительная клетка, стенка которой разрушена ферментативным или химическим путем.

Редифференциация — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Ростовой цикл — рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется S-образной кривой. Фазы ростового цикла: латентная, экспоненциальная, замедления роста, стационарная, деградации.

Селекция (Selection) 1. Наука о методах создания новых сортов культурных растений и пород животных.

Сибсы (Sibses) Прямые потомки одних и тех же родителей (братья и/или сестры).

Скрещивание (Gross, crossing, mating) Однократное скрещивание генетически различающихся организмов.

Скрининг (Screening) Метод (или комплекс методов) идентификации единичного объекта (особи в популяции, клетки с искомыми свойствами, участка нуклеотидной последовательности и т.д.) путем перебора большого числа объектов.

Слияние изолированных протопластов — формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Соматоклональные вариации и варианты — фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органельных геномов растительных клеток. От истинных генных мутаций

отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменение в структуре генов, хромосом, геномов).

Соматическая (парасексуальная) гибридизация — система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению соматических гибридов-растений и гибридных клеточных линий.

Стволовые клетки (Stem cells) Митотически активные стволовые клетки, в результате деления которых происходит замещение погибших клеток в многоклеточном организме.

Субкультивирование — перенос клеток в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Субстрат (Substrate) Вещество, превращение которого катализируется специфическим ферментом.

Тотипотентность - свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т. е. реализовать омнипотентность ядра с образованием целого организма.

Устойчивые клеточные линии (Established cell lines) Культуры клеток, способные к неограниченному росту *in vitro*. Получаются из перевиваемых клеточных культур, часть клеток которых приобретают селективные преимущества и обладают повышенной скоростью роста.

Фенотип (Phenotype) Совокупность всех признаков особи, формирующаяся в процессе взаимодействия ее генотипа и внешней среды.

Фертильность (Fertility) Способность организмов приносить жизнеспособное потомство.

Химера (Chimera) Организм, включающий клетки, ткани и органы разных организмов.

Хромосома (Chromosome) Структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК; носитель генетической информации. Способна к воспроизведению с сохранением структурно-функциональной индивидуальности в ряду поколений. У эукариот находится в ядре клетки, у прокариот — непосредственно в цитоплазме.

Цикл выращивания — период от помещения инокулюма или трансплантата в свежую среду до последующего субкультивирования.

Штамм — культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

Эксплант — фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

Эмбриональные стволовые клетки, ES-клетки (Embryonic stem cells) Клетки из эмбрионов на стадии бластоцисты, способные к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты.

Эукариоты (Eukaryotes) Организмы, у которых: 1) имеется ядро, где содержатся хромосомы; 2) в цитоплазме присутствуют различные органеллы — митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли.