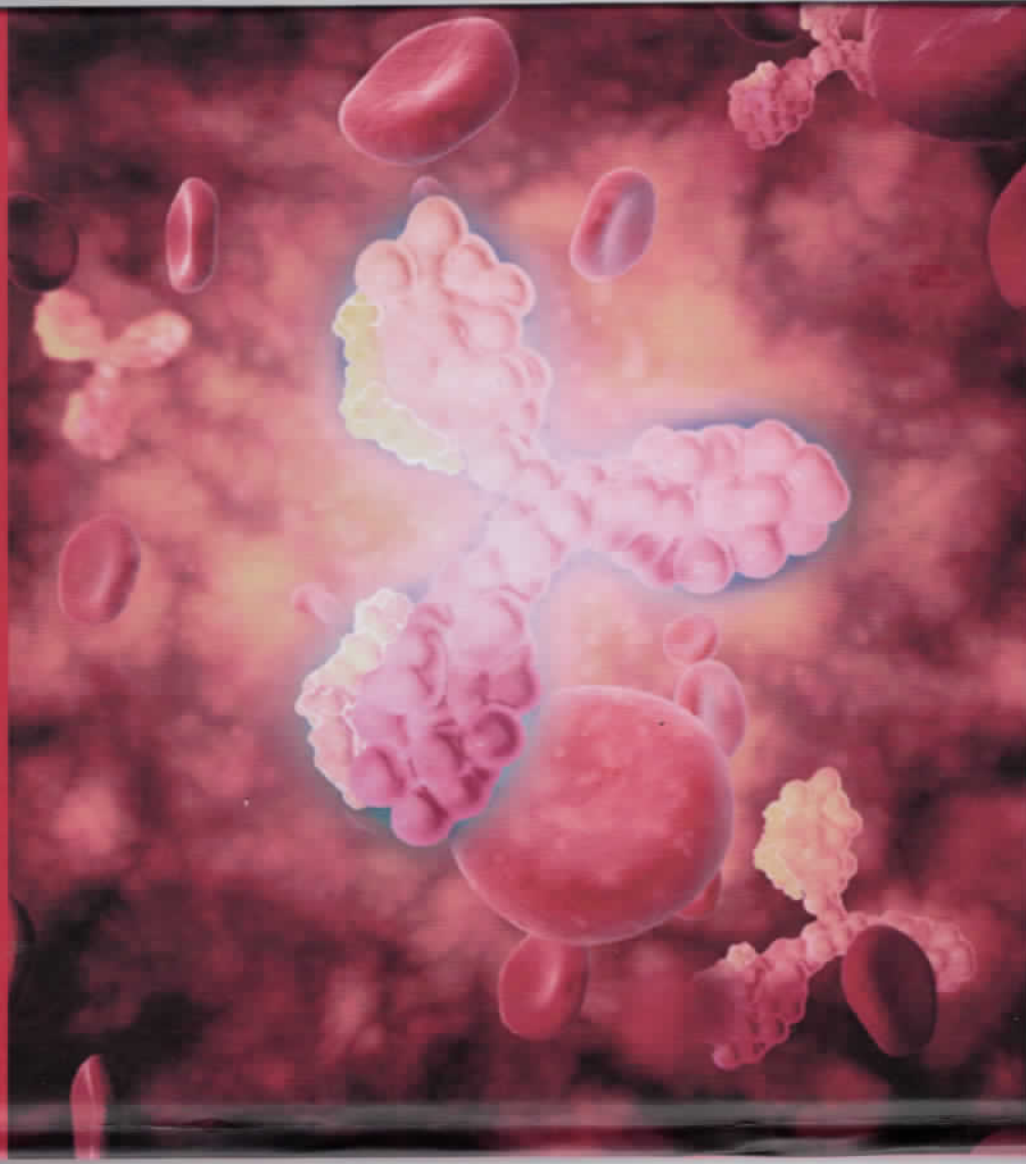


К. Давранов, П. Мирхамидова, Д. Туйяиева, В. Файзиев



Клеточная и генная инженерия



574.21
52-48

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЧИРЧИКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
ИНСТИТУТ ТАШКЕНТСКОЙ ОБЛАСТИ

К.Давранов, П.Мирхамидова, Д.Туйчиева, В.Файзиев

КЛЕТОЧНАЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Учебное пособие к практическим занятиям

(Учебное пособие для магистров естественно-научных
направлений высших учебных заведений)

- 13699/31 -

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA ORTA
MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI CHIRCHIQ DAVLAT
PEDAGOGIKA UNIVERSITETI

AXBOROT RESURS MARKAZI

"HISTORY AND PAGE"
ТАШКЕНТ – 2022

УДК: 577.21(075.8)
ББК: 28.04я73
К 48

ISBN 978-9943-7653-2-0

Давранов К., Мирхамидова П., Туйчиева Д., Файзиев В.
Клеточная и генная инженерия [Текст] : учебное пособие / К. Давранов,
П. Мирхамидова, Д. Туйчиева, В. Файзиев. – Ташкент: History and page, 2022.
–158 с.

Учебное пособие «Клеточная и генная инженерия» подготовлено в соответствии с учебной программой по специальности 5A110409 – Методика преподавания точных и естественных наук. Практические занятия являются дополнением к курсу «Клеточная и генная инженерия». Авторами подробно рассмотрены основные приёмы генной инженерии, каждое занятие содержит задачи (с решениями), вопросы и дополняющие тексты. Предмет охватывает общие проблемы, такие как, ознокомление магистров с понятиями как, методы генной инженерии, биологические активные вещества, трансгенные организмы, структура и функции клетки, генетическая рекомбинация, транслукция, транспозоны, вектор, плазмиды. Пособие является актуальным, предназначено для магистров биологических факультетов педагогических ВУЗов.

Данное учебное пособие рекомендован Министерством высшего образования Республики Узбекистан для студентов высших учебных заведений
(сведетельство №500 от 23 ноября 2021 г.)

© Давранов К., Мирхамидова П., Туйчиева Д., Файзиев В.
© Издательство "History and page", 2022.

Практическое занятие №1.

Тема: Нуклеиновые кислоты.

Роль нуклеиновых кислот в биосинтезе белков

План:

1. Нуклеиновые кислоты и их особенности.
2. Значение нуклеиновых кислот в живых организмах.
3. Химический состав нуклеиновых кислот.
4. Определение нуклеотидного ряда в нуклеиновых кислотах.
5. Биосинтез белков (трансляция) и значение нуклеиновых кислот в биосинтезе.

История исследования

- В 1847 из экстракта мышц быка было выделено вещество, которое получило название «инозиновая кислота». Это соединение стало первым изученным нуклеотидом. В течение последующих десятилетий были установлены детали его химического строения. В частности, было показано, что инозиновая кислота является рибозид-5'-фосфатом, и содержит N-гликозидную связь.
- В 1868 году швейцарским химиком **Фридрихом Мишером** при изучении некоторых биологических субстанций было открыто неизвестное ранее вещество. Вещество содержало фосфор и не разлагалось под действием протеолитических ферментов. Также оно обладало выраженными кислотными свойствами. Вещество было названо «нуклеином». Соединению была приписана брутто-формула $C_{29}H_{49}N_9O_{22}P_3$.
- Уилсон обратил внимание на практическую идентичность химического состава «нуклеина» и открытого незадолго до этого «хроматина» — главного компонента хромосом [1]. Было выдвинуто предположение об особой роли «нуклеина» в передаче наследственной информации.
- В 1889 г **Рихард Альтман** ввел термин «нуклеиновая кислота», а также разработал удобный способ получения нуклеиновых кислот, не содержащих белковых примесей.
- **Левин и Жакоб**, изучая продукты щелочного гидролиза нуклеиновых кислот, выделили их основные составляющие — нуклеотиды и нуклеозиды, а также предложили адекватные структурные формулы, описывающие их свойства.

- В 1921 году Левин выдвинул гипотезу «тетрануклеотидной структуры ДНК» [2], оказавшуюся впоследствии ошибочной.
- В 1935 году Клейн и Танхаузер с помощью фермента фосфатазы провели мягкое фракционирование ДНК, в результате чего были получены в кристаллическом состоянии четыре ДНК-образующих нуклеотида [3]. Это открыло новые возможности для установления структуры этих соединений.
- В 1940-е годы научная группа в Кембридже под руководством **Александера Тодда** проводит широкие синтетические исследования в области химии нуклеотидов и нуклеозидов. В результате их работы были установлены все детали химического строения и стереохимии нуклеотидов. За цикл работ в этой области **Александр Тодд** был награжден Нобелевской премией в области химии в 1957 году [4].
- Чаргаффом** была установлена закономерность содержания в нуклеиновых кислотах нуклеотидов разных типов, получившая впоследствии название **Правило Чаргаффа**.
- В 1953 году **Уотсоном и Криком** установлена вторичная структура ДНК, двойная спираль [5].

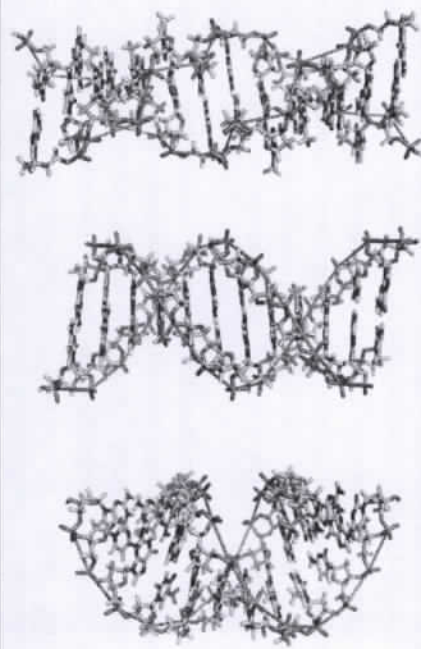


Рисунок 1. Разные формы нуклеиновых кислот. На рисунке (слева направо) представлены А (типична для РНК), В (ДНК) и Z (редкая форма ДНК)

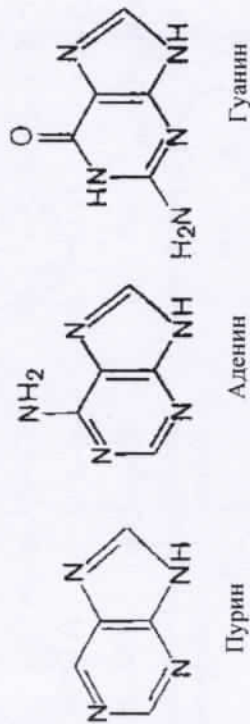
Нуклеиновые кислоты сложные высокомолекулярные соединения, с большой молекулярной массой. Нуклеиновые кислоты играют большую роль в таких жизненноважных процессах, как хранение и передача наследственных признаков и биосинтез белков. Они впервые обнаружены

швейцарским ученым И.Ф. Мишером в 1869 году в многоядерных клетках и поэтому названы (nucleos- ядро) нуклеиновыми кислотами.

Химический состав нуклеиновых кислот состоит из азотистых оснований - пуриновых и пиримидиновых оснований, углеводных компонентов - рибозы и (или) дезоксирибозы, а также фосфорной кислоты [6].

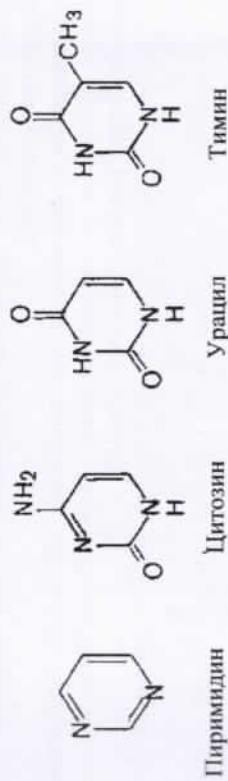
Пуриновые основания

В состав нуклеиновых кислот из пуриновых оснований, входят аденин и гуанин.

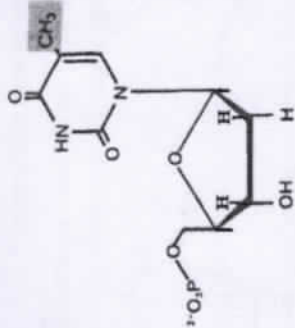


Пиримидиновые основания

Из пиримидиновых оснований в составе нуклеиновых кислот имеются цитозин, урацил и тимин.



Кроме того, в составе нуклеиновых кислот в незначительных количествах встречаются минорные (редко встречающиеся) азотистые основания: 5-метил и 5-оксиметилцитозин, дигидроурацил, псевдоурацил, 1-метилурацил и другие.



Тимидиловая кислота (ТМФ)
Тимидинмонофосфорная кислота

Если к углеводному остатку нуклеозида присоединены 2 или 3 остатка фосфорной кислоты, обычно используют аббревиатуры ДФ (дифосфат) и ТФ (трифосфат). Таким образом, аденозин + трифосфат с тремя фосфатными группами в 5'-положении углевода будет обозначаться АТФ. Структура АТФ, а также соответствующих ди- и монофосфатов изображена на рисунке 4. Эти нуклеотиды за счет макроэргических связей (обладающих большим запасом потенциальной энергии) называют энергетическими соединениями. При гидролизе 1 моля АТФ до АДФ высвобождается около 7 ккал потенциальной энергии.

Нуклеотиды выполняют следующие важные биологические функции:

- считаются источником энергии;
- являются коферментами ряда ферментов;
- участвуют в процессах синтеза; - выполняют регуляторную функцию (и АМФ).

Строение нуклеиновых кислот

Молекулы нуклеиновых кислот состоят из полинуклеотидных цепей, образующиеся в результате полимеризации нуклеотидных остатков.

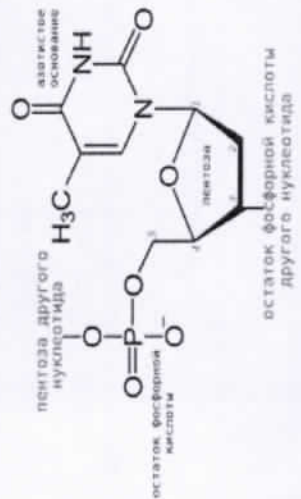


Рисунок 3. Строение нуклеиновых кислот

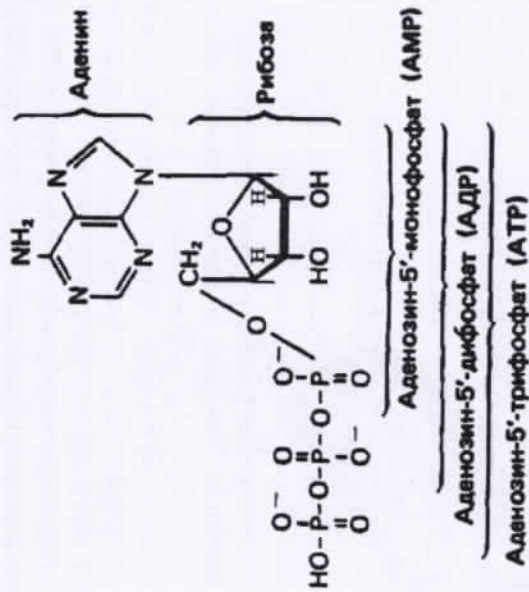


Рисунок 4. Структура АТФ и соответствующих ди- и монофосфатной формы

В зависимости от химического строения, выполняемой функции и локализации в клетке нуклеиновые кислоты делятся на две группы: *рибонуклеиновые кислоты* (РНК) и *дезоксирибонуклеиновые кислоты* (ДНК), они приводятся в следующей таблице:

Состав	ДНК	РНК
Пуриновые основания	Аденин, гуанин	Аденин, гуанин
Пиримидиновые основания	Цитозин, тимин	Цитозин, урацил
Углеводные компоненты	Дезоксирибоза	Рибоза
Неорганическое вещество	Фосфорная кислота	Фосфорная кислота
Локализация в клетке	Ядро	Цитоплазма
Выполняемая функция	Хранение и передача наследственных признаков	Участие в биосинтезе белка

В молекуле нуклеиновых кислот нуклеотиды соединяются друг с другом фосфорэфирной связью. Фосфорная кислота всегда образует связь

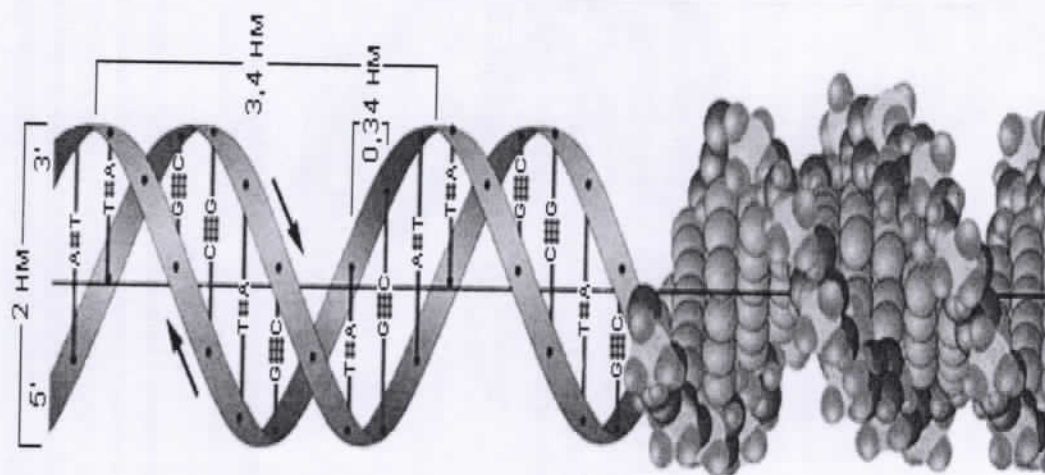


Рисунок 7. Двойная спираль ДНК

Две антипараллельные цепи с комплементарной последовательностью нуклеотидов закручены относительно друг друга в правозакрученную спираль так, что на один виток приходится примерно 10 пар нуклеотидов.

На основании рентгеноструктурных анализов нуклеиновых кислот, полученных М. Уилкинсом и правил Чаргаффа, в 1953 году Д. Уотсон и Ф. Крик предложили модель вторичной структуры ДНК. Согласно этой модели молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей образующих правозакрученную двойную спираль. Каждая из двух спиралей имеет общую ось, диаметр вокруг оси равен 20 Å. Нуклеотидные остатки расположены относительно друг друга, образуя угол равный 36° . Один шаг спирали равен 3,4 нм и содержит 10 пар нуклеотидов. Расстояние между соседними основаниями составляет 0,34 нм.

Пентозофосфатная группа полинуклеотидной цепи расположена снаружи спирали, а азотистые основания – внутри. За счет связей между пентозой и фосфорной кислоты полинуклеотидные цепи ориентированы в противоположные направления (антипараллельные), то есть, если одна спираль направлена от 5' к 3', то вторая от 3' к 5'. Азотистые основания располагаются внутри двойной спирали комплементарно друг другу [2,8].

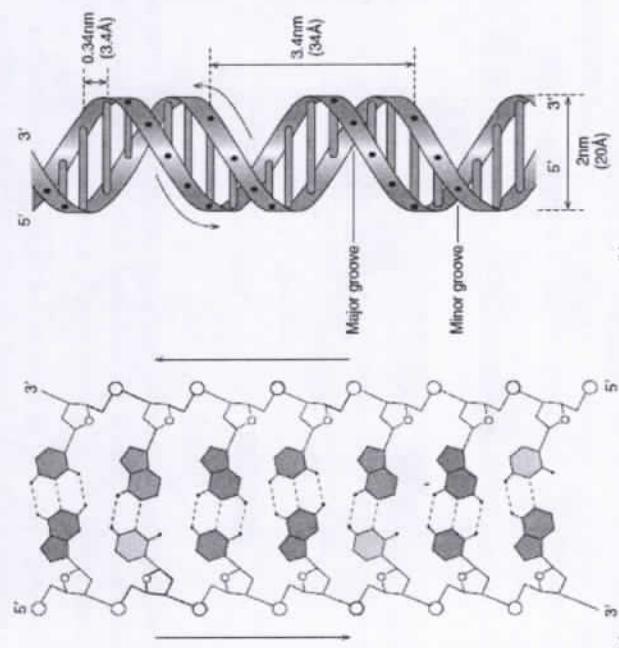


Рисунок 8. Вторичная структура ДНК

Третьичная структура ДНК

Линейная ДНК в клетке имеет форму вытянутой молекулы, она упакована в компактную структуру и занимает всего 1/5 объема клетки. Например, длина ДНК хромосомы человека достигает 8 см, а упакована так, что уменьшается в хромосоме с длиной 5 нм. Подобная укладка возможна только потому, что ДНК имеет спирализованную структуру. Из этого следует, что двухцепочечная спираль ДНК в пространстве может подвергаться дальнейшей укладке в определенную третичную структуру – *суперспираль*, или кольцевую форму [3,5].

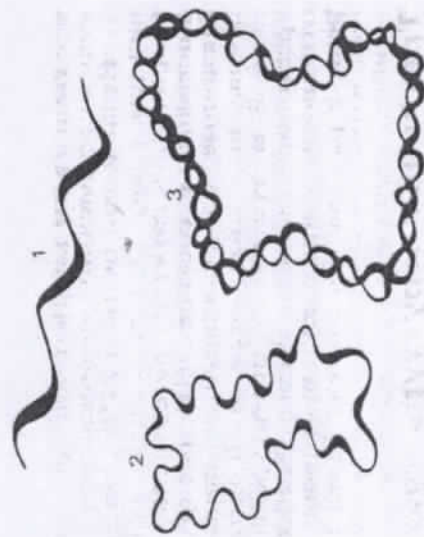


Рисунок 11. Схема третичной структуры ДНК:

1-линейная одноцепочечная ДНК – бактериофаг φX174 и другие вирусы; 2-кольцевая одноцепочечная ДНК вирусов и митохондрий; 3-кольцевая двойная спираль ДНК

Суперспиральная структура характерна для хромосом высших организмов. Такая структура стабилизируется за счет ковалентных связей с остатками аминокислот, входящих в состав тех белков, которые образуют нуклеопротейный комплекс (хроматин). Следовательно, ДНК эукариотических клеток ассоциирована главным образом основным характером – гистонами, а также кислыми белками и фосфопротеинами.

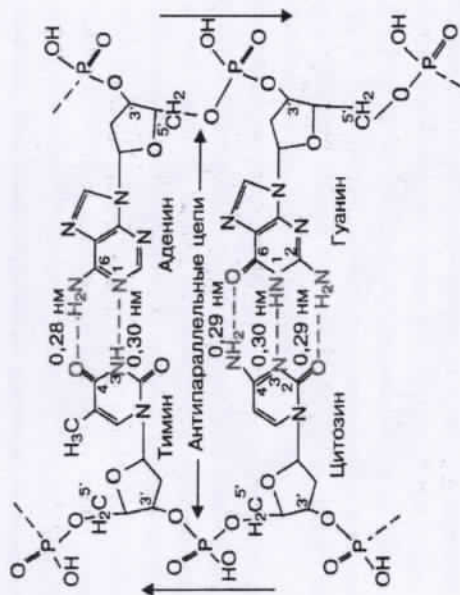


Рисунок 9. Комплементарные взаимодействия азотистых оснований и формирование двойной спирали ДНК.

Аденин и тимин связываются двумя, а гуанин и цитозин – тремя водородными связями формируют двойную спираль ДНК.

Если порядок нуклеотидов в одной цепи АТГТЦ, то нуклеотидами в другой цепи будут ТАЦАГ, они связываются между собой водородными связями. При этом аденин с тимин образуют двойную водородную связь, а гуанин с цитозином образуют тройную водородную связь.

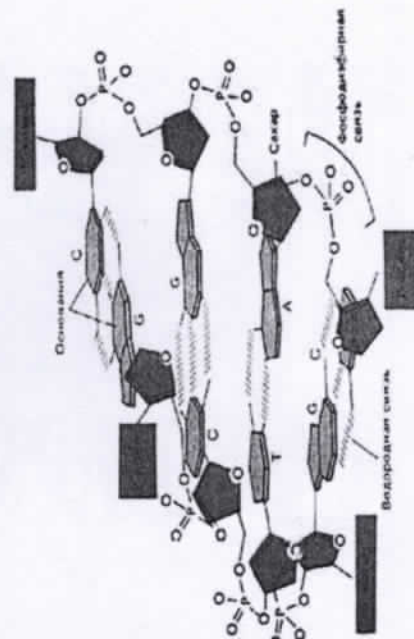


Рисунок 10. Первичная и вторичная структура ДНК

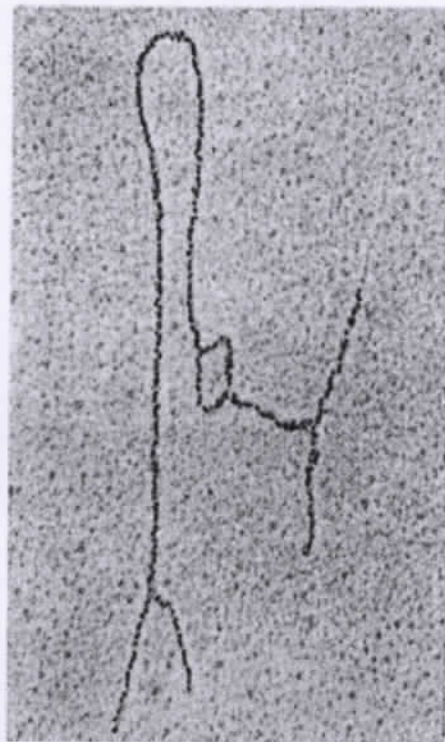


Рисунок 12. ДНК кишечной палочки (ColE1).

Так выглядит ДНК кишечной палочки под электронным микроскопом, после того, как ее состояние зафиксировали при температуре 72°C . Видны три раскрытых участка — два на концах и один в середине. Разрыв водородных связей между комплементарными основаниями вызван воздействием высокой температуры. Данная фотография служит доказательством справедливости модели Уотсона-Крика — у ДНК действительно двойная спираль.

Третьичная структура молекул ядерной ДНК — формируется при взаимодействии ее с белками-гистонами, аминокислотными остатками, катионами 2-х валентных металлов, фосфатными группами, в результате образуется хроматин. Молекула ДНК уменьшается в длине и в объеме. Существенно возрастает устойчивость ДНК.

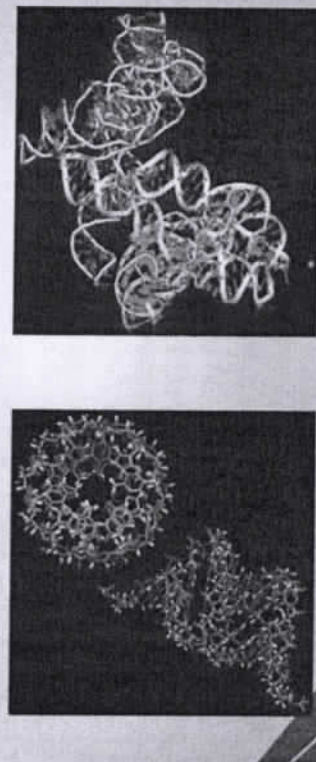


Рисунок 13. Третьичная структура ДНК.

У большинства прокариот, митохондрий, хлоропластов, а также у некоторых вирусов ДНК находится в свободном от белков состоянии и имеет кольцевую структуру. Если кольцевая ДНК не имеет суперспиральной конформации, то молекула называется релаксированной.

При превращении релаксированной ДНК в суперспиральную затрачивается определенное количество энергии и молекула становится *более компактной*, что дает возможность упаковать очень больших кольцевых молекул ДНК в малых объемах.

Существуют ферменты, которые способны увеличивать или уменьшать число супервитков, то есть могут регулировать степень суперспиральности. Такие ферменты называют *топоизомеразы*.

Суперспиральность ДНК чрезвычайно важно, так как некоторые белки и ферменты не связываются с ДНК, если она находится не в суперспиральной конформации.

У большинства организмов ДНК существует в виде двойной спирали, однако встречаются и одноцепочечные ДНК. Например, некоторые бактериофаги (φX 174, S13, φ) имеют одноцепочечное строение ДНК.

Митохондриальная ДНК представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу с молекулярной массой $10 \cdot 10^6$, не связанную с белками. Ее информационная ёмкость составляет около 15 генов, что обуславливает цитоплазматическую наследственность [8,11].

Таким образом, выше приведенные свойства в строении ДНК имеют большое значение в передаче наследственных признаков от поколения к поколению и биосинтезе белков.

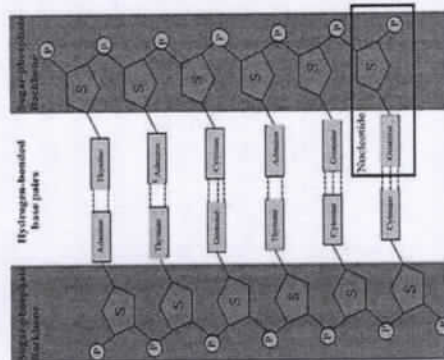


Рисунок 14. Структура двухцепочечной ДНК, продукта синтеза ДНК, с отдельными нуклеотидными звеньями и связями. Синтез ДНК

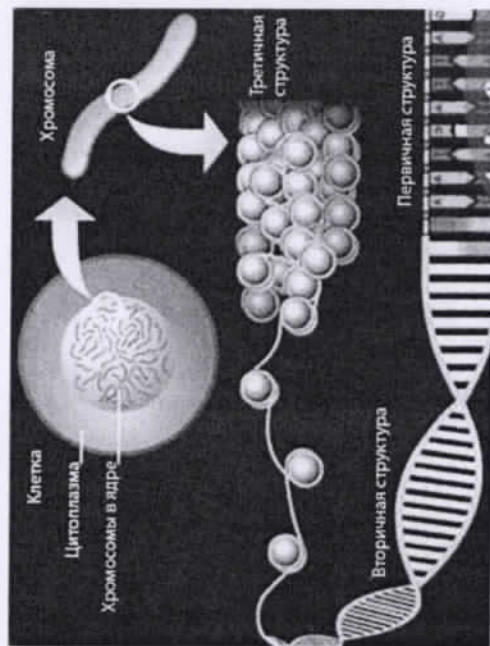


Рисунок 15. Сходство ДНК и РНК.

Доказательства роли ДНК в наследственности

В 1928 г. Гриффите обнаружил явление трансформации. Он вводил мышам **вирулентный** капсульный (S) и **невирулентный** бескапсульный (R) штаммы пневмококков *Streptococcus pneumoniae*. При введении мышам вирулентного штамма S они заболевали пневмонией и погибали, а при введении невирулентного R — оставались живыми (рис. 16 а, б). Затем Гриффите ввел смесь невирулентного штамма R со штаммом убитого нагреванием вирулентного S и получил неожиданный результат — мыши заболели пневмонией и погибли. Из погибших животных были выделены бактерии, которые обладали вирулентностью и были способны образовать капсулу. Следовательно, живые бактерии невирулентного бескапсульного штамма R **трансформировались** — приобрели свойства убитых болезнетворных капсульных бактерий S. Однако химическая природа «трансформирующего фактора», долго оставалась неизвестной.

В 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Картни показали, что **трансформирующим фактором** является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) поскольку только обработка дезоксирибонуклеазой (ДНК-азой) полностью прекращала трансформирующую активность ДНК [2,9].

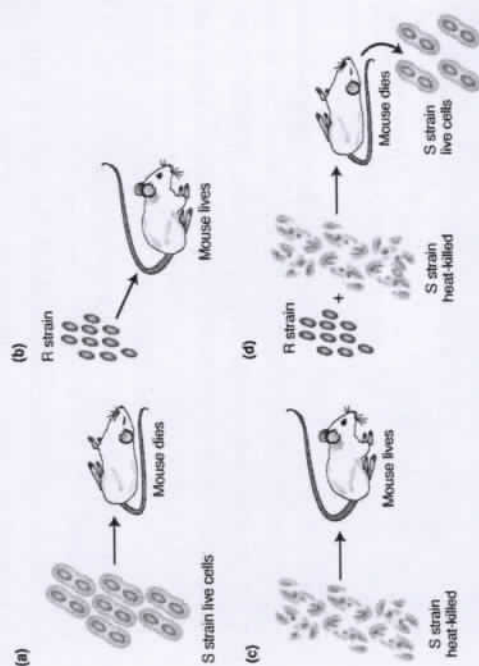


Рисунок 16. Схема экспериментов Ф. Гриффитса на мышах по трансформации у пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*.

Окончательным доказательством генетической роли ДНК были эксперименты А. Херши и М. Чейз, проведенные в 1952 г. с бактериофагом T2. Белок фага T2 пометили радиоактивной серой (^{35}S), а ДНК фага радиоактивным фосфором (^{32}P). После заражения бактерий мечеными фагами было установлено, что в клетку бактерии проникает только молекула ДНК, а белковая оболочка фага остается снаружи (рис. 16). Тем не менее в клетках зараженных бактерий образовалось множество зрелых частиц бактериофага T2. Это однозначно говорило о том, что **наследственная информация** о всех признаках и свойствах фага заключена именно в ДНК [2,9,11].

Рибонуклеиновые кислоты

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — одна из трёх основных макромолекул (две другие — ДНК и белки), которые содержатся в клетках всех живых организмов и играют важную роль в кодировании, прочтении, регуляции и выражении генов.

Так же, как ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), РНК состоит из длинной цепи, в которой каждое звено называется нуклеотидом. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара рибозы и фосфатной группы. Последовательность нуклеотидов позволяет РНК

кодировать генетическую информацию. Все клеточные организмы используют РНК (мРНК) для программирования синтеза белков.

Рибонуклеиновые кислоты встречаются во всех частях клетки, основная часть их сконцентрирована в рибосомах. РНК, находящиеся в составе клеток, различаются друг от друга молекулярными массами, свойствами, строениями и функциями.

В настоящее время найдено в клетках более 40 видов РНК. Больше всех изучены три основных типа РНК, различающихся локализацией, размером, нуклеотидным составом, структурой и функциональными свойствами. Это – информационная РНК, транспортная РНК и рибосомальная РНК [10].

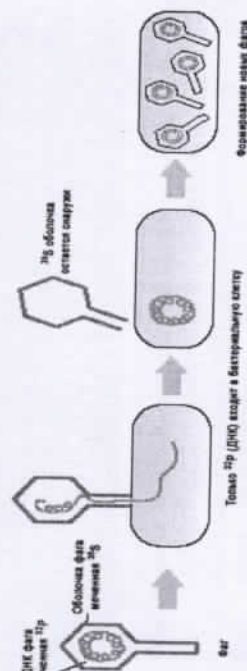


Рисунок 17. Схема эксперимента Херши и Чейз, демонстрирующего, что генетическим материалом фага является ДНК.

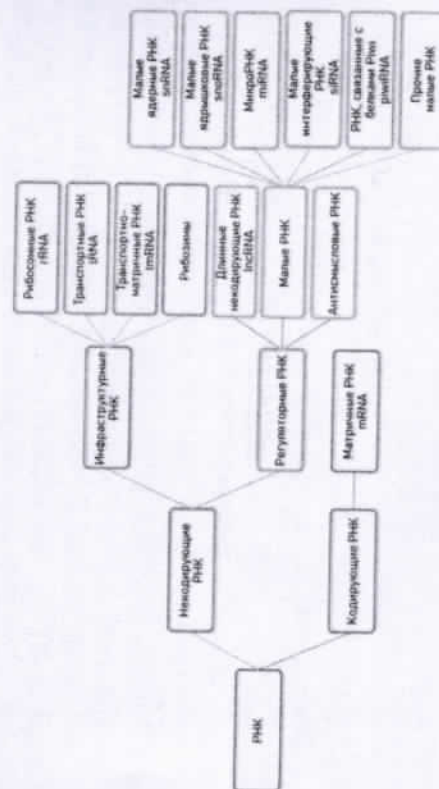


Рисунок 18. Классификация РНК

Рибосомы

- Тельца сферической или слегка овальной формы, состоящие из большой и малой субъединиц
- Субъединицы синтезируются в ядрышке
- Большинство прикреплены к шероховатой ЭПС, часть плавает свободно в цитоплазме
- Функция – синтез белка

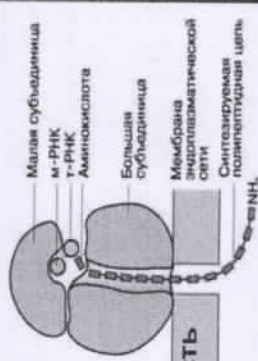


Рисунок 19. Строение рибосомы

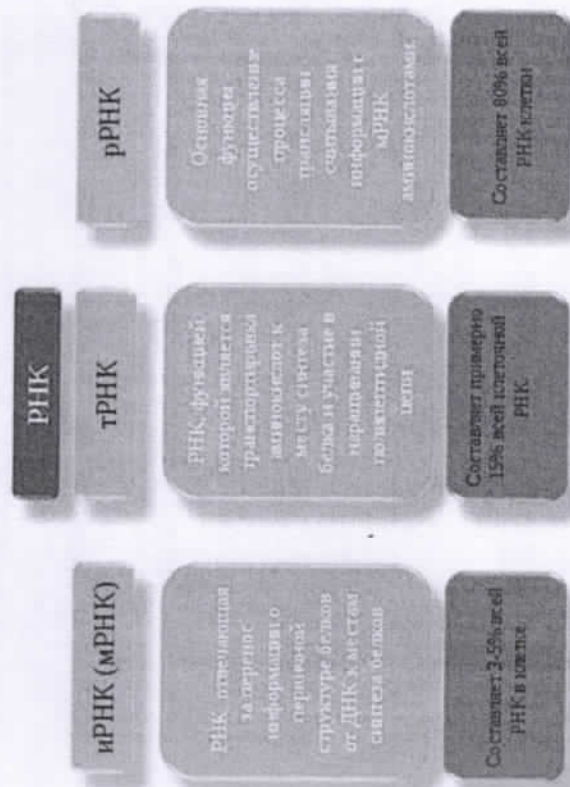


Рисунок 20. Строение и функции РНК

Результат транскрипции

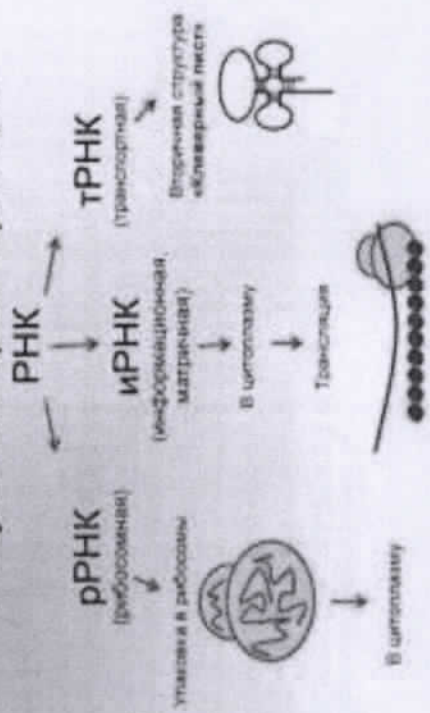


Рисунок 21. Транскрипция

Информационная РНК - иРНК (матричная РНК - мРНК) – синтезируется в ядре. Она составляет примерно 5% всех РНК клетки. Молекулярная масса иРНК составляет около 1 миллиона. В зависимости от нуклеотидного состава молекулярная масса их бывает различным. Информационная РНК переносит информацию, находящуюся в молекуле ДНК к месту синтеза белков – рибосомам, почему и ее называют информационной РНК.

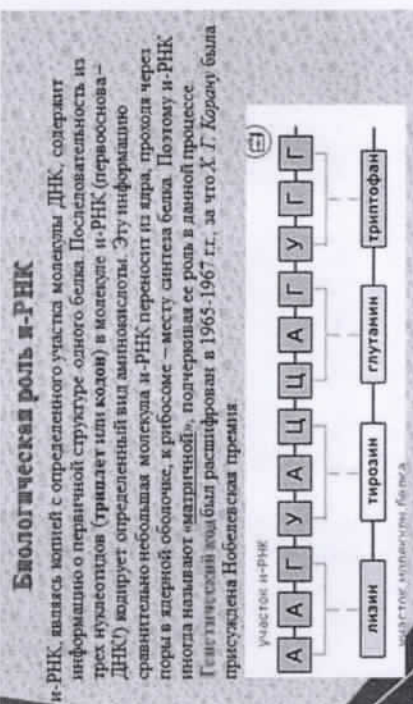


Рисунок 22. Биологическая роль информационной-РНК

Рибосомальная РНК (рРНК) – является составной частью рибосомы. Она составляет почти 80% всех РНК клеток. Молекулярная масса ее велика. Раньше она 1,5 – 2 млн. и состоит из 4000 – 6000 мононуклеотидных остатков, которые встречаются связанными с белками. Участвует в биосинтезе белка.

Рибосомальная РНК

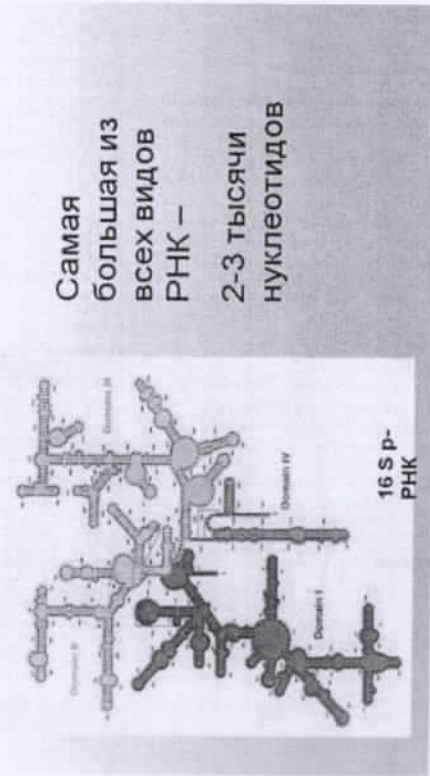


Рисунок 23. Рибосомальная РНК.

Транспортная РНК – (т РНК) или растворимая РНК (s-РНК), на ее долю приходится около 15% от общего содержания РНК клетки. Она выполняет функцию переноса аминокислот к месту синтеза белков. К каждой аминокислоте подходит только одна тРНК, имеющая специальную структуру. Молекулярная масса тРНК сравнительно небольшая (25,000 – 35,000) и состоит из 60 – 90 мононуклеотидных остатков.

Рибонуклеиновые кислоты имеют следующий химический состав: азотистые основания – аденин, гуанин, цитозин, урацил; из углеводных компонентов – рибозу, и фосфорную кислоту. Кроме того, в составе молекулы РНК встречаются в незначительных количествах псевдоурацил, 5 – метилцитозин и 1 – метилгуанин.

Молекула РНК образуется из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные части цепи приближаются друг к другу и связываются водородными связями. В зависимости от типа РНК спиральные структуры могут иметь различные формы строения.

Вторичная структура тРНК имеет большое значение. Полинуклеотидные цепи тРНК, состоящие из нескольких десятков

нуклеотидных остатков, всегда начинаются с остатка гуанозина имеющего свободную фосфорную кислоту. Ниже приводится строение структуры тРНК валина. В связи с образованием водородных связей между азотистыми основаниями появляется сложная конфигурация, напоминающая «лист клевера» т РНК.

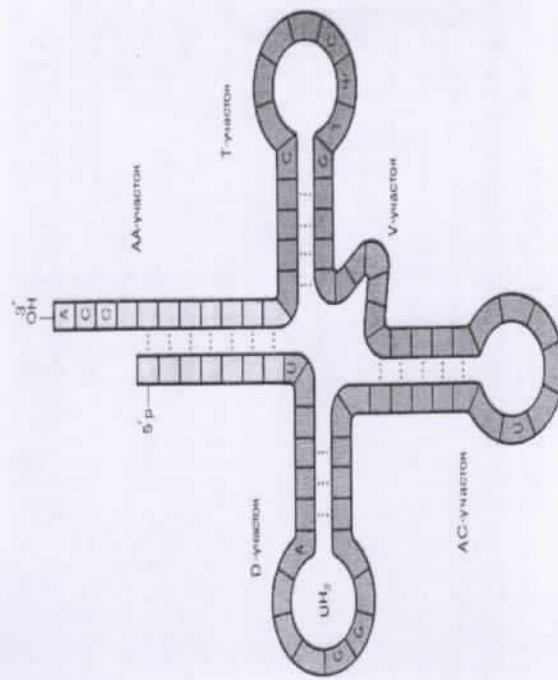


Рисунок 24. Структура тРНК – лист клевера

В молекулах других типов РНК, наряду со спирализованными частями, также встречаются и неспирализованные участки. В клетке РНК бывает в связанном с белком состоянии [9,10].

Определение нуклеотидного ряда в нуклеиновых кислотах.

Нативная молекула ДНК расщепляется на несколько фрагментов с помощью фермента рестриктазы. После определения нуклеотидного ряда фрагментов можно сформировать первичную структуру ДНК. Несколько методов используются для определения первичной структуры ДНК. В частности, очищенная (нативная) ДНК идентифицируется как первичная структура посредством химических реакций. Другой метод заключается в том, что на основе ДНК, синтезируемой с помощью фермента, формируется первичная структура. Оба метода полностью автоматизированы. Метод Сэнгера секвенирование нуклеиновых кислот на основе флуоресцентного метода четырехнуклеотидов с различными агентами и их спектрального анализа с использованием компьютера определяют первичные структуры

ДНК или РНК. Нуклеотидный ряд некоторых РНК может быть секвенирован с помощью специфических РНК – полимераз (метод Максима-Гилберта). В настоящее время, идентифицируя РНК с длинным нуклеотидным рядом (Например, i-РНК), можно секвенировать ген, из которого синтезируется та же РНК в молекуле ДНК. Для этого РНК расщепляется и синтезируется с помощью фермента обратной транскриптазы клнк и используется в исследовательских исследованиях.

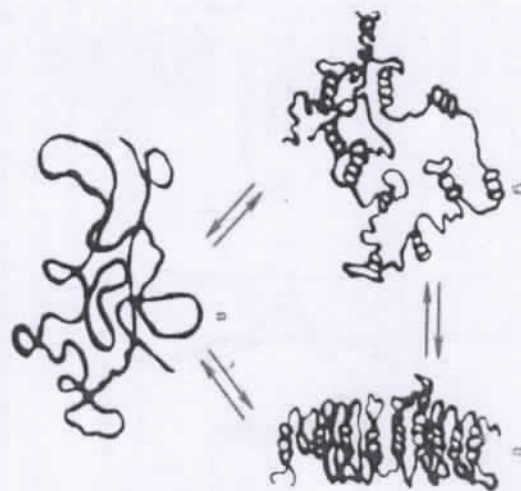


Рисунок 25. Зависимость третичной структуры РНК от ионной силы, температуры и рН среды (по А.С.Спирину и П.Гавриловой).

а – компактная палочка, б – компактный клубок, в – развернутая цепь

Нуклеотидный ряд нуклеиновых кислот и специфические структуры также определяются компьютерными программами с высокой эффективностью. С помощью специальной структуры нуклеотидного ряда ДНК и РНК, пуриновых и пиримидиновых фрагментов, можно определить степень повторяемости каждой хильдинуклеотидной цепи. Один из факторов, определяющих первичную структуру молекулы ДНК, характеризуется своеобразным расположением двух азотистых оснований. В частности, степень повторяемости 5' – TSG – 3' и 5' – GTS – 3' у прокариот одинакова, и такие состояния можно наблюдать в расположении динуклеотидов 5' – GA – 3' и 5' – AG – 3'. Однако в вирусной, животной и

растительной ДНК уровни повторения 5' – TSG – 3' и 5' – GTS – 3' варьируются от 1/2 до 1/5. Следует отметить, что локализация, относящаяся к 5' – TSG – 3', реже встречается в ДНК эукариот. Это связано с тем, что данный динуклеотид, выполняя роль мишени в процессе метилирования, одновременно снова участвует в экспрессии генов. Полученные с учетом этих особенностей компьютерные программы позволяют определять специфические субнуклеотидные сегменты нуклеотидного ряда ДНК или РНК на основе действия рестриктивных эндонуклеаз. Именно на основе этой методологии определяются гомологические ряды в первичной структуре, в том числе семейная близость или отдаленность генов, которые также являются определяющим фактором [3, 5].

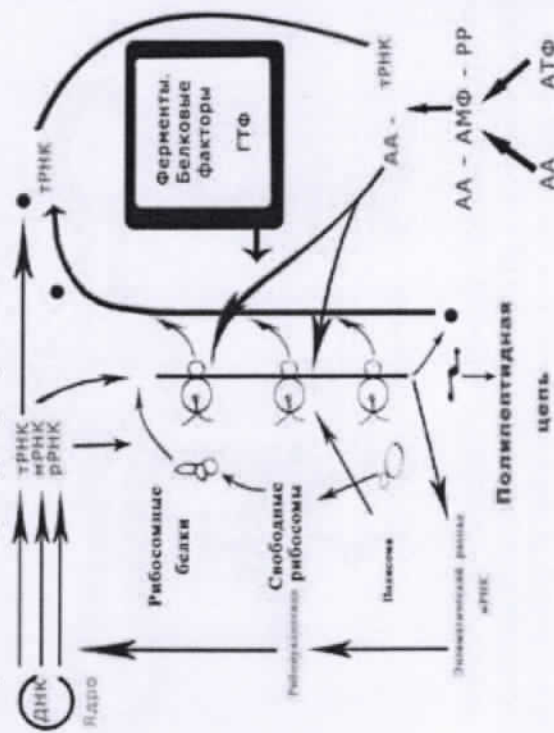


Рисунок 26. Роль разных типов РНК в синтезе белка (по Уотсону).

Посредством компьютерных программ возможен переход через нуклеотидный ряд на аминокислотный язык –информацию генетического кода. С помощью одного и того же метода идентифицируются различные механизмы в геноме, включая нуклеотиды с геном-оператором или промотором.

Биосинтез белков (трансляция). Одной из двух важнейших проблем современной естествознания является биосинтез белков в живой природе. Второе - для человечества в неорганической природе, в дальнейшем

выделение энергии на основе физических исследований элементарных частиц может возрасти до минимума. Управление жизненными процессами в живой природе происходит при расщеплении белков. Признак жизнеспособности организма проявляется через определенный белок или комплекс белков. Биологические признаки живых существ лежат в основе следующих родов: ДНК → РНК → БЕЛОК

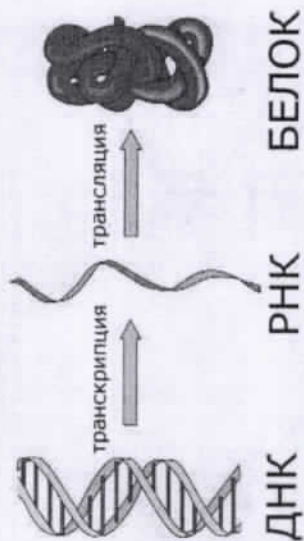
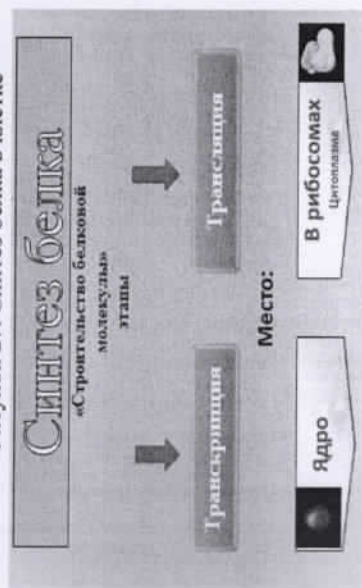


Рисунок 27. Синтез белка в клетке



28. Общая схема синтеза белка

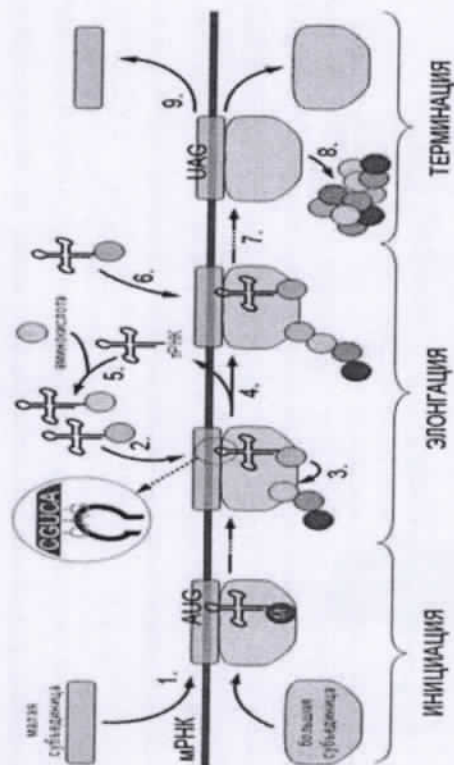


Рисунок 29. Строение и переобразование белка в РНК и ДНК

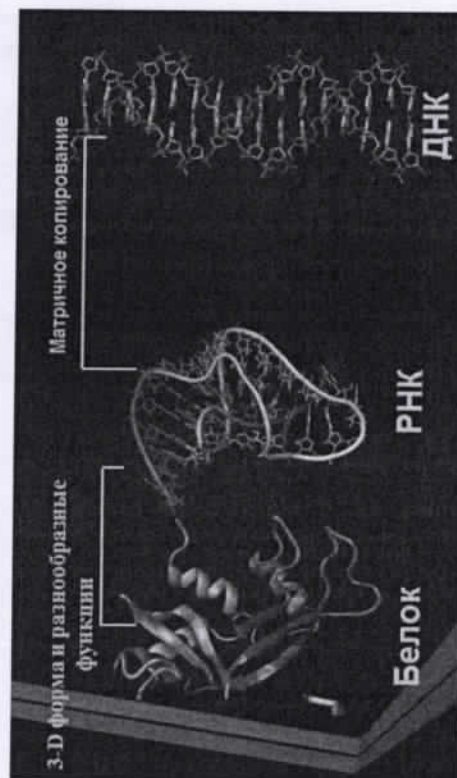


Рисунок 30. Общая схема трансляции

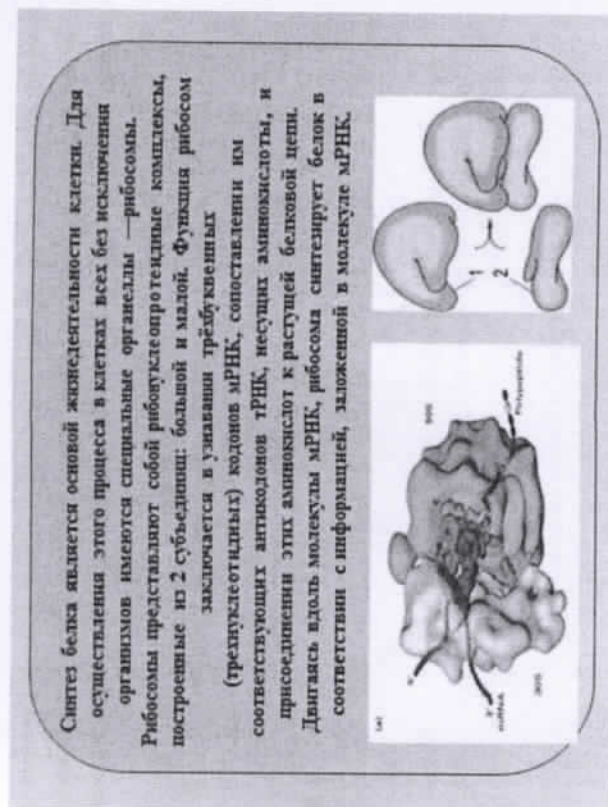


Рисунок 31. Описание синтеза белка

Биосинтез белков очень сложный и многоступенчатый процесс, требующий участия различных ферментов, систем и разных РНК. Биосинтез белков совершается в рибосомах. При этом информация, выраженная с помощью нуклеотидов в иРНК проявляется в виде аминокислотной последовательности в полипептидной цепи, т.е. информация о синтезе белка «с языка» нуклеотидов переводится (трансляция) «на язык» аминокислот. Общий механизм биосинтеза белков для всех живых организмов одинаков и состоит из следующих основных этапов:

- 1) Активирование аминокислот;
- 2) Инициация – начало синтеза полипептидной цепи;
- 3) Элонгация – удлинение новообразующейся полипептидной цепи;
- 4) Терминация – окончание образования полипептидной цепи.

1. **Активирование аминокислот.** Поскольку молекулы аминокислот химически не активны, они в биосинтезе белков не могут непосредственно участвовать. Чтобы участвовать в биосинтезе белков аминокислоты должны сначала перейти в активное состояние.

Активирование аминокислот с АТФ очень сложный процесс. Каждая аминокислота активируется особыми ферментами –аминоацил–тРНК-синтетазами.

Каждый из этих ферментов обладает двойной специфичностью к определенной аминокислоте и к соответствующей ей тРНК. Активирование аминокислоты протекает в каталитическом центре фермента. Эта реакция проходит в два этапа.

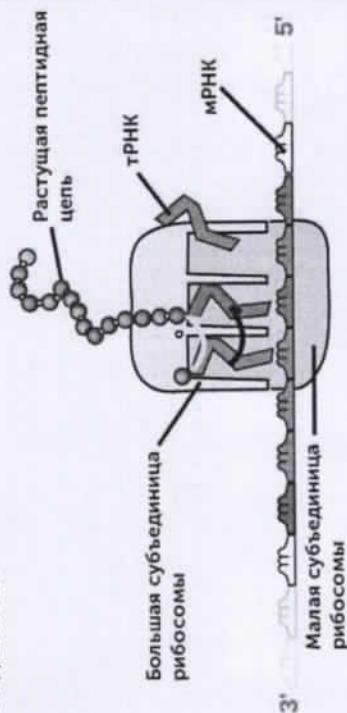


Рисунок 32. Схема синтеза

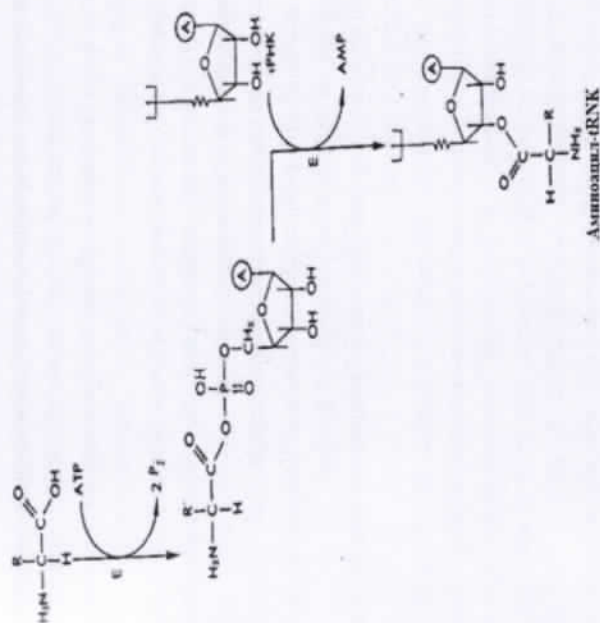
На первом этапе АТФ, и аминокислота взаимодействуют и в результате образуется связанный с ферментом промежуточный продукт — **аминоацил-аденилат**. Карбоксильная группа аминокислоты связывается ангидридной связью с 5'-фосфатной группой АМФ с выделением пиррофосфата. При этом аминоацил-аденилат приобретает от АТФ часть энергии необходимой для образования пептидной связи.

На втором этапе аминоацил-аденилат-ферментный комплекс взаимодействует со специфической для данной аминокислоты тРНК с образованием аминоацил-тРНК и высвобождением АМФ и фермента аминоацил-т РНК-синтезы.

Фермент аминоацил — тРНК — синтеза «узнает» только тРНК, специфичные для данной аминокислоты. Этот процесс протекает с высокой точностью.

Такая высокая специфичность в выборе тРНК предопределяет дальнейшее взаимодействие ее антикодона с определенным кодоном мРНК и расположение соответствующей аминокислоты в полипептидной цепи.

Нагруженные аминокислотами тРНК далее переносятся к рибосомам, на которых осуществляется процесс полимеризации аминокислот с образованием пептидных связей.



2. **Инициация.** Инициация — это одна из наиболее сложных этапов процесса биосинтеза белков. На этом этапе протекают сбор комплекса инициации и подготовительные реакции. Биосинтез происходит при помощи собранного комплекса инициации.

Для комплекса инициации синтеза полипептидной цепи необходимы:

Иницирующий кодон АУГ или (редко) ГУГ в и РНК; Формилметионин-тРНК у эукариот метионин тРНК; ГТФ; Mg^{2+} рибосомные 30S-и 50 S-субчастицы (у эукариот 40 S-и 60 S-субчастицы) и факторы инициации — IF-1, IF-2, IF-3 (у эукариот e IF-2, e IF-3, e IF-5)

Началом синтеза белка в иРНК является сочетание трех нуклеотидов АУГ. Эти нуклеотиды кодируют метонин. У иРНК кодон инициатор находится у-5'-конце, а 3'-конец в конце полинуклеотидной цепи. Синтез любой полипептидной цепи начинается с инициаторной аминокислоты-формилметионина у прокариот и у эукариот

Поскольку формильная группа формилметионина блокирует аминогруппу иницирующего метионина, наращивание полипептидной цепи может осуществляться только с С-конца.

После окончания синтеза полипептидной цепи формильная группа удаляется под действием деформилазы.

Инициация протекает следующим образом. Иницирующий фактор IF-3 соединяется с 30 S-субчастицей рибосомы. Белковый фактор IF-2 соединяется ГТФ и формилметионил-тРНКф. С образовавшимся комплексом реагирует 30S- IF-3.

В итоге получается иницирующий комплекс: 30S-IF-3-ГТФ-IF-2-формилметионил-тРНК. К этому комплексу при участии иницирующего фактора IF-1 присоединяется иРНК своим 5'-концом.

После этого присоединяется 50S-субчастица и образуется функционально активная 70S-рибосом. При этом высвобождаются все три фактора инициации, а также ГДФ и неорганический фосфат.

Необходимо отметить, что важную роль в биосинтезе белка играют две функциональные центры рибосом.

Один из них получил название А-участок (аминоацил-тРНК связывающий), а другой, в котором расположена метионил-тРНКф, Р-участок (пептидил-тРНК-связывающий). В результате инициаторных процессов формилметионил-тРНК встает сразу в Р-участок. При этом ее антикодон 3'-УАЦ-5' связан с метиониновым кодоном мРНК 5' АУГ-3'. А-участок свободен, в него встает следующий кодон мРНК, этот кодон считывается соответствующей аминоацил-тРНК. Таким образом, на стадии инициации собирается весь аппарат для синтеза полипептидной цепи. Факторы инициации повторно используются для инициации синтеза новых цепей [9,10,11].

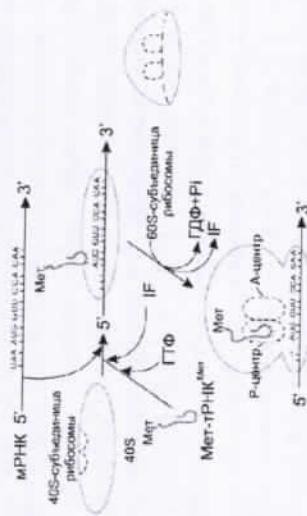


Рисунок 33. Инициация синтеза белка.

Комплекс, состоящий 40S субъединицы рибосомы, Мет-тРНК^{мет}, факторов инициации и молекулы ГТФ, присоединяется и скользит по мРНК до встречи с иницирующим кодоном AUG. Антикодон Мет-тРНК^{мет} связывается с кодоном AUG, к комплексу с затратой энергии ГТФ присоединяется 60S субъединица рибосомы, а факторы инициации удаляются.

На рибосоме формируется А- и Р-центры.

3. Элонгация. Процесс элонгации состоит из трех этапов, которых последовательно повторяются до окончания синтеза всего пептида:

1. Кодон-зависимое связывание аминоацил-тРНК с А-участком;
2. Транспептидация, включающая образование пептидной связи и перемещение удлиненного пептида с Р-участка на А-участок;
3. Транслокация пептидил-тРНК с А-участка в Р-участок. На этом этапе происходит вытеснение использованной тРНК и Р-участка рибосомы и перемещение иРНК. В результате очередной кодон иРНК устанавливается в А-участке, после чего весь цикл повторяется.

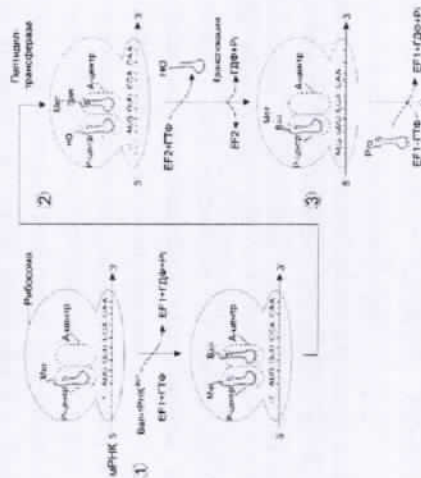


Рисунок 34. Элонгация синтеза белка.

- 1- Связывание aa-тРНК в А-центре происходит за счет энергии ГТФ и при участии фактора элонгации EF1;
- 2- Образование пептидной связи катализирует пептидилтрансфераза, активный центр которой формируется рРНК, входящей в состав большой субъединицы рибосомы;
- 3-транслокация – перемещение рибосомы по мРНК от 5'-к 3'-концу на один кодон идет с использованием энергии ГТФ.

Рассмотрим цикл элонгации с состояния, когда в Р-участке рибосомы находится инициаторная формилметионил-тРНКф. А-участок с установленным там кодоном матричного РНК-свободен. Процесс происходит в присутствии ГТФ и белкового фактора элонгации EF-T и прокариот или EF-1 у эукариот. ГТФ гидролизуется на ГДФ и неорганический фосфат благодаря взаимодействию кодон-антикодон. Таким образом, аминоацил-тРНК помещается в А-участке рибосомы [11].

На следующем этапе в пептидилтрансферазном центре происходит перенос формилметионинового остатка (или пептидного остатка в

последующих стадиях) на аминокетогруппу вновь пришедшей аминокислоты, расположенного в А-участке. В результате этой реакции образуется пептидная связь между аминоацил-тРНК и остатком формилметионина катализируется эта реакция ферментом пептидилтрансферазой, являющимся одним из белков 50S-рибосомы.

Этап **транслокации** очень сложный. Для него требуется ГТФ, второй фактор элонгации-ЕF-6 у прокариот и EF-2 у эукариот, а также энергия гидролиза ГТФ. В результате транслокации иРНК передвигается на один кодон.

При этом дипептидил-тРНК поступает в Р-участок, а вытесненная инициаторная тРНК уходит с рибосомы. В А-участке встает следующий кодон. Цикл повторяется три поступления следующей аминоацил-тРНК. мРНК передвигается, считывание информации с ней идет в направлении 5' 3', ее кодоны «переводятся» на «язык» белков.

Таким образом, полипептидил цепь белков растет в результате последовательного присоединения аминокислотных остатков по карбоксильному концу цепи.

4. **Терминация** – последний этап образования белковых молекул. В процессе терминация прекращается удлинение полипептидной цепи, как только появляются в А-участке терминирующие кодоны – UAA, UAG и UGA. Эти кодоны не имеют своей аминоацил-тРНК.

Терминирующие кодоны узнаются специальными факторами терминации RF-1, RF-2 и RF-3. RF-1 распознает кодон UAA и UAG, тогда как RF-2 может распознать UAA и UGA. В эукариотических клетках имеется лишь один фактор терминации e RF, который способен узнавать все три терминирующих кодона.

Белковые факторы терминации индуцируют гидролиз сложноефирной связи между тРНК и полипептидом молекулы пептидил-тРНК в Р-участке рибосомы. В результате полипептидная цепь высвобождается из рибосомы.

После завершения синтеза пептидной цепи и ее освобождения, и рибосомы уходят факторы терминации.

Свободная рибосома диссоциирует на две субъединицы. На конечном этапе от 30S-субъединицы рибосомы уходит иРНК.

Генетический код. Обозначение какой-нибудь информации условными знаками называется кодирование или кодом. В биологии генетическую информацию, то есть обозначение 20 разных аминокислот, составляющих молекулу белков, при помощи 4 вида нуклеотидов в молекуле ДНК называется генетическим кодом. Наследственная информация в цепи ДНК закодирована в виде триплета состоящего из трех нуклеотидов.

Триплеты образуют 64 разных кодонов. Этих кодонов достаточно кодировать 20 аминокислот [10,11].

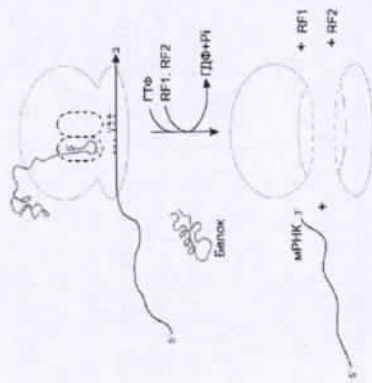


Рисунок 35. Терминация синтеза белка.

При попадании в А-центр стоп-кодона вновь синтезированный пептид освобождается из связи с тРНК, субъединицами рибосомы и мРНК с участием факторов терминации и энергии ГТФ.

В 1961 году английский ученый Ф.Крик доказал, что код является триплетным, вырожденность заключается в том, что большинство аминокислот кодируются не одним, а несколькими триплетами. Это повышает надежность функционирования белок-синтезирующей системы. Например, для серина и лейцина код вырожден шестикратно, для тирозина и гистидина двукратно, а две аминокислоты-метионин и триптофен-кодируются только одним кодоном каждая (РНК-аминокислотный код).

Генетический код однозначен т.е. каждый кодон кодирует только одну аминокислоту. Исключение представляют инициаторные кодоны AUG и ГУГ. В начале трансляции они кодируют включение формилметионина, а находясь внутри цепи, AUG кодирует метионин, а ГУГ – валин.

Как видно из рисунка 36 характерной особенностью кодового словаря является то, что три из 64 триплетов (UAA, AUG и UGA) не кодируют никакой аминокислоты и поэтому получили название «бессмысленных». Однако эти триплеты играют исключительно важную роль в процессах трансляции. Они являясь терминирующими кодонами, прекращают трансляцию и в связи с этим синтезированная полипептидная цепь высвобождается из рибосомы.

синтезироваться 100 г белка. Так, в крови человека синтезируется 8 г гемоглобина, 23 г печеночного белка и 32 г мышечного белка. Синтез белков в клетке, как и нуклеиновых кислот, осуществляется на основе матрицы (мессенжера). Этот процесс сложен и состоит из нескольких этапов. Биосинтез белков представляет собой специфическую белковую синтезирующую систему, которая включает в себя следующие структуры:

1. Рибосомы - это нуклеопротеиновые частицы, содержащие 60% рибосомной РНК и 40% белка. Длина 160 Å, диаметр 250 Å, молекулярная масса 4 млн. Несколько наборов рибосом называются полирибосомами или полисомами;
2. Матричная РНК;
3. Транспорт РНК;
4. Этапами синтеза белка были инициация, удлинение, терминация и белки и ферменты, осуществляющие трансляционные процессы;
5. Протеиногенные аминокислоты;
6. Аминоацил-Т-РНК-синтетазаферменты, образующие аминоксил-Т-РНК;
7. Макроэргические нуклеозидтрифосфаты АТФ и ГТФ;
8. Ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , NH_4^{+} .

В биосинтезе белка участвуют более 200 макромолекул. Это тироксин и нуклеиновые кислоты, и было обнаружено, что только 100 макромолекул необходимы для активации аминокислот. Рибосома состоит из 60 макромолекул, в трансляции участвуют более 10 видов белков.

Именно в рибосомах нуклеиновая кислота, которая является неживой молекулой, превращается в неодушевленные белки. Следовательно, в рибосомах химия переходит в биологию [12,13].

Модификация белков

Модификация белков (от Modificatio - изменение) биогенная, происходит после завершения трансляции матричной рибонуклеиновой кислоты, или мРНК, (синтез белка на мРНК-матрице) или до ее завершения. В первом случае модификацию белков наз. посттрансляционной, во втором - котрансляционной. Осуществляется благодаря реакциям различных функциональных групп аминокислотных остатков, а также пептидных связей и обуславливает конечную форму белковой молекулы, ее физиологическая активность, стабильность, перемещения внутри клетки. Внеклеточные (секретируемые) белки, а также многие белки цитоплазматической мембраны и различных внутриклеточных компартментов (обособленных участков клетки) подвергаются гликозилированию, в результате которого образуются гликопротеины. Наиболее сложно организованы маннозосодержащие цепи,

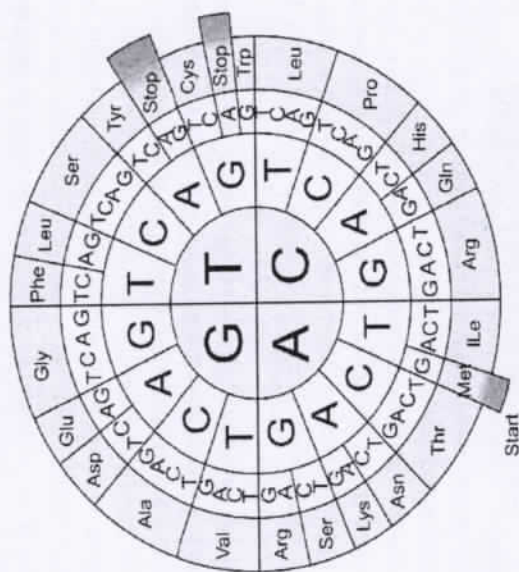


Рисунок 36. Генетический код.

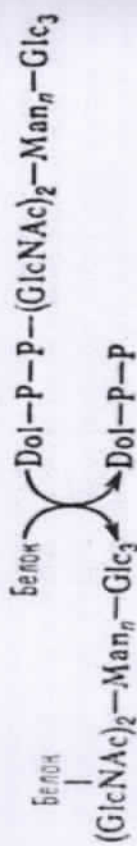
Последовательность нуклеотидов кодона считывается от центра к периферии.

Генетический код *универсален*, то есть он в основном одинаков у белоксинтезирующих организмов, стоящих на разных уровнях развития. Благодаря универсальности кода возможно генетическая инженерия. Универсальность кода свидетельствует о древности его происхождения и консервативности, в результате которой даже при длительной эволюции сохраняются неизменными важнейшие особенности метаболизма. [10].

Таким образом, кодом аминокислот являются триплеты нуклеотидов ДНК, транскрибируемые в различные виды РНК.

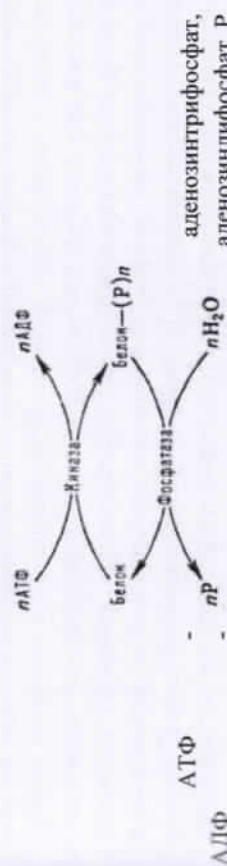
Как известно, цвет наших волос и кожи зависит от пигмента под названием меланин, которого у альбиносов нет. Синтез меланина осуществляется белком-ферментом тирозиназой. Мутация или инактивация этого белка является причиной потери альбиносов. Таких белковых процессов в организме можно наблюдать очень много. Полное определение биосинтеза белков позволяет исследовать закономерности наследственности, управлять варибельностью роста организмов, выявлять, лечить причины различных наследственных заболеваний и решать ряд других задач. Синтез белков интенсивно осуществляется в организме. В печени человека за 10 дней обновляется половина белков. В сыворотке крови в течение 20-30 дней происходит обмен гидроксилами. Каждый день в организме человека должно

присоединенные к полипептидам N-гликозидной связью. Начальная стадия формирования таких цепей протекает котрансляционно по схеме:



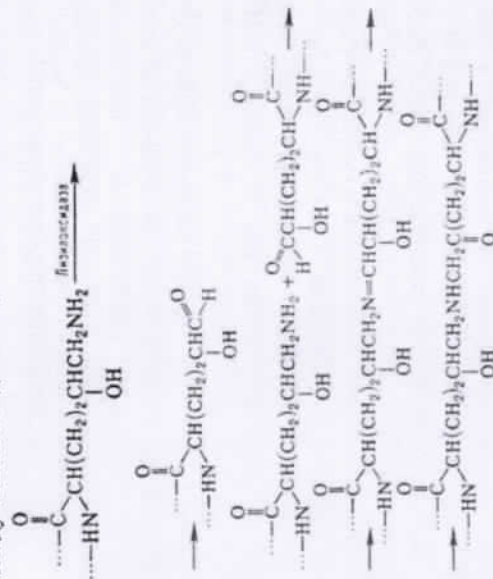
Dol-долихол (полипенол), Dol—P—P-долихолпирофосфат, Glc-глюкоза, GlcNac-N-ацетил-D-глюкозамин, Man-манноза. Послед. стадии осуществляются посттрансляционно с участием нескольких ферментов, локализованных в разных субклеточных компартментах. Так, для G-белка вируса везикулярного стоматита, гликозидные цепи которого построены из 15 углеводных остатков, установлена такая последовательность событий. Сначала в эндоплазматич. ретикулеуме происходит в две стадии отделение терминальных остатков глюкозы с участием двух разных глюкозидаз. Затем маннозидазы (I и II) удаляют 6 остатков маннозы, а N-ацетил-D-глюкозаминтрансфераза осуществляет присоединение трех остатков GlcNac к остаткам маннозы гликопротеина. Наконец, в комплексе Гольджи с этими остатками связываются с участием соответствующих трансфераз остатки фуруктозы, галактозы и сиаловой кислоты. Моносахаридные остатки могут подвергаться фосфорилированию, сульфированию и другим модификациям. Гликозилированию секретируемых белков предшествует протеолитич. процессинг - отделение от N-конца полипептидной цепи "сигнальной" последовательности аминокислот. В эукариотич. клетках (клетки всех организмов, за исключением бактерий и синезеленых водорослей) этот процесс осуществляется контрансляционно, в прокариотич. клетках (клетки бактерий и синезеленых водорослей) он может протекать посттрансляционно. Наибольшее распространенные сигнальные последовательности включают 23 аминокислотных остатка. Характерные особенности этих последовательностей - наличие на конце короткого положительно заряженного участка, за которым следует гидрофобный участок, содержащий от 7 до 14 аминокислотных остатков. Сигнальные последовательности завершаются консервативным по длине (5-7 остатков) гидрофильным участком, на C-конце которого чаще всего находятся остатки аланина, глицина, серина, треонина, цистеина или глутамина. Они образуются из групп SH цистеина в ходе многостадийного процесса с участием фермента ди-сульфидизомеразы. На его ранних стадиях появляется значит. количество "неправильных" дисульфидных мостиков, которые ликвидируются в результате тиолдисульфидного обмена, в котором, по-

видимому, участвует цистамин ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$)₂. Предполагают, что такой "переворот" связей происходит до тех пор, пока не возникает наибольшая стабильная третичная структура, в которой дисульфидные мостики "захоронены" и вследствие этого недоступны реагентам. К наибольшим распространённым модификациям внутриклеточных белков относятся фосфорилирование и дефосфорилирование по группе ОН остатков серина, тирозина и треонина, которые осуществляются с участием ферментов протеинкиназ и фосфатаз по схеме:

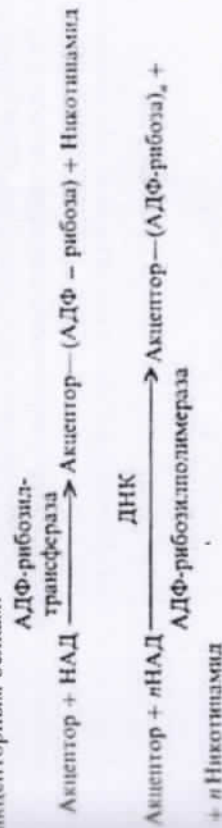


фосфорная кислота или ее остаток. Фосфорилирование сопровождается также изменением физико-химических свойств неферментных белков. Обратимое фосфорилирование белков контролирует, например, такие биологические процессы, как транскрипция и трансляция, метаболизм липидов, гликолиз, гликолиз, мышечное сокращение. Белки митохондрий и хлоропластов, кодируемые ядерными ДНК, имеют на N-конце избыточные аминокислотные остатки, которые избирательно направляют полипептидные цепи в определенные компартменты органелл, после чего отщепляются в результате протеолиза с участием специфических эндопептидаз. Избыточные аминокислотные остатки предшествуют митохондриальным белкам существенно различаются по количеству аминокислотных остатков; их может быть от 22 до 80. Короткие последовательности характеризуются высоким (20-25%) содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков, равномерно расположенных по полипептидной цепи. Длинные последовательности включают дополнительно участок, состоящий из гидрофобных аминокислот, который "закоряет" предшествующий аминокислотный бисектор митохондриальных мембран. Известны предшествующие для ряда гормонов (например, для гастрина, глюкагона и инсулина), которые переходят в активную форму посредством расщепления полипептидной цепи в участках, содержащих два последовательно расположенных остатка

структуры коллагена. Гидроксизин участвует в образовании ковалентных связей между полипептидными цепями коллагена по схеме:

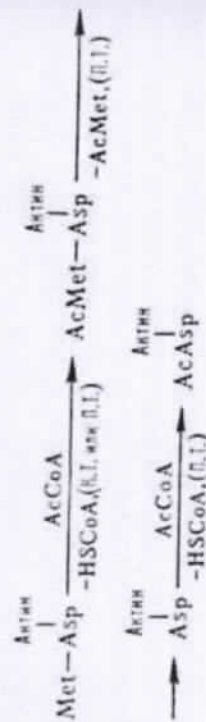


Ядерные белки (гистоны, негистоновые белки) подвергаются аденозиндифосфатрибозилрованию и полиадеозин-дифосфатрибозилрованию, в ходе которого адеозиндифосфатрибозилные остатки переносятся от кофермента никотинамидендинуклеотида (НАД) к акцепторным белкам:



Эти две реакции различны во многих аспектах. В частности, полиадеозиндифосфатрибозилрование протекает в присутствии ДНК. Большинство адеозиндифосфатрибозилных групп присоединяется к белкам посредством эфирной связи, образованной группой OH в положении 5' остатка рибозы и группой COOH C-концевой аминокислоты или глутаминовой кислоты, находящейся внутри полипептидной цепи. Большое значение имеет карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты с образованием гамма-карбоксиглутаминовой кислоты в предшественнике протромбина. Эта реакция катализируется витамином K-зависимой карбоксилазой, локализованной в мембранах эндоплазматического

основных аминокислот (аргинин и лизин). Расщепление осуществляется с участием специфич. эндопептидазы, действующей в ансамбле со вторым ферментом, имеющим карбоксипептидазную активность. Последний удаляет остатки концевых основных аминокислот, завершая превращ. пептида в активный гормон. К белкам, подвергающимся протеолитич. активации, относятся также протеиназы (пепсин, трипсин, химотрипсин), альбумины, проколлаген, белки системы свертывания крови и другие. В некоторых случаях неактивные формы ферментов (зимогены) необходимы для временной "консервации" ферментов. Так, зимогены трипсина и химотрипсина (соотв. трипсиноген и химотрипсиноген) синтезируются в поджелудочной железе, секретируются в тонкий кишечник и только там под действием специфических ферментов превращаются в активную форму. Широкий круг белков (гистоны, миозин, актин, рибосомальные белки и др.) метилируются посттрансляционно по остаткам лизина, аргинина и гистидина (N-метилирование), а также по остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислот (O-метилирование). В качестве метилирующего агента обычно выступает S-аденозилметинин. В некоторых эукариотических клетках более половины растворимых белков ацетилированы по N-концу. Этот процесс может осуществляться ко- и посттрансляционно (на схеме обозначено соответственно К. Т. и П. Т.), например [13]:



HSCoA-кофермент A, AcCoA - ацетилкофермент A, Met-метионин, Asp - аспарагиновая кислота. Для пептидов, содержащих от 3 до 64 аминокислотных остатков и секретируемых в различные органы (гастрин, секретин, холецистокинин и др.), обнаружено посттрансляционное амидирование остатка C-концевой аминокислоты (за исключением концевых остатков аргинина и аспарагина). Некоторые типы модификаций характерны для отдельных белков или небольших групп белков. В частности, в коллагене и несколько других белках со сходными аминокислотными последовательностями обнаружены 4- и 3-гидроксипролин, а также 5-гидроксизин. Гидроксилирование остатков пролина и лизина протекает котрансляционно и имеет важное значение для формирования уникальной

ретикулула. Аналогичная реакция протекает при созревании некоторых других факторов свертывания крови [12].

Посттрансляционная модификация

После завершения трансляции большая часть белков подвергается дальнейшим химическим модификациям, которые называются посттрансляционными модификациями. Известно более двухсот вариантов посттрансляционных модификаций белков [8,9].

Среди них:

- ❖ **Фолдинг** (англ. Folding) - это процесс принятия молекулами определенной формы или конформации. Наиболее активно изучается фолдинг белков, которые образуют третичную структуру за счет специфической последовательности аминокислот, имеющих определенные химические свойства.

- ❖ Форма молекулы белка обуславливает его функции и может быть использована для разработки лекарственных средств, влияющих на различные процессы в организме. В некоторых случаях возможно существование двух правильных конформаций белка (конформеров), выполняющих различные функции и имеющих примерно равные по энергии состояния в разных областях фазового пространства белковой молекулы. Образование правильной трехмерной структуры белка крайне важно для его корректной работы, так как нарушения в свертывании приводят к образованию неактивной молекулы с новыми свойствами. Фолдинг также имеет большое значение при синтезе новых молекул или фолдамеров. Они могут служить моделями биологических молекул и потенциально могут быть использованы при разработке новых функциональных наноматериалов.

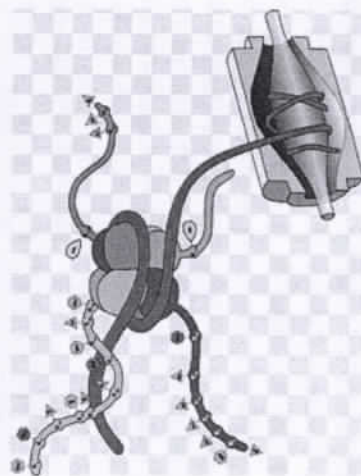


Рисунок 37. Посттрансляционная модификация.

- ❖ **Сплайсинг** белков (отщепление сигнальной последовательности, вырезание интрона и лигирование экзенов, например, инсулина).

- ❖ **Сплайсинг** белков или белковый сплайсинг — внутримолекулярный автокаталитический процесс, происходящий в некоторых белках, при котором внутренняя часть белка (под названием интеин) выщепляется из белка-предшественника с последующим лигированием оставшихся частей. На месте сплайсинга в белке-предшественнике находится цистеин или серин, то есть аминокислота с нуклеофильной боковой группой. Известные в настоящее время реакции сплайсинга не требуют экзогенных кофакторов и источников энергии (например, АТФ или ГТФ). До открытия сплайсинга белков словом «сплайсинг» обозначали сплайсинг пре-мРНК.

- ❖ **Убиквитирование** (ubiquitination) [лат. ubique — вездеущий и -in (e) — суффикс, обозначающий «подобный»] — процесс присоединения к белку «цепочки» молекул убиквитина. При убиквитировании происходит соединение С-конца убиквитина с боковыми остатками лизина в субстрате. Полнубиквитининовая цепочка навешивается в строго определенный момент и является сигналом, свидетельствующим о том, что данный белок подлежит деградации. Убиквитирование определенного белка способствует его деградации с помощью протеолитических ферментов, содержащихся в протеасомах. Процесс убиквитирования впервые описал А. Хершко в 1979 г. (Нобелевская премия за 2004 г. совместно с И. Роузом и А. Цихановером) [16,17].

Характеристика человеческого убиквитина

Количество аминокислот	76
Молекулярная масса	8564,47 Да
Изоэлектрическая точка(pI)	6,79
Гены	RPS27A (UBA80, UBCEP1), UBA52 (UBCEP2), UBB, UBC

- ❖ **Метилирование** белка (protein methylation) [франц. methyle — группа CH₃, от греч. methu — вино, мёд и hyle — дерево; древесный алкоголь] — процесс посттрансляционной модификации белка, заключающийся в энзиматическом присоединении метильной группы к аминокислотам полипептида. Метилирование белка осуществляется главным образом по аминокислотным остаткам лизина, аргинина и гистидина (N-метилование),

а также по остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислот (О-метилирование). В метилировании белка принимают участие разнообразные метилазы. Так, метилирование гистонов осуществляется гистоновыми метилтрансферазами (гистон-лизин метилтрансферазой и гистон-аргинин метилтрансферазой), которые катализируют перенос метильных групп из С-аденозилметинина на лизино-9 гистона H_3 приводит к связыванию этого, напр., метилирование H_1 , конденсации хроматина и ингибированию белка хроматина. Метилирование белка участвует в эпигенетической регуляции транскрипции. Метилирование генов, в передаче сигналов внутри клеток, в дифференцировке и других процессах. Впервые метилирование белка обнаружено Д. Комбом с соавторами в 1966 г. [15, 16, 17].

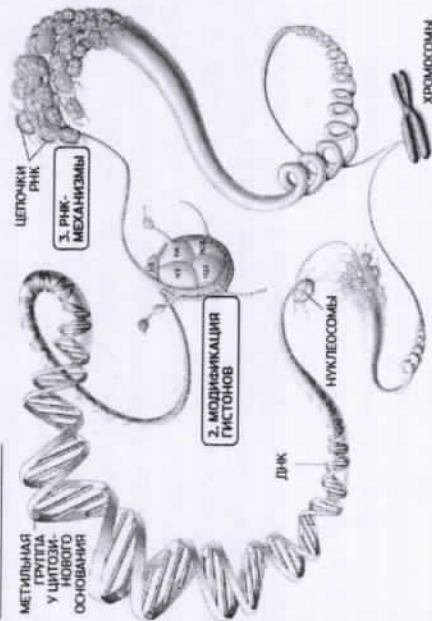


Рисунок 38. Метилирование ДНК

❖ **Фосфорилирование** — процесс переноса остатка фосфорной кислоты от фосфорилирующего агента-донора к субстрату, как правило, катализируемый ферментами и ведущий к образованию эфиров фосфорной кислоты. Обратимое фосфорилирование боковых цепей аминокислот — широко распространённый способ регуляции активности ключевых белков клетки, в том числе ферментов и белков сигнальных путей.

❖ **Гликозилирование** ферментативный процесс, в ходе которого происходит присоединение остатков сахаров к органическим молекулам. В процессе гликозилирования образуются гликозиды, или, в случае белков и липидов, гликопротеины и гликолипиды, соответственно. Гликозилирование является одной из форм котрансляционной и посттрансляционной

модификации белков. Гликозилирование имеет большое значение для структуры и функций мембранных и секретируемых белков. Преобладающая часть белков, синтезируемых в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, подвергается гликозилированию. Гликозилирование представляет собой ферментативный специфический процесс. В цитоплазме и ядре гликозилирование осуществляется в форме O-GlcNAc модификации. Известны пять классов гликанов: в случае N-связанных гликанов сахар присоединен к атому азота боковой цепи остатка аспарагина или аргинина; в O-связанных гликанах сахар присоединен к гидроксильным боковым цепям остатков серина, треонина, тирозина или гидроксизина или к атомам внешнего липидов, например, церамидов; фосфогликианы содержат остаток сахара, соединенный через фосфат с серином; C-связанные гликаны представляют собой редкую форму гликозилирования, в которой сахар соединяется с атомом углерода боковой цепи триптофана.

❖ **Глутатионирование.**

❖ **Гидроксилирование.**

❖ **Трансглутаминирование.**

Посттрансляционные модификации могут регулировать продолжительность существования белков в клетке, их ферментативную активность и взаимодействия с другими белками. В ряде случаев посттрансляционные модификации являются обязательным этапом созревания белка, в противном случае он оказывается функционально неактивным. К примеру, при созревании инсулина и некоторых других гормонов необходим ограниченный протеолиз полипептидной цепи, а при созревании белков плазматической мембраны — гликозилирование.

Посттрансляционные модификации могут быть как широко распространёнными, так и редкими, вплоть до уникальных. Примером универсальной модификации служит убиквитинирование (присоединение к белку цепи из нескольких молекул короткого белка убиквитина), которое служит сигналом к расщеплению этого белка протеасомой. Другой распространённой модификацией является гликозилирование — считается, что около половины белков человека гликозилировано. К редким модификациям относят тирозинирование/детирозинирование.

Один и тот же белок может подвергаться многочисленным модификациям. Так, гистоны (белки, входящие в состав хроматина у эукариот) в разных условиях могут подвергаться более чем 150 различными модификациям [8, 9, 14, 15, 16].

Посттрансляционные модификации делают на:

- модификации главной цепи;
- отщепление N-концевого остатка метионина;
- ограничение протолиз — удаление фрагмента белка, которое может происходить с концов (отщепление сигнальных последовательностей) или, в отдельных случаях, в середине молекулы (созревание инсулина);
- присоединение различных химических групп к свободным амин- и карбоксильной группам (N-ацелирование и другие);
- модификации боковых цепей аминокислот;
- присоединение или отщепление небольших химических групп (гликозилирование, фосфорилирование и другие);
- присоединение липидов и углеводородов;
- изменение стандартных аминокислотных остатков на нестандартные (образование цитруллина);
- образование дисульфидных мостиков между остатками цистеина;
- присоединение небольших белков (сумоилирование и убиквитинирование).

Посттрансляционные модификации белков (убиквитинирование и сумоилирование) могут быть связаны не только с их деградацией, но и определяют характер их функционирования. В частности, это определяет их локализацию в клетке, репарацию ДНК, регуляцию структуры хроматина. При этом наблюдаются взаимодействия (в том числе конкурентные) убиквитинирования и сумоилирования. В частности, эти два процесса конкурируют у дрожжей - сахаромидетов за модификацию PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), отвечающего за процессивность репликации ДНК. При этом полиубиквитинирование Lys63 (контролируемое генами пути репарации RAD6) ведет к безошибочной (немутагенной) репарации. Моносомоилирование ассоциируется с репликацией. Моноубиквитинирование Lys164 (также путь RAD6) активирует синтез ДНК в обход поврежденных полимеразы η (eta) и ζ (zeta). Убиквитинирование полимеразы ζ ассоциировано с мутагенезом, индуцируемым повреждениями ДНК. Моноубиквитинирование и моносомоилирование PCNA повышает спонтанный мутагенез в отсутствие повреждений ДНК [8,9,14].

Соотношение транскрипционной и посттрансляционной регуляции в синтезе конкретных белков и образовании белковых комплексов хорошо прослеживается в контроле клеточного цикла эукариот. Многие белки, контролирующие клеточный цикл проявляют свою активность кратковременно на определенных стадиях цикла. Несмотря на то, что

белковые комплексы, ответственные за клеточный цикл консервативны у разных эукариот, регуляция их синтеза и функционирования дивергировала весьма значительно. При этом изменение транскрипционной регуляции протонов сопровождалось (отражалось в) изменением посттрансляционной регуляции — в первую очередь их фосфорилирования. Эти данные получены L.J.Jensen et al., 2006 при сравнении методами микрочипов. Выявлено у *H. sapiens* 600 генов, периодически-экспрессирующихся в клеточном цикле, у *S. cerevisiae* — 600, у *Sch. pombe* — 500, у *A. thaliana* — 400 [16,17].

Белки, периодически необходимые в клеточном цикле, синтезируются благодаря периодической транскрипции соответствующих генов, но отнюдь не всегда в момент, когда они необходимы. Активация этих белков в нужный момент заключается в их фосфорилировании. Сделав свое дело в составе нужных комплексов, эти белки быстро разрушаются. Этот же принцип используется в прохождении или не прохождении контрольных точек (checkpoints) клеточного цикла, на которых происходит задержка после повреждения ДНК, обеспечивающая возможность для ее репарации. Вспомните курс генетики клеточного цикла.

Среди 228 протеинкиназ (кином) D.melanogaster, исследованных в культуре клеток с применением метода интерференции РНК (RNAi) 80 вовлечены в контроль клеточного цикла [15,16].

Фосфопротеинкиназы вместе с фосфатазами и ГТФазами (G-белками) составляют разветвленную сеть сигнальной трансдукции, координирующей множество путей (биосинтеза, деградации и т.д.), становления морфологии на клеточном и тканевом уровне, подвижности и т.д. Роль пусковых устройств при этом отводится ГТФазам. Они регулируют каскады фосфорилирования-дефосфорилирования, собственно представляющие собой пути сигнальной трансдукции [8,9,14,15,16].

Эндоплазматический ретикулум: модификация белков, гликозилирование

Одна из главных функций эндоплазматического ретикулума — ковалентное присоединение сахаров к белкам. Большинство белков, поступивших в полость эндоплазматического ретикулума, перед тем, как попасть в аппарат Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану или внеклеточное пространство, становятся гликопротеинами. Напротив, в митохондриях очень немногие белки гликозилированы, а те, которые гликозилированы, несут различные модификации сахаров.

Нельзя существенным для понимания процесса гликозилирования белков было открытие того факта, что к белкам в эндоплазматический

ретикулум присоединяется всего лишь один олигосахарид, состоящий из N-ацетилглюкозамина, маннозы и глюкозы и содержащий всего 14 остатков.

Так как этот олигосахарид всегда присоединяется к $-NH_2$ - группе боковой цепи остатка аспарагина, его называют N-связанным или аспаригин-связанным олигосахаридом.

Присоединение катализируется связанным с мембраной ферментом, активный центр которого обращен в полость эндоплазматического ретикулума. Это объясняет, почему белки цитозоля не гликозилируются таким способом.

Заранее сформированный предшественник олигосахарида переносится к нужному остатку аспарагина. Это одностадийная реакция, и она происходит практически сразу после того, как остаток аспарагина появится в полости эндоплазматического ретикулума в процессе переноса белка через мембрану.

Поскольку большинство белков импортируется в эндоплазматический ретикулум котрансляционно, N-связанный олигосахарид почти всегда добавляется в процессе синтеза белка, что обеспечивает наилучший доступ к нужным остаткам аспарагина. Сигналами для N-гликозилирования служат две последовательности Asp-X-Ser или Asp-X-Thr (где X-любая аминокислота, кроме пролина) [12,13].

Олигосахарид - предшественник удерживается в мембране эндоплазматического ретикулума молекулой специального липида - долихола.

Олигосахарид связан с долихолом высокоэнергетической фосфатной связью, обеспечивающей энергию активации для реакции гликозилирования. Прежде чем присоединиться к белку, олигосахарид строится из моносахаридов на этой связанной с мембраной молекуле липида. Вначале сахара активируются в цитозоле путем образования промежуточных продуктов - нуклеотид - сахаров, которые затем (прямо или косвенно) передают свой сахар молекуле липида в определенной последовательности. Пройдя этот путь, предшественник олигосахарида перескакивает с цитозольной стороны мембраны эндоплазматического ретикулума в его полость.

Все разнообразие N-связанных олигосахаридных структур возникает в результате модификаций молекулы исходного предшественника. Еще в эндоплазматическом ретикулуме у большинства гликопротеинов от олигосахарида отщепляется три остатка глюкозы и один остаток маннозы. "Доделка" или "процессинг" олигосахарида продолжается в аппарате Гольджи.

Наиболее широко распространены в гликопротеинах N-связанные олигосахариды. Гораздо реже олигосахариды связываются с гидроксильной группой боковой цепи остатка серина, треонина или гидроксилизина. Такие O-связанные олигосахариды образуются в аппарате Гольджи [11,12,13].

Модификация белков в аппарате Гольджи

В цис-зону аппарата Гольджи синтезированные в эндоплазматическом ретикулуме белки попадают после первичного гликозилирования и редукции там же нескольких сахаридных остатков. В конечном итоге все белки там имеют одинаковые олигосахаридные цепи, состоящие из двух молекул N-ацетилглюкозамина, шести молекул маннозы. В цис-цистернах начинается вторичная модификация олигосахаридных цепей и их сортировка на два класса. В результате олигосахариды на гидролитических ферментах, предназначенных для лизосом (богатые маннозой олигосахариды), фосфорилируются, а олигосахариды других белков, направляемых в секреторные гранулы, или к плазматической мембране, подвергаются сложным превращениям, теряя ряд сахаров и присоединяя галактозу, N-ацетилглюкозамин и сиаловые кислоты.

При этом возникает специальный комплекс олигосахаридов. Такие превращения олигосахаридов осуществляются с помощью ферментов - гликозилтрансфераз, входящих в состав мембран цистерн аппарата Гольджи. Так как каждая зона в диктиосомах имеет свой набор ферментов гликозилирования, то гликопротеиды как бы по эстафете переносятся из одного мембранного отсека ("этажа" в стопке цистерн диктиосомы) в другой и в каждом подвергаются специфическому воздействию ферментов. Так в цис-участке происходит фосфорилирование манноз в лизосомных ферментах и образуется особая маннозо-6-группировка, характерная для всех гидролитических ферментов, которые потом попадут в лизосомы [14,15,16].

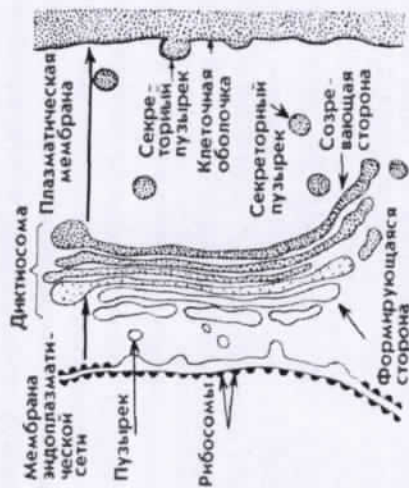


Рисунок 39. Аппарат Гольджи: структура, функция

В средней части диктосом протекает вторичное гликозилирование секреторных белков: дополнительное удаление маннозы и присоединение N-ацетилглюкозамина. В транс-участке к олигосахаридной цепи присоединяются галактоза и сиаловые кислоты.

Эти данные были получены совершенно разными методами. С помощью дифференциального центрифугирования удалось получить раздельные более тяжелые (цис-) компоненты аппарата Гольджи и более легкие (транс-) и определить в них наличие гликозидаз и их продуктов. С другой стороны, используя моноклональные антитела к различным ферментам с помощью электронной микроскопии удалось их локализовать прямо на срезах клеток.

В ряде специализированных клеток в аппарате Гольджи происходит синтез собственно полисахаридов.

Синтез же основного каркасного полисахарида растительных клеточных стенок, целлюлозы, происходит как уже говорилось, на поверхности плазматической мембраны.

В аппарате Гольджи клеток животных происходит синтез длинных неразветвленных полисахаридных цепей гликозаминогликанов. Один из них, гиалуроновая кислота, входящая в состав внеклеточного матрикса соединительной ткани, содержит несколько тысяч повторяющихся дисахаридных блоков. Многие гликозаминогликаны ковалентно связаны с белками и образуют протеогликаны (мукопротеины). Такие полисахаридные цепи модифицируются в аппарате Гольджи и связываются с белками, которые в виде протеогликанов секретируются клетками. В аппарате

Гольджи происходит также сульфатирование гликозаминогликанов и некоторых белков.

В аппарате Гольджи растительных клеток происходит синтез полисахаридов матрикса клеточной стенки (гемиллюлозы, пектины). Кроме того, диктосомы растительных клеток участвуют в синтезе и выделении слизи и муцинов [11,12,13].

Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала. Работа с тетрадью с конспектом.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы.

Задачи занятия: Получить представление о нуклеиновых кислотах, о нуклеопротеинах в тканях, механизмах биосинтеза и распада нуклеотидов и регуляции этих процессов.

1. Структура нуклеиновых кислот
2. Свойства генетического кода
3. Биосинтез белка

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, по физиологии растений.

Задание 1: Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|---|---|
| А. Первичная структура ДНК | 1. Модель -двойная спираль |
| Б. Вторичная структура ДНК | 2. 3', 5' -Фосфодиэфирные связи |
| В. Для первичной структуры РНК характерны связи | 3. Последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи |
| Г. Для вторичной структуры ДНК характерны связи | 4. Водородные связи между азотистыми основаниями |
| | 5. Силы гидрофобного взаимодействия между выше- и нижележащими азотистыми основаниями |

Задание 2: Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|--------------------|---|
| А Аденозин | 1 Пиримидиновый нуклеозид |
| Б Гуанин | 2 Азотистое основание пуринового ряда |
| В Цитозин | 3 Пиримидиновый нуклеотид |
| Г Уридинтрифосфат | 4 Азотистое основание пиримидинового ряда |
| Д Тимидин | 5 Пуриновый нуклеозид |
| Е Гуанозиндифосфат | 6 Пуриновый нуклеотид |

Задание 3: Назовите нуклеотиды, структура которых схематически изображена ниже:

- 1) аденин – дезоксирибоза – фосфат – фосфат;
- 2) цитозин – рибоза – фосфат;
- 3) гуанин – дезоксирибоза – фосфат – фосфат – фосфат;
- 4) урацил – рибоза – фосфат – фосфат;

Задание 4: Изучить и записать содержание незаменимых аминокислот в различных белках:

Содержание незаменимых аминокислот в различных белках (в г на 100 г белка)

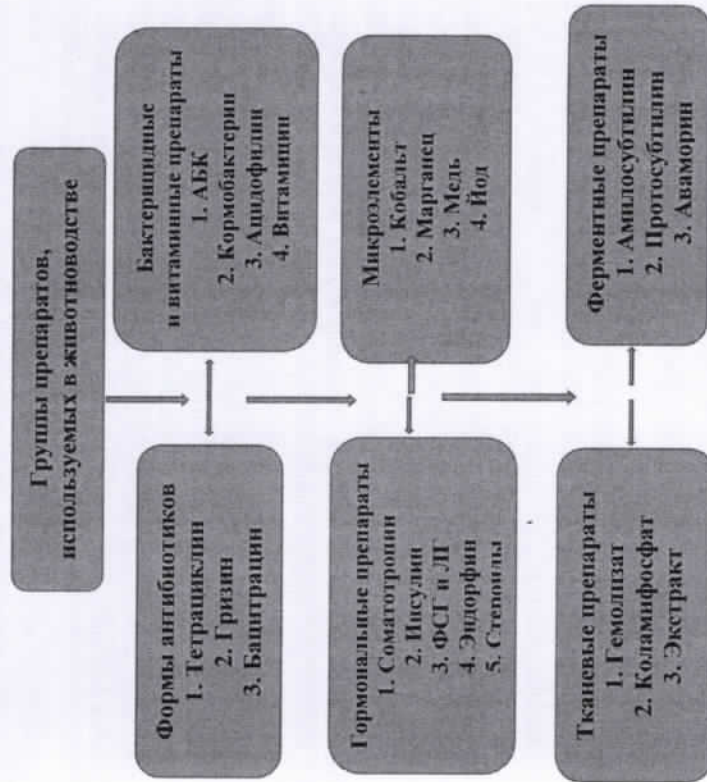
Аминокислоты	Молоко от коровы	Эталоны ФАО	Соя	Горох	Рис	Пшеница	Кукуруза	Ячмень
Лизин	6,6	4,2	6,6	6,5	3,5	2,6	2,5	3,2
Триптофан	1,4	1,4	1,3	0,8	1,3	1,3	0,6	1,2
Метионин	2,4	2,2	1,4	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7
Треонин	4,6	2,8	3,8	3,8	3,5	2,6	3,2	2,9
Валин	6,9	4,2	5,4	4,5	6,5	4,6	4,4	5,4
Лейцин	9,9	4,8	7,9	6,5	8,0	6,9	11,2	7,2
Изолейцин	6,6	4,2	5,3	5,0	4,6	3,4	2,7	3,5
Фенилаланин	4,9	2,8	5,1	4,8	5,2	4,3	4,1	5,1

Задание 5. Изучить и записать содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов:

Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов (на 100 г белка)

Аминокислота	Микроорганизмы			
	дрожжи	водоросли	бактерии	грибы
Валин	5-7	5-7	4-6	5-7
Лейцин	6-9	6-10	5-11	6-9
Изолейцин	4-6	4-7	5-7	3-6
Треонин	4-6	3-6	4-5	3-6
Метионин	1-3	1,5-2,5	2-3	2,5
Лизин	6-8	5-10	6-7	3-7
Фенилаланин	3-5	3-5	3-4	3-6
Триптофан	1-1,5	до 2	1,5	1,5-2

Задание 6. Зарисовать схему используемых в животноводстве средств:



Практическое занятие №2.

Тема: Методы генной инженерии

Цель: Ознакомление методами генной инженерии.

План

1. Методы клеточной и генной инженерии и их особенности.
2. Значение и использование культуры тканей в клеточной и генной инженерии.
3. Первые опыты культуры тканей и клеток растений.
4. Основной метод в клеточной инженерии.
5. Основной метод в генной инженерии

Метод клеточной и генной инженерии дают возможность создавать организмы с новыми, в том числе и не встречающимися в природе комбинациями наследственных свойств.

Клеточная инженерия основана на культивировании отдельных клеток или тканей на искусственных питательных средах. Клеточные культуры используют для получения ценных веществ (культура клеток женьшеня продуцирует лекарственное вещество). Метод вегетативного размножения в пробирке (*in vitro*) позволяет бесконечно размножать одно растение из кусочков его стебля, почки и т.д. Этот метод применим для овощей, культур, плодовых деревьев, декоративных растений и другие.

Метод гибридизации клеток приобрел большое значение в селекции. Он позволяет гибридизировать соматические клетки, культивируемые на искусственных средах вне организма, не только между собой, но и с клетками животных другого вида. Широко применяют методику слияния протопластов (клеток, лишенных своих оболочек при ферментативной обработке) у растений.

Для изучения закономерностей функционирования дифференцированных клеток пересаживают ядра из соматических клеток в яйцеклетки с предварительно удаленными ядрами. В 1977 году проведены успешные эксперименты по клонированию овец. Этот эксперимент показал, что соматические клетки млекопитающих содержат полную генетическую информацию взрослого организма [9,10].

Генная инженерия — совокупность методов и технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), выделения генов и введения их в другие организмы. Задача этих методов состоит в получении индивидуальных генов или генетических структур и введении их в новое генетическое окружение с целью создания организма с новыми, заранее

предопределенными признаками. Методами генной инженерии осуществлен синтез биологически активных веществ и препаратов в трансформированных клетках, а также культивирование генов больных и здоровых людей в клетках других организмов с целью изучения молекулярных основ наследственных заболеваний человека и разработки новых методов их лечения.

Клеточная инженерия — это направление в науке и селекционной практике, которое изучает методы гибридизации соматических клеток, принадлежащих разным видам, возможности клонирования тканей или целых организмов из отдельных клеток.

Одним из распространенных методов селекции растений является метод гаплоидов — получения полноценных гаплоидных растений из спермиев или антектоток.

Получены гибридные клетки, совмещающие свойства лимфоцитов крови и опухолевых, активно размножающихся клеток. Это позволяет быстро и в нужных количествах получать антитела.

Культура тканей — применяется для получения в лабораторных условиях растительных или животных тканей, а иногда и целых организмов. В растениеводстве используется для ускоренного получения чистых диплоидных линий после обработки исходных форм колхицином.

Генная инженерия — искусственное, целенаправленное изменение генотипа микроорганизмов с целью получения культур с заранее заданными свойствами.

Основной метод — выделение необходимых генов, их клонирование и введение в новую генетическую среду. Метод включает следующие этапы работы:

- выделение гена его объединение с молекулой ДНК клетки, которая сможет воспринимать донорский ген в другой клетке (включение в плазмиду);
- введение плазмиды в геном бактериальной клетки — реципиента;
- отбор необходимых бактериальных клеток для практического использования;
- исследования в области генной инженерии распространяются не только на микроорганизмы, но и на человека. Они особенно актуальны при лечении болезней, связанных с нарушениями в иммунной системе, в системе свертывания крови, в онкологии.

Клонирование. С биологической точки зрения клонирование — это вегетативное размножение растений и животных, потомство которых несет наследственную информацию, идентичную родительской. В природе

клонироваться растения, грибы, простейшие животные, т.е. организмы, размножающиеся вегетативным путем. В последние десятилетия этот термин стали употреблять при пересадке ядер одного организма в яйцеклетку другого. Примером такого клонирования стала известная овечка Долли, полученная в Англии в 1997 г. [8,9,10].

Биотехнология – процесс использования живых организмов и биологических процессов в производстве лекарств, удобрений, средств биологической защиты растений; для биологической очистки сточных вод, для биологической добычи ценных металлов из морской воды.

Включение в геном кишечной палочки гена, ответственного за образование у человека инсулина позволило наладить промышленное получение этого гормона.

В сельском хозяйстве удалось генетически изменить десятки продовольственных и кормовых культур. В животноводстве использование гормона роста, полученного биотехнологическим путем, позволило повысить удой молока; с помощью генетически измененного вируса создать вакцину против герпеса у свиней. С помощью вновь синтезированных генов, введенных в бактерии, получают ряд важнейших биологически активных веществ, в частности гормоны и интерферон. Их производство составило важную отрасль биотехнологии.

По мере развития генной и клеточной инженерии в обществе возникает все больше и больше беспокойства по поводу возможных манипуляций с генетическим материалом. Некоторые опасения теоретически оправданы. Например, нельзя исключить пересадок генов повышающих устойчивость к антибиотикам некоторых бактерий, создания новых форм пищевых продуктов, однако эти работы контролируются государствами и обществом. В любом случае опасность от болезней, недоедания и других потрясений значительно выше, чем от генетических исследований.

Перспективы генной инженерии:

- создание организмов, полезных для человека;
- получение новых лекарственных препаратов;
- коррекция и исправление генетических патологий.

Таким образом генная и клеточная инженерия – являются важнейшими методами(инструментами), лежащими в основе современной биотехнологии [10,11].

Методы клеточной инженерии направлены на конструирование клеток нового типа. Они могут быть использованы для воссоздания жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, для объединения целых

клеток, принадлежавших различным видам с образованием клетки, несущей генетический материал обеих исходных клеток, и других операций.

Генно-инженерные методы направлены на конструирование новых, не существующих в природе сочетаний генов. В результате применения генно-инженерных методов можно получить рекомбинантные (модифицированные) молекулы РНК и ДНК, для чего производится выделение отдельных генов (кодирующих нужный продукт), из клеток какого-либо организма. После проведения определенных манипуляций с этими генами осуществляется их введение в другие организмы (бактерии, дрожжи и млекопитающие), которые, получив новый ген (гены), будут способны синтезировать конечные продукты с измененными, в нужном человеку направлении, свойствами. Иными словами, генная инженерия позволяет получать заданные (желаемые) качества изменяемых или генетически модифицированных организмов или так называемых «трансгенных» растений и животных.

Наибольшее применение генная инженерия нашла в сельском хозяйстве и в медицине.

Люди всегда задумывались над тем, как можно научиться управлять природой, и искали способы получения, например, растений с улучшенными качествами: с высокой урожайностью, более крупными и вкусными плодами или с повышенной холодостойкостью. С давних времен основным методом, который использовался в этих целях, была селекция. Она широко применяется до настоящего времени и направлена на создание новых и улучшение уже существующих сортов культурных растений, пород домашних животных и штаммов микроорганизмов с ценными для человека признаками и свойствами [10].

Селекция строится на отборе растений (животных) с выраженными благоприятными признаками и дальнейшим скрещивании таких организмов, в то время как генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат клетки. Важно отметить, что в ходе традиционной селекции получить гибриды с искомой комбинацией полезных признаков весьма сложно, поскольку к потомству передаются очень большие фрагменты геномов каждого из родителей, в то время как генно-инженерные методы позволяют работать чаще всего с одним или несколькими генами, причем их модификации не затрагивают работу других генов. В результате, не теряя других полезных свойств растения, удается добавить еще один или несколько полезных признаков, что весьма ценно для создания новых сортов и новых форм растений. Стало возможным изменять у растений, например, устойчивость к климату и стрессам, или их чувствительность к насекомым или болезням, распространённым в определённых регионах, к засухе и т.д.

Учёные надеются даже получить такие породы деревьев, которые были бы устойчивы к пожарам. Ведутся широкие исследования по улучшению пищевой ценности различных сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза, соя, картофель, томаты, горох и др.

Выделяют «три волны» в создании генно-модифицированных растений:

Первая волна – конец 1980-х годов – создание растений с новыми свойствами устойчивости к вирусам, паразитам или гербицидам. В растениях «первой волны» дополнительно вводили всего один ген и заставляли его «работать», то есть синтезировать один дополнительный белок. «Полезные» гены «брали» либо у вирусов растений (для формирования устойчивости к данному вирусу), либо у почвенных бактерий (для формирования устойчивости к насекомым, гербицидам).

Вторая волна – начало 2000-х годов – создание растений с новыми потребительскими свойствами: масляные культуры с повышенным содержанием и измененным составом масел, фрукты и овощи с большим содержанием витаминов, более питательные зерновые и прочие.

В наши дни ученые создают растения «третьей волны», которые в ближайшие 10 лет появятся на рынке: растения-вакцины, растения-биореакторы для производства промышленных продуктов (компонентов для различных видов пластика, красителей, технических масел), растения-фабрики лекарств и другие.

Генно-инженерные работы в животноводстве имеют другую задачу. Вполне достижимой целью при современном уровне технологии является создание трансгенных животных с определённым целевым геном. Например, ген какого-нибудь ценного гормона животного (например, гормона роста) искусственно внедряется в бактерию, которая начинает продуцировать его в больших количествах. Еще один пример: трансгенные козы, в результате введения соответствующего гена, могут вырабатывать специфический белок, фактор VIII, который препятствует кровотечению у больных, страдающих гемофилией, или фермент, тромбокиназу, способствующий рассасыванию тромба в кровеносных сосудах, что актуально для профилактики и терапии тромбозов у людей. Трансгенные животные вырабатывают эти белки намного быстрее, а сам способ значительно дешевле традиционного [7,8,9].

В конце 90-х годов XX в. учёные США вплотную подошли к получению сельскохозяйственных животных методом клонирования клеток эмбрионов, хотя это направление нуждается еще в дальнейших серьезных исследованиях. А вот в ксенотрансплантации – пересадке органов от одного вида живых организмов другому, – достигнуты несомненные результаты.

Наибольшие успехи получены при использовании свиней, имеющих в геном перенесенные гены человека, в качестве доноров различных органов. В этом случае наблюдается минимальный риск отторжения органа.

Учёные также предполагают, что перенос генов поможет снизить аллергию человека к коровьему молоку. Целенаправленные изменения в ДНК коров должны привести также к уменьшению содержания в молоке насыщенных жирных кислот и холестерина, что сделает его еще более полезным для здоровья.

Потенциальная опасность применения генетически модифицированных организмов выражается в двух аспектах: безопасность продовольствия для здоровья людей и экологические последствия. Поэтому важнейшим этапом при создании генно-модифицированного продукта должна быть его всесторонняя экспертиза во избежание опасности того, что продукт содержит протейны, вызывающие аллергию, токсичные вещества или какие-то новые опасные компоненты [7,8,9,10].

Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала. Работа с тетрадью с конспектом.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы. Ознакомить студентов с баллами

Задачи занятия: Изучить методов и их особенностей генной инженерии.

Значение клеточной и генной инженерии в науке и селекционной практике.

Первые опыты культуры тканей и клеток растений.

Современное состояние методов клеточной и генной инженерии

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, по физиологии растений.

Задание: Ответьте на следующие вопросы, приводя примеры:

1. Производством лекарств, гормонов и других биологических веществ занимается такое направление, как

- генная инженерия
- биотехнологическое производство
- сельскохозяйственная промышленность
- агрономия

2. В каком случае метод культуры тканей окажется наиболее полезным?

- при получении гибрида яблоки и груши
- при выведении чистых линий гладкосемянного гороха
- при необходимости пересадить кожу человеку при ожоге

- при получении полипептидных форм капюсты и редьки
3. Для того чтобы искусственно получить человеческий инсулин методами генной инженерии в промышленных масштабах, необходимо ...
- ввести ген, отвечающий за синтез инсулина в бактерии, которые начнут синтезировать человеческий инсулин
 - ввести бактериальный инсулин в организм человека
 - искусственно синтезировать инсулин в биохимической лаборатории
 - выращивать культуру клеток поджелудочной железы человека, отвечающей за синтез инсулина.

Практическое задание №3.

Тема: Ферменты, используемые в генной инженерии

Цель: Изучение ферментов и их свойства используемых в генной инженерии.

План

1. Открытие и получение ферментов для использования в клеточной и генной инженерии.
2. Значение и классификация ферментов в клеточной и генной инженерии.
3. Основные ферменты используемые в клеточной и генной инженерии.

Общепринято термины "рестриктаза", "эндонуклеаза рестрикции" и "сайт специфическая эндонуклеаза" считать синонимами.

Все рестрикционные эндонуклеазы бактерий узнают специфические, довольно короткие последовательности ДНК и связываются с ними. Этот процесс сопровождается разрезанием молекулы ДНК либо в самом сайте узнавания, либо в каком-то другом, что определяется типом фермента. Наряду с рестрикционной активностью бактериальный штамм обладает способностью метилировать ДНК; для этого процесса характерна такая же специфичность в отношении последовательностей ДНК, как и для рестрикции. Метилаза добавляет метильные группы к адениновым или цитозиновым остаткам в том же сайте, в котором связывается рестрикционный фермент. В результате метилирования сайт становится устойчивым к рестрикции. Следовательно, метилирование защищает ДНК от разрезания.

Общепринято термины "рестриктаза", "эндонуклеаза рестрикции" и "сайт специфическая эндонуклеаза" считать синонимами.

Все рестрикционные эндонуклеазы бактерий узнают специфические, довольно короткие последовательности ДНК и связываются с ними. Этот процесс сопровождается разрезанием молекулы ДНК либо в самом сайте узнавания, либо в каком-то другом, что определяется типом фермента. Наряду с рестрикционной активностью бактериальный штамм обладает способностью метилировать ДНК; для этого процесса характерна такая же специфичность в отношении последовательностей ДНК, как и для рестрикции. Метилаза добавляет метильные группы к адениновым или цитозиновым остаткам в том же сайте, в котором связывается рестрикционный фермент. В результате метилирования сайт становится устойчивым к рестрикции. Следовательно, метилирование защищает ДНК от разрезания.

Рестриктазы впервые были выделены из *E. coli* в 1968 г. Оказалось, что они способны разрезать (плавить) молекулы ДНК на разных сайтах (местах) рестрикции. Эти ферменты получили название эндонуклеаз класса I. Затем у бактерий были обнаружены эндонуклеазы класса II, которые распознают в чужеродной ДНК сайты рестрикции специфически и на этих сайтах тоже осуществляют рестрикцию. Именно ферменты этого класса стали использоваться в генной инженерии. Тогда же были открыты ферменты класса III, которые плавают ДНК рядом с сайтами распознавания, но эти ферменты не имеют значения в генной инженерии [18,19].

Действие системы рестрикции-модификации «рационализуется» так называемыми палиндромными (распознающими последовательностями) участками оснований, которые являются сайтами рестрикции ДНК. Палиндромные последовательности — это последовательности оснований, которые одинаково читаются вперед и назад, как, например, последовательность букв радар. Поскольку цепи ДНК обладают антипараллельным направлением, то считают, что последовательность является палиндромной, если она идентична, когда читается в направлении от 5'-к 3'-концу на верхней и 3'-к 5'-концу на нижней цепи, а именно:

Палиндромы могут быть любых размеров, но большинство тех палиндромов, которые используют в качестве сайтов узнавания рестриктазами, состоят из 4, 5, 6 и реже 8 оснований.

Рестриктазы — это абсолютно необходимый инструмент в генной инженерии для вырезания интересующих фрагментов (генов) из больших молекул ДНК. Поскольку известно более 100 ферментов рестрикции, то это позволяет выбрать рестриктаз и селективное вырезание фрагментов из исходной ДНК.

Замечательной особенностью рестриктаа является то, что они производят разрезы молекул на несколько фрагментов (рестриктвов) ДНК уступами, в результате чего в образующихся концах одна цепь длиннее другой, образуя своеобразный хвост. Такие концы (хвосты) получили название «липких» концов т. к. они способны к самокомплементарности.

Рассмотрим результаты рестрикции на примере одной из наиболее известных рестриктаз Eco RI из системы рестрикции—модификация *E. coli*. Вместо того, чтобы плавить ДНК в центре палиндромной последовательности узнавания, этот фермент плавит ДНК за пределами центра и производит 4 самокомплементарных («липких») конца, состоящих из разного количества нуклеотидов, а именно:

Эти «липкие» концы в генно-инженерных опытах полезны по той причине, что они могут быть воссоединены комплементарно при низких температурах, что позволяет эффективное смыкание ДНК-фрагментов [18,19].



Рисунок 40. Рестриктазы
Различают 3 основных класса рестриктаз: 1, 2 и 3.

Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности, но

- рестриктазы 1-го класса осуществляют разрезы в произвольных точках молекулы ДНК, а
- рестриктазы 2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии.



Рисунок 41. Секвенирование нуклеиновых кислот.

Ферменты второго класса состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

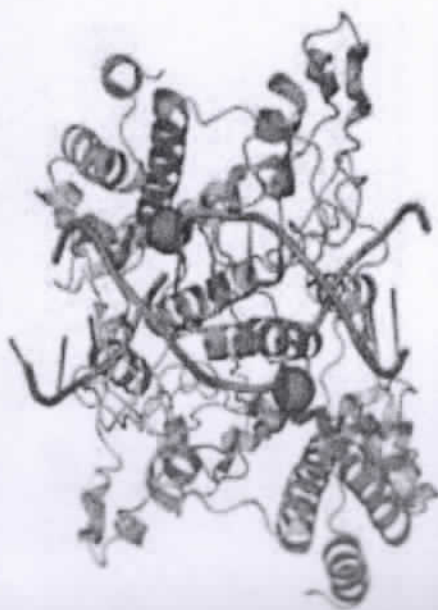
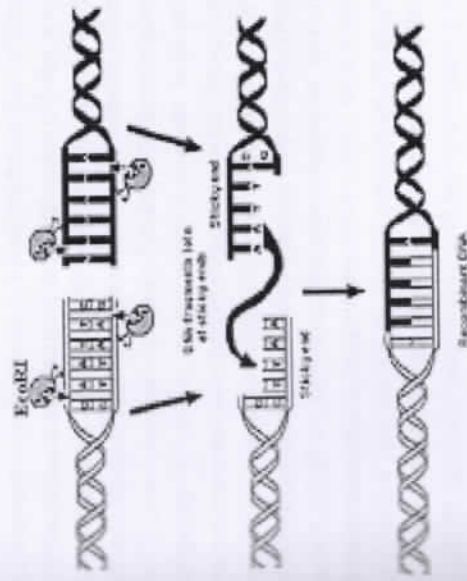


Рисунок 42. Эндонуклеазы рестрикции

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса 2, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются также, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары ферментов называют изоэнзимами. Различают истинную изоэнзимную,

обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкоцепными рестриктазами и незначительна при применении крупноцепных эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупноцепными рестриктазами, либо применяют прием "полорестрикции", т.е. рестриктицию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте [15,18,19].



Restriction Enzyme Action of EcoRI

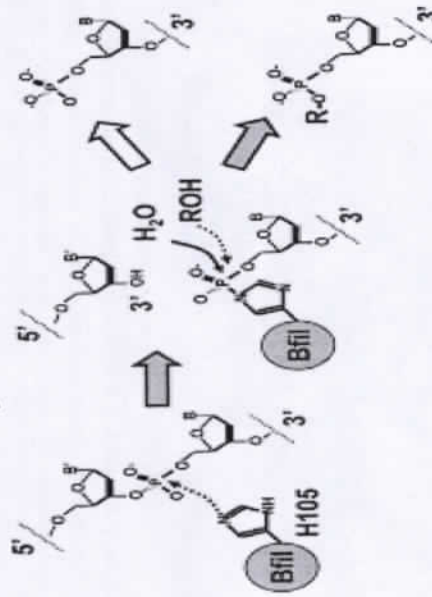
Рисунок 43. Действия эндонуклеазы рестрикции EcoRI

Механизм действия рестриктаз

В качестве мишеней (мест узнавания) часто выступают палиндромы из 4-6 пар оснований - сайты рестрикции. Точки узнавания рестриктазами симметричны относительно поворота на 180°C, то есть последовательность нуклеотидов слева направо в одной нити такая же, как справа налево в другой. Симметрия подразумевает, что те из них, которые должны быть метилированы, встречаются на обеих цепях ДНК. В результате сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), либо метилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрезают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Большинство рестриктаз класса 2 узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупноцепные. Мелкоцепные рестриктазы узнают тетра- и пента-нуклеотиды и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупноцепные, узнающие последовательности из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Например, в ДНК бактериофага T7, состоящей из 40000 пар оснований, отсутствует последовательность,



узнаваемая рестриктазой R1 из E. Coli [15,18,19].

К мелкоцепным относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупноцепным - Eco R I (из *Escherichia coli*) и Hind III. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, - через 4096 пар оснований. Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то

Полностью метилированный сайт не подвержен ни рестрикции, ни модификации. Полуметилированный сайт не узнается ферментом рестрикции, но может быть превращен с помощью метилазы в полностью метилированный. У бактерий метилирование, как правило, связано с сохранением имеющегося состояния модификации. Репликация полностью метилированной ДНК ведет к образованию полуметилированной ДНК. Вероятно, узнавание полуметилированных сайтов представляет собой обычный этап функционирования метилазы *in vivo*.

Неметилированный сайт-мишень представляет собой субстрат либо для рестрикции, либо для модификации *in vitro*. В клетке немодифицированная ДНК с большей вероятностью рестрицируется. Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, а затем рядом разрезается другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место экзонуклеотическая деградация. Происходит эффективный гидролиз АТФ, роль которого еще не выяснена.

Каким образом фермент узнает один сайт, а разрезает другой, достаточно удаленный? Важно отметить, что белок никогда не отделяется от молекулы ДНК, с которой он первоначально связался. Если фермент инкубировать со смесью модифицированной и немодифицированной ДНК, он предпочтительно разрезает немодифицированную ДНК. Следовательно, узнавая сайт связывания, белок не отделяется от неметилированной ДНК для того, чтобы найти сайт разрезания.

Существуют две альтернативные модели, объясняющие взаимосвязь между сайтами узнавания и разрезания: в соответствии с одной из них движется фермент, согласно другой модели, перемещается ДНК. Если движется фермент, то его перемещение вдоль ДНК будет продолжаться до тех пор, пока он не сделает выбор сайта разрезания. Если же движется ДНК, то фермент остается прикрепленным в сайте узнавания, а ДНК протаскивается через второй сайт связывания на ферменте, и это продолжается до тех пор, пока фермент не достигнет области разрезания (пока не охарактеризованной). Получены электронно-микроскопические данные, свидетельствующие, что фермент вызывает образование петли в ДНК и остается, по-видимому, связанным с сайтом узнавания после разрезания; эти данные подтверждают вторую модель [15,16,18,19].

Построение рестрикционных карт

Ферменты рестрикции стали эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК очень большого

размера в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. С помощью метода электрофореза в агарозном геле раздел фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты вообще не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно элюировать (вымывать) в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами.

Сравнение размеров фрагментов ДНК, полученных после обработки определенного участка генома набором рестрицирующих нуклеаз позволяет построить рестрикционную карту, на которой указано положение каждого сайта рестрикции относительно других участков.

Молекулу ДНК длиной 5000 пар нуклеотидов (п.н.) обрабатывают специально рестриктазами А и В. Фрагменты разделяют электрофорезом. Фермент А разрезал ДНК на 4 фрагмента размером 2100, 1400, 1000 и 500 п.н. Обработка рестриктазой В дала 3 фрагмента: 2500, 1300 и 1200 п.н. (рис. 14). Для определения расположения сайтов рестрикции этих ферментов на следующем этапе применяют процедуру двойного расщепления – обрабатывают ДНК двумя эндонуклеазами. Обработка изучаемого фрагмента одновременно двумя рестриктазами дала 6 фрагментов: 1900, 1000, 800, 600, 300 и н. [14,15,16,18,19].

При конструировании векторных плазмид используют специальные ферменты, которые можно подразделить на несколько групп:

- 1) ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- 2) ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- 3) ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- 4) ферменты, позволяющие осуществлять изменение структуры концов фрагментов ДНК.

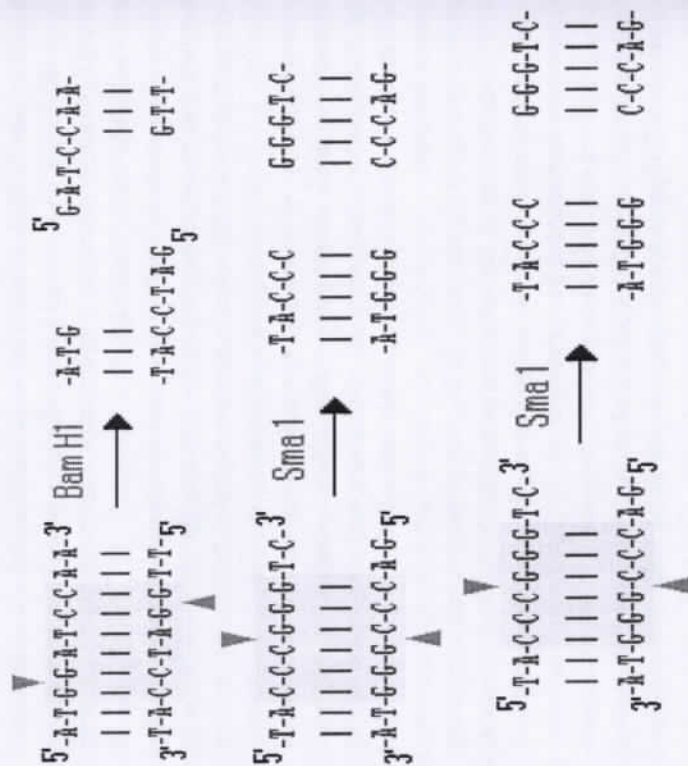


Рисунок 44. Рестрикция

Рестриктазы. Для выделения фрагментов ДНК используют ферменты, которые специфически расщепляют молекулы ДНК, - бактериальные *эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)*.

Все рестрикционные эндонуклеазы узнают специфические, довольно короткие последовательности ДНК и связываются с ними. Этот процесс, определяемый типом фермента, сопровождается разрезанием молекулы ДНК, либо в самом сайте узнавания (последовательности, которые распознаются эндонуклеазой и в которых происходит расщепление молекулы ДНК), либо в каком-то другом сайте.

Различают 3 основных класса рестриктаз. Рестриктазы 1-го класса осуществляют разрезы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы 2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. В генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса, которые узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощеплящие.

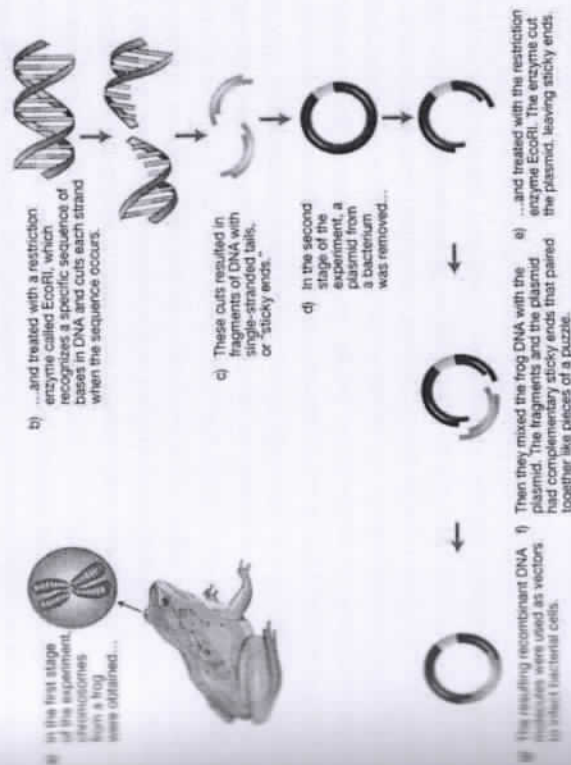


Рисунок 45. Полученные молекулы рекомбинантной ДНК.

Мелкощеплящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулу гораздо больше разрывов, чем крупнощеплящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов.

Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень мала при обработке мелкощеплящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощеплящих эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощеплящими рестриктазами, либо применяют прием «недорестрикции», т.е. рестрикцию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте [14,15,16].

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса 2. Для их обозначения используются сокращенные названия микроорганизмов — продуцентов. Род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид — двумя строчными; штамм обычно не указывается. Римские цифры —

остове молекулы, то есть восстановление связи между 3'-гидроксильной концевой группой одной цепи и 5'-фосфатной группой другой, проводят ферментом ДНК-лигазой бактериофага Т4, которую открыли в 1961 г. Мелльсон и Вейгл. Лигаза фага Т4 универсальна, так как помимо лигирования «липких» концов способна катализировать реакцию восстановления двухцепочечных фрагментов ДНК с «тупыми» концами, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты связываются с ферментом [14,15,16].

Обратная транскриптаза (ревертаза). При конструировании векторных молекул используется также фермент, синтезирующий ДНК на матрице РНК, который называется *обратная транскриптаза* или *ревертаза*.

При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Темин выдвинула гипотезу о существовании вирусспецифичного фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. В 1970 г. Темин с Мизутани, а также независимо от них Балтимор, открыли искомый фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название обратная транскриптаза, или ревертаза. Она обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК—ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах.

Ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК. Полимеразы. Впервые ДНК-полимераза была выделена Каррибергом с соавторами в 1958 году из *E. coli*. ДНК-полимераза *IE. coli* (Pol I) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК, а только с одноцепочечными формами, полученными после денатурации. Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5'—3' полимеразной, 3'—5' экзонуклеазной и 5'—3' экзонуклеазной.

Порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма. Например, *HpaI* и *HraI* — это соответственно первая и вторая рестрицирующие эндонуклеазы класса 2, выделенные из *Haemophilus parainfluenzae*.

Одна из самых употребляемых в генной инженерии рестриктаз *EcoRI* — это эндонуклеаза, выделенная из *Escherichia coli*. Подобно многим другим рестриктазам, этот фермент расщепляет ДНК по *палиндромной последовательности*, т.е. короткому сегменту ДНК, в котором обе цепи при считывании в направлении 5'—>3' имеют одинаковую последовательность. Для *EcoRI* это последовательность 5'-GAATTC-3'. *EcoRI* расщепляет фосфодиэфирные связи обеих цепей между G и A. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом («липкие» концы). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена. Эти комплементарные «липкие» концы (AATT), удерживаются вместе за счет спаривания оснований. Их, однако, можно легко отделить друг от друга путем небольшого нагревания. При охлаждении липкие концы гибридизуются вновь в правильной ориентации.

Помимо рестриктаз, гидролизующих (расщепляющих) полинуклеотидную цепь с образованием «липких» концов, существуют рестриктазы, которые вносят разрывы в цепи строго друг против друга с образованием фрагментов ДНК с «тупыми» концами. Сайты узнавания для них могут состоять из четырех, пяти, шести, восьми или более пар нуклеотидов.

Обработка образца ДНК определенной рестриктазой всегда дает один и тот же набор фрагментов — при условии, что расщепление происходит по всем сайтам узнавания. Если использовать несколько ферментов рестрикции и сначала обработать ДНК каждой из рестриктаз в отдельности, а затем их комбинациями, можно построить физическую карту данной ДНК, т.е. установить порядок следования сайтов рестрикции вдоль молекулы. Определив размер полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза, можно найти положение рестрикционных сайтов [14,15,16,18,19].

ДНК-лигаза. Создание рекомбинантных ДНК было бы невозможно без использования рестрицирующих эндонуклеаз. Однако одних только ферментов рестрикции недостаточно для осуществления молекулярного клонирования. Водородные связи между теми четырьмя основаниями, которые образуют липкие концы, недостаточно прочны, чтобы удерживать два объединившихся фрагмента ДНК. Устранение разрывов в сахарофосфатном

Для целей генетической инженерии часто используют, так называемый, фрагмент Кленова, состоящий из полимеразы и 3'-5' экзону- клезы. Фрагмент Кленова (Poi IK) обычно используют для дотройки одноцепочечных 5'-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых рестриктазами, до тупых; для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК, а также для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

Другая полимераз поли (А) — полимераз *E. coli* была открыта в 1973 году Сиппелом. Она катализирует присоединение к 3'-ОН концу одноцепочечных молекул РНК поли (А) последовательностей. Применяется при подготовке молекул РНК к копированию с них комплементарной ДНК для введения радиоактивной метки в 3'-конец РНК.

Терминальная трансфераза (концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза). Фермент был обнаружен Боллумом в 1962 году в тимусе теленка. Его субстратом при использовании в качестве кофактора ионов Mg^{2+} является одноцепочечная ДНК с 3'-ОН концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одно цепочечным 3'-ОН концом. Если в качестве кофактора используются Co^{2+} , этот фермент может катализировать присоединение дезоксирибонуклеотидов к 3'-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами. При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, дезоксирибонуклеотидов лишь одного типа образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные 1-цепочечные 3'-концы. Таким же образом можно построить другим молекулам ДНК гомополимерные 3'-концы, комплементарные первым. Смешение полученных препаратов ДНК при определенных условиях может приводить к формированию гибридных молекул ДНК. Именно с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы в 1972 г. был выполнен первый эксперимент по рекомбинации молекул ДНК *in vitro* [14,15,16,18,19].

Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала. Работа с тетрадью с конспектом.
4. Задание на дом. 5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

Задачи занятия: Изучить свойства и особенности ферментов используемых в генной инженерии.

Значение ферментов клеточной и генной инженерии.

Первые опыты получения ферментов используемых в генной инженерии.

Основные ферменты используемые в клеточной и генной инженерии.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, по физиологии растений.

1. Ферменты, фрагментирующие нуклеотидные последовательности — нуклеазы. Эти ферменты катализируют гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей в молекулах нуклеиновых кислот с образованием 3'-гидроксильной или 5'-гидроксильной группы. Нуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК, получили название ДНКазы, соответственно нуклеазы, расщепляющие РНК, — РНКазы. Известны нуклеазы, способные расщеплять как ДНК, так и РНК. Нуклеазы, катализирующие гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей внутри молекулы ДНК, а также кольцевые молекулы ДНК относятся к эндонуклеазам. При использовании эндонуклеаз исследователи получают набор полинуклеотидных фрагментов различной длины.

Эксонуклеазы расщепляют нуклеотидные последовательности с концов цепей, причем некоторые эксонуклеазы способны отщеплять по одному нуклеотиду, тогда как другие — олигонуклеотиды.

В генетической инженерии широко используется особая группа ферментов — эндонуклеазы рестрикции, или рестриктазы. Эти ферменты способны распознавать в молекулах ДНК определенные полинуклеотидные последовательности, которые называются сайтами рестрикции. Рестриктазы с различными сайтами узнавания являются основным инструментом в генетической инженерии. Обычно для расщепления (фрагментации) молекул ДНК используются рестриктазы, распознающие в большинстве случаев палиндромные последовательности, состоящие из 4–8 нуклеотидов. Например, рестриктаза *EcoRI* распознает последовательность нуклеотидов, расположенных в каждой из цепей на равном расстоянии от оси симметрии и комплементарных друг другу (5'-GAATTC-3'). При фрагментации молекул ДНК с использованием ферментов рестриктаз могут образовываться фрагменты с «тупыми» и «липкими» концами [14,15,18,19].

Если точки расщепления противоположных цепей ДНК в сайте рестрикции смещены друг относительно друга, то в образующихся фрагментах ДНК будут присутствовать выступающие одноцепочечные участки. Такие фрагменты ДНК могут взаимодействовать друг с другом в силу их комплементарности самим себе и друг другу, поэтому их называют «липкими». В «липких» концах выступающим одноцепочечным участком может быть как 5'-, так и 3'-конец. Если точки расщепления обеих цепей ДНК в сайте рестрикции расположены непосредственно друг под другом, то

после расщепления молекулы ДНК образуются «тупые» концы, в которых нет выступающих одноцепочечных участков ДНК.

С помощью рестриктаз исследователи могут расщепить молекулы ДНК на фрагменты различной длины – от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Полученные фрагменты разного размера далее можно разделить с помощью электрофореза в агарозном геле, учитывая, что скорость перемещения фрагментов при электрофоретическом разделении обратно пропорциональна их размерам. После разделения фрагменты ДНК можно элюировать из геля и использовать для дальнейших исследований по определению первичной структуры ДНК и генно-инженерного конструирования [14,15,16,18,19].

Работа 1. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Оптимальные предельные условия работы каждой рестриктазы описаны в каталогах и на сайтах фирм – производителей ферментов. Исходя из этих сведений, для составления реакции рестрикции выбирается буфер (как правило, наиболее подходящий буфер поставляется фирмой вместе с рестриктазой, в отдельной пробирке), температура проведения реакции и необходимость добавления в реакцию сопутствующих веществ (например, бычий сывороточный альбумин). Ниже даны схема проведения гидролиза и состав реакционной смеси для расщепления плазмидной ДНК рестриктазой BamHI («СибЭнзим»).

Материалы и оборудование: центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга Eppendorf, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, магнитная мешалка, якорек для магнитной мешалки, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, компьютер с установленной программой BioDoc, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 1 мл), конические универсальные (0,1–10 мкл, 100–200 мкл, 1 мл), мерные цилиндры (1 000 мл – 1 шт., 50 мл – 1 шт.), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), колба мерная (1 л – 1 шт.), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл универсальные, штатив для микропробирок на 1,5–2 мл, лента лабораторная «Pagarfilm M», 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, Gene ruler 100 п.н. Plus DNA Ladder 0,5 мкг/мкл, дДНК, MgCl₂, Tris-HCl, ЭДТА, CH₃COOH (ледяная), дистиллированная вода, NaCl, DTT, фермент BamHI, агароза, 10×TAE буфер, перчатки латексные или нитриловые, маркеры.

Ход работы:

Приготовить необходимый набор посуды, инструментов и материалов в лаборатории. Для проведения реакции гидролиза ДНК предварительно подготовить реакционную смесь, суммарный объем которой составляет 100 мкл. Для этого к 20 мкг дДНК добавить 10 мкл буфера SE-G (состав буфера: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,6 при 25°C); 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT), 3–5 ед. а. фермента BamHI и довести объем дистиллированной водой до 100 мкл. Смесь перемешать на «vortex», центрифугировать в течение 5 с при 8 000 об./мин и инкубировать в термостате в течение 1 ч при 37°C.

Все операции проводить на лабораторном столе, ферменты либо по местить в лед, либо одновременно извлекать из морозильной камеры.

Для контроля полноты проведения гидролиза провести электрофорез в 0,8%-ном агарозном геле аликвоты реакционной смеси (5 мкл) и 1 мкл раствора интактной плазмиды (0,5 мкг/мкл). Остальную реакционную смесь заморозить, впоследствии с этой ДНК проводят препаративный электрофорез, элюируют ее из геля и используют для лигирования с целевым фрагментом (описано ниже).

Приготовить 10-кратный TAE (40 mM Tris – 12,1 г/л; 40 mM CH₃COOH – 11 мл/л; 2 mM ЭДТА – 3,7 г/л). Для этого в стакан на 100 мл налить 2/3 необходимого объема воды, добавить туда навески солей, ледяную уксусную кислоту (ЭДТА очень плохо растворяется в щелочной среде), и перемешать раствор на магнитной мешалке до растворения кристалликов солей. Затем переместить раствор в мерную колбу и долить воды до риски, как это полагается делать для нецветных растворов (лимба ниже риски). 100 мл 10-кратного TAE развести в десять раз в мерной колбе, часть буфера залить в форезную камеру (около 500 мл, но зависит от размера камеры). В мерный стакан на 100 мл налить 50 мл одноократного TAE, добавляя 0,4 г агарозы. Гель варить в микроволновой печи при мощности 500 В – 1 мин (не использовать фольгу в качестве крышки для стакана!!!) или на водяной бане, используя до полного растворения крупинок агарозы. Гель остудить до 60–на плитке до полного растворения бромистого этидия и залить в заливочную форму (как правило, размер геля 15×10 см), использовать гребенку, которая формирует карман объемом до 20 мкл.

Пока агарозный гель застывает провести подготовку пробы ДНК – на ленту «Pagarfilm M», нанести 2 мкл красителя фирменного или 0,25%-ного бромфенолового синего, 30% (вес/объем) глицерина в воде. Затем к каплям красителя добавить 5 мкл ДНК, перемешать пипетированием. После застывания геля пробы нанести в отдельные карманы. Электрофорез проводить 15 мин при напряжении 2 В/см. В случае успешного проведения

Практическое занятие №4.

Тема: Методы выращивания микроорганизмов

Цель: Ознакомление методами выращивания микроорганизмов и способами приготовления питательных сред.

План

1. Выращивание микроорганизмов, культивирование и рост бактерий.
2. Приготовление и стерилизация питательной среды.
3. Аппаратурно-технологическая схема стадий выращивания микроорганизмов, выделения и сушки белковых препаратов.

Культивирование микроорганизмов - это метод размножения микроорганизмов в определенной питательной среде и в контролируемых лабораторных условиях. Успешность и воспроизводимость экспериментов во многом зависят от контролируемой среды и выбор надежных приборов является наиболее важным моментом. Наши приборы зарекомендовали себя в тысячах экспериментов и получили признание во всем мире - это подтверждают многочисленные публикации со ссылкой на приборы Биосан. Шейкеры, рокеры, инкубаторы с CO_2 и без него.

В XIX веке английский физиолог С. Рингер разработал солевой раствор, содержащий хлориды натрия, калия, кальция и магния для поддержания биения сердца животных вне организма. В 1885 году Вильгельм Ру установил принцип культивирования тканей, извлекая часть костного мозга из куриного эмбриона и держал его в теплом физиологическом растворе в течение нескольких дней. Росс Гранвилл Харрисон, работавший в Медицинской школе Дж. Хопкинса, а затем в Йельском университете, опубликовал результаты своих экспериментов в 1907-1910 годах, создав методологию культивирования тканей. В 1910 г. Пейтон Раус, работая с культурой клеток саркомы цыпленка, индуцировал образование опухолей у здоровых животных. В 1910 году сотрудник Института Рокфеллера Пейтон Раус провел изыскательный опыт, чтобы установить природу раковой опухоли - саркомы у домашней курицы. Он взял больные ткани из мышц груди птицы, измельчил, смешал с песком и пропустил через очень мелкий фильтр, задерживающий все, кроме микроорганизмов. Затем ввел фильтрат здоровому цыпленку от другой родительской линии, и у него развилась саркома. Научная группа из Имперского колледжа в Японии выполнила похожие эксперименты независимо от Рауса, еще одно подтверждение пришло из Копенгагена, где ученые вызвали у кур лейкемию. Стало ясно, что

работы в трансиллюминаторе в УФ-лучах (290-330 нм) на электрофонограмме можно будет увидеть дорожки с продуктом гидролиза ДНК. Внимание, не включать с трансиллюминатор без закрытого защитного щитка или очков, иначе можно получить ожог роговицы глаз!

2. Ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК или РНК.

В генетической инженерии для синтеза ДНК на матрице ДНК или РНК используются ДНК-полимераза I и обратная транскриптаза (ревертаза). Благодаря полимеразной и 5'-3'- и 3'-5'-экзонуклеазным активностям ДНК-полимераза I способна заполнять брешь (разрывы) в ДНК и превращать «липкие» концы в «тупые». Ревертаза используется для получения кДНК на основе обратной транскрипции иРНК в комплементарную ДНК.

3 Ферменты, лигирующие фрагменты ДНК, - лигазы. В генетической инженерии для лигирования (связывания) фрагментов молекул ДНК часто используется ДНК-лигаза фага T4. Этот фермент способен катализировать лигирование одноцепочечных разрывов, липких концов и двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. ДНК-лигазы катализируют образование фосфодиэфирных связей между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов.

Работа 2. Лигирование

Материалы и оборудование: центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-400N, автоматические пипетки (0,1-10 мкл, 10-100 мкл, 1 мл), наконечники универсальные (0,1-10 мкл, 100-200 мкл, 1 мл), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, криоштатив для пробирок объемом 1,5-2 мл, таймер, холодильник, лигаза T4 с буфером, маркеры.

Ход работы:

ДНК вектора (0,2 мкг) гидролизовать эндонуклеазами рестрикции, смешать с эквивалентным количеством ДНК целевого фрагмента (например, кДНК), предварительно гидролизованной соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Сайты рестрикции целевого фрагмента подбираются таким образом, чтобы они располагались только по флангам нуклеотидной последовательности и с учетом комплементарности липких концов в векторной ДНК.

К смеси фрагментов ДНК добавить 5 ед. а. ДНК-лигазы фага T4 и одну десятую часть от объема реакционной смеси лигазного буфера (10 $\times$; состав буфера: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,6 при 25°C); 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT). Полученную смесь инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре или в течение 12 ч при 4°C.

рак может быть запущен вирусом, позже его так и назвали: вирус саркомы Рауса (RSV).

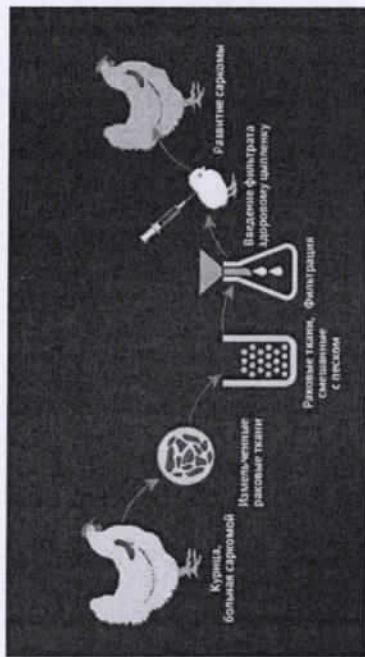


Рисунок 46. Опыт Пейтона Рауса с тканями саркомы кур показал, что этот вид рака провоцируется вирусом

Однако в то время на эксперименты не обратили особого внимания, поскольку считалось, что вирус не способен вызывать рак у человека, а птичий рак изучать бесполезно. Примерно тогда же высказали гипотезу о генах как носителях наследственной информации. Но то, что они есть и у вирусов, поняли спустя три десятка лет. И вспомнили об опытах Рауса.

Опухоли инфекционной природы обнаружили у кроликов, мышей, кошек, приматов. Первый вирус, связанный с человеческим раком, нашли в 1960-х, — это вирус Эпштейна — Барр (герпеса). Позже это привело к открытию онкогенных вирусов (Нобелевская премия по физиологии или медицине 1966 г.) [20].

Методы культивирования клеток получили значительное развитие в 1940-х 1950-х годах в связи с исследованиями в области вирусологии. Выращивание вирусов в культурах клеток дало возможность получения чистого вирусного материала для производства вакцин. Вакцина против полиомиелита стала одним из первых препаратов, массово произведённых с использованием технологий культивирования клеток. В 1954 г. Эндерс, Уэллер и Роббинс получили Нобелевскую премию «За открытие способности вируса полиомиелита расти в культурах различных тканей». В 1952 г. была получена широко известная линия раковых клеток человека HeLa [21].

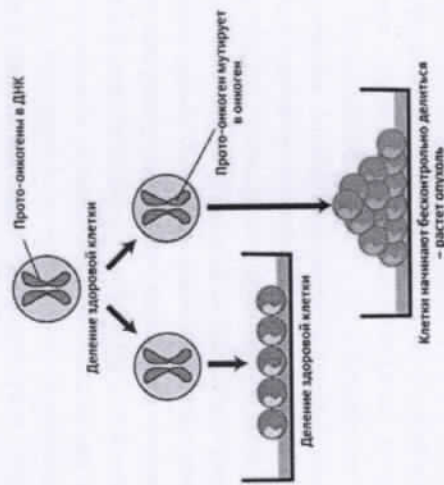


Рисунок 47. Онкогены происходят из обычных участков ДНК (их называют протоонкогенами) путем небольшой мутации. Разница в один нуклеотид может превратить ген в онкоген

Однако в то время на эксперименты не обратили особого внимания, поскольку считалось, что вирус не способен вызывать рак у человека, а птичий рак изучать бесполезно. Примерно тогда же высказали гипотезу о генах как носителях наследственной информации. Но то, что они есть и у вирусов, поняли спустя три десятка лет. И вспомнили об опытах Рауса.

Культивирование микроорганизмов можно поводить поверхностным или глубинным, периодическим или непрерывным методами, в аэробных или анаэробных условиях. Большое значение при выборе способа культивирования имеет отношение выбранного для культивирования микроорганизма к молекулярному кислороду и конечная цель культивирования: накопление биомассы или получение определенного метаболита (спирта, кислорода, фермента и т.д.).

При культивировании поверхностным способом микроорганизмы выращивают на поверхности плотной, сыпучей среды или в тонком слое жидкой среды, при этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. В жидких средах аэробные микроорганизмы часто растут, образуя на поверхности пленку. Факультативные анаэробы развиваются не только на поверхности, но и в толще жидкой среды, вызывая более или менее равномерное ее помутнение. На сыпучих средах поверхностным методом получают ферментные препараты. Поверхностное культивирование микроорганизмов применяется как в лабораторных

условиях, так и в промышленности.

Все способы культивирования аэробных микроорганизмов сводятся к увеличению поверхности соприкосновения питательной среды с кислородом воздуха. При глубинном культивировании в жидких средах микроорганизмы используют растворенный кислород. Вместе с тем растворимость кислорода в воде невелика, поэтому, чтобы обеспечить рост аэробных микроорганизмов в толще среды, ее необходимо постоянно аэрировать (подводить кислород в глубь жидкой среды). Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют культуральной жидкостью.

Наиболее широко распространенный в лабораторной практике способ **глубинного культивирования** - выращивание на качалках, обеспечивающих встряхивание или вращение колб или пробирок, обеспечивая большее соприкосновение среды с воздухом и насыщение ее кислородом. Аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием (барботированием) через толщу среды стерильного воздуха. Этот способ используется в лабораторных исследованиях, но особенно широко применение он нашел в промышленной микробиологии при получении биомассы, в производстве антибиотиков, ферментов, кислот.

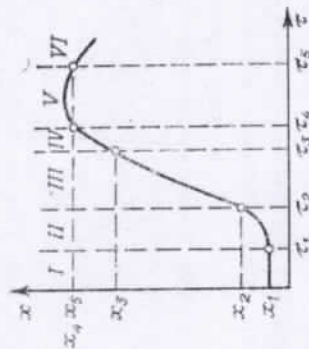
Преимущества глубинного культивирования заключаются в том, что этот способ не требует больших площадей и громоздкого оборудования, объем ферментаторов можно увеличить за счет увеличения высоты, простота обслуживания, возможность автоматизации, удобство выделения целевого продукта из культуральной жидкости.

Глубинное культивирование микроорганизмов может быть периодическим и непрерывным. При периодическом методе культивирования весь объем питательной среды засевают чистой культурой, и выращивание ведут в оптимальных условиях определенного периода времени до накопления нужного количества целевого продукта. Поскольку культивирование ведется на невозобновляемой питательной среде (в стационарных условиях), клетки все время находятся в меняющихся условиях. Сначала они имеют в избытке все питательные вещества, затем постепенно наступает недостаток питания и отравление вредными продуктами обмена. В связи с этим культура в своем развитии проходит четыре фазы роста и размножения, в течение которых изменяются размеры клеток, скорость размножения, морфологические и физиологические свойства.

Первая стадия - лаг-фаза, или фаза задержки роста, следует непосредственно за внесением посевного материала в питательную среду. В этой фазе микроорганизмы не размножаются, а приспосабливаются к среде,

происходит повышение содержания нуклеиновых кислот, увеличение размера. Эта стадия является подготовкой к дальнейшему интенсивному синтезу белка клеткой, т.е. ее росту и размножению.

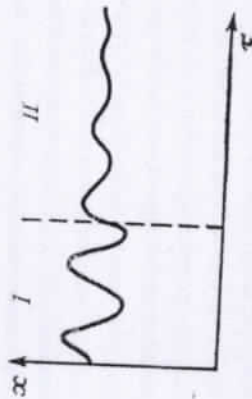
Вторая стадия - фаза логарифмического роста (экспоненциальная) характеризуется высокой скоростью размножения клеток, так как в среде много питательных веществ и мало вредных продуктов обмена. Время, необходимое для удвоения числа клеток, называется продолжительностью генерации. В благоприятных условиях клетки бактерий делятся каждые 20-30 мин, их число увеличивается в геометрической прогрессии (1, 2, 4, 8, 16 и т.д.).



Третья стадия - стационарная (фаза зрелости), когда размножение микроорганизмов замедляется, и скорости размножения и отмирания уравновешиваются, в результате чего число клеток остается постоянным.

Четвертая стадия - фаза отмирания, когда начинается гибель клеток и их количество снижается за счет отмирания и автолиза (самопереваривания).

Периодическое культивирование осуществляется во многих производствах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Недостатком периодического культивирования являются нерациональные затраты времени на прохождение всех четырех стадий развития культуры, причем период самой активной жизнедеятельности - фаза логарифмического роста - занимает небольшую часть производственного цикла.



В течение последних тридцати лет все большее значение приобретает более прогрессивный метод непрерывного культивирования микроорганизмов, который состоит в том, что культура находится в специальном аппарате, куда постоянно притекает свежая питательная среда и с такой же скоростью отводится культуральная жидкость. Посевной материал выращивается до стадии логарифмического роста и вносится в питательную среду. Длительность периода логарифмического роста зависит от количества питательных веществ в среде, а также от количества вредных продуктов обмена, выделяемых клеткой.

При большой скорости притока среда быстро обновляется, питательные вещества не успевают накопиться, и культура поддерживается сколь угодно долго в активном состоянии, не достигая стадии отмирания. Несмотря на значительное аппаратное усложнение технологического процесса, метод непрерывного культивирования имеет ряд преимуществ по сравнению с периодическим способом.

В последние годы активно разрабатывается и применяется метод непрерывного культивирования клеток микроорганизмов в иммобилизованном (прикрепленном) состоянии - на пленках, гранулах, волокнах, специально подобранных синтетических полимерных материалах. Иммобилизованные клетки микроорганизмов функционируют многократно и в течение длительного времени сохраняют высокую биохимическую активность.

Непрерывное культивирование очень перспективно и широко используется в пищевой и микробиологической промышленности и создает возможность автоматического поддержания заданных оптимальных условий, благодаря чему обеспечивается стандартность готового продукта при наименьших затратах.

Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.

3. Закрепление изученного материала. Проведение малую лабораторную работу по приготовлению питательной среды.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

Задачи занятия: ознакомление с способами выращивания микроорганизмов и питательными средами, их составом, назначением, техникой приготовления.

Ознакомиться способами выращивания микроорганизмов.

Изучить составы ниже приведенных питательных сред, записать в рабочую тетрадь название сред и их составы.

Охарактеризовать каждую среду согласно классификации: по составу, назначению, консистенции; указать условия культивирования микроорганизмов на каждой из сред?

Оборудование и материалы: дистиллированная вода, электрическая плита, мерные цилиндры, весы, шпатель, стерильные колбы на 250 мл с ватными пробками, хозяйственная рукавица, сухие питательные среды разного состава, стерильные чашки Петри, спиртовка, спички, чашки Петри с питательной средой.

Среда 1: (г/л): Na_2HPO_4 - 24, KH_2PO_4 - 12, NaCl - 2, NH_4Cl - 4, глюкоза - 10, pH - 7,2.

Среда 2: (г/л): Na_2HPO_4 - 24, KH_2PO_4 - 12, NaCl - 2, NH_4Cl - 4, глюкоза - 10, инстин - 0,01, агар - 15, pH - 7,2.

Среда 3: Среда М 9 (основа для культивирования почвенных бактерий), (г/л): Na_2HPO_4 - 24, KH_2PO_4 - 12, NaCl - 2, NH_4Cl - 4, pH - 7,2.

Среда 4: (г/л): Na_2HPO_4 - 24, KH_2PO_4 - 12, NaCl - 2, NH_4Cl - 4, гидролизат казеина - 10, дрожжевой экстракт - 5, pH - 7,2.

Среда 5: (г/л): пептон - 5, мясной экстракт - 5, бромкрезоловый пурпурный 1,6% раствора - 0,625 мл, креоловый красный 0,2% раствора - 2,5 мл, глюкоза - 0,5 г, пиридоксаль - 0,5, pH среды - 6,0.

Среда 6: Среда Эшби (концентрированная) для культивирования азотфиксирующих микроорганизмов, (г/л): KH_2PO_4 - 2, NaCl - 2, K_2SO_4 - 1, MgSO_4 - 2, CaCO_3 (мел) - 50, маннит - 200, pH - 7,2.

Среда 7: Мясопептонный бульон (для культивирования широкого круга микроорганизмов), (г/л): мясная вода, NaCl - 0,5 %.

Среда 8: Картофельная среда (в основном для культивирования спорообразующих бактерий), (г/л): картофель, мел - на кончике ножа.

Среда 9: Среда (для выделения актиномицетов), (г/л): крахмалрастворимый - 20, KNO_3 - 1, K_2HPO_4 - 0,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, NaCl - 0,5, FeSO_4 - следы, вода водопроводная, pH 7,2-7,3.

Среда 10: Для выделения культур *Clostridium*, (г/л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$, $\text{MgSO}_4 - 0,5$, $\text{NaCl} - 0,5$, вода водопроводная, глюкоза - 20, пептон - 5, $\text{CaCO}_3 - 10$, pH - 7,0.

Среда 11: Для выделения микроорганизмов, растворяющих фосфаты кальция, (г/л): глюкоза - 10, аспарагин - 1, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 0,2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,2$, дрожжевой экстракт - 0,02, агар - 15, вода водопроводная.

Среда 12: Выделение культур микроорганизмов, (г/л): $\text{NH}_4\text{Cl} - 0,5$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$, $\text{MgSO}_4 - 0,2$, $\text{CaCO}_3 - 0,2$, вода водопроводная.

Среда 13: Выделение культур лактобацилл, (г/л): гидролизат казеина - 10, мясной экстракт - 10, дрожжевой экстракт - 5, глюкоза - 20, ацетат натрия - 5, цитрат аммония - 2, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 2$, $\text{MgSO}_4 - 0,2$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O} - 0,05$, вода дистиллированная.

Среда 14: среда Гиса, (г/л): пептон - 10, $\text{NaCl} - 5$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 10$, индикатор Андресе - 1% или бромкрезоловый пурпурный - 1,6%, агар - 5, вода дистиллированная, pH - 7,2.

Среда 15: (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 24$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 12$, $\text{NaCl} - 2$, $\text{NH}_4\text{Cl} - 4$, гидролизат казеина - 10, дрожжевой экстракт - 5, агар - 20, pH - 7,2.

2. Приготовить 150 мл плотной питательной среды.

Последовательность приготовления питательной среды с использованием сухого питательного агара следующая:

- Налить в 250-мл стерильную колбу 150 мл дистиллированной воды.
- Взвесить на весах лабораторных нужное количество питательной среды (5 г из расчета на 100 мл).
- Засыпать сухой питательный агар в холодную воду.
- Тщательно размешать. Для этого поставить колбу с содержимым на магнитную мешалку. Закрыть колбу ватной пробкой, соблюдая приемы поддержания стерильности.
- Поставить колбу со средой на электрическую плитку либо водяную баню. Довести среду до полного растворения агара, не допуская его пригорания.
- Простерилизовать среду на паровом стерилизаторе.
- Остудить среду до 45 °С.
- Соблюдением приемов стерильности в боксе абактериальной воздушной среды разлить среду по 25 мл в стерильные чашки Петри.
- Дать застыть агаризованной среде.

*Примечание: 1) взвешивание реактивов в мг следует проводить на весах аналитических; 2) Измерение pH питательной среды выполнять на иономере.

Приведённый ниже список наиболее распространённых клеточных линий не является полным и исчерпывающим.

Аббревиатура	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
CH-1		человек	почка (эмбриональная)		Производная от HEK-293 ECACC
3T3-L1	"3-day transfer, inoculum 3 x 10 ⁵ cells"	мышь	эмбриональный фибробласт		Известна также как NIH 3T3 ECACC
MDA-MB-231		человек	меланома		
MDA-MB-468		крыса	глиобластома		
A2780		человек	яичник	рак яичника	ECACC
A2780-AD		человек	яичник	производное A2780 с резистентностью к адриамицину	ECACC
A2780-BX		человек	яичник	Производное A2780 с резистентностью к цисплатине	ECACC
A2780-TP		человек	глиобластома	злокачественная глиома	ECACC
A431		человек	кожный эпителий	плоскоклеточная карцинома	ECACC Cell Line Data Base
A439		человек	карцинома лёгких	эпителий	DSMZECACC
B10		крыса	нейробластома		ATCC (недоступная ссылка)
B10-P1		человек	периферические лейкоциты	HIV+ лимфома	ATCC
B10-A8-10	bronchial epithelium + adenovirus 12-SV40	человек	лёгкие	эпителий	ATCC (недоступная ссылка)

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
	virus hybrid (Ad12SV40)				
bEnd.3	brain endothelial	мышь	кора головного мозга	эндотелий	ATCC
BHK-21	"Baby Hamster Kidney"	хомяк	почка	фибробласты	ECASSOlympus
BR 293		человек	молочная железа	рак	
BxPC3	Biopsy xenograph of pancreatic carcinoma line 3	человек	панкреатическая аденокарцинома	эпителий	ATCC (недоступная ссылка)
C3H-10T1/2		мышь	эмбриональные мезенхимальные клетки		ECASS
C6/36		<i>Aedes albopictus</i> (комар)	ткань личинки		ECASS
CHO	Chinese hamster ovary	серый хомячок (<i>Cricetulus griseus</i>)	яичник	эпителий	ECASSCCLC (недоступная ссылка)
COR-L23		человек	лёгкие		ECASS
COR-L23/CPR		человек	лёгкие		ECASS
COR-L23/5010		человек	лёгкие		ECASS
COR-L23/R23		человек	лёгкие	эпителий	ECASS

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
100/7	<i>Cercopithecus aethiops</i> , origin-defective SV-40	обезьяна <i>Cercopithecus aethiops</i>	почка	фибробласты	ECASSATCC
100/11	<i>Chronic Myeloid Leukaemia</i> lymphocyte	человек	хроническая миелоидная лейкоemia	T-клеточная лейкоemia	Blood
100/1	<i>canine mammary tumor</i>	собака	молочная железа	эпителий	
100/7		собака	остеосаркома		ECASS
100/10		собака	гистиоцитоз	моноциты/макрофаги	ECASS J Vir Meth
100/140		человек	карцинома	простата	
100/140	Data milder Cancer of the Prostate	человек	метастазирующий рак простаты	эпителий	11317521
100/4		мышь		T-клеточная лейкоemia	ECASS
100/16/A		мышь	молочная железа	эпителий	ECASS
100/16/A		мышь	молочная железа	эпителий	ECASS
100/1		человек	метастазы в лимфатический узел	меланома	
100/100		человек	лёгкие	рак	ECASS
100/1		человек	лёгкие		
100/1		гибридома	гибридома	секретирует MA2.1 mAb (против HLA-A2 и HLA-B17)	Journal of Immunology

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
HB55		гибридома	гибридома	секретирует L243 mAb (против HLA-DR)	Human Immunology
HCA2		человек	Фибробласты		Journal of General Virology
HEK-293	human embryonic kidney	человек	почка(эмбриональная)	эпителий	ATCC
HeLa	Henrietta Lacks	человек	рак шейки матки	эпителий	DSMZ/ECACC
Hepatecl c7	clone 7 of clone 1 hepatoma line 1	мышь	гепатома	эпителий	ECACC ATCC (недоступная ссылка)
HL-60	human leukemia	человек	Миелобласты	клетки крови	ECACC/DSMZ
HMEC	human mammary epithelial cell	человек		эпителий	ECACC
HT-29		человек	эпителий толстого кишечника	аденокарцинома	ECACC Cell Line Data Base
Jurkat		человек	T-клеточная лейкемия	белые клетки крови	ECACC DSMZ
JY		человек	Лимфобласты	B-клетки, иммортализованные EBV	
K562		человек	Лимфобласты	хроническая миелоидная лейкемия	ECACC
Ku812		человек	Лимфобласты	эритролейкемия	ECACC IGCstandards
KCL22		человек	Лимфобласты	хроническая миелоидная	

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
KYO1	Kyoto 1	человек	Лимфобласты	лейкемия	DSMZ
LNCap	Lymph node Cancer of the Prostate	человек	аденокарцинома простаты	эпителий	ECACC/ATCC (недоступная ссылка)
Ma-Mel 1, 2, 3, ..., 48		человек		линии клеток меланомы	
MC-38		мышь		аденокарцинома	
MCF-7	Michigan Cancer Foundation -7	человек	молочная железа	инвазивная карцинома протоков молочной железы	ER+, PR+
MCF-10A	Michigan Cancer Foundation	человек	молочная железа	эпителий	ATCC
MDA-MB-231	M.D. Anderson - Metastatic Breast	человек	молочная железа	рак	ECACC
MDA-MB-468	M.D. Anderson - Metastatic Breast	человек	молочная железа	рак	ECACC
MDA-MB-435	M.D. Anderson - Metastatic Breast	человек	молочная железа	меланома или карцинома (единого мнения нет)	Cambridge Pathology ECA CC
MDCK II	Madin Darby canine kidney	собака	почка	эпителий	ECACC/ATCC
MOR/O.		человек	лёгкие		ECACC

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
2R					
NCI-H69/CPR		человек	лёгкие		ECACC
NCI-H69/LX10		человек	лёгкие		ECACC
NCI-H69/LX20		человек	лёгкие		ECACC
NCI-H69/LX4		человек	лёгкие		ECACC
NIN-3T3	National Institutes of Health, 3-day transfer, inoculum 3×10^5 cells	мышь	эмбрион	Фибробласты	ECASSATCC
NALM-1			периферическая кровь	Хроническая миелоидная лейкемия	Cancer Genetics and Cytogenetics
NW-145				меланома	ESTDAB
OPCN / OPCT	Ouyax [1] Prostate Cancer....	человек		линии клеток рака простаты	Asterand
Peeg		человек	T-клеточная лейкемия		DSMZ
PNT-1A / PNT 2				линии клеток рака простаты	ECACC
RenCa	Renal Carcinoma	мышь		карцинома почки	
RIN-5F		мышь	поджелудочная железа		
RMA/RMAS		мышь		T-клеточный	

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
				рак	
Si08-2		человек		остеосаркома	ECACC
SI-9	<i>Spodoptera optera frugiperda</i>	бабочка <i>Spodoptera optera frugiperda</i>	яичник		DSMZECACC
SkBr3		человек		карцинома молочной железы	
T2		человек		гибридома В-клеток и T-клеточной лейкемии	DSMZ
T-47D		человек	молочная железа	карцинома протоков	
T84		человек	карцинома толстого кишечника/ метастазы в легкое	эпителий	ECASSATCC
THP1		человек	моноциты	острая миелоидная лейкемия	ECACC
U373		человек	Глиобластома-астроцитомы	эпителий	
U87		человек	глиобластома-а-астроцитомы	эпителий	Absam
U937		человек	лейкемическая моноцитарная лимфома		ECACC
VCaP	Vertebra Prostate Cancer	человек	метастазирующий рак простаты	эпителий	ECACC ATCC
Vero	'Vera Reno' (почка зелёной) /	африканская зелёная мартышка	эпителий почки		ECACC

Линия клеток	Расшифровка сокращения	Организм	Ткань	Морфология	Примечания и ссылки
	'Vero' ('истина')				
WM39		человек	кожа	первичная меланома	
WT-49		человек	Лимфо-бласти		
X63		мышь	меланома		
YAC-1		мышь	лимфома		Cell Line Data Base ECACC
YAR		человек	B-лимфоциты	трансформированы EBV	[2] Human Immunology

1. Способы классификации процессов культивирования микроорганизмов.

Методы культивирования микроорганизмов. Культивирование продуцентов в промышленных условиях принято называть ферментацией. По аппаратурному оформлению, технологическим особенностям, методам управления многие процессы биотехнологических производств аналогичны процессам химической технологии, в то же время существует ряд различий между ними.

- 1). Главными компонентами биотехнологических процессов являются биореакторы;
- 2). Неприемлемость использования в биотехнологии высокотемпературных режимов и высоких давлений, широко применяемых в химической технологии;
- 3). В биотехнологии преимущественно применяются одностадийные процессы синтеза целевых продуктов, а в химической технологии – многостадийные;
- 4). Биотехнологические процессы позволяют синтезировать ряд органических веществ, не доступных методам химического синтеза.

В то же время, биохимические и химические реакции подчиняются принципу ЛеШателье. В основу классификации биотехнологических процессов могут быть положены различные принципы. Биотехнологические процессы можно условно подразделить на биологические, биохимические и биоаналогичные. Первые основываются на использовании акариот,

прокариот и эукариот; вторые – на использовании ферментов; третьи – на химическом синтезе веществ, функционально близких или эквивалентных первичным и вторичным метаболитам.

Биореакторы характеризуются такими показателями, как уровень структурной организации, способностью к репродукции, наличие или отсутствие собственного метаболизма в подходящих условиях.

По уровню структурной организации биореакторы могут быть представлены молекулами (ферменты, нуклеотиды, полисахариды, пептиды), организованными частями (вирусы, фаги, вирионы), одноклеточными (бактерии, дрожжи) и многоклеточными особями (высшие грибы, растительные каллусы, одноклеточные культуры млекопитающих); целыми организмами растений и животных. Уровень организации биореактора накладывает отпечаток на организацию и аппаратное оформление соответствующих биотехнологических процессов.

По отношению к асептике различают нестерильные и стерильные производства.

По локализации биореактора различают поверхностные и глубинные процессы. Под поверхностными процессами понимают культивирование биореакторов на подложке из 3 питательных сред; глубинные процессы предусматривают погружение биореакторов в жидкие питательные среды.

По фазовому составу ингридиентов различают жидкофазные, твердофазные и газофазные процессы. По условиям проведения процесса: одноступенчатые – большинство процессов, осуществляемых с использованием культур микроорганизмов и ферментов. Двухступенчатый: на первом этапе – культивирование продуцента; на втором – пересадка культуры в биореактор, где нет питательной среды, но находится вещество, необходимое для получения целевого продукта. Многоступенчатые процессы предусматривают генетическую инженерии и рДНК-биотехнологии.

Механизмы образования продуктов. Биосинтез предусматривает получение целевых продуктов на основе реализации тех или иных метаболических путей биореактора. В процессах биотрансформации имеет место видоизменение молекулы – предшественника целевого продукта или превращение одного продукта в другой. По способу подачи питательной среды и отбора культуральной жидкости подразделяют периодические, полупериодические и непрерывные процессы культивирования.

Периодический процесс относится к закрытым системам. Все компоненты среды вносятся в начале ферментации, продукты реакции в процессе культивирования не отводятся. Состав среды, концентрация питательных и метаболитов постоянно изменяются. В процессе

культивирования популяция мко проходит все стадии развития. Периодическая ферментация позволяет поддерживать постоянную температуру, равномерное распределение растворенных веществ по всему объему биореактора.

В то же время периодические процессы связаны с рядом проблем:

- большие затраты времени в связи с необходимостью загрузки и разгрузки биореактора;
- низкая продуктивность, связанная с малой концентрацией клеток в среде, ингибированием конечным продуктом и истощением субстрата;
- длительность процесса ферментации.

2. Количественные показатели роста и продуктивности микроорганизмов. Процесс периодического культивирования полностью соответствует экспоненциальной модели роста мко. Использование уравнений Моно и экспоненциального роста позволяет вывести следующие количественные показатели периодической ферментации:

- Продуктивность по биомассе: $Q_X = (X_1 - X_0) / (\tau_1 - \tau_0)$;
- Продуктивность по продукту: $Q_P = (P_1 - P_0) / (\tau_1 - \tau_0)$;
- Удельная скорость потребления субстрата: $q_X = (S_0 - S_1) / X_1(\tau_1 - \tau_0)$;
- Удельная скорость образования продукта: $q_P = (P_1 - P_0) / X_1(\tau_1 - \tau_0)$.

Количественные показатели процесса непрерывного культивирования:

- Скорость потока (коэффициент разбавления): $D = W/V$, где: W – скорость потока среды, м³/ч;
- Скорость образования биомассы и выноса биомассы из системы: $dX/d\tau = \mu X - DX = (\mu - D)X$
- Скорость поступления и потребления лимитирующего субстрата: $dS/d\tau = D(S_0 - S_1) - \mu X/Y_{X/S}$;
- Скорость образования и выноса из системы продукта P : $dP/d\tau = q_P X - DP = 0$.

3. Виды полунепрерывного и непрерывного культивирования микроорганизмов. Периодический процесс с подпиткой (полунепрерывный) используется для снижения эффекта ингибирования продуктами метаболизма и недостатком субстрата. Процесс осуществляют отъемно-доливым способом: при достижении определенной концентрации клеток, метаболитов или по истечении определенного времени определенную часть культуральной жидкости сливают и вносят такой же объем свежей среды. **Непрерывные процессы.** Различают два типа непрерывной (проточной) ферментации.

1. Биореакторы полного смешения – жидкая фаза в них интенсивно перемешивается, постоянно подается питательная среда и отводится культуральная жидкость. Данные реакторы могут работать по принципу хемотата или турбидостата. В первом случае в системе поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды, причем постоянный подвод клеток не обязателен, поскольку в начальном периоде проводят периодическое культивирование, а затем включают подачу жидкости с клетками или без них. Во втором случае в биореакторе поддерживают постоянную концентрацию клеток, регулируя скорость потока среды. При достижении определенной максимальной концентрации клеток подача среды может быть автоматически прекращена и процесс протекает некоторое время в периодических условиях.

2. Биореакторы полного вытеснения (тубулярные). Среда протекает по тубулярному реактору без перемешивания, состав и концентрация питательных веществ, продуктивность неодинаково распределены по объему реактора; вместе со средой в реактор подаются клетки. Использование непрерывно действующих (проточных) реакторов имеет ряд преимуществ перед периодическими процессами. Это открытые системы, которые при определенных условиях приходят в стационарное состояние, когда все параметры системы (концентрации всех компонентов среды и клеток) постоянны во времени.

Это резко упрощает управление работой биореактора и автоматизацию процесса.

Если $\mu = D$, то $dX/d\tau = 0$, т.е. система находится в состоянии динамического равновесия.

$\mu^*[X] = D^*[X]$; $\mu = D$. Последнее равенство называют законом хемотата, который заключается в том, что в стационарном режиме удельная скорость роста устанавливается равной скорости разбавления среды, которая задается подбором параметров V и W_0 . В зависимости от метода, благодаря которому поддерживается данное состояние, различают хемотатный (поддержание постоянной концентрации лимитирующего субстрата) и турбидостатный (поддержание постоянной концентрации биомассы) принципы культивирования. Также известны методы управления ростом непрерывной культуры по pH (pH-стат) и по кислороду (оксистат).

3. Автоселекция микроорганизмов при непрерывном культивировании. В биотехнологических производствах широко используется хемотатное культивирование смешанных культур, состоящих из двух и более штаммов. В этом случае задача по оптимизации процесса культивирования сводится к определению значений скорости потока и

стационарной концентрации лимитирующего субстрата, при которых достигается максимальный выход биомассы каждого из биообъектов.

4. При условии, что $[X1]_0 = 0$ и $[X2]_0 = 0$, справедливо уравнение:

$$\mu_{\max} 1 \cdot [S]/(K_{s1} + [S]) = D \text{ и } \mu_{\max} 2 \cdot [S]/(K_{s2} + [S]) = D$$
 Из уравнения следует, что характер взаимодействия культур в реакторе будет определяться значениями констант уравнения

Моно для каждой из них. При этом возможны два случая:

1) Кривые роста штаммов не пересекаются, причем не важно равны ли величины $\mu_{\max} 1$ и $\mu_{\max} 2$ или нет, так как форма кривых определяется величинами K_{s1} и K_{s2} . В этом случае в предпочтительном положении оказывается тот штамм, для которого величина $\mu_{\max}$ достигается при меньшей концентрации лимитирующего субстрата.

2) При любом значении D стационарная величина концентрации лимитирующего субстрата на уровне, оптимальном для штамма 1, в результате штамм 1 при заданном значении D растет и развивается нормально, а штамм 2 не способен размножаться вследствие лимитирования роста недостатком субстрата и неизбежно вымывается из биореактора. 2) Кривые роста штаммов пересекаются (обязательным условием являются неравенства $\mu_{\max} 1 \neq \mu_{\max} 2$, $K_{s1} \neq K_{s2}$). В этом случае оптимальные параметры процесса культивирования достигаются в точке пересечения кривых роста. При $D < D_{opt}$ предпочтение будет иметь штамм 1, при $D > D_{opt}$ штамм 2. При исследовании закономерностей роста культур в условиях длительной непрерывной ферментации было обнаружено явление автоселекции, связанное со спонтанными мутациями используемых штаммов в биореакторе. При этом мутации, приводящие к увеличению удельной скорости роста, называют положительными, а приводящие к изменению удельной скорости – отрицательными. В условиях хемотата клетки, образовавшиеся в результате отрицательных мутаций, при установившемся значении $[S]$ растут медленнее, чем основная культура. В результате они будут полностью вымываться из аппарата. Клетки, образовавшиеся в результате положительных мутаций, способны расти и размножаться при концентрациях субстрата меньше стационарной величины $[S]$. Накопление положительных мутантов приводит к вымыванию основной культуры из биореактора. Автоселекция заключается в отборе более жизнеспособных, быстрорастущих и эффективно потребляющих субстрат клеток. Несмотря на перечисленные аспекты, автоселекция в ряде случаев является желательным явлением, так, как мутация, приводящая к увеличению кинетических показателей роста неоднозначно связана с другими технологическими свойствами штамма. Например, положительный штамм с

точкой зрения роста, может снизить или утратить способность синтезировать метаболит, являющийся целевым продуктом, содержать меньшее количество белка и прочие.

5. Принципы масштабирования биотехнологических процессов. Масштабирование – перенесение лабораторных процессов культивирования биообъектов в условия крупномасштабного биотехнологического производства. Главная задача масштабирования – сохранение высокого выхода биомассы или целевых метаболитов при минимальных затратах энергии, субстрата и продолжительности культивирования. Большая часть исследований в данной области связана с масштабированием аэробных ферментаций.

Главными параметрами, обуславливающими масштабные эффекты являются:

1) Число регенераций. Число регенераций, необходимых для достижения конечной концентрации биомассы является функцией объема ферментатора: $Ng = 1,44 (\ln V + \ln [X] - \ln [X_0])$.

2) Режим стерилизации. При увеличении размеров емкостного аппарата для стерилизации площадь его поверхности резко снижается относительно объема, что затрудняет передачу тепла и контроль температуры в аппарате.

3). Режим перемешивания и аэрации среды. Для обеспечения постоянной скорости массопереноса O_2 при условии сохранения специфической скорости утилизации кислорода культурой при увеличении объема аппарата окружающую скорость мешалки увеличивают на коэффициент, равный $\sqrt{M3}$, где M – масштаб диаметра.

4). Интенсивность переноса тепла в объеме аппарата. Ферментационные процессы осуществляются при условии поддержания постоянства температуры, что требует поддержания теплового баланса: $Q_{мет.} + Q_{перем.} - Q_{испар.} - Q_{теплообм.} = 0$ где: $Q_{мет.}$ – тепло, затрачиваемое на поддержание метаболизма; $Q_{перем.}$ – тепло, затрачиваемое на перемешивание среды; $Q_{испар.}$ – тепло, отводимое с парами и газами; $Q_{теплообм.}$ – тепло, отводимое с тепло- и хладоносителями. Для удовлетворения этого равенства необходимо поддержание определенной величины $Q_{теплообм.}$. Поверхность теплообмена между средой и хладоносителем, доступная для удаления тепла из единицы объема жидкости, снижается при увеличении размеров масштабирования, что ограничивает увеличение объема биореактора: $As = Q_{теплообм.}/K \cdot \Delta T_{ср}$ Величина K при масштабировании снижается, в частности за счет увеличения толщины стенок теплообменных поверхностей.

Масштабирование биотехнологических процессов в общем случае основывается на двух принципах:

1). Масштабирование при обеспечении постоянства потребления энергии на единицу объема биореактора. Для обеспечения данного требования необходимо учитывать зависимость между потреблением энергии (P_g) и параметрами ферментатора: $P_g = K (P_1^2 \cdot N \cdot D_i^3 / Q^{0.56})^{0.45}$; где: K – константа, зависящая от геометрических размеров аппарата; P_1 – энергия, потребляемая неазируемым ферментатором, Дж; Q – скорость аэрации, м³ / м³ * мин; D_i – диаметр мешалки, м; N – скорость вращения мешалки, мин⁻¹.

2). Масштабирование при условии сохранения постоянной (по сравнению с лабораторными условиями) скорости переноса O_2 (только для аэробных ферментаций). Реализация принципа основана на создании условий, обеспечивающих поддержание постоянного значения коэффициента диффузии кислорода KLO_2 . Скорость переноса кислорода (QO_2) рассчитывают на единицу объема биореактора, исходя из соотношения произведений плотности потока и площади поверхности раздела фаз «газ-жидкость» к объему жидкой фазы в реакторе: $QO_2 = Ke (C / e - Ce) A/V$; где: Ke – коэф. массопередачи; C / e и Ce – концентрации растворенного вещества в жидкой фазе, находящейся в равновесии с газовой фазой, и в объеме жидкой фазы; A – площадь поверхности раздела фаз «газ-жидкость» [20].

Практическое занятие №5.

Тема: Расположение генетического материала

Цель: Изучить сведения о расположении генетического материала.

План

1. Определение термина генетический материал.
2. Расположение генетического материала и их виды.
3. Хромосомный уровень организации генетического материала.
4. Линейное расположение генов в хромосомах.

Организация генетического материала

1. Организация генетического материала вирусов.

Вирусы – это неклеточные формы жизни, обладающие собственным геномом и способные к воспроизведению только в клетках живых организмов.

Вирион (вирусная частица) состоит из белковой оболочки (капсид) и заключенной в эту оболочку нуклеиновой кислоты.

Генетический материал вирусов и фагов может быть представлен как ДНК, так и РНК. Нуклеиновые кислоты вирусов могут быть как одноцепочечные, так и двухцепочечные. Молекулы нуклеиновой кислоты вирусов могут иметь линейную или кольцевую форму. Есть вирусы с фрагментированным геномом, состоящим из нескольких молекул нуклеиновой кислоты [24, 25].

ДНК-содержащие вирусы:

Аденовирус, вирус герпеса – линейная двухцепочечная ДНК

Парвовирус – одноцепочечная линейная ДНК

Паповавирусы – сверхспиральная замкнутая кольцевая ДНК

Фак М13 – одноцепочечное кольцо

Вирус гепатита В – частично одноцепочечная кольцевая ДНК

Вирус папилломы человека – двухцепочечная кольцевая ДНК

РНК-содержащие вирусы:

Ретровирусы, вирус полиомиелита – одноцепочечный диплоидный геном

Вирус гриппа – 8 разных одноцепочечных молекул

HTM – одноцепочечная молекула

Реновирус – 10 разных двухцепочечных молекул

II. Организация генетического материала прокариот

1. Хромосомная ДНК.

Хромосома бактерий представлена двунитевой кольцевой суперспирализованной молекулой ДНК.

В упаковке кольцевой ДНК принимают участие негистоновые белки. Кольцевая ДНК складывается в петли, основания которых фиксируются негистоновыми белками.

Хромосомная ДНК бактерий занимает определенную область – **нуклеоид**.

Геном прокариот состоит из структурных генов и регуляторных последовательностей, организованных в опероны.

Экстрахромосомная ДНК бактерий представлена плазмидами.

II. Экстрахромосомная ДНК.

1. Плазмиды – малые кольцевые двухцепочечные самореплицирующиеся ДНК бактерий.

Классификация плазмид

I. По количеству копий:

- Однокопийные (1 плазида данного типа на клетку)
- Мультикопийные (много копий плазмиды данного типа на клетку)

II. По совместимости:

- Совместимые (в клетке находятся одновременно несколько типов плазмид)

- Несовместимые (в клетке только один тип плазмид)

III. По способности к переносу:

- Трансмиссивные (конъюгативные) - способные к переносу в другие бактериальные клетки при конъюгации, содержат гены *tra*
- Нетрансмиссивные (неконъюгативные) - не способные к переносу в другие клетки, не содержат гены *tra*
- Коинтегративные - содержат гены *tra* и гены, придающие клетке определенные свойства:

Col - плазмиды - кодируют синтез колицинов;

Ent - плазмиды - кодируют синтез бактериальных токсинов;

Hly - плазмиды - определяют синтез факторов, определяющих разрушение гемоглобина (гемолизины)

R - плазмиды - несут гены устойчивости к антибиотикам

F - плазмиды - содержат гены переноса (*tra*)

Конъюгация - половой процесс у бактерий, при котором происходит прямой перенос генетического материала от клетки - донора к клетке - реципиенту.

Донорами являются клетки, имеющие F-плазмиды (половые факторы).

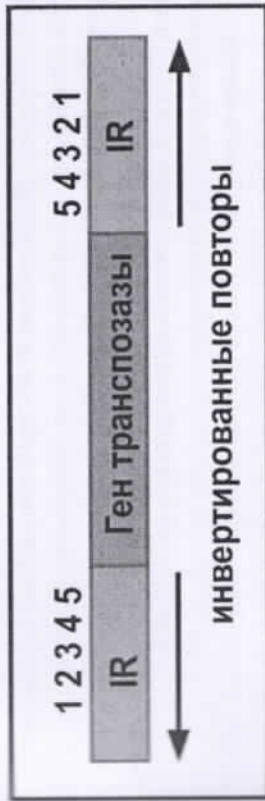
Донорные клетки (F+) соединяются с реципиентными клетками (F-) при помощи половых пилей (F-пилей).

F-плазмиды несут гены *tra* (переноса), необходимые для переноса этих плазмид и других плазмид, а также бактериальной хромосомы.

2. Мобильные генетические элементы - особые последовательности ДНК, способные перемещаться из одного участка локализации в другой. Могут вызывать различные типы генных мутаций (делеция, вставка, инверсия, сдвиг рамки считывания). Встраивание мобильных может вызывать инактивацию генов. Встраивание поблизости от молчащего гена может приводить к его активации. Способствуют эволюции генома

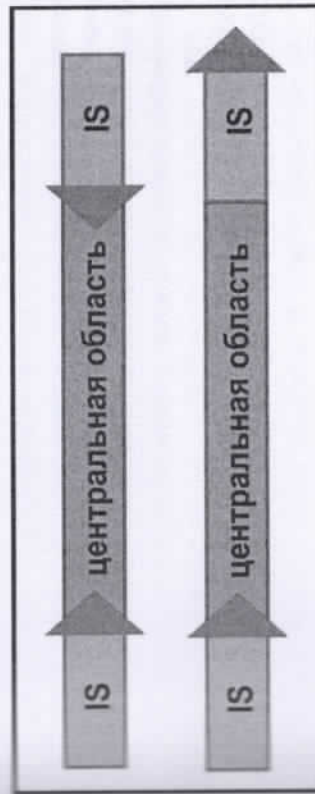
IS-элементы. Простые инсерционные последовательности (800-1000 н.п.).

Входят в состав бактериальных хромосом и плазмид. Содержат ген транспозазы и IR-элементы, которые представлены короткими инвертированными повторами. При встраивании IS-элементы вызывают в месте встраивания небольшую дупликацию [24, 25, 26].



Транспозоны (Tn).

Сложные МГЭ размером более 2000 н.п. Транспозоны фланкированы длинными концевыми повторами (плечами), которые могут состоять из IS-элементов. Содержат гены транспозазы и другие структурные гены (например, гены устойчивости к антибиотикам, солям тяжелых металлов, синтетическим токсинам).



III. Организация генетического материала эукариот

1. Ядерная ДНК.

ДНК эукариот является избыточной. Большая часть геномной ДНК представлена некодирующими последовательностями.

Последовательности нуклеотидов эукариотического генома:

1. Уникальные последовательности. 1 - 2 копии на геном.
- а) уникальные кодирующие последовательности (2 - 3 %). Это последовательности генов, кодирующие белки. Состоят из экзонов, интронов и регуляторных областей.
- б) уникальные некодирующие последовательности (интроны) (38%)
2. Повторяющиеся последовательности (60%). Встречаются в геноме в большом числе копий. Расположены в геноме тандемно (друг за другом) или дисперсировано (рассеянно) по геному.

а) Умеренно повторяющиеся последовательности. До 100 копий на геном. Размер последовательностей от нескольких сотен до нескольких тысяч н.п. (рРНК, тРНК, гистоны и др.)

б) Высоко повторяющиеся последовательности. До 500 тыс. копий на геном. Короткие последовательности до нескольких сотен н.п.

Тандемные последовательности:

- Центромерная ДНК. Повторяющиеся единицы имеют размер примерно 170 п.н. (сателлитная ДНК). Эти единицы образуют ряды, длина которых составляет от 250 т.п.н. до 5 млн п.н. (3% генома).

- Теломерная ДНК. У человека теломерными являются последовательности ГТТТТА. В разных хромосомах они повторяются от 250 до 1500 раз.

- Гены рРНК. В геноме человека есть 5 групп таких генов (для 18S, 28S и 5.8S рРНК), каждая из которых содержит около 60 копий. Они расположены в коротких плечах акроцентрических хромосом (13, 14, 15, 21, 22 пары). Эти кластеры рРНК вместе с дополнительными участками называются **ядрышковыми организаторами**, потому что ядрышко может быть образовано каждым из них. В хромосоме 1 расположен еще один кластер тандемно повторяющихся генов – для 5S рРНК.

- Гены тРНК. В эукариотических клетках насчитывается 40-60 основных типов тРНК. Гены сгруппированы в кластеры, расположенные в разных хромосомах. У человека на гаплоидный геном приходится 1300 генов тРНК (по 10-20 копий на каждый тип тРНК).

- Гены гистоновых белков. У некоторых видов эукариот расположены тандемно, у птиц и млекопитающих разбросаны по геному. На гаплоидный геном у человека приходится 40 копий генов гистоновых белков (H_1 , H_2A , H_2B , H_3 , H_4).

Диспергированные последовательности:

Разбросаны по геному *по отдельности*, а не кластерами. Являются подвижными (мобильными) генетическими элементами, которые называются **ретротранспозонами**.

- Длинные диспергированные элементы LINE (Long Interspersed Elements).

LINE-1 (L-1): 500 000 копий на геном (15% генома). Длина более 5000 п.н. Кодируют несколько белков, способных вызывать транспозицию самого элемента L-1 или других мобильных элементов. В том числе **обратную транскриптазу** (фермент, который использует мРНК как матрицу и создает

комплементарную ей одноцепочечную ДНК-копию, кДНК) и эндонуклеазу, которая производит надрезы в ДНК, куда может встраиваться новая кДНК.

- Короткие диспергированные элементы SINE (Short Interspersed Elements).

Alu – последовательности. 1 млн копий на геном (10-12% генома). Длина 300 н.н. Чаще находятся между генами и внутри интронов, иногда включены в мРНК. Не кодируют белков и поэтому не могут сами перемещаться по геному. Предполагается, что ферменты, кодируемые элементами L1, участвуют в ретроинверсии последовательностей **Alu**.

III. Экстрахромосомная ДНК.

1. Мобильные генетические элементы.

Транспозоны. (Р-элемент и copia D. melanogaster, Ac-элемент кукурузы)

- Ограничены инвертированными (или прямыми) повторами.

- 30-50 копий на геном.

- Кодируют транспозазу.

- При встраивании сайт-мишень обычно дуплицируется.

Ретроинверсии. Сходны по структуре с проретровирусами и ограничены прямыми длинными концевыми повторами (LTR). Для транспозиции используется механизм обратной транскрипции и необходимы ферменты обратная транскриптаза и интеграз (кодируются ретроинверсией). В составе LTR есть сайты инициации транскрипции и сайты ноннадеинирования для РНК-полимеразы II. Синтезируемая молекула РНК транслируется с образованием ферментов, необходимых для синтеза ДНК и внедрения ее в геном.

Семейство LINE млекопитающих. Ретроинверсии LINE не имеют концевых повторов. Обнаружен в гене фактора VIII у больных гемофилией.

2. Геном митохондрий

- Митохондрии имеют кольцевую двухцепочечную ДНК (мтДНК) размером 16 569 н.п.;

- Митохондриальная хромосома содержит 37 генов: 2 гена рРНК, 22 гена тРНК, 13 генов цитохромов;

- ДНК митохондрий не связана с гистоновыми белками;

- Гены мтДНК млекопитающих и человека не имеют интронов;

- Транскрибируются обе цепи мтДНК;

- Генетический код митохондрий отличается от универсального по 4 кодам;

- Гены мтДНК кодируют 5% митохондриальных белков, синтез остальных белков митохондрий кодируют гены хромосомной ДНК;
 - мтДНК наследуется только по материнской линии;
- Мутации мтДНК могут приводить к митохондриальным болезням [24, 25, 26, 27].

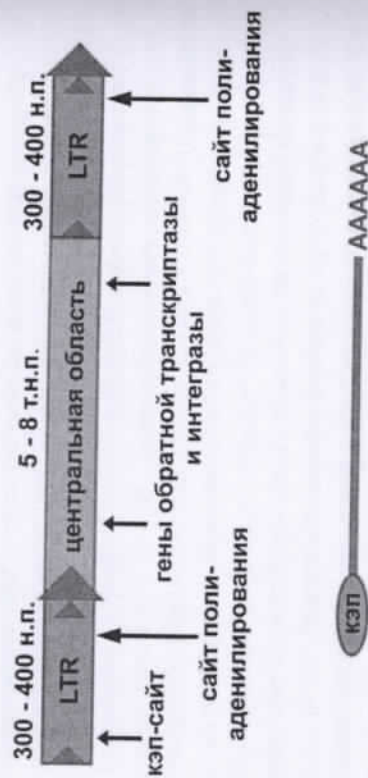


Рисунок 48. Строение типичного ретротранспозона и его транскрипт.

Структура хроматин

Хроматин — комплекс ДНК и белков (гистонов и негистоновых белков).

Выделяют два типа хроматина — эухроматин и гетерохроматин.

Эухроматин — синтетически активная малоспирализованная часть хроматина.

Рисунок 49. Структуры хроматина

Гетерохроматин — синтетически неактивная сильно спирализованная форма хроматина. Различают факультативный гетерохроматин и конститутивный гетерохроматин.

Флукулативный гетерохроматин может при определенных

Конститутивный гетерохроматин — не может переходить в

Единица организации хроматина — **нуклеосома**. Основой нуклеосомы является нуклеосомный кор (сердцевина). Кор состоит из четырех типов гистоновых белков — H_2A , H_2B , H_3 , H_4 (по 2 копии каждого типа). У всех эукариот в состав хроматина входят одни и те же типы гистонов. На нуклеосомный кор наматывается ДНК длиной 145 п.н. Эта величина одинакова у всех видов эукариот. Нуклеосомы образуют нить, диаметром 10 нм. Участок ДНК между нуклеосомами называется линкером. Длина линкерной ДНК видоспецифична (от 10 до 150 п.н.). С линкером связывается гистон H_1 .

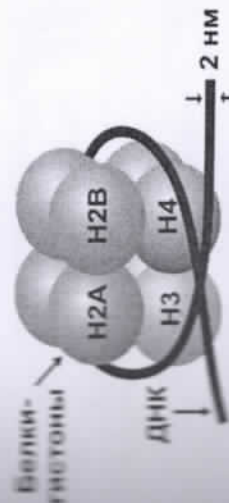


Рисунок 50.

Упаковка хроматина

Нить нуклеосом.

Нить нуклеосом сворачивается в спираль – соленоид (диаметр 30 нм).

Стадии упаковки хроматина:

1. Нуклеосома
2. Нить нуклеосом (10 нм)
3. Хроматиновая фибрилла (соленоид) (30 нм)
4. Петельный уровень (300 нм)
5. Интерфазная хромонема (хроматин) (700 нм)
6. Метафазная хромосома (1400 нм)

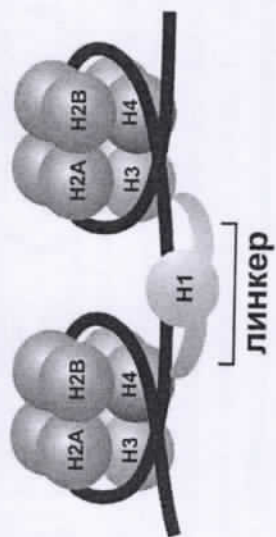


Рисунок 51. Нуклеосомный уровень. Линкер ДНК.

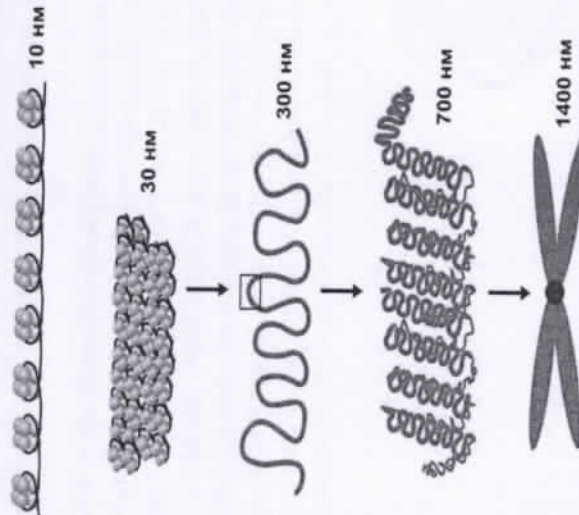


Рисунок 52.
Суперспирализация ДНК
эукариот

Нить ДНК с нуклеосомами образует нерегулярную соленоид-подобную структуру толщиной около 30 нанометров, так называемую 30 нм фибриллу. Дальнейшая упаковка этой фибриллы может иметь различную плотность.

Если хроматин упакован плотно, его называют конденсированным или гетерохроматином, он хорошо видим под микроскопом. ДНК, находящаяся в гетерохроматине не транскрибируется, обычно это состояние характерно для незначительных или молчащих участков. В интерфазе гетерохроматин обычно располагается по периферии ядра (пристеночный гетерохроматин). Полная конденсация хромосом происходит перед делением клетки.

Если хроматин упакован неплотно, его называют эу- или интерхроматином. Этот вид хроматина гораздо менее плотный при наблюдении под микроскопом и обычно характеризуется транскрипционной активностью. Плотность упаковки хроматина во многом определяется модификациями гистонов - ацетилированием, фосфорилированием, метилированием и другими модификациями.

Считается, что в ядре существуют так называемые функциональные домены хроматина (ДНК одного домена содержит приблизительно 30 тысяч пар оснований), то есть каждый участок хромосомы имеет собственную «территорию». Вопрос пространственного распределения хроматина в ядре изучен пока недостаточно. Известно, что теломерные (концевые) и центромерные (отвечающие за связывание сестринских хроматид в митозе) участки хромосом закреплены на белках ядерной ламинаы.

Соленоид образует петли, скрепленные у основания негистоновыми белками. Механизм упаковки хроматина в структуру интерфазной хромониемы и метафазной хромосомы до конца не изучен.

Хроматин в геноме человека содержит около 10 тысяч петель, они способны исчезать и появляться снова. Предполагается, что петли способны участвовать в активации генов. Возникновению петель способствуют два белка CTCF и когезин [28,29,30].

Заполните таблицу «Различия ДНК и РНК»

ДНК	РНК

Клеточный цикл. Клеточный цикл идет с образованием двух дочерних клеток. Деление клетки прокариот включает в себя репликацию одной хромосомы и всех плазмид, присутствующих в клетке, а также удвоение клеточных органелл, плазматической мембраны и компонентов клеточной стенки. Скорость деления бактерий зависит от наличия питательных веществ в среде, когда их достаточно, деление происходит быстро, и наоборот, если их мало, скорость инициации репликации уменьшается, но скорость репликации не меняется. Время инициации репликации ДНК не является постоянным (20-220 мин).

Клеточный цикл эукариот состоит из двух периодов:

- **период клеточного роста** (интерфаза), во время которого идет синтез ДНК и белков и осуществляется подготовка к делению клетки.

Состоит из нескольких стадий:

- G₁-фаза (от англ. *gap* — промежуток), или фазы начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов;
- S-фаза (от англ. *synthesis* — синтез), во время которой идет репликация ДНК клеточного ядра, также происходит удвоение центриолей (если есть).
- G₂-фаза, во время которой идет подготовка к митозу.

Дифференцировавшиеся клетки, которые более не делятся, находятся в фазе покоя G₀ (имея столько же ДНК, как в G₁);

- **период клеточного деления** (фаза M, от слова *mitosis* — митоз). Включает две стадии:

- кариокинез (деление клеточного ядра). Митоз, в свою очередь, делится на пять стадий.
- цитокинез (деление цитоплазмы).

После начала репликации в длинном цикле новые точки инициации на хромосоме не возникают, пока не произойдут все события клеточного цикла. Время появления новых точек инициации не является постоянным. И от него будет зависеть продолжительность клеточного цикла.

В коротком цикле новые точки инициации образуются до завершения цикла репликации. Таким образом, следующий цикл репликации начинается до завершения деления клетки.

Инициация репликации происходит при участии специального белка. Синтез белка прекращается, если белок погружен в какую-либо неструктурированную среду. Деление клетки происходит, когда ее жевательная масса достигает двух клеток, и репликация заканчивается. Время, которое уходит на деление, практически не меняется и составляет 20 мин.

При делении клеток две клетки образуются из одной клетки. Деление клеток является центральной частью размножения организмов. Клетка делится несколькими способами. Наиболее распространенным из них является деление митоза. Митоз деление характерно для соматических клеток и состоит из двух основных стадий: деления ядра (кариокинез) и деления цитоплазмы (цитоккинез). Митоз-это непрерывный процесс, при котором происходит равномерное распределение наследственной информации между двумя образовавшимися дочерними клетками. Перед этим происходит удвоение хромосом.

Митотический цикл состоит из 5 стадий. Это: интерфаза, профаза, метафаза, анафаза и телофаза. Между двумя делениями ядро клетки находится в фазе интерфазы. Несмотря на то, что интерфазу называют ядерной стадией в спокойном состоянии, дело в том, что в ядре в этот период активно осуществляются обменные процессы, клетка готовится к делению. В интерфазе каждая хромосома делится и образует 2 хроматиды. Интерфаза делится на 3 периода: только после митоза интерфазный период обозначается G₁. Продолжительность этого периода составляет от 10 часов до нескольких суток. В этот период молодая клетка увеличивается в размерах, увеличивается в объеме. В нем накапливаются запасы многих органических, минеральных веществ. Синтез ДНК в интерфазе известен как **период-S**. За этот период молекула ДНК увеличивается в два раза, на это уходит 6-10 часов. В результате каждая хромосома образует две хроматиды.

Период после интерфазного синтеза ДНК называется G₂, в котором синтез РНК и белка происходит, даже если ДНК не синтезируется, и он длится до 3-4 часов. В клетках животных двойственность центриолей происходит в конце телофазы и в начале интерфазы. В этот период ядро приобретает сетчатое строение при окрашивании, а на следующем этапе из него формируются хромосомы.

Первой стадией митозного деления является **профаза** (про - проявление, фозис - период), при которой происходит утолщение и увеличение хромосом за счет спирализации хроматических нитей - хроматин. Они находятся в состоянии парных хроматид и видны в световой микроскоп. Хроматиды в хромосомах не диффундируют в профазе, и присоединяются через общую часть - **центромеру**.

В профазе центриоли начинают разделяться и раздвигаться. В середине и в конце профазы происходит распад ядерной оболочки и ядер, образуются зародыши деления. В результате пары хроматид оседают в общей массе цитоплазмы и кариоплазмы. На этом профаза заканчивается.

В **метафазе** (мета - тогда) хроматиды уплотняются, утолщаются и собираются вдоль клеточного центра. Центромера хроматид расположена в экваториальной плоскости, а остальная часть - вне экваториальной плоскости. С увеличением плотности нитей устрей они сцепляются парно в хроматидах в таком положении, что к каждой центромере прикрепляются нити акроматина с двух полюсов. На этом этапе растяжимость центромеры сильно уменьшается.

Анафаза (Ана - повторная) стадия, при которой центромеры в хроматидах разделяются, а отдельные хроматиды распределяются по полюсам. Сначала начинают отделяться центромеры, а затем и сами хроматиды. На каждом полюсе количество хромосом выравнивается, и они соответствуют количеству хромосом клетки до деления.

В **телофазе** (телос - 1) происходит диффузия, истончение, удлинение хромосомных нитей. Вокруг каждой группы хромосом формируется ядерная оболочка, начинают формироваться ядра. Деление цитоплазмы завершается и формируется клеточная оболочка, то есть происходит цитокинез. Образовавшиеся новые дочерние клетки переходят в фазу интерфазы.

Процесс митоза обычно занимает 1-2 часа. Продолжительность зависит от типа клетки, возраста, условий внешней среды. Деление клеток может прекратиться под воздействием высоких температур, больших доз радиации, наркотических веществ и растительных ядов.

Длительность клеточного цикла у разных клеток разная. Быстро размножающиеся клетки взрослых организмов, такие как кроветворные или базальные клетки эпидермиса и тонкой кишки, могут входить в клеточный цикл каждые 12-36 ч. Короткие клеточные циклы (около 30 мин) наблюдаются при быстром делении яиц иглокожих, земноводных и других животных. В экспериментальных условиях короткий клеточный цикл (около 20 ч) имеют многие линии клеточных культур. У большинства активно делящихся клеток длительность периода между митозами составляет примерно 10-24 ч [28,31].

Биологическое значение митоза.

Митотическое деление клетки характеризуется высокой степенью точности. Механизм митоза заключался в течение миллионов лет в эволюционном развитии организма. Митоз-это процесс, при котором деление вызывает выживание клеток, фактически обеспечивая непрерывность жизни.

Дочерние клетки, образующиеся при митозном делении, будут иметь диплоидный набор хромосом, как и материнская клетка. Митозное деление клетки лежит в основе вегетативного размножения растений, бесполого размножения животных, эмбрионального и постэмбрионального развития,

регенерации поврежденной части тела. Благодаря митозу в организмах происходит равномерное распределение наследственной информации и сохраняется ее целостность.

Понятие генной инженерии.

Модификация генов организма или комплекса генов в интересах человека называется генной инженерией. Объектами исследований генной инженерии являются вирусы, бактерии, живые грибы, клетки человека животных и растений. Генетическая инженерия-это особый раздел молекулярной биологии, основной целью которого является новая комбинация генетической информации клетки и получение новых веществ для человека и животных путем их репликации. С помощью методов генной инженерии можно копировать гены человека, животного в микроорганизмы и синтезировать необходимые вещества. Такая технология имеет важное значение в медицине, сельском хозяйстве, промышленном производстве.

Генная инженерия фокусируется на решении фундаментальных проблем:

1. Извлечение необходимых генов из клеточной ДНК или их синтез в лабораториях.
2. Образование рекомбинантной молекулы ДНК.
3. Клонирование генов т. е. воспроизведение фрагмента ДНК с помощью рекомбинантных векторных конструкций.
4. Внедрение чужеродных генов в клетку с помощью рекомбинантных векторов и производство желаемого человеком продукта, такого как белок, благодаря своей активности [7,8,14].

Клонирование генов

Клонирование генов - это состояние, которое объясняет амплификацию и диссоциацию отдельных генов в клетках-реципиентах прокариот или эукариот. Эти клетки, содержащие необходимые гены, позволяют а) получить большое количество белка, кодирующего этот ген, или б) получить большое количество очищенного гена этого гена. В настоящее время при клонировании генов используются две схемы. Согласно первой схеме, изначально геномная ДНК случайным образом распадается на более мелкие фрагменты под действием эндонуклеаз. Каждый фрагмент затем вставляется в клетку-реципиент с помощью вектора. Он, в свою очередь, размножается путем амплификации генов, содержащих эти фрагменты. **Вектор** - это "такси", которое вводит чужеродную ДНК в бактериальную клетку. Существует 2 типа векторов: бактериальные плазмиды и бактериофаги.

Плазмиды - это дочерние молекулы ДНК с замкнутым кольцом в клетке. Они реплицируются независимо от геномной ДНК бактерий, чтобы

вставить клнк в плазмиду, необходимо "открыть" "замкнутую" цепь плазмиды. Для этого плазмиды подвергаются действию рестриктаз. Они расщепляют ДНК *CZ* на фрагменты(палиндромы).

Рестриктазы - разрезают дочернюю ДНК в соответствии с определенной последовательностью *n-d* (обычно это короткие палиндромные последовательности); разные рестриктазы распознают разные полиндромы.

Сшивание (лигирование) - чужеродная ДНК сшивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью ДНК-лигазы. Чтобы это произошло, концы кДНК и плазмидной ДНК должны быть липкими. Для этого на концах должна быть последовательность *БЗ*. В результате образуется рекомбинантная плазида. Этот процесс называется методом **гомополимерных концов**. Этот метод основан на присоединении коротких фрагментов ДНК с непрерывной последовательностью к 3' - му концу цепи, образующей ДНК. В результате этого образуется рекомбинантная плазида. Происходит трансформация рекомбинантной плазмиды в реципиентную бактерию: плазида проникает внутрь бактерии и присоединяется к ее жизненному циклу. Только рекомбинантные бактерии получают трансформацию. Поэтому их и выбирают. Отбор проводят в зависимости от резистентности к антибиотикам. Это означает, что только бактерии, содержащиеся в плазме, могут размножаться в среде с антибиотиками [14,19,24].

Ход занятий.

1. Повторение ранних изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

Задачи занятия: Повторить материал, касающийся морфологии, химического состава, функций хромосом и методов их изучения. Значение генетического материала в клеточной и генной инженерии.

Первые опыты применения генетических материалов в генной инженерии.

Основные виды генетического материала.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, учебники. Рисунок кариотипа мужчины, ножницы, клей, белый лист бумаги формата А4, конверт.

Задание 1: Метод получения препаратов митотических хромосом

Для культивирования используются лимфоциты периферической крови, фибробласты (из кусочков кожи), клетки костного мозга, амниотические клетки околоплодной жидкости, хорiona, клетки разных тканей абортированных эмбрионов.

1. **Взятие венозной крови.** В заранее приготовленные стерильные пробирки наливают раствор гепарина, производят венопункцию, с соблюдением стерильности вводят кровь (1–2 мл) из шприца в пробирку и плотно закрывают пробкой. Гепарин препятствует свертываемости крови.

2. **Постановка культуры клеток.** Для осаждения эритроцитов кровь оставляют в холодильнике на 1–2 часа. Дальнейшая работа проводится в стерильном боксе. Там специальной пипеткой отсасывают плазму с лейкоцитами (лимфоцитами), добавляют питательную среду, антибиотики и фитогемагглютинин (ФГА), способствующий интенсивному делению клеток. Эту смесь в стерильной посуде (пробирке, флаконе) помещают в термостат на 48–72 часа при $t = 37^{\circ}\text{C}$.

3. **Получение препаратов хромосом.** Данный этап работы характеризуется рядом последовательных процедур обработки клеток.

А. Воздействие колхицином. Алкалоид, получаемый из растения безвременник (колхикум), вводится в культуру клеток на 2–3 часа с целью остановки клеточного деления на стадии метафазы. В практике он может быть заменён колцемидом и винбластином.

Б. Обработка культуры клеток лимфоцитов гипотоническим солевым раствором (гипотонический шок) По окончании инкубации с колхицином культивируемые клетки отделяют от среды центрифугированием. К осадку клеток добавляют раствор хлорида кальция или цитрата натрия с целью разбухания хромосом. Клетки вновь переводят в осадок центрифугированием. Надосадочную жидкость удаляют отсасыванием или осторожным сливанием. В. Фиксация. Обязательным компонентом фиксирующей жидкости является ледяная уксусная кислота в смеси с метиловым спиртом в соотношении 1:3. Клетки проводят через 3–4 смены фиксатора, 12 каждый раз отделяя от него центрифугированием. Общая продолжительность фиксации составляет не менее 40 минут.

Г. Нанесение клеточной взвеси на предметное стекло. Клеточную смесь тщательно разбивают пастеровской пипеткой с резиновой грушей. На предметное стекло наносят 3–4 капли взвеси и производят высушивание препарата на воздухе или над спиртовкой. Задача этой процедуры – получить хорошо разбросанные метафазные пластинки при сохранении целостности хромосомного набора каждой их них.

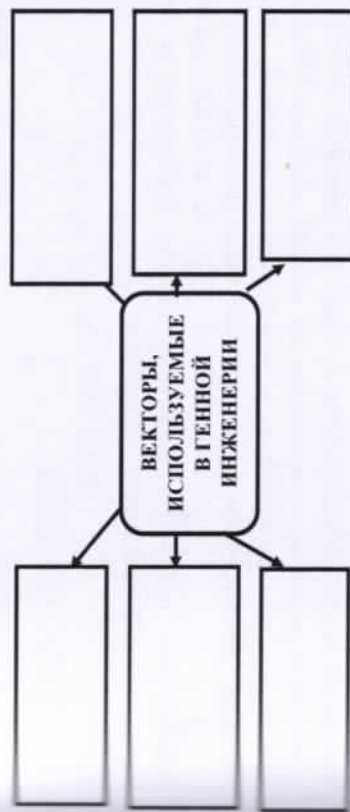
Д. Простая окраска препаратов хромосом (рутинный метод) Применяется для определения числовых аномалий кариотипа, изучения хромосомного мутагенеза. С этой целью применяют азур-эозин. Заблаговременно готовят 0,1% раствор азура и 0,1% раствор эозина в дистиллированной воде. Оба раствора можно хранить в сосудах из тёмного стекла долгое время. Перед

окраской готовят их рабочую смесь на водопроводной воде в соотношении: раствор азур – 6 частей, раствор эозина – 3 части, водопроводная вода – 9 частей. Краску наливают на препараты на 3–5 минут, после чего смывают проточной водой, а препараты высушивают на воздухе. Вместо азур-эозина может быть использована краска Гимза-Романовского, в которую оба красителя входят в качестве составных частей, она готова к использованию и её просто разводят водопроводной водой 1:50. Процедура окраски такая же.

Е. Дифференциальная окраска хромосом (G-метод) для определения структурных и количественных аномалий хромосом. Описано много вариантов техники G-окраски. Часто используют методику с применением трипсина – фермента, расщепляющего белки. Обработка им приводит к удалению части белков, связанных с ДНК, что делает хромосому более контрастной по упаковке. Препараты помещают в 0,025%-ный раствор трипсина на 10–15 секунд при комнатной температуре, ополаскивают в спирте и высушивают. Окрашивают красителем Гимза. После окраски каждая пара хромосом приобретает поперечную исчерченность (полосатость), благодаря чередованию по длине хромосомы светлых и тёмных сегментов. Последние получили название G-дисков. Кроме того, дифференциальное окрашивание хромосом обеспечивает температурно-солевыми воздействиями на фиксированные хромосомы. G-окраска выявляет участки, обеднённые генами и содержащие повышенное количество A–T пар.

Ж. Флуоресцентная окраска хромосом (Q-метод, H-метод, FISH-метод) Q-окраска проводится флуоресцирующим красителем квинакрином, H-окраска другим флуоресцирующим красителем Hoechst 33258. При этом также выявляются участки хромосом, обогащённые A–T парами нуклеотидов. FISH-метод (fluorescent in situ hybridization) – это выявление участков гомологии предварительно денатурированных молекул ДНК комплементарных какому-либо фрагменту, объединённому с флуоресцирующим красителем. Фрагмент используется в качестве зонда при гибридизации непосредственно на цитологических препаратах.

Задание 2: Заполните приведенную ниже векторную схему, используемую в генной инженерии.



Практическое занятие № 6.

Тема: Технологии производства аминокислот

Цель: Ознакомиться с технологиями производства аминокислот.

План

1. Аминокислоты и их значение в производстве.
2. Способы производства аминокислот.
3. Подготовка и стерилизация питательных сред.

Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

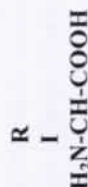
Задачи занятия: Изучить некоторые технологии производства аминокислот. Ознакомиться с аминокислотами и их значениями в производстве, способами производства аминокислот. Подготовка и стерилизация питательных сред.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, учебники.

Характеристика аминокислот

Аминокислоты являются производными карбоновых (жирных) кислот. В их составе имеется карбоксильная ($-\text{COOH}$) и аминогруппа ($-\text{NH}_2$).

Аминогруппа всегда замещает один атом водорода у α -углеродного атома (кроме глицина) аминокислот. Общая формула α -аминокислот следующая:

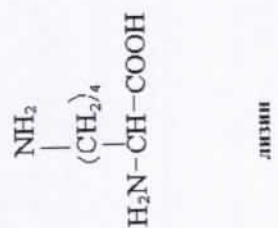
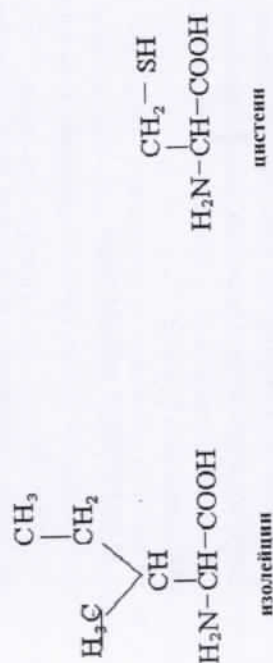
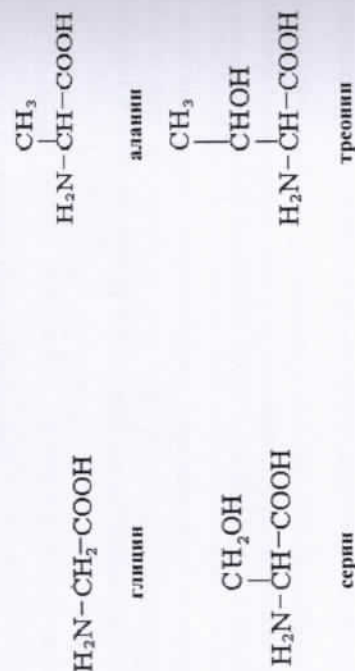


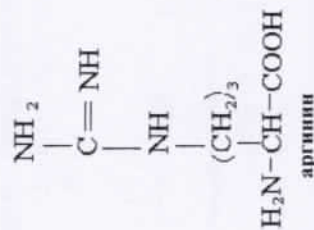
В составе аминокислот встречаются различные функциональные группы. В зависимости от этих функциональных групп, аминокислоты отличаются друг от друга.

Аминокислоты по строению делятся на алифатические (открытые цепочки), ароматические (кольцевые) и гетероциклические. По физико-химическим свойствам делятся на нейтральные, кислотные и основные аминокислоты. Аминокислоты могут содержать в своем составе добавочные функциональные группы, и поэтому называются дикарбоновыми, диаминовыми аминокислотами, оксиаминокислотами, серосодержащими аминокислотами и т.п.

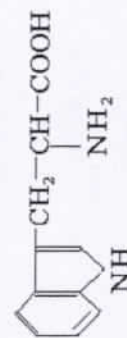
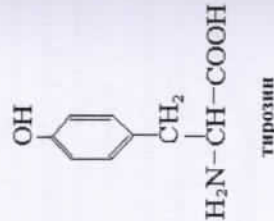
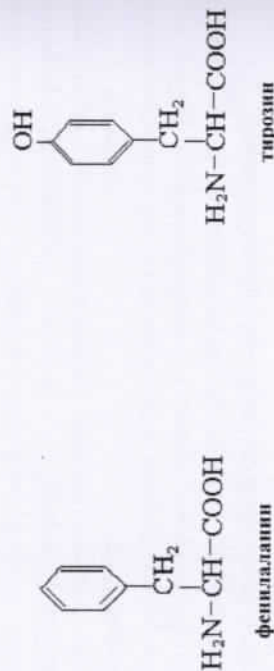
До настоящего времени определены более 300 свободных аминокислот в животных, растительных тканях и в микроорганизмах. Однако в составе белков встречаются только 20 α -аминокислот и их два амида. Аминокислоты, входящие в состав белков приведены ниже:

Ациклические аминокислоты

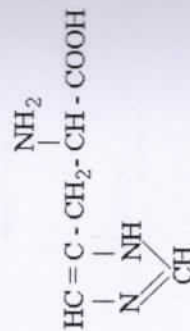




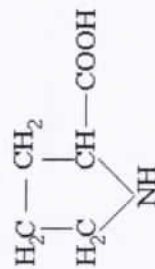
Циклические аминокислоты



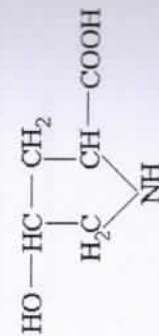
триптофан



гистидин



пролин



оксипролин

Многие α-аминокислоты, не входящие в состав белков, выполняют важные функции в обмене веществ, в частности, цитруллин, гомосерин, гомоцистеин, диоксифенилаланин и другие.

Аминокислоты играют большую роль в здравоохранении, животноводстве и легкой промышленности. По значению для макроорганизма аминокислоты подразделяют на заменимые и незаменимые. К незаменимым относятся те аминокислоты, которые не синтезируются в животном или человеческом организме, они должны быть привнесены с пищей или кормом для животных.

Заменимые синтезируются *in vivo* из аммиака и различных источников углерода. Микроорганизмы сами синтезируют все необходимые им аминокислоты из аммиака и нитратов, а углеводные «скелеты» - из соответствующих интермедиаторов [2,3,4,5].

Незаменимые аминокислоты — необходимые аминокислоты, которые не могут быть синтезированы в том или ином организме. Для разных видов организмов список незаменимых аминокислот различен. Все белки, синтезируемые организмом, собираются в клетках из 20 базовых аминокислот, только часть из которых может синтезироваться организмом. Невозможность сборки определённого белка организмом приводит к нарушению его нормальной работы, поэтому необходимо поступление незаменимых аминокислот в организм с пищей.

Незаменимыми для взрослого здорового человека являются 8 аминокислот: валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин; также часто к незаменимым относят гистидин; (F V T W M I K H). Для детей также незаменимым является аргинин.

5 аминокислот (A D N E S) — **заменимые** у человека, означает что они могут синтезироваться в достаточных количествах в организме.

6 других аминокислот (R C G Q P Y) считаются **условно незаменимыми** в питании человека, что означает ограниченные возможности их синтеза в зависимости от состояния организма, например, у новорожденных и больных людей.

В результате дефицита необходимых аминокислот в организме человека нарушается синтез белков, что приводит к ослаблению функций памяти и умственных способностей, снижению иммунитета (сопротивляемости организма болезням). В то же время избыток потребления несбалансированного белка приводит к перегрузке работы органов, в первую очередь печени и почек. Ценность потребляемого с пищей белка для человека определяется его сбалансированностью по содержанию незаменимых аминокислот [5,6,7].

Рассчитать требования к рекомендованной суточной норме достаточно сложно; эти значения претерпели значительные изменения за последние 20 лет. Следующая таблица представляет список рекомендованных ВОЗ и Национальной библиотекой медицины США суточных норм для взрослого человека [3,5,6,7].

Аминокислота	ВОЗ г на 1 кг веса тела	ВОЗ мг для веса 70 кг	США мг на 1 кг веса тела	Кодирующий кодон генетического кода
H Гистидин	10	700	14	CAU, CAC
I Изолейцин	20	1400	19	AUU, AUC, AUA
L Лейцин	39	2730	42	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
K Лизин	30	2100	38	AAA, AAG
M Метионин + C Цистеин (15 всего)	10,4 + 4,1 (15 всего)	1050 всего	19 всего	Метионин: AUG; Цистеин: UGU, UGC.
F Фенилаланин + Y Тирозин	25 (всего)	1750 всего	33 всего	Фенилаланин: UUU, UUC; Тирозин: UAU, UAC.
T Треонин	15	1050	20	ACU, ACC, ACA, ACG
W Триптофан	4	280	5	UGG
V Валин	26	1820	24	GUU, GUC, GUA, GUG

Рекомендованная суточная норма для детей от 3 лет и старше на 10-20 % выше, чем для взрослого [7,11,12,13].

Исходя из оценки аминокислот, ученые давно стремятся использовать способности микроорганизмов продуцировать заменимые и незаменимые аминокислоты в ощутимых количествах.

Потребность людей в аминокислотах достаточно велика и этим определяется уровень их производства в мире (порядка 500 тыс. тонн в год). Большинство микроорганизмов и зеленые растения способны синтезировать de novo все двадцать аминокислот. Углеродные скелеты аминокислот образуются из промежуточных продуктов обмена.

Исходным материалом для синтеза аминокислот служат простые промежуточные продукты катаболизма (пируват, 2 - оксиглутарат, оксалоацетат и фумарат, эритрозо - 4 - фосфат, рибозо - 5 - фосфат и ATP). При синтезе большинства аминокислот аминокислота вводится только на последнем этапе путем трансаминирования. Некоторые аминокислоты

образуются в результате ряда превращений других аминокислот, и в этих случаях трансаминирование не требуется. Белки синтезируются на рибосомах из аминокислот по информации м - РНК, которая переписана (путем транскрипции) с генов ДНК. [1,5]

Продукты аминокислот

Специфические ферменты, регулирующие биосинтез аминокислот, широко распространены у бактерий; они с определенной глубиной изучены у *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* и прочие. У грибов, на аминокислотное лимитирование, отмечается некоординированное, параллельное возрастания уровня ферментов, катализирующих реакции биосинтеза различных аминокислот. Этот «общий контроль биосинтеза аминокислот» был также назван «метаболическим интерблоком», или «перекрестнопутевой регуляцией», впервые выявленной у *Neurospora crassa* в 1965 году М. Карсониотисом и сотрудниками, а позднее - у *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* и других грибов.

В гиперпродукции отдельных аминокислот культурами *Escherichia coli*, *Begonia marsecensis* и другие важную роль играют Feedak - репрессия, например, при биосинтезе ароматических аминокислот на последних стадиях.

В любом живом организме аминокислоты расходуются прежде всего на биосинтез первичных метаболитов - ферментных и неферментных белков. Следовательно, кроме биосинтеза аминокислот de novo, возможен другой путь их получения, а именно - из гидролизатов соответствующих белков (триптофан разрушается при кислотном гидролизе), в том числе из нативной биомассы микробных клеток.

Природные аминокислоты являются, как правило, оптически активными L - и D - формами, которые трудно разделить. Вот почему микробный синтез с помощью коринебактерий и некоторых других микробов является ныне основным и экономически выгодным. Первое место здесь по праву занимает Япония, где лишь глутаминовой кислоты изготавливается свыше 100 тысяч тонн в год; большинство природных незаменимых аминокислот производит фирма «Такеда». С. Киношита, впервые в 50-е годы открывший и доказавший перспективность микробного синтеза, уже в 1963 году признавал: «Мало сомнения в том, что недалеко то время, когда с помощью микроорганизмов будет возможно производить все известные аминокислоты». Это время наступило уже к 70 - м годам. Получены микробы - гиперпродукты из родов *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* и другие, с помощью которых освоено крупнотоннажное производство не только глутамата, но и L - лизина, L - валина, L - гистидина и других. При

суперпродукции уровень экспрессии клонированного гена выражается в синтезе специфического белка в количестве 2 % от всех растворимых белков клетки - хозяина. В настоящее время имеются продуценты, у которых количество синтезируемого специфического белка достигает 10-15% (здесь важнейшую роль играют многокопийные плазмиды, несущие встроены гены). Генно - инженерными методами во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) был получен штамм *Escherichia coli*, обладающий сверхпродукцией L - треонина (30 г / л за 40 часов ферментации).

С любым штаммом - продуцентом какой - либо аминокислоты необходимо внимательное и бережное обращение в целях поддержания ее в активном состоянии в течении длительного времени.

Получен штамм *Escherichia coli*, продуцирующий за 48 часов 27 г / л L - пролина, и штамм, продуцирующий до 22,4 г / л L - фенилаланина.

С помощью *Corynebacterium* sp. можно получить алкалоидсодержащих средах L - тирозин (до 19 г/л); с помощью *Corynebacterium glutamicum* на глюкозной среде - L - валин (до 11 г / л; L - аргинин, L - гистидин, L - изолейцин - 15 - 20,8 г / л.

Биосинтез аминокислот

Технология получения аминокислот базируется на принципах ферментации продуцентов и выделения вторичных метаболитов, то есть размножают маточную культуру вначале на агаризованной среде в пробирках, затем - на жидкой среде в колбах, инокуляторах и посевных аппаратах, а затем в головных (основных) ферментаторах. Обработку культуральных жидкостей и выделение аминокислот проводят по схеме, аналогичной схеме получения антибиотиков. Изолированные чистые кристаллы целевого продукта обычно высушивают под вакуумом и упаковывают.

Одноступенчатый метод получения аминокислот

Известны два способа получения аминокислот: одноступенчатый и двухступенчатый. Согласно первому способу, например, мутантный полиауксотрофный штамм - продуцент аминокислоты культивируют на оптимальной для биосинтеза среде [2,3]

Двухступенчатый метод получения аминокислот

В двухступенчатом способе микроб - продуцент культивируют в среде, где он получается и синтезирует все необходимые ингредиенты для последующего синтеза (в идиофазу) целевого продукта.

Если ферменты биосинтеза аминокислоты накапливаются внутриклеточно, то после 1 - ой ступени клетки сепарируют, дезинтегрируют

и применяют клеточный сок. В других случаях для целей биосинтеза целевых продуктов применяют непосредственно клетки [2,3].

Получение лизина

Если аминокислота предусмотрена в качестве добавки к кормам, то биотехнологический процесс кормового продукта включает следующие стадии: ферментацию, стабилизацию аминокислоты в культуральной жидкости перед упариванием, вакуум - упаривание, стандартизацию упаренного раствора при добавлении наполнителя, высушивание и упаковку готового продукта, в котором должно содержаться не более 10 % основного вещества. Например, в промышленности изготавливают сухой кормовой и анилик кормовой концентраты лизина наряду с кристаллическим лизином.

Если концентрат содержит 70 - 80 % сухих веществ, то достаточно устойчив против микробной порчи за счет повышенной осмотической концентрации ингредиентов [4,5,6].

Получение аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов и клеток

Экономически целесообразным являются способы получения аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов и клеток. Сравнительно давно реализован процесс получения L - аспаргиновой кислоты из фумаровой и аммиака в одну стадию с помощью иммобилизованных клеток *E. coli* или *Pseudomonas aeruginosa*, обладающая аспартазной активностью.

Аспартаза катализирует реакцию присоединения аммиака к фумаровой кислоте. Фермент в иммобилизованном состоянии сохраняет активность на низком уровне 2 - 2,5 недель и более.

L - Аспаргиновую кислоту можно получить и с помощью иммобилизованных клеток, что существенно повышает длительность функционирования системы, производительность которой по целевому продукту составляет около 2000 кг с 1м реактора. Периодические ферментации используют при получении других L - аминокислот (глутаминовой, фенилаланина, лизина, триптофана и др.). При этом культивируют обычно специальные мутантные штаммы, метаболизм которых по целевому продукту изучен достаточно полно. Так, например, установлено, что лимитирующим агентом коринебак герий, образующих глутаминовую кислоту, является биотип в дозе 1 - 5 мкг/ л. Биотип индуцирует структурно - функциональные изменения в клеточной мембране, благодаря чему увеличивается ее проницаемость для глутаминовой кислоты, выходящей из клетки в культуральную жидкость. Отдельные штаммы продуцентов способны накапливать ее более 50 г/л на мелассных средах

[4,5,6].

Роль биотина аналогична в случае получения пролина, являющимся производным глутаминовой кислоты.

Несложность этой технологии и ее преимущества по сравнению с глубиной ферментацией наглядно иллюстрируют опыт японской фирмы «Танабе Сейяку». В 1973 году эта фирма разработала способ получения аспарагиновой кислоты при помощи иммобилизованных бактериальных клеток, обладающих аспартазной активностью. Аспартаза катализирует присоединение аммиака по двойной связи фумаровой кислоты, т.е. аспарагиновая кислота образуется в одной стадии и данный биотехнологический процесс можно отнести к категории биотрансформации органических соединений. Иммобилизованный в геле фермент функционировал хорошо, длительность его полуинактивации составила 1 месяц. Затем в геле иммобилизовали клетки продуцента, дополнительно стабилизируя их путем химического связывания между собой и с гелем. Длительность полуинактивации клеток в этом случае увеличилась до 4 месяцев. Технологию биотрансформации фумаровой кислоты, таким образом, можно представить в такой последовательности:

- выращивание клеток методом глубоинной ферментации и их выделение центрифугированием;
- иммобилизация клеток биокатализатора в геле в виде гранул размером 2-3 мм;
- биотрансформация фумарата аммония в колонке с катализатором в проточном режиме и получение раствора аспарагиновой кислоты;
- кристаллизация, центрифугирование и промывка кристаллов.

Производительность системы биотрансформации аспарагиновой кислоты 1 м биореактора 1700 кг [11,12,13].

Технология получения глутамата

В основе сверхсинтеза глутаминовой кислоты из глюкозы у этих бактерий лежат два биохимических принципа: недостаток фермента α -кетоглутаратдегидрогеназы и блокировка биосинтеза биотина. Неспособность клеток синтезировать биотин приводит к увеличению проницаемости цитоплазматической мембраны, что повышает экскрецию глутамата. Он образуется в результате аминирования α -кетоглутарата, неспособного к дальнейшим превращениям в цикле трикарбоновых кислот.

При биосинтезе глутаминовой кислоты очень большое значение имеет концентрация биотина в среде. Необходимо обеспечить его концентрацию 1-5 мкг/л. В этом случае нарушается нормальный синтез фосфолипидов мембраны и последняя становится проницаемой для глутамата. При

концентрации биотина 15 мкг/л наблюдается интенсивный рост биомассы. Проницаемость цитоплазматической мембраны для глутамата можно снизить также при помощи пенициллина, добавляя его к среде во время логарифмической фазы роста. В этом случае фосфолипиды экстрагируются из мембраны и транспорт глутамата может осуществляться в течение 40-50 часов. Бактериальный синтез глутамата позволяет получать примерно 50% - ный выход продукта из сахара и накапливать в среде ферментации до 200 г/л глутамата. Известны методы получения глутамата на этанольных средах (до 60 г/л) или на ацетате (до 98 г/л) [6].

В последние годы в народном хозяйстве и медицине широко используются различные аминокислоты. В основном они играют большую роль в повышении питательности белковых кормов. Некоторые продукты питания и кормовые продукты не содержат в себе достаточного количества незаменимых аминокислот, в частности лизина. Примерами таких продуктов являются кукуруза, пшеница, рис и т.д.

Аминокислоты, полученные промышленным путем, используются в чистом виде или в составе комбикормов с целью повышения питательности кормовых продуктов. Поэтому одной из сфер применения аминокислот является сфера увеличения содержания растительных белков в кормах. Научно обосновано и широко используется на практике, что с помощью водных аминокислот, вводя их в состав натуральных кормов, можно экономить расход кормов.

Помимо включения аминокислот в состав кормов для животных в сельском хозяйстве, они также могут широко использоваться в пищевой промышленности. Они используются для изготовления ряда полимерного сырья, такого как синтетическая кожа, ряд специальных волокон и пленок для упаковки пищевых продуктов. Изучено инсектицидное действие некоторых аминокислот или их производных. Метинин, глицин, глутаминовая кислота, гаммааминомасляная кислота и др. широко используются в медицинской практике в качестве лекарственных средств.

Широкое использование аминокислот в различных отраслях народного хозяйства наглядно видно на примере страны Япония. В Японии 65% аминокислот, производимых по всей стране, используются в пищевой промышленности, 18% - в животноводстве, 15% - в медицине и 2% - в различных отраслях промышленности. В настоящее время мировое производство аминокислот составляет несколько миллионов тонн в год.

Во всем мире производство L-глутаминовой кислоты, L-лизина, DL-метинина, L-аспарагина и глицина играет ведущую роль.

Основными способами получения аминокислот являются:

- путем экстракции из гидролизатов белка растительного сырья;
- путем химического синтеза;
- путем микробиологического синтеза;
- получение из микроорганизмов с помощью выделенных ферментов или иммобилизованных половых клеток [11,12,13].

На примере страны Японии можно привести следующие способы получения аминокислот:

Методы и годовой объем производства аминокислот, используемые в Японии

Аминокислоты	Способ изготовления	Объем производства, тонна/год
Аланин	F, X	150-200
Аргинин	M, X, G	100-300
Аспарагиновая кислота	F	1000
Аспарагин	X, G	10-50
Цитруллин	M, X	10-50
Цистеин	G	1-10
Цистин	G	100-200
Глицин	X	5000-6000
Глутаминовая кислота	M	100000
Гистидин	M, G	100-200
Гомосерин	M	10-50
Оксипролин	G	10-50
Глутамин	M	200-300
Изолейцин	M, G	10-50
Лейцин	M, G	50-100
Лизин	M	15000
Метионин	X	60000-70000
L-метионин	M	100-200
Орнитин	M, G	10-50
Фенилаланин	M, X	50-100
Пролин	M, G	10-50
Серин	M, G	10-50
L-треонин	M	50-100
DL-, L-триптофан	X, F	100
Тирозин	M, G	10-100
Валин	M	50-100
ДОФА	F	0,1

Примечание: F - ферментативный синтез; M - микробиологический синтез; G - экстракция из растительного сырья и гидролизатов животного белка; ДОФА - диоксифенилаланин.

Получение многих аминокислот на основе микробиологического синтеза является в то же время перспективным и экономически эффективным методом.

Помимо микробиологического синтеза, аминокислоты могут быть получены также путем гидролиза природных белков, хранящихся в растительном и животном сырье, как указано выше. Этот способ считается одним из основных. Одним из основных недостатков этого метода является использование в качестве белковых кормов или пищевых продуктов сырых продуктов, которые могут быть использованы. Например, в Юго-Восточной Азии моноглютамат натрия получают из соевого кунжута. Аналогичным образом, получение аминокислот таким способом из ряда других видов сырья не дает экономического эффекта.

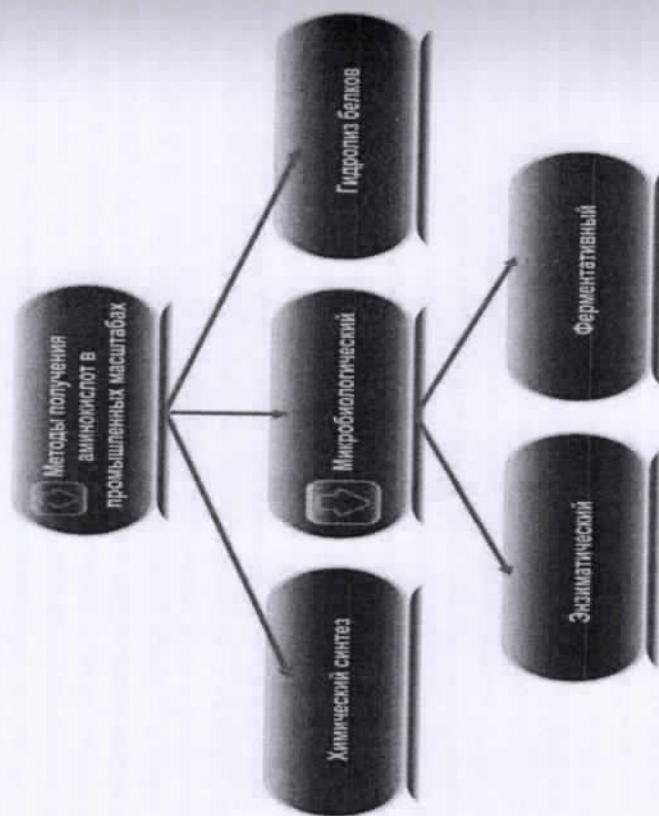
Химический синтез аминокислот является достаточно эффективным, высокоавтоматизированным самофункциональным процессом, и таким образом можно синтезировать соединения с желаемой структурой. При этом не получается несъедобное сырье. Однако эти процессы многоступенчатые и требуют сложного оборудования. Основным недостатком этого метода является то, что аминокислоты могут быть получены только в форме химического соединения. Хорошо зарекомендовал себя способ получения L-Д-метионина, широко применяемый в птицеводстве, и в больших количествах [5,6,11,12,13]. В последние годы широко используется химико-микробиологический комбинированный способ получения аминокислот, при котором исходное соединение получают в результате химической реакции, а затем проводят заключительную стадию с использованием ферментативной активности соответствующих штаммов микроорганизмов.

Синтез аминокислот микробиологическим методом основан на высоком содержании этих продуктов в питательной среде, в которой выращивается большинство микроорганизмов. Среди микроорганизмов есть ряд видов бактерий, дрожжей и грибов, которые обладают способностью образовывать высокий уровень глутаминовой кислоты.

Установлено, что большинство штаммов исследуемых микроорганизмов, независимо от их систематического состояния, синтезируют L-аланин и глутаминовую кислоту в больших количествах. Также установлено, что многие штаммы синтезируют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин и лизин в больших количествах.

Не установлено, что микроорганизмы обладают способностью синтезировать аминокислоты и зависят от вида. Большинство аминокислотных продуцентов - грамотрицательные, неспоровые бактерии,

принадлежащие к семействам *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Actinobacter*, *Brevibacterium* [21,22,23].



Предшественники	Фермент	Продукт
Суммарная аминокислота	Аспергилл	L-аспаргиновая кислота
Коричная кислота	Фенилаланинаминоксидаза	L-фенилаланин
L-аспаргиновая кислота	Аспартаминотрансфераза	L-аланин
Фенол, серин	Тирозинфеноксидаза	L-тирозин
Изоглутамин, серин	Транс-фенилаланин-аминооксидаза	L-триптофан
Глицин, метанол CH_3OH	Сериндегидраза	L-серин

Энзиматический синтез

По данному способу процесс получения аминокислот заключается в синтезе предшественника аминокислоты и последующей его трансформации в целевую аминокислоту с использованием выделенных ферментов или микроорганизмов [21,22,23].

Практическое занятие № 7.

Тема: Производство кормовых витаминов и антибиотиков

Цель: Ознакомиться с технологиями производства кормовых витаминов и антибиотиков.

План

1. Кормовые витамины и антибиотики и их значение в производстве.
2. Способы производства кормовых витаминов и антибиотиков.
3. Микроорганизмы синтезирующие кормовых витаминов и антибиотиков

Ход занятий.

1. Повторение ранее изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы.

Краткая характеристика

Витаминами называются соединения, образующиеся в растениях, состоящие из сравнительно низкомолекулярных веществ разнообразного химического строения, объединенных в группы по признаку необходимости для жизнедеятельности живых организмов. Витамины считаются незаменимой частью пищевых продуктов. Но они по сравнению с основными питательными веществами - белками, углеводами и жирами, требуются в незначительных количествах.

Отсутствие витаминов в пище может быть причиной нарушения процессов обмена веществ, и в последствии приводить к тяжелым заболеваниям и даже к смерти.

Витамины в 1880 году впервые были открыты Н.И.Луниным. Лунин пришел к выводу, что в пище кроме белков, углеводов и жиров содержатся какие-то неизвестные, но жизненно важные вещества.

Витамины в переводе означают «необходимый для жизни амин», т.е. vita- жизнь, vitamin – амины жизни.

Витамины, не смотря на то, что они низкомолекулярные органические вещества, имеют большое значение в жизнедеятельности организмов, в росте, размножении и развитии.

Витаминам присущи следующие свойства:

- не синтезируются в человеческом организме;
- не участвуют в образовании структур;
- недостаток их в организме нарушает обмен веществ и вызывает определенные заболевания;

Изменение содержания витаминов в организме может привести к следующим состояниям:

1. *Авитаминоз* – заболевания, возникающие при отсутствии какого либо витамина.
2. *Гиповитаминоз* – заболевания, вызываемые при недостатке витаминов.
3. *Гипервитаминоз* – заболевания, развивающиеся при избытке в организме витаминов.

До настоящего времени определены более 30 витаминов, которые разделены на 3 группы: водорастворимые, жирорастворимые витамины, витаминоподобные вещества.

Витамины - это биологически активные вещества с различным химическим строением, которые играют важную роль в поддержании жизнедеятельности живого организма.

Биологическая активность витаминов определяется тем, что некоторые из них в качестве активных групп (коферментов) входят в состав каталитического центра ферментов. При недостатке этих веществ снижается активность ферментов, в результате чего биохимические процессы, протекающие с участием указанных ферментов, замедляются или полностью исчезают [12,13].

Известно, что организмы человека и животных не обладают способностью синтезировать витамины, но растения в благоприятных условиях обладают способностью полностью покрывать свои потребности в витамине (кроме витамина В₁₂). Микроорганизмы также обладают способностью самостоятельно синтезировать большинство необходимых витаминов. Из них видно, что продукты, вырабатываемые растениями и микроорганизмами, являются источником витаминов для человека и животных.

Микробиологическая промышленность производит два типа питательных витаминных препаратов. Содержит витамин В₂-рибофлавиновое питательное вещество и препарат КМБ-12, содержащий витамин В₁₂.

Витамины - это органические соединения, значение которых для жизнедеятельности живых организмов неоспоримо.

О том, что содержание витаминов в пище очень низкое (в 100 граммах кормовых продуктов содержится всего 10-100 мг), говорит и тот факт.) и учитывая, что они быстро разлагаются, рекомендуется периодически добавлять в них витамины. Поэтому производство витаминов в промышленных условиях налажено.

Следует также отметить, что традиционные методы производства витаминов основаны на переработке больших объемов продуктов или на

химических путях, что является экономически менее прибыльной отраслью. Начиная с 4-й четверти прошлого века производство витаминов рассматривается с упором на рентабельную сферу, то есть подготовку путем микробиологического синтеза.

С помощью генетической манипуляции (путем воздействия на контроль метаболизма) были созданы штаммы микроорганизмов, способные производить витамины в количестве 10000 и даже больше, чем необходимо для роста. К ним относятся рибофлавин синтезирующий *Ashbyi gossypii*, витамин В₁₂ синтезирующий штамм *Propionobacterium shermanii* M-82.

Витамины - группа низкомолекулярных органических веществ, обладающих сильным и разнообразным биологическим действием в очень малых количествах. В природе источником витаминов служат в основном растения и микроорганизмы. Менахиноны и кобаламины синтезируются только микроорганизмами. Несмотря на то, что в производстве в настоящее время на первое место выходит получение многих витаминов путем химического синтеза, перспективы микробиологического синтеза велики. Например, чрезвычайно перспективным является получение биотина микробиологическим путем для использования в кормах для кур и свиней. В мире существует 40 промышленных добавок, производящих витамины. Из них 18 в США, 8 в Японии, 14 в Западной Европе. Ведущее место по производству витаминов занимает швейцарский концерн Hoffman La Roche. Этот концерн производит 50-70% всех витаминов, которые выпускаются в мире [12,13,22,23].

Некоторые микроорганизмы, синтезирующие рибофлавин

Микроорганизмы-продуценты	Синтез рибофлавина, мг/л
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	97
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	58
<i>Mycocandida riboflavin</i>	200
<i>Candida flaveri</i>	567
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480
<i>Ashbyi gossypii</i>	6420

Антибиотики

Антибиотики - вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокардиотических или простейших.

Антибиотик — вещество микробного, животного или растительного происхождения, способное подавлять рост микроорганизмов или вызывать их гибель.

Некоторые антибиотики оказывают сильное подавляющее действие на рост и размножение бактерий и при этом относительно мало повреждают или вовсе не повреждают клетки макроорганизма, и поэтому применяются в качестве лекарственных средств.

Некоторые антибиотики используются в качестве цитостатических (противоопухолевых) препаратов при лечении онкологических заболеваний.

Антибиотики не воздействуют на вирусы, и поэтому бесполезны при лечении заболеваний, вызываемых вирусами (например, грипп, гепатиты А, В, С, ветряная оспа, герпес, краснуха, корь).

Чрезмерное использование антибиотиков в Европе приводит к невосприимчивости людей к этому классу препаратов и мешает, в частности, трансплантации органов, протезированию тазобедренного сустава, интенсивной терапии недоношенных детей и лечению рака.

Целый сектор современной медицины оказался под угрозой, поскольку микробы выработали устойчивость к антибиотикам, из-за чего лекарства становятся бесполезными. Наиболее невосприимчивы к антибиотикам стали такие бактерии, как MRSA. Такая инфекция убивает ежегодно около 25 тыс. человек в Европе и около 19 тыс. в США.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ, WHO) не раз предупреждала об опасности распространения форм бактерий, устойчивых к антибиотикам. По данным этой организации, до 4% случаев туберкулеза устойчивы ко всем известным врачам лекарствам. Особенно критично складывается ситуация в некоторых странах бывшего СССР, где доля форм туберкулеза, устойчивых к антибиотикам, доходит до 20%. До 60% заболеваний туберкулеза в форме, устойчивой к антибиотикам, приходится на четыре региона: Россию, Индию, Китай и страны Южной Африки.

В 2008 году новая форма устойчивых к антибиотикам бактерий, вызывающих менингит и пневмонию, была выявлена у детей в Южной Африке.

Антибиотики - это фармацевтические препараты, синтезируемые микроорганизмами, которые производятся в наибольшем количестве. Некоторые из них используются в сельском хозяйстве против различных вредителей (например, полиоксин, баридамицин, когасин и т. д.), другие

используются в медицине (пенициллин, тетрациклин, цефалоспорины С и Н) широко используется. Известно, что грибы, принадлежащие только к 6 родам, синтезируют более 1000 различных антибиотиков.

Большинство антибиотиков синтезируются актиномицетами. Известно, что один *Streptomyces Griseus* синтезирует более 50 антибиотиков. Из антибиотиков, синтезируемых микроорганизмами, в практике широко используется лишь часть. Прежде всего это пенициллины и цефалоспорины.

Эти антибиотикосинтезирующие грибы принадлежат к роду *Penicillium* и роду *Cephalosporium*. Такие антибиотики, как стрептомицин, гентамицин, тетрациклин синтезируются актиномицетами рода *Streptomyces*, а также бактериями родов *Micromonospora* и *Bacillus*.

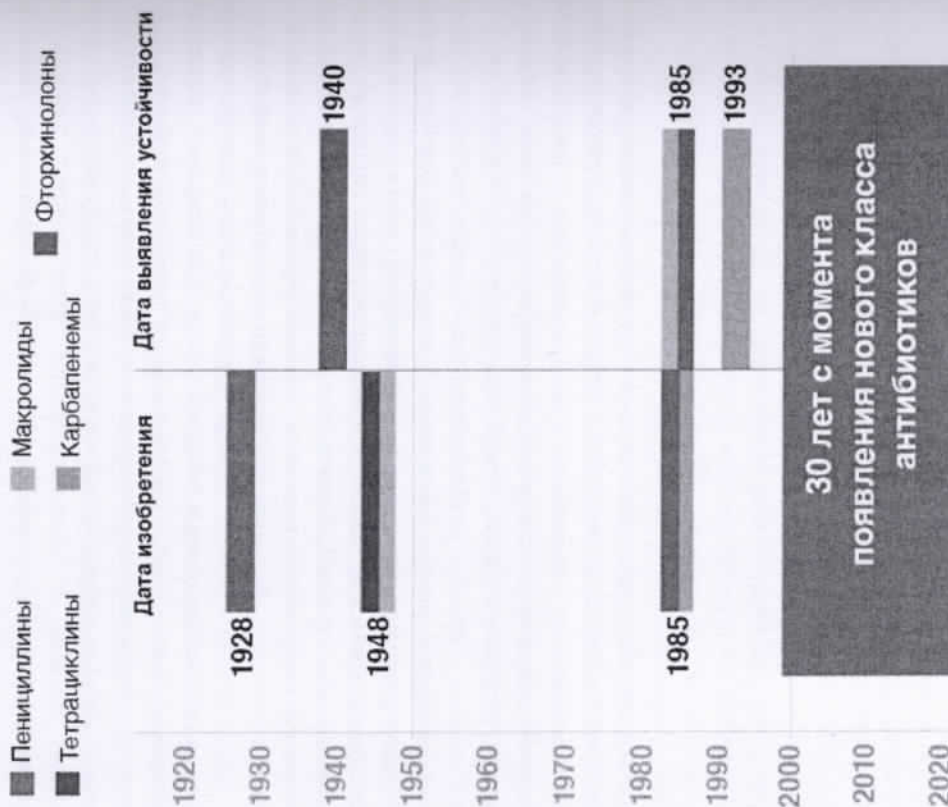
Получение антибиотиков из микроорганизмов.

Антибиотики (антибиотические вещества) продуцируют различные группы организмов (бактерии, грибы, высшие растения, животные). В научной литературе термин антибиотик был введен Вейсманом в 1942 году. Этот термин, хотя и не обладает определенным совершенством (дословный перевод - означает против жизни"), но не только прочно вошел в научную лексику, но и широко используется в повседневном общении.

Антибиотики - особые продукты жизнедеятельности живых организмов или их модификации, вещества, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным микроорганизмам (бактериям, грибам, водорослям, простейшим животным), вирусам и др., останавливающие их рост или полностью теряющие развитие

[12]

Хронология изобретения антибиотиков и развития устойчивости к ним



Источник: Public Health England

BBC

Хронология изобретений

- 1872 год — русский ученый Алексей Герасимович Полотебнов, в Медицинском Вестнике, публикует статью "Патологическое значение плесени", изучив плесневые грибы *Penicillium glaucum*, подробно описал

бактериостатические свойства зелёной плесени на основе лечебной практики по лечению гнойных ран и варикозных язв, писал: «Результаты проведённых мною опытов могли бы, я думаю, позволить сделать подобные же наблюдения и над ранами операционными, а также глубокими нарывами. Такие наблюдения и могли бы дать экспериментальное решение вопроса о значении плесени для хирургии».

• 1895 год — итальянский ученый Винченцо Тиберио, в журнале экспериментальной гигиены, публикует статью о антибактериальной силе некоторых экстрактов плесени и опробованного для лечения тифозных и колерных инфекций у кроликов. Что сделало его одним из нескольких исследователей, чья работа над связью плесени/антибиотика предполагала открытие препарата Пенициллин.

• 1896 год — Б. Гоизо из жидкости, содержащей культуру грибка из рода *Penicillium* (*Penicillium brevicompactum*), выделил кристаллическое соединение — микофеноловую кислоту, подавляющую рост бактерий сибирской язвы.

• 1899 год — Р. Эммерих и О. Лоу сообщили об антибиотическом соединении, образуемом бактериями *Pseudomonas fluorescens*, и назвали его иноуаназой; препарат использовался как местный антисептик.

• 1928 год — А. Флеминг впервые выделил пенициллин из плесневых золотистых грибов *Penicillium notatum*, однако ему не удалось выделить достаточно стабильный экстракт.

• 1935 год — Г. Домагк опубликовал статью о терапевтическом действии протозила в *Deutsche Medizinische Wochenschrift*.

• 1937 год — М. Вельш описал первый антибиотик стрептомицетного происхождения — актиномицетин.

• 1939 год — Г. Домагк получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине «за открытие антибактериального эффекта протозила».

• 1939 год — Н. А. Красильников и А. И. Коренько получили мицетин; Р. Дюбо — тиротрицин.

• 1939 год — начало производства стрептоцида на химико-фармацевтическом заводе «АКРИХИН».

• 1940 год — Э. Чейн выделил пенициллин в кристаллическом виде.

• 1942 год — 3. Ваксман впервые ввёл термин «антибиотик».

• 1942 год — 3. В. Ермольева с сотрудниками получили первый советский пенициллин, который получил название Крустолин, он был выделен из плесневых серо-зелёных грибов *Penicillium crustosum*. Лекарство оказалось в 1,4 раза эффективнее пенициллина.

Временная шкала выпуска антибиотиков

- 1942 - пенициллин G,
- 1944 - стрептомицин
- 1948 - хлортетрациклин
- 1949 - хлорамфеникол, неомицин
- 1950 - окситетрациклин,
- 1952 - эритромицин
- 1954 - бензилпенициллин
- 1955 - спирамицин, тиамфеникол, ванкомицин
- 1956 - пенициллин
- 1958 - колистин, демиклоциклин
- 1959 - виргининамицин
- 1960 - метициллин, метронидазол
- 1961 - ампициллин, спектиномицин, сульфаметоксазол, триметоприм
- 1962 - клоксациллин, фузидиевая кислота
- 1963 - фузафунгин, лимециклин
- 1964 - гентамицин
- 1966 - доксициклин
- 1967 - карбенициллин, рифампицин, джозамицин
- 1968 - клиндамицин
- 1970 - цефалексин
- 1971 - цефазолин, пивампициллин, тинидазол
- 1972 - амоксициллин, цефрадин, миноциклин, прistinамицин
- 1973 - фосфомидин
- 1974 - талампициллин
- 1975 - тобрамицин, бакампициллин, тикарциллин
- 1976 - амикацин
- 1977 - азлоциллин, цефадроксил, цефамандол, цефокситин, цефуроским, мезлоциллин, пивмезиллин
- 1979 - цефаклор
- 1980 - цефмстазол, цефотаксим, цефсулодин, пиперациллин
- 1981 - клавулановая кислота, цефепразон, цефотиам, латамоксеф, нетелмидин
- 1982 - апалциллин, цефтриаксон, микрономицин
- 1983 - цефменоксим, цефтазидим, цефтироксим, шипрофлоксацин, норфлоксацин
- 1984 - цефоницид, цефотетан, темоциллин,
- 1985 - цеппирамид, имипенем/циластатин, имипенем/циластатин,
- 1986 - мупиноцин, азтреонам, цефоперазон/сульбактам, офлоксацин
- 1987 - ампициллин/клавулановая кислота
- 1987 - ампициллин/сульбактам, цефиксим, рокситромицин, сультамициллин

- 1988 - азитромицин, цефаклор, флоромксеф, исепамицин, мидекамицин, рифапентин, тейкоплантин
- 1989 - цефподоксим, энрофлоксацин, ломефлоксацин
- 1990 - арбекацин, цефозидим, кларитромицин
- 1991 - цефдинир, цефетамет, цефпиром, цефтрибуфен, флероксацин, лоракарбеф, пиперациллин/тазобактам, руфлоксацин
- 1993 - бродимоприм, диритромицин, левофлоксацин, надифлоксацин, панипенем/бетамипрон, спарфлоксацин
- 1994 - цефепим
- 2015 - теиксобактин [32]

Уникальность этого продукта, образующегося при обмене веществ микроорганизмов, определяется: во-первых, антибиотик-это вещества, обладающие высокой биологической активностью, в отличие от других веществ, например, спиртов, органических кислот и некоторых других, способных подавлять рост микроорганизмов. В подтверждение своего мнения обратимся к примеру: для остановки роста грамположительных бактерий (микрококков, стрептококков, диплококков и др.) Достаточно 0,01-0,25 мкг/мл эритромицина, но спирт или органические кислоты в такой концентрации могут не оказывать на бактерии никакого действия. Во-вторых, антибиотические вещества обладают избирательным (специфическим) действием. Это означает, что не все организмы, которые вступают в контакт с антибиотиком, чувствительны к его действию. По этой причине микроорганизмы делятся на две группы: чувствительные к определенным антибиотикам и резистентные (устойчивые) к ним микроорганизмы.

Некоторые антибиотики останавливают рост небольшого количества видов микроорганизмов, в то время как другие ограничивают развитие большинства видов микроорганизмов. Исходя из этой сущности антибиотиков, их разделяют на две группы:

- Антибиотики с узким спектром биологического действия;
- Антибиотики широкого спектра биологического действия.

В настоящее время обнаружено около 6000 антибиотиков. Наибольшее количество антибиотиков (более 3000) образуют актиномицеты. Расширяется линейка новых антибиотиков, синтезируемых актиномицетами. Антибиотики-представители химических соединений, относящихся к разным классам-представляют собой вещества типа полипептидов и актиномицинов, имеющие несколько более сложный состав, чем достаточно простые синтетические соединения.

Антибиотические вещества в силу многообразия своей химической структуры обладают различными механизмами биологического действия, исходя из чего их можно разделить на следующие группы:

1. Антибиотики, оказывающие конкурентное действие на обмен веществ (пурамины, D-циклосерин, актиноизоиновая кислота)
2. Антибиотики, подавляющие синтез клеточных оболочек (пенициллины, бациллатин, ванкомицин, цефалоспорины).
3. Антибиотики, нарушающие функцию мембран (полиены, валиномицин, грамицидин, трихомицин и др.).
4. Антибиотики, подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот, сами по себе делятся на две группы:
 - Ингибиторы синтеза РНК (анзомицины, Гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиозин, оливинмицины и др.);
 - Ингибиторы синтеза ДНК актиномицин D (актиномицин C11, брунеомицин, митомоцин, новобиозин, саркомицин и др.).
 Кроме них, по биохимическим механизмам действия антибиотики классифицируются следующим образом:
 1. Азотистые основания: ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азазерин, декоинин, саркомицин и др.).
 2. Антибиотики, подавляющие синтез белка (баситроан, аминогликозиды, метимицин, тетрациклины, левомицетин, макролиды и др.).
 3. Антибиотики, угнетающие дыхание (олигомицины, потулин, пиоциантин и др.).
 4. Антибиотики, останавливающие фосфорилирование (валиномицин, грамицидин, колizei, олигомицины и др.).
 5. Антибиотики, обладающие антиметаболическими свойствами (актиномицины и антибиотические вещества, синтезируемые некоторыми видами грибов). Эти соединения действуют как антиметаболиты аминокислот, витаминов и нуклеиновых кислот.

Продуценты, химическая природа и спектр действия важнейших антибиотиков

Антибиотик	Продуцент	Химическая природа	Спектр действия
Пенициллин	<i>Penicillium notatum</i>	Гетероциклическое соединение, построенное из конденсированных тиазolidинового и бета-лактоимного колец $C_{16}H_{18}O_4N_2$	Грамположительные бактерии, спирохеты
Цефалоспорины C	<i>Cephalosporium sp.</i>	$C_{16}H_{21}O_8N_3S$	Грамположительные и граммотрицательные бактерии
Гризеофульвин	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Кислородсодержащее гетероциклическое соединение $C_{17}H_{17}O_6C$	Грибы

Стрептомицины	<i>Streptomyces griseus</i>	N-метил-L-глюкозаминидо-β-стрептозидострепидин	Грамположительные и граммотрицательные бактерии, туберкулезная палочка
Неомицин	<i>Streptomyces fradiae</i>	2,6-диаминоглюкозодезоксистрептамино-о-необиозамин	Грамположительные и граммотрицательные бактерии
Мономицин	<i>Streptomyces circulatus</i> var. <i>monomycin</i>	Глюкозаминидо-дезоксистрептамино-D-рибозидиамин	Грамположительные и граммотрицательные бактерии, простейшие
Канамицин	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Глюкозаминидо-дезоксистрептамино-канозамин	Грамположительные и граммотрицательные бактерии, туберкулезная палочка
Гентамицин	<i>Micromonospora purpurea</i>	Гексозамино-дезоксистрептамино-гептозамин	Грамположительные и граммотрицательные бактерии
Ристомицин	<i>Proactinomyces fructifer</i> var. <i>ristomycin</i>	Молекула содержит сахара и новые аминокислоты	Грамположительные бактерии
Линкомицин	<i>Streptomyces lincolnensis</i> var. <i>lincolnensis</i>	Молекула содержит метил-пропил-пролин и линкозамин	Грамположительные бактерии
Ванкомицин	<i>Streptomyces fradiae</i>	Полипептид	Туберкулезная палочка
Рифамицин	<i>Streptomyces mediterranei</i>	$C_{39}H_{49}NO_{14}$	Грамположительные и граммотрицательные бактерии, туберкулезная палочка
Циклосерин	<i>Streptomyces orchidaceus</i>	d-4-амино-3-изоксазолон	Туберкулезная палочка
Тетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Полноокислительное гидроароматическое соединение	Грамположительные и граммотрицательные бактерии, риккетсии
Эритромицин	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Макролид	Грамположительные бактерии
Олеандомицин	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Макролид	Грамположительные бактерии
Хлорамфеникол	<i>Streptomyces venezuelae</i>	D-трео-1-(n-нитрофенил)-2-дихлорэтил-амино-пропан-1,3-диол	Грамположительные и граммотрицательные бактерии

Новоблошин	<i>Streptomyces sphaeroides</i>	Дериват 4,7-дигидрокси-3-амино-8-метилкумарина	Риккетсии в ные бактерии
Нистатин	<i>Streptomyces noursei</i>	Полиен	Грибки
Леворин	<i>Streptomyces levoris</i>	Полиен	Грибки
Гипотримин В	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Молекула содержит ароматический, аминодиклительный и гликозидный фрагменты	Грамположительные бактерии, гелиминты
Актиномин	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Пептид, содержащий хромофор (феноксазин)	Грамположительные бактерии, раковые клетки
Оливомин	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Молекула содержит хромофор оливин, а также сахара оливиникозу, оливиноту, оливиноту и оливиноту	Грамположительные бактерии, раковые клетки
Брунеомин	<i>Streptomyces albus var. brunomycin</i>	$C_{24}H_{20}O_8N_4$	Грамположительные бактерии, раковые клетки
Рубомицин С	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	Молекула содержит хромофор и аминосахар	Грамположительные бактерии, раковые клетки
Митомин С	<i>Streptomyces caescriptosus</i>	Молекула содержит эфирин, пирролиндиольное кольцо, аминобензодиксонин	Грамположительные бактерии, раковые клетки
Тиротрицин	<i>Bacillus brevis</i>	Полипептид	Грамположительные бактерии
Граммидин С	<i>Bacillus brevis var. G. B.</i>	Декапептид	Грамположительные бактерии
Бацитрацин	<i>Bacillus subtilis</i>	Полипептид	Грамположительные бактерии
Полимиксин	<i>Bacillus polymyx</i>	Полипептид	Грамположительные бактерии
Низин	<i>Streptococcus lactis</i>	Полипептид	Грамположительные бактерии, туберкулезная палочка

Микроорганизмы-продуценты, синтезирующие антибиотики

Промышленное производство антибиотических веществ осуществляется в основном на основе микробиологического синтеза или путем химической модификации молекулы физиологически активного соединения, полученного в процессе биосинтеза. Только немногие антибиотики получают химическим синтезом (например, левомицетин).

Основными продуцентами производимых в промышленности антибиотиков являются бактерии, актиномицеты и грибы имеющие мицелий. В настоящее время в медицинской практике используется около 100 антибиотиков [33,34]

Антибиотик	Продуцент	Действующий объект	Механизм действия
Пенициллин	<i>Penicillium sp.</i>	Грамотрицательные бактерии	Клеточная стенка перестает образовываться
Цефалоспорины	<i>Cephalosporium sp.</i>	Грамотрицательные, грамположительные бактерии	Клеточная стенка перестает образовываться
Эритромицин	<i>Streptomyces erythreus</i>	Грамотрицательные бактерии	Подавляет активность рибосомного 50S-субъединицы
Стрептомицин	<i>S. griseus</i>	Грамотрицательные, грамположительные бактерии	Подавляет активность рибосомного 50S-субъединицы
Тетрациклин	<i>S. aureofaciens</i>	Грамотрицательные, грамположительные бактерии	Прекращает связывание аминокислот-тРНК с рибосомой
Полимексин	<i>Bacillus polymyxa</i>	Грамположительные бактерии	Разрушает цитоплазматическую мембрану
Бацитрацин	<i>B. subtilis</i>	Грамотрицательные бактерии	Останавливает синтез пептидогликанового компонента клеточной стенки
Амфотерицин В	<i>Streptomyces nodosus</i>	Микроскопические грибы	Воздействует на компоненты мембраны
Хлорамфеникол	<i>S. venezuelae</i>	Грамотрицательные, грамположительные бактерии	Останавливает процесс трансляции в рибосоме

Задачи занятия: Изучить способы производства кормовых витаминов и антибиотиков. Биотехнологические методы производства антибиотиков. Ознакомиться с питательными витаминами и с их производством, а также микроорганизмами синтезирующих витаминов.

Ознакомятся с антиоксидантами и их производством, а также бактериями, актиномицетами и грибами синтезирующих антиоксидантов.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, учебники.

Антибиотики – это группа высокоэффективных биологически активных веществ, которые синтезируются микроорганизмами и способны убивать или подавлять рост живых клеток. В зависимости от химической природы антибиотики делят на: - лактамные (пенициллины, цефалоспорины); - тетрациклины (тетрациклин, морфоциклин, метациклин); - макролиды (эритромицин); -аминогликозиды (гентамицин); - гликопептиды (ванкомицин); - амфениколы (левомецетин); - линкосамиды (линкомицин); - полиеновые (противогрибковые – нистатин); - противоопухолевые (блеоминин) и др. По типу действия антибиотики делят на бактерицидные и бактериостатические, по спектру действия – узкого и широкого. В качестве продуцентов антибиотиков используются микроорганизмы, плесневые грибы, актиномицеты, высшие растения и ткани животных. Значение антибиотиков для сельского хозяйства:

1. Антибиотики применяются для лечения животных и птиц;
2. Кормовые антибиотики используются для кормления животных и птиц.
3. Применяются антибиотики в растениеводстве для борьбы с болезнями растений, антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов и имеют ряд преимуществ перед химическими препаратами.
4. Антибиотики применяются также в пищевой промышленности для консервирования продуктов питания, для сохранения свежего мяса, молока, рыбы и т.д.

Методы получения антибиотиков:

1. Химический синтез.
2. Биосинтез (прямая ферментация микроорганизма – продуцента).
3. Мутационный биосинтез (мутасинтез).

Задание 1. Изучить этапы технологии производства неочищенных антибиотиков.

Этапы технологии производства неочищенных антибиотиков:

1. Посуду, инструменты, материалы стерилизуют, используя для этой цели автоклав. В него закладывают стеклянную посуду, затем герметически закрывают и проводят стерилизацию водяным паром в течение 30–45 минут. Наиболее эффективным способом стерилизации рабочего бокса является ультрафиолетовое облучение его бактерицидной лампой в течение 60 минут.

2. Для размножения гриба используют его исходную культуру, расфасованную в стеклянные флаконы. Для раскладки посевного материала производят посев гриба в колбу над пламенем спиртовой горелки. Колбы с посевным материалом ставят на специальную качалку для лучшей аэрации с целью более интенсивного роста гриба при температуре от 26 до 28° С на 18–24 ч.

3. Переносят посевной материал в большие бутылки и вновь помещают на качалку и подвергают встряхиванию при температуре 26–28°С в течение 18–24 ч.

4. Производят загрузку раскладки гриба и необходимых компонентов питательной среды в специальные реакторы для ферментации. При изготовлении кормового нативного антибиотика ферментация протекает 24–36 ч. Через каждые 6–12 ч из ферментатора отбирают пробу для проверки антибиотика на активность. В процессе развития гриба в ферментаторе накапливаются газообразные продукты его жизнедеятельности, которые удаляются через шланг.

5. По окончании процесса ферментации антибиотиков культуральную жидкость проверяют на активность преимущественно следующими микробиологическими методами:

- **методом перпендикулярных штрихов на агаре.** Для этого выделенную в питательной среде канавку заполняют средой с антибиотиком. Перпендикулярно канавке засевают различные виды микроорганизмов. Длина белых полосок указывает на неодинаковую чувствительность микробов к антибиотику.

- **методом бумажных дисков.** Для этого на питательную среду, засеянную микробами, накладывают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиком. В центре наложен диск без антибиотиков (контрольный). Вокруг диска с антибиотиками роста микроорганизмов не наблюдается (зона угнетения);

- **методом цилиндриков.** Для этого в питательную среду, засеянную бактериями, погружают стеклянные или металлические незапаянные цилиндрики, которые заполняют антибиотиками. Ширина зоны угнетения вокруг цилиндриков указывает на антимикробные свойства антибиотиков. Антибиотики выпускаются в жидком и сухом виде. После проверки на активность их расфасовывают в соответствующую посуду и этикетировать. Каждая серия антибиотиков обязательно снабжается наставлением о способе их использования.

Общие сведения о производстве антибиотиков

Успехи антибиотической отрасли промышленности и качество выпускаемой продукции определяются уровнем основных стадий технологического процесса. Промышленное получение антибиотиков — это сложная многоступенчатая биотехнологическая система, состоящая из ряда последовательных стадий.

1) **Стадия биосинтеза антибиотика.** Это основная биологическая стадия сложного процесса получения антибиотического вещества. Главная задача на этой стадии — создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика.

Высокая результативность стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента антибиотика, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма, в том числе стоимости применяемых предшественников, а также общих энергетических затрат на процессы, связанные с развитием продуцента антибиотического вещества.

2) **Стадия предварительной обработки культуральной жидкости,** клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации. Эффективность стадии во многом определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, местом основного накопления биологически активного вещества (в культуральной жидкости или внутриклеточно).

3) **Стадия выделения и очистки антибиотика.** На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и основного места накопления антибиотического вещества применяются различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используются следующие: экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, упаривание, сушка.

Особенность этой технологической стадии определяется тем, что на первом этапе работы приходится иметь дело с небольшой концентрацией (не более 1%) антибиотика в обрабатываемом растворе, тогда как на последующих этапах концентрация антибиотического вещества увеличивается до 20—30%. Все это требует применения различных емкостей и различных объемов используемых реагентов.

4) **Стадия получения готовой продукции,** изготовления лекарственных форм, расфасовка. Особенности стадии определяются очень высокими требованиями к качеству конечного продукта. При химической очистке антибиотических веществ необходимо соблюдать высокую чистоту помещений, оборудования, проводить систематическую дезинфекцию их. В

случае выпуска антибиотиков, предназначенных для инъекций, препараты должны быть стерильными: получение таких антибиотических препаратов, приготовление различных лекарственных форм, дозировка и упаковка должны осуществляться в асептических условиях.

В современных условиях производства антибиотиков необходимо принимать меры к максимальному снижению себестоимости препаратов. Для этого необходимо:

- 1) внедрение в производство наиболее высокопродуктивных штаммов микроорганизмов — продуцентов антибиотиков;
- 2) создание и обеспечение самых благоприятных условий развития продуцента антибиотика на относительно дешевых средах;
- 3) широкое использование математических методов планирования процесса развития организма и электронно-вычислительной техники с целью оптимизации и моделирования условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход антибиотика;
- 4) применение современного оборудования на всех стадиях технологического процесса с автоматизированными контролирующими устройствами основных параметров развития организма и стадий биосинтеза антибиотика [33,34,35,36]

Практическое занятие № 8.

Тема: Производство ферментов

Цель: Ознакомиться с технологиями производства ферментов.

План

1. Ферменты и их значение в народном хозяйстве.
2. Типы ферментов.
3. Технологии производства ферментов.

Ход занятий.

1. Повторение ранее изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

Ферменты (энзимы) — это биокатализаторы преимущественно белковой природы (иРНК тоже имеют ферментативную активность), которые принимают участие в химических реакциях в организме. Слово фермент происходит от слова fermentatio — брожение, а энзим — от «enzyme», что

означает *закавка в дрожжах*. Наука, изучающая ферменты, называется *энзимологией* или *ферментологией*.

Принятые обозначения в энзимологии:

E – фермент, энзим ("enzyme").

S – субстрат – вещество, на которое действует фермент.

P – продукт реакции – вещество, образовавшееся в результате ферментативной реакции

Значение ферментов: ферменты принимают участие в большинстве процессов, происходящих в организме – 1) реакция синтеза и распада веществ, 2) процессах переваривания и всасывания, 3) освобождения энергии, 4) обеспечивают координацию биохимических реакций. Нарушение синтеза или активности ферментов приводит к возникновению болезней. Ферменты располагаются в субклеточных структурах (оргanelлах) соответственно их функциям. Например: а) в ядре содержатся ферменты преобразования нуклеиновых кислот; б) во внутренней мембране митохондрий – ферменты дыхательной цепи; в) в лизосомах – гидролазы; г) в цитоплазме – ферменты гликолиза, синтеза жирных кислот; д) в матриксе митохондрий – ферменты ЦТК, окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, β -окисления жирных кислот; е) плазматическая мембрана содержит ферменты транслоказы, которые переносят через мембрану ионы Na^+ , K^+ , глюкозу, аминокислоты [36,37].

История энзимологии: В 1814 году Кирхгоф открыл, что солод ячменя вызывает брожение крахмала. Дальнейшее развитие ферментологии связано с именами Либиха, Пастера, Манасеиной, Лебелева. В 1913 году Ментен и Михаэлис выдвинули теорию механизма действия ферментов. В 1926 году (год рождения ферментологии как науки) Самнер выделил кристаллическую уреазу и доказал ее белковую природу. В 1969 году Меррифилд (Нью-Йорк) синтезировал искусственно рибонуклеазу.

Номенклатура ферментов принята V Международным конгрессом биохимиков (1961).

1. Систематическая номенклатура. Название фермента включает: химическое название субстрата; тип химической реакции (в соответствии с международной классификацией ферментов); суффикс «аза». Например, L-Лактат: NAD^+ - оксидоредуктаза.

2. Рабочая номенклатура. Название фермента образуется из химического названия субстрата с добавлением суффикса «аза» либо из названия химического превращения субстрата с добавлением суффикса «аза». Например, *lipos* (жир), фермент катализирующий его превращение

называется «липаза». Лактатдегидрогеназа – это рабочее название фермента L-Лактат: NAD^+ - оксидоредуктазы.

3. Тривиальное (исторически сложившееся) название. Не дает представления о субстрате или типе химического превращения. Пример – пенициллин, тромбин, трипсин, ренин. Согласно систематической номенклатуре каждому ферменту был дан код (шифр), состоящий из 4х цифр, которые обозначают: 1-класс, 2-подкласс, 3-подподкласс, 4-порядковый номер фермента в подподклассе. Например, 1.1.1.27 – лактатдегидрогеназа, которая относится к I классу – оксидоредуктазам.

Центры ферментов: Молекула фермента взаимодействует с субстратом не всей своей поверхностью, а определенными участками. На поверхности фермента различают:

Активный центр – это участок фермента, который взаимодействует с субстратом. Активных центров может быть 2, 4, 6, 8, в каждый входят 7-15 аминокислот. Наиболее часто в состав активных центров ферментов входят функциональные группы таких аминокислот:

- OH – группы серина, треонина, тирозина;
- SH – группы цистеина;
- NH – группа гистидина;
- COOH – группы глутамата и аспартата;
- NH_2 – группы аргинина и лизина.

В сложных ферментах в активный центр входят кофакторы (небелковые компоненты):

простетические группы, коферменты, ионы металлов. Активный центр является комплементарным к строению S, имеется соответствие (комплементарность) E и S как «ключа и замка».

В структуре активного центра выделяют:

• участок, который связывается с субстратом: контактный ("якорный") участок;

• каталитический участок, в состав которого входят химические группы, принимающие непосредственное участие в преобразовании субстрата ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $=\text{N}$, $-\text{NH}_3^+$, COOH).

Кроме активного центра, некоторые ферменты имеют дополнительный, регуляторный, **аллостерический** (allost – другой, steros – пространственный) центр, с которым взаимодействуют аллостерические регуляторы (эффекторы, модуляторы). Аллостерические эффекторы могут быть позитивными (активаторами), которые повышают каталитическую активность фермента или негативными (ингибиторами), которые ее снижают. Активный и аллостерический центры локализованы на разных субъединицах фермента.

При взаимодействии аллостерического центра с эффекторами происходят конформационные изменения активного центра фермента, что приводит к увеличению или снижению его активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются регуляторными [36, 37, 38].

Механизм действия ферментов. Считается, что взаимодействие фермента и субстрата происходит по закону комплементарности. То есть конформация активного центра фермента должна соответствовать конфигурации субстрата (они подходят друг другу как ключ к замку). Позже была предложена теория индуцированного соответствия – замок формируется только в момент приближения субстрата к активному центру фермента. В процессе взаимодействия субстрата с ферментом выделяют 5 этапов:

- 1) присоединение фермента к субстрату и образование фермент-субстратного комплекса;
- 2) квантово-механические сдвиги, которые приводят к ослаблению связей;
- 3) разрыв или образование новых связей ведет к образованию продукта реакции;
- 4) образование новых связей не соответствует активному центру фермента;
- 5) освобождение продуктов реакции от фермента.

Ферменты как биологические катализаторы широко используются людьми в своей практической деятельности в различных областях. Источником ферментов могут быть животные ткани, растительные клетки и микроорганизмы. В настоящее время установлено, что существует более двух тысяч ферментов, в то время как несколько сотен были выделены в чистом виде как отдельные вещества.

Микроорганизмы представляют особый интерес в качестве источника производства ферментов, поскольку они быстро растут в доступной среде. Они дают возможность приготовить нужный фермент по своему усмотрению, в зависимости от состава используемых кормов. Кроме того, многие микроорганизмы выделяют ферменты из своих клеточных оболочек, что делает возможным более активное использование микроорганизмов.

Помимо большой интенсивности обмена веществ, скорость роста биомассы у микроорганизмов очень велика. Это позволяет выделить в некоторых клетках за короткий промежуток времени огромное количество ферментов в течение 24-72 часов. Его нельзя сравнивать с животным и растительным сырьем.

Еще одним важным свойством многих микроорганизмов является их способность расти, используя в качестве корма различные отходы жизнедеятельности (целлюлозу, нефтяные углеводороды, метан, метанол и

др.). Некоторые виды сырья, которые могут использовать микроорганизмы, токсичны для человека и животных. Таким образом, микроорганизмы служат для защиты окружающей среды, а также для синтеза ферментов.

Количество синтезируемых определенных ферментов может быть еще выше в клетке микроорганизмов. Например: количество рибулозобисфосфат-карбоксилазы составляет 40-60% водорастворимого белка, который в какой-то момент синтезируется фототрофными бактериями.

Как уже отмечалось, многие микроорганизмы вырабатывают ферменты, которые в больших количествах выделяются в культуральные условия. Эти ферменты в основном относятся к гидролазам, которые расщепляют белки, крахмал, целлюлозу, жиры и другие нерастворимые в воде вещества. Несколько ферментов встречаются только в микроорганизмах. Установлено, что фермент нитрогеназа, участвующий в образовании аммиака из азота в виде молекулы, встречается только у бактерий, обладающих способностью поглощать азот.

Еще одной характерной особенностью некоторых бактерий является их способность окислять неорганические субстраты: аммиак, нитриты, сульфидные и другие соединения серы, двухвалентное железо. Осуществление таких процессов обусловлено наличием в микроорганизмах отдельных ферментов. Установлено, что некоторые бактерии и водоросли могут образовывать водород в молекуле и хранить ферменты дегидрогеназы, которые проводят окислительно-восстановительные реакции.

Большинство бактерий обладают способностью синтезировать ферменты, способствующие росту и развитию, используя в качестве субстрата метан, метанол, метилированные амины, окись углерода и другие идентичные соединения углерода. Очистка окружающей среды от нескольких загрязняющих ее веществ осуществляется за счет ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, которые разлагают пластмассы, пестициды и другие токсичные, сложные соединения на более простые компоненты [37,38].

Технология получения ферментов

Производство ферментных препаратов микробного происхождения может осуществляться поверхностным и глубинным методами.

Поверхностный метод заключается в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненной стерилизованной сыпучей питательной среды, размещенной в ковшах. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и расхода воздуха. Основные параметры поверхностного способа получения ферментов приведены на слайде.

Для выращивания продуцентов ферментов глубинным методом в промышленных условиях используют ферментаторы из нержавеющей стали, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Глубинный способ ведения процесса имеет ряд существенных преимуществ перед поверхностным культивированием, т. к. позволяет существенно автоматизировать процесс, в ряде случаев значительно сократить объемы отходов, проводить процесс непрерывно, сократив в 2–4 раза площади цехов, а также позволяет использовать анаэробных продуцентов.

Сначала ферментатор заполняют питательной средой, стерилизуют ее, затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфицирования в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала и другими условиями культивирования. Основные параметры глубинного способа получения ферментов приведены на слайде.

Культура микроорганизмов, выращенная поверхностным способом, и культуральная жидкость после глубинного культивирования содержат большое количество балластных веществ. Выделение и очистка ферментов – трудоёмкий и дорогостоящий процесс поэтому, если ферментный препарат можно использовать в виде неочищенной культуры микроорганизмов, его очистку не проводят. В таких отраслях, как спиртовая и кожевенная, целесообразнее использовать именно неочищенную культуру микроорганизма; то же самое можно сказать и об использовании культур микроорганизмов в сельском хозяйстве при приготовлении комбикормов и при непосредственной обработке кормов на фермах [37,38].

В большинстве отраслей пищевой промышленности (хлебопекарной, пивоваренной, виноделии, сыроделии, крахмало-паточном и сокоэкстрактном производствах), а также в микробиологической промышленности и особенно медицине можно использовать только очищенные препараты ферментов, частично или полностью освобожденные от балластных веществ.

Исходным материалом для получения очищенных ферментных препаратов может служить фильтрат культуральной жидкости, резе – биомасса продуцента или водный экстракт из поверхностной культуры продуцента. Ферментные препараты могут быть получены в виде порошков или жидких концентратов. В процессе выделения происходит повышение доли активного белка в общей массе препарата, увеличивается его удельная активность.

Например, в таблице представлены основные этапы выделения высокоочищенной протениназы из технического препарата ГЗХ. Эта схема позволяет получить с высоким выходом (до 22 %) очищенный препарат инклеточной нейтральной протениназы из *B. subtilis*, которая относится к металлопротеиназам.

Схема очистки фермента от балластных веществ сводится к освобождению его от нерастворимых веществ, сопутствующих растворимых веществ и других ферментов. Процессы получения очищенных препаратов из поверхностных и глубинных культур несколько различны. Из поверхностных культур труднее получить высокоочищенные препараты из-за большого количества балластных веществ. Из глубинных культур получить очищенные препараты несколько легче, но при этом приходится вести выделение из разбавленных растворов, если выделение ферментов проводится из жидкой части культуры. Выделение осложняется, если фермент внутриклеточный, и тогда необходимо разрушать клетки микроорганизмов.

Принципиальную схему выделения и очистки ферментов из глубинных и поверхностных культур микроорганизмов можно представить в виде следующей схемы.

Из нее ясно, что экстракт из поверхностной культуры или фильтрат культуральной жидкости является исходным материалом для получения препаратов ферментов различной степени очистки. На первом этапе выделения отходом процесса является нерастворимая часть культуры – биомассот, содержащий нерастворимые включения среды и биомассу продуцента.

Далее в зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ при получении очищенных ферментных препаратов комбинируют различные приемы и методы, такие, как термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями и солями, очистка на молекулярных ситах, ионообменная хроматография, электрофорез и др.

Еще одна технологическая схема получения препаратов из поверхностной и глубинной культур в виде жидких концентратов, сухих технических препаратов, получаемых сушкой распылением, и препаратов, осажденных органическими растворителями.

Фильтрат охлажденной культуральной жидкости собирается в основном сборнике и по мере надобности передается в сборник небольшой вместимости перед поступлением в подогреватель вакуум-выпарной установки пленочного типа. Концентрат культуральной жидкости с содержанием сухого вещества 6–10 % поступает в сборник концентрата.

Для получения сухого технического препарата концентрат направляют в башню распылительной сушилки 8. Сухой препарат через циклон 10, бункер 11 и шнек 12 попадает на стадию стандартизации, фасования и упаковки.

Для получения более очищенного препарата концентрат из сборника подается на осаждение органическим растворителем. Предварительно концентрат охлаждают в теплообменнике до температуры 2–3 °С и подают через дозатор в осадитель. Одновременно в осадитель дозируется охлажденный растворитель. Образовавшийся осадок отделяют на сепараторе 16. Надосадочную жидкость направляют на регенерацию, а осадок – на промывку спиртом и повторное сепарирование. Промытый осадок высушивают в вакууме, измельчают, взвешивают, смешивают с наполнителем и направляют на фасование и упаковывание.

При получении ферментных препаратов из культур микроорганизмов, выращенных поверхностным способом, процесс очистки начинается с экстракции ферментов водой. Нерастворимый осадок высушивают и в виде сухого бишофита утилизируют на корм скоту.

Экстракт с содержанием сухого вещества 7–14 % при получении из него сухих препаратов не нуждается в дополнительном концентрировании и поэтому может быть сразу направлен на распылительную сушку с целью получения технического препарата, или же экстракт направляется в осадитель, а затем на осаждение органическими растворителями или солевыми растворами. Из экстракта можно получить стабильный жидкий концентрат с содержанием сухого вещества 50%, для чего экстракт направляют в сборник, затем в подогреватель и на вакуум-выпарную установку. Готовый жидкий концентрат фасуют в специальные емкости и направляют на склад готовой продукции. Из глубинной культуры можно также получать жидкие концентраты, например, методом ультрафильтрации.

Существуют многочисленные схемы получения ферментных препаратов различной степени очистки, вплоть до кристаллических и гомогенных препаратов. Такие схемы, созданные в различных странах мира, в большинстве своём очень сложны и сочетают в себе самые различные комбинации технологических приёмов. Поэтому давать какие-то общие рекомендации крайне трудно, и в каждом конкретном случае необходимо проводить кропотливые исследования на всех стадиях выделения фермента из данной культуры продуцента. Только в результате такой работы можно прийти к практическим рекомендациям, которые будут справедливы только для данного фермента, данной культуры микроорганизма и для данной среды [37,38,39].

Задачи занятия: Изучить свойства и способы производства ферментов. Ознакомиться с ферментами, типами ферментов и с их производством, а также микроорганизмами синтезирующих ферментов.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, учебники.

Задачи: Изучить важнейшие ферментные препараты, применяемые в животноводстве:

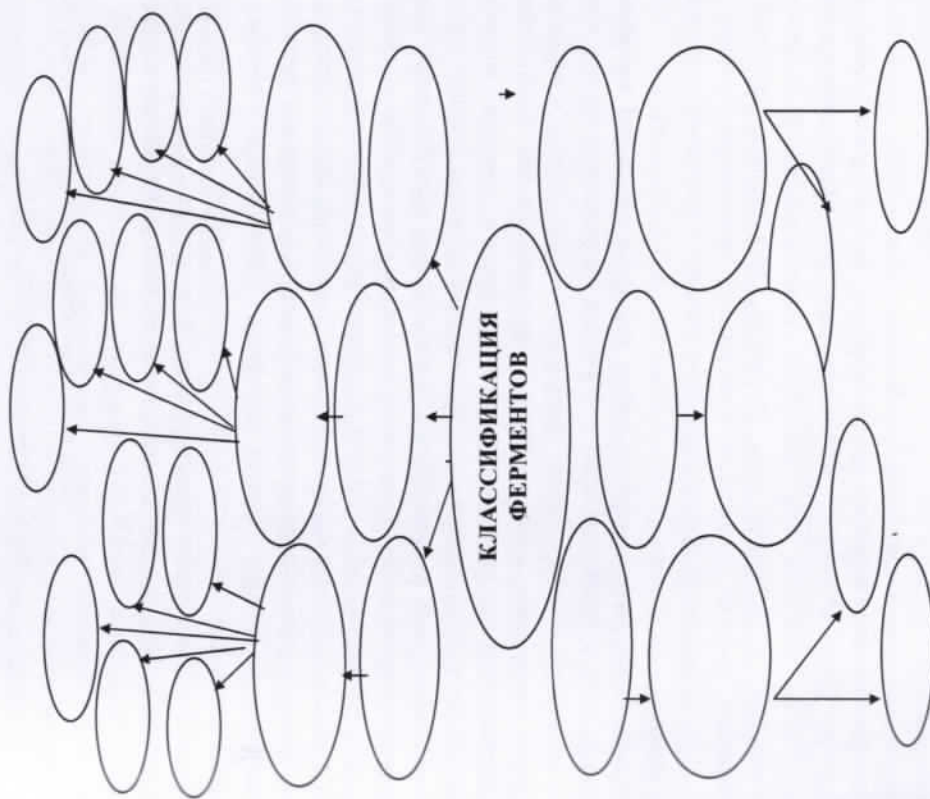
Важнейшие ферментные препараты, применяемые в животноводстве

Препарат	Область применения
Амилосубтилилин ГЗХ	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика желудочно-кишечных, паразитарных заболеваний
Протосубтилилин ГЗХ	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных, птиц и рыб; получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика желудочно-кишечных и паразитарных заболеваний
Глюкаваморин ПЗХ	Добавление в кормовые рационы телят и ягнят, свиней, крупного рогатого скота; при силосовании картофеля, бобовых трав
Пектаваморин ПХ	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; при силосовании картофеля, бобовых трав
Пектофостидин ГЗХ	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; гидролиз БВК, дрожжей и растительных отходов; силосование бобовых трав;
Амилоризин ПХ	Добавление в кормовые рационы ягнят и при откорме свиней
Дрожжелитин ГЗХ	Получение ферментативных гидролизатов
Целлюлозирин ГЗХ	Добавление в кормовые рационы крупного рогатого скота и птиц; гидролиз растительных отходов; силосование бобовых трав
Гликозидаза ГЗХ	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получение ферментативных гидролизатов
Лизосубтилилин Г10Х	Получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика паразитарных заболеваний крупного рогатого скота

Протезим ГЗХ	Добавление в кормовые рационы свиней и птиц
Лизоцеллолозин Г10Х	Гидролиз дрожжей и растительных отходов; добавление в кормовые рационы птиц
Лизогризин Г10Х	Гидролиз дрожжей и растительных отходов
Мальтаваморин Г10Х	Гидролиз растительных отходов
Целлолигнорин ПХ	Гидролиз растительных отходов, силосование бобовых трав
Целлокандин ГЗХ	Гидролиз растительных отходов, силосование бобовых трав
Лизоцим ГЗХ	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; лечение и профилактика паразитарных заболеваний

Примечание. Буква Г означает, что препарат получен при глубинном выращивании микроорганизмов, П - получен из поверхностной культуры микроскопических грибов, 2- показывает, что это концентрат, 3 — сухой ферментный препарат, 10- очищенный фермент, препарат, ПХ — высушенная поверхностная культура грибов.

Задание: С помощью данного метода заполните ниже следующий график:



Практическое занятие № 9.

Тема: Заболевания генома белка

Цель: Ознакомиться с заболеваниями генома белка.

План

1. Понятие «молекулярная патология» или «молекулярные болезни».
2. Свойства заболевания геномики белка и их виды.
3. Причины появления опухолей.

История исследований болезней обмена веществ у человека убедительно показывает, что пионерами в данной области были клиницисты, что описали в конце прошлого и начале нынешнего столетия некоторые из этих патологий. Знаменитая концепция А. Гаррода о врожденные нарушения обмена как о определенных метаболические блоки, сформулированная еще в 1908 г., стимулировала биохимические исследования в этом направлении, особенно широкое развитие они получили в последние 2-3 десятилетия. До нынешнего времени накоплен огромный материал с биохимической характеристики многих болезней обмена, без чего невозможна четкая диагностика и лечение. Однако, как и ранее, больные с дефектами обмена на первых этапах обследования попадают в первую очередь в поле зрения клиницистов различных профилей, перед которыми встает очень трудная задача - отнести ту или иную патологию к определенной болезни обмена и организовать комплексное клинико-биохимическое обследование.

Многие заболевания обусловлены мутациями, которые изменяют генетическую конституцию человека, что приводит к нарушению нормального функционирования организма. Уже выявлено около 600 наследственных нарушений метаболизма, но только для 105 из них установлен точный уровень "метаболического блока" и характер дефекта. Исследователи продолжают идентифицировать все новые и новые заболевания из этой группы.

На основании данных современной биохимической генетики можно объяснить, каким образом генетическая информация транслируется при синтезе белков со специфическими метаболическими или структурными особенностями. Все названы мутации могут приводить как к нарушению первичной структуры белка, так и к изменению количества синтезированного специфического белка. Если процесс нарушен врожденным дефектом метаболизма, имеет существенное значение для здоровья и если степень изменений достаточный для проявления патологического процесса, то могут проявляться клинические признаки. Некоторые генетические изменения не сопровождаются клиническими проявлениями и лишь определяют

полиморфизм, что отличает одного индивида от другого. Другие изменения могут проявляться лишь при определенных условиях, которые на протяжении всей жизни могут и не возникнуть. Наконец, вероятные такие генетические нарушения, которые вызывают заболевания, выраженность которого колеблется от очень умеренных проявлений до состояний, приводящих к летальному исходу. В большинстве случаев врожденные нарушения обмена веществ с клиническими последствиями проявляются (или могут быть обнаруженными) в период новорожденности. Такие младенцы сразу после рождения конечно выглядят здоровыми, однако признаки патологии, такие как летаргия, затруднение три кормления, судороги, рвота и др., могут проявиться в них уже через несколько часов. Некоторые нарушения метаболизма могут остаться нераспознанными в период новорожденности и диагноз может быть поставлен только через несколько месяцев и даже лет. Ранние клинические проявления обычно неспецифические и могут быть отнесены к перинатальной патологии. Врожденное нарушение обмена веществ должно рассматриваться как возможный источник состояния у любого ребенка с одним из указанных клинических проявлений:

- неопределенное отставание умственного, двигательного развития, судороги;
- необычный запах, в частности, под время острого заболевания;
- эпизоды необоснованной рвоты, ацидоза, нарушений психики, кома;
- почечная колика, гепатомегалия [28, 40].

Классификация молекулярных нарушений обмена веществ

1. Нарушения метаболизма аминокислот:
 - 1.1. Фенилаланина (фенилкетонурия);
 - 1.2. Тирозина (тирозинемия, алькаптонурия);
 - 1.3. Метионина (гомоцистинурия);
 - 1.4. Цистина (цистинурия);
 - 1.5. Триптофана (болезнь Хартнупа, триптофанемия и др.);
 - 1.6. Лейцина (болезнь кленового сиропа);
 - 1.7. Гистидина (гистидинурия, гистидинемия) и других аминокислот.
2. Нарушения метаболизма углеводов:
 - 2.1. Галактозы (галактоземия);
 - 2.2. Фруктозы (фруктоземия);
 - 2.3. Гликогена (гликогенозы);
 - 2.4. Дисахаридов энтеропатии (синдром мальабсорбции углеводов).
3. Наследственные болезни обмена соединительной ткани:
 - 3.1. Мукополисахаридозы;
 - 3.2. Болезнь Марфана.

4. Наследственные болезни обмена липидов:

4.1. Гиперлипотеинемия;

4.2. Сфинголипидозы (болезнь Ниманна - Пика);

4.3. Ганглиозидозы (болезнь Тея - Сакса).

5. Наследственные болезни порфиринового обмена (порфирии).

6. Энзимопатии желчно-пигментного обмена (болезнь Жильбера).

7. Энзимопатии панкрео-инсулярного гормона-синтеза:

7.1. Муковисцидоз;

7.2. Урожденная недостаточность энзимов поджелудочной железы;

7.3. Болезнь Вильсона - Коновалова;

7.4. Целиакия.

8. Энзимопатии биосинтеза гормонов.

Рак — злокачественная опухоль из клеток эпителия кожи, слизистых оболочек желудка, кишечника, дыхательных путей, различных желез и т. д.

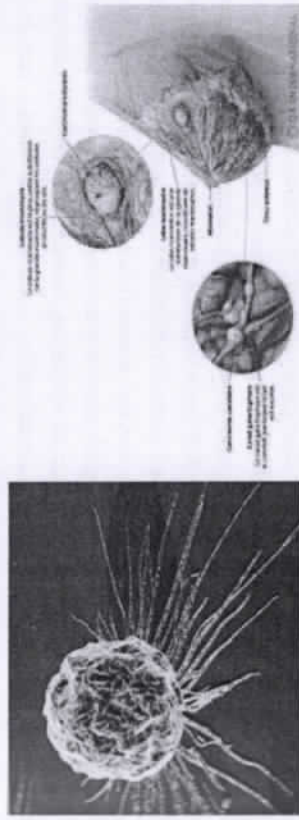
В связи с морфологическими особенностями выделяют различные формы рака: плоскоклеточный рак (развивается преимущественно на коже и слизистых оболочках, покрытых плоским эпителием), аденокарциному, скарин и другие.

Рак (канцер) (латинское *cancer*, *carcinoma*, от греческого *carcinos* — рак, краб) — злокачественная опухоль из эпителия, то есть из ткани, покрывающей животный организм снаружи и выстилающий его изнутри, а также формирующей его железы. Следовательно, рак — злокачественная опухоль (новообразование, бластома) кожи, пищеварительного тракта, дыхательных и мочевыводящих путей, легких, почек, печени, половых органов и желез. Название, данное врачами средневековья, связано с внешним видом опухоли, напоминающей рака или краба. Рак составляет подавляющее большинство всех злокачественных новообразований человека, к которым также относятся многочисленные саркомы, гемобласты, глиальные, костные и другие опухоли. В некоторых странах под раком понимают любое злокачественное новообразование.

Возникновение раковой опухоли

Опухоль возникает вследствие нарушения процессов обмена веществ в клетках и ослабления контроля за внутриклеточными процессами со стороны организма. В результате приобретения новых качеств и частичной независимости от регуляторных систем организма, молодые делящиеся клетки теряют способность к дифференцировке — они не приобретают должных функций и не формируют нормально работающую ткань. Не участвуя в жизнедеятельности организма, такие клетки становятся ненужными ему, лишними. Организм пытается избавиться от них при помощи иммунных реакций, которые не всегда оказываются эффективными.

Избыток молодых, все время размножающихся, но не работающих клеток, к тому же требующих все возрастающего количества энергетических и пищевых ресурсов, ведет к тому, что такие клетки нападают на породившую их ткань или орган. Эти клетки (они и называются опухолевыми) внедряются в ткань органа, инфильтрируют (см. Инфильтрат) и разрушают их, захватывают кровеносные и лимфатические сосуды, по которым распространяются по организму — метастазируют [41, 42].



Причины рака. Онкогенез

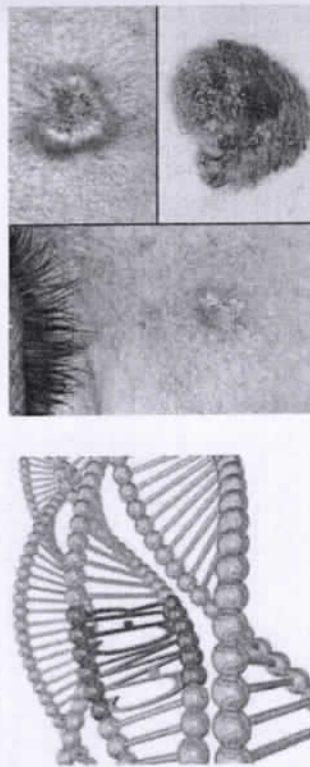
О причинах появления опухоли известно не все. Предрасположенность к раку того или иного органа (например, молочной железы, желудка) наследуется, то есть носит семейный характер. Наследуются гормональные отклонения в организме или местные структурные нарушения в каком-либо органе (полипоз кишечника, родимые пятна на коже и т. д.). Эти отклонения и неправильности и могут привести к развитию опухоли, что отметил еще более ста лет тому назад немецкий патолог Юлиус Фридрих Конгейм. Однако для возникновения опухоли — онкогенеза — одних тканевых уродств недостаточно. Необходимы мутагенные стимулы, вызывающие изменения в наследственном аппарате клетки и затем опухолевую трансформацию. Такие стимулы могут быть внутренними (например, повышенная выработка гормонов или других продуктов метаболизма, их дисбаланс) или внешними — физическими (например, ионизирующее или ультрафиолетовое излучение), химическими, вирусной природы и т. д. Эти факторы обладают мутагенным и, тем самым, канцерогенным воздействием, которое запускает механизм, производящий раковые клетки во все возрастающем количестве.

Считается, что программу опухолевого роста имеет любая клетка. Эта программа записана в специальных генах — онкогенах. В обычных условиях

онкогены жестко блокированы (репрессированы), но под воздействие мутатенов блокада может сниматься, и онкогены получают возможность работать. Известно также, что многие канцерогены подавляют иммунную систему организма, освобождая от ее жесткого и постоянного контроля отклонившиеся от нормы клетки. Контрольные и восстанавливающие функции иммунной системы резко ослабевают в старости, когда чаще всего и появляется злокачественная опухоль.

Формы рака

Раковая ткань представляет собой весьма подвижное и изменчивое образование. Поведение ее зависит от множества факторов, в том числе от интенсивности защитных противораковых реакций, на которые способен организм в том или ином конкретном случае. Иммунная система человека может частично или полностью разрушить опухоль. Она также может блокировать раковые клетки на начальной стадии и не дать им возможности проникнуть вглубь органа (неинвазивный рак, или «рак на месте» — «in situ»). В названии формы рака находят отражение: принадлежность к тому или иному органу (рак легких, рак яичников и т. д.), вид эпителия, служащий источником опухоли (рак плоскоклеточный, железистый — аденокарцинома, базальноклеточный и т. д.), скорость роста, гистологическим эквивалентом которой служит степень зрелости раковой ткани (рак дифференцированный и недифференцированный), свойства, связанные со степенью зрелости опухоли и эффективностью иммунных реакций в ней (рак агрессивный, стабильный, регрессивный).



Клиника, диагностика, профилактика и лечение рака

Симптомы заболевания раком появляются сравнительно поздно, когда опухоль достигает значительных размеров и нарушает функции органа, в котором растет. Если орган полый, может нарушиться его проходимость, появляются патологические (воспалительного или иного характера) выделения, возможны кровотечения. Больной ощущает слабость, худеет, у

него повышается температура тела, он испытывает боли, увеличивается скорость оседания эритроцитов.

Важнейший принцип диагностики рака — ее своевременность, выявление опухоли на ранней (доклинической) стадии, когда выздоровление наступает у 80-95% больных. Для этого используются все известные современной медицине методы: клинические, биохимические, иммунологические, рентгенологические, ультразвуковые, эндоскопические, цитологические, гистологические со взятием биопсии. Эффективность совокупного их применения очень высока.

Профилактика рака — это, во-первых, выявление его на начальной стадии при массовом обследовании той части населения, которую относят к группе повышенного риска. Для этого используют флюорографию легких, маммографию, мазки из шейки матки. Другая задача профилактики — создание для людей оптимальных условий существования со сведением к минимуму загрязненности среды обитания, с уменьшением вероятности контакта организма с канцерогенными факторами, общее оздоровление населения. Подобные мероприятия могут существенно снизить заболеваемость злокачественными опухолями.

Лечение рака — хирургическое, а также с применением гормонов, лучевой терапии и химиотерапевтических средств. Для повышения защитных сил организма прибегают к воздействию на иммунную систему. Различные методы лечения часто используют в сочетании друг с другом — в зависимости от стадии заболевания, локализации опухоли, тканевой ее принадлежности и других факторов. Существует множество хороших клиник для лечения этой болезни. В России хороший онкологический центр в Екатеринбургe, возможно лечение в клиниках Германии, и в других странах [41, 43].

Распространенность рака (эпидемиология)

Рак — болезнь пожилых людей. В индустриально развитых странах Запада он занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний в перечне причин смерти и, несмотря на усилия медиков, не уступает его уже много десятилетий подряд. Происходит даже рост заболеваемости раком в этих странах (с 1960 по 1980 год — в полтора раза), связанный, как полагают, с постарением населения и ухудшением экологических условий в больших городах. Шесть миллионов умерших (в 1996 году — 6,3 млн.) — такова ежегодная дань человечества злокачественной опухоли.

В некоторых случаях рак отступает. Так, реализация социальной программы по борьбе с раком желудка в Японии за сравнительно короткое

время привела к снижению заболеваемости почти в два раза. Значительное снижение заболеваемости раком желудка отмечено также в Соединенных Штатах Америки и странах Европы. Связано оно, однако, с немедицинскими факторами. «Виновником» частичной победы над опухолью оказался бытовой холодильник, коренным образом изменивший традиционные методы консервации пищевых продуктов солением и копчением.

У разных народов и в разных географических зонах распространены разные формы рака. Япония и Россия «больны» раком желудка. В США, развитых странах Европы, а также в крупных городах России преобладают рак легких и рак молочной железы (в Москве в 1996 году от всех форм рака умерло 225 тысяч человек). Это результат загрязнения среды обитания промышленными отходами, выхлопными газами автомобилей, курения табака, а также не всегда оправданного отказа от грудного вскармливания новорожденных. В Африке национальное бедствие — рак печени (малобелковая пища), в Монголии и Казахстане — рак пищевода (обжигание горячей и жирной пищи), в Индии и Средней Азии — рак полости рта (привычка жевать бетель). Пристрастие американцев к легко усваиваемым продуктам без клетчатки (к «быстрой еде») привело к росту в стране рака толстой и прямой кишок.

Перемена места жительства людей сопровождается постепенным снижением (через поколение) заболеваемости «родным» раком и приобретением предрасположенности к раку, преобладающему в новой стране проживания. Распространенность различных форм рака изучают, анализируя условия жизни, привычки и особенности питания населения, минеральный состав почвы и воды, всю совокупность экологических условий; составляются и специальные карты, отражающие число заболеваний различными формами рака в конкретных населенных пунктах определенного региона.

Наука о раке называется — онкология (от греческого *onkos* — опухоль и *logos* — слово, учение) — медико-биологическая наука, изучающая теоретические, экспериментальные и клинические аспекты онкогенеза у человека, животных, растений и разрабатывающая методы распознавания, лечения и профилактики опухолей.

Онкология сформировалась в 20 веке на основе достижений экспериментальной медицины. В экспериментальной (начиная с трудов русского ученого Мстислава Александровича Новинского, 1876) и теоретической онкологии сложились 3 основных направления: вирусное (французский ученый Амадей Боррель, 1903; американский патолог и онколог — Фрэнсис Роус, 1911), химическое (японские ученые К. Ямагива и

К. Итикава, 1915) и радиационное (французский ученый и радиолог Антуан Лакассань, 1932, и другие) в зависимости от индуцирующего агента. В СССР ученый, микробиолог и иммунолог Лев Александрович Зильбер создал вирусгенетическую теорию опухолей. Быстрое развитие клинической онкологии связано с достижениями хирургии, радиологии, химиотерапии и иммунологии [41,42,43].

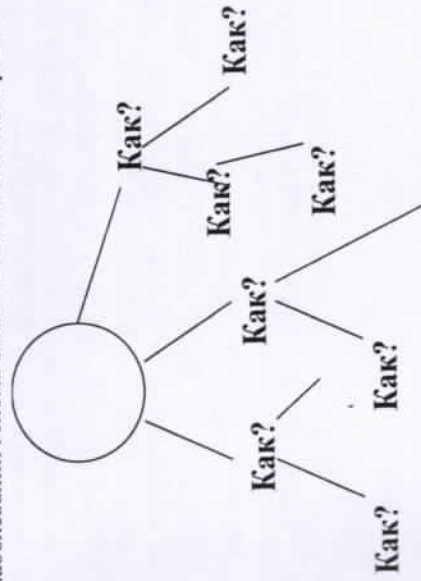
Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала.
4. Задание на дом.
5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

Задачи занятия: Изучить свойства заболеваний генома белка и причины появления опухолей.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, учебники.

Ступенчатое подчинение снизу вверх диаграммы «Как?», покажите причины заболеваний генома белка на основе этой диаграммы.



Практическое занятие № 10.

Тема: Запрограммированная клеточная смерть

Цель: Ознакомиться с апоптозом – с механизмом запрограммированной клеточной смертью.

План:

1. Понятие апоптоза. Краткая история изучения явления апоптоза
2. Причины и примеры апоптоза. Механизм течения апоптоза. Морфология апоптоза
3. Предель деления клеток по Леонарду Хейфлику (Лимит Хейфлика)
4. Регуляция апоптоза. Роль усиления или ослабления апоптоза в развитии патологических процессов
5. Примеры заболеваний, связанных с апоптозом. Злокачественные опухоли и апоптоз. Апоптоз Т-хелперов при СПИДе

У всех многоклеточных организмов, включая человека, генетически заложена программа гибели клеток, называемая апоптозом, или запрограммированной клеточной смертью [44].

После открытия феномена апоптоза стало очевидным, что гибель эукариотических клеток происходит не только вследствие их случайного повреждения или старения, но и в результате активации определенной генетической программы. Определяющее биологическое значение программируемой гибели клеток связано с поддержанием оптимальной численности клеток в органах и тканях путем удаления «избыточных» и функционально аномальных клеток, включая злокачественно трансформированные клетки.

В генетическом аппарате многоклеточных организмов - животных, растений и грибов заложена программа гибели клеток. Это специальная программа, которая при определенных обстоятельствах может привести клетку к гибели. При нормальном развитии эта программа направлена на удаление избыточно образовавшихся клеток «безработных», а также клеток «пенсионеров», переставших занимать общественно полезным трудом.

Другая важная функция клеточной гибели - удаление клеток «инвалидов» и клеток-«диссидентов» с серьезными нарушениями структуры или функции генетического аппарата. В частности, апоптоз - один из основных механизмов самопрофилактики онкологических заболеваний [54].

Для выявления и изучения клеток, находящихся в состоянии апоптоза, разработано множество разнообразных методов и их модификаций. Эти методы базируются на регистрации событий, связанных с:

- уменьшением размеров и увеличением плотности клеток;

- изменениями состава наружной мембраны клеток;
- избирательной фрагментацией ядерной ДНК;
- изменениями содержания молекулярных маркеров Апоптоза (или их перераспределением в погибающей клетке).

Апоптоз — необходимое общеприродное явление, позволяющее биологическим системам освободиться от стареющих или больных, появившихся в результате мутаций и ставших потенциально опасными для организма клеток. Такие клетки должны быть умерщвлены для того, чтобы, во-первых, обеспечивался баланс между пролиферацией и смертью части клеток организма, а во-вторых, чтобы отягощенные грузом мутаций клетки не исказили наследственную программу развития [44].

Данная тема очень актуальна на сегодняшний день, поскольку физиологическая роль апоптоза очень существенна, нарушения этого процесса могут быть весьма вредными. Так, несвоевременный апоптоз определенных мозговых нейронов оказывает влияние на образование нарушений, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, в то время как неспособность делящихся клеток перейти к апоптозу после случившихся существенных нарушений ДНК способствует развитию рака [52].

Понятие апоптоза

Апопто́з (от греч. - «листопад») - регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро (в среднем за 90 минут) фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции. Морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1—3 часа. Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (повреждённых, мутантных, инфицированных) клеток. В многоклеточных организмах апоптоз к тому же задействован в процессах дифференциации и морфогенеза, в поддержании клеточного гомеостаза, в обеспечении важных аспектов развития и функционирования иммунной системы. Апоптоз наблюдается у всех эукариотов, начиная от одноклеточных простейших и вплоть до высших организмов. В программируемой смерти прокариотов участвуют функциональные аналоги эукариотических белков апоптоза [55].

Исследования программируемой клеточной смерти ведутся с конца 1960-х годов. Термин «апоптоз» был впервые употреблён в 1972 году в работе британских учёных — Дж. Керра, Э. Уайли и А. Керри. Одними из первых к изучению генетики и молекулярных механизмов апоптоза приступили С. Бреннер, Дж. Салстон и Р. Хорвиц, все трое в 2002 году были

удостоены Нобелевской премии по физиологии или медицине за открытия в области генетической регуляции развития органов и за достижения в исследованиях программируемой клеточной смерти. В настоящее время установлены основные механизмы реализации апоптоза в эукариотических клетках, активно ведутся исследования регуляторов и активаторов апоптоза. Интерес учёных связан с возможностью применения знаний о программируемой клеточной смерти в медицине при лечении онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний [55].

В организме среднестатистического взрослого человека в результате апоптоза погибает ежедневно порядка 50—70 миллиардов клеток. Для среднестатистического ребёнка в возрасте от 8 до 14 лет число клеток, погибших путём апоптоза, составляет порядка 20—30 миллиардов в день. Суммарная масса клеток, которые на протяжении 1 года жизни подвергаются разрушению, эквивалентна массе тела человека. При этом восполнение утраченных клеток обеспечивается за счёт пролиферации — увеличения клеточной популяции путём деления [55].

В отличие от некроза, апоптоз — активный процесс: клетка включает специальные энергетически контролируемые механизмы самоуничтожения, которые осуществляют генетически контролируемое разрушение компонентов клетки. Причем в конце процесса клетка распадается на несколько фрагментов — апоптотических телец, каждое из которых окружено плазмолеммой с несколько измененной структурой. Эти тельца быстро распознаются окружающими клетками (по особенностям плазмолеммы) и быстро ими фагоцитируются. Поэтому вскоре на месте погибшей клетки не остается никакого следа. Соседние клетки не повреждаются, и воспалительная реакция не развивается.

Таким образом, апоптоз — эволюционно выработанный механизм клеточного самоуничтожения, позволяющий уничтожать ненужные или ставшие опасными клетки без ущерба для окружающих клеток. Поэтому апоптоз нередко определяют, как программируемую гибель клетки [45].

Краткая история изучения явления апоптоза

Термин «апоптоз» (в переводе с греч. Означает опадание листьев с деревьев осенью) введен в научный обиход австралийским патологоанатомом Керром и соавт. в 1972 г. для обозначения формы гибели клеток, прототипом которой является гибель тимоцитов, возникающая под действием глюкокортикоидов. Хотя первое детальное описание смерти клеток как физиологического явления было дано в 1895 г. Флемингом, который впервые описал распад клеток овариального эпителия на частицы (впоследствии названные апоптотическими или апоптотическими тельцами),

определив процесс быстрого исчезновения образовавшихся при распаде клеток фрагментов цитоплазмы и ядра как хроматолизис.

Данная форма клеточной смерти была отождествлена с ранее описанной Куэссманом (1950) программированной гибелью клеток эмбриона. В научной литературе чаще встречается термин апоптоз.

ДеДювом (1953) была выдвинута лизосомальная концепция физиологической гибели клеток. Автор предположил, что при определенных условиях клетка может сама себя убить, используя для этой цели собственные лизосомы. Это явление получило название клеточного суицида. Однако вскоре была описана не связанная с лизосомами гибель клеток в результате накопления в ней свободных радикалов и свободного внутриклеточного кальция [53].

Понятие же «апоптоз» было сформулировано Вилли только в 1980 г. Данное понятие было связано с деградиацией хроматина, катализируемой эндонуклеазами. Биохимически активный характер апоптоза подтвержден в лаборатории этого автора в 1984 г., где была показана значимость макромолекулярного синтеза для реализации процесса апоптоза. В 1987 г. автор сформулировал 4 основных элемента апоптоза: 1) уменьшение объема апоптотической клетки; 2) конденсация и фрагментация хроматина на ранних стадиях апоптоза с формированием так называемых апоптотических телец; 3) изменение мембраны апоптотической клетки, приводящее к распознаванию ее фагоцитами; 4) сопряженность апоптоза с активным белковым синтезом [53].

Хотя еще в 1976 г. Скалка с соавт. и в 1979 г. К.П. Хансон, высказали мысль о том, что радиационная гибель лимфоцитов в интерфазе представляет собой проявление программированной их гибели, то есть апоптоза.

Возникшее с конца 80-х годов большое внимание к апоптозу стало в последние годы XX века и первые годы XXI века всеобщим, особенно в связи с тем, что появились методические возможности регистрации различных проявлений апоптоза и анализа его молекулярных механизмов. Изучение апоптоза оказалось очень продуктивным для понимания ряда жизненно важных явлений и процессов, включая индивидуальное развитие организма, иммунный гомеостаз и онкогенез. В связи с развитием учения об апоптозе возникла необходимость пересмотра концептуальных основ не только физиологии, но и патологии. Вместо прежних представлений о гибели клеток многоклеточного организма как отрицательном биологическом явлении, идентифицируемом с некрозом, сформировался новый взгляд, согласно которому гибель части клеток в пределах организма является закономерным и необходимым гомеостатическим процессом, обусловленным

апоптозом. Само существование многоклеточного организма подразумевает баланс жизни и смерти на уровне составляющих его клеточных популяций. В нормальных условиях в процессе жизни многоклеточного организма отмечаются два взаимоуравновешивающихся процесса: пролиферация и гибель клеток, что обеспечивает сохранение постоянства клеточного состава данного организма [53].

Причины и примеры апоптоза

Апоптоз может запускаться в клетке в двух основных ситуациях: во-первых, когда в ДНК (хромосомах) или во внутриклеточных мембранах накапливается слишком много неустойчивых повреждений; во-вторых, когда клетка получает соответствующую команду извне, воспринимаемую специальными рецепторами плазмолеммы [45].

Первую ситуацию определяют, как «апоптоз по внутренним показаниям», а вторую — как «апоптоз по команде».

Классический пример «апоптоза по внутренним показаниям» — гибель стареющих клеток у взрослого человека: как долгоживущих и невозобновляемых клеток — нейронов в головном мозгу, кардиомиоцитов, так и короткоживущих клеток, чей пул постоянно пополняется, — лейкоцитов, клеток кишечного эпителия. Другой пример — гибель клетки в ходе митотического цикла. Интенсивные деления клеток повышают вероятность апоптоза (из-за постоянно происходящих преобразований ДНК и хромосом в целом) [45].

Что касается «апоптоза по команде», то его примеры очень разнообразны:

1. гибель определенных клеток в процессе эмбриогенеза — в частности, клеток хорды, межпальцевых перепонок, хвоста, многих нейронов ЦНС и т. д.;
2. гибель клеток формирующейся иммунной системы — например, клеток, способных атаковать собственные антигены организма;
3. гибель созревающих кровяных клеток в отсутствие определенных стимуляторов — цитокинов;
4. гибель клеток большинства фолликулов в яичниках.

Следует заметить, что в одних случаях сигналом к «апоптозу по команде» является связывание определенного («негативного») фактора с соответствующим рецептором клетки. В других случаях сигналом служит, напротив, прекращение действия «позитивного» фактора, т. е. освобождение клеточного рецептора от связи с ним [45].

Механизм течения апоптоза

Программа апоптотической гибели состоит из следующих основных этапов: 1) индукция, или запуск программы апоптоза; 2) активация проапоптотических белков; 3) каскад каспаз, расщепляющих белки-мишени; 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка; 5) фрагментация клетки на апоптотические тельца; 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками [46].

В запуске апоптоза участвуют различные органеллы, но, прежде всего это плазматическая мембрана и митохондрии. Индукция апоптоза, и активация проапоптотических белков ведет к активации каспаз (цистеиновых протеаз). Различают инициаторные (47,46,52,53) и эффекторные каспазы (48, 49,50), то есть каспазы функционируют как протеолитические каскады. Итогом работы эффекторных каспаз является разрушение множества белков, которые могут участвовать в поддержании гомеостаза и в репарации компонентов клетки, белков — регуляторов клеточного цикла, структурных белков. В результате действия эффекторных каспаз и активированных ими других ферментов (эндоуклеаз, гелсалина) разрушаются такие компоненты клетки как ядерная ламина, нарушается целостность ДНК, происходит специфическая компактизация хроматина, наблюдается распад элементов цитоскелета, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и т. д. Помимо каспазного в последние годы различают некаспазный механизм апоптотической гибели, при котором происходит выход из митохондрий и миграция в ядро флавопротеина AIF и эндоуклеазы

G, вызывающих распад ядерной ДНК на крупные фрагменты. Наблюдаемые при данном механизме конденсация хроматина и экспозиция фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны соответствуют признакам апоптоза [46].

Морфологические преобразования в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов. Конечными этапами апоптоза является уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т. д. Апоптотические клетки и тельца экспонируют на поверхности сигнальные и адгезивные молекулы, которые узнаются соседними клетками или макрофагами и способствуют фагоцитозу. К таким молекулам относятся фосфатидилсерин, лизофосфолипиды, витронектин, тромбоспондин и др. Процессы фагоцитоза способствуют также инаktivации на поверхности умирающих клеток молекул типа CD31, необходимых для распознавания не

подлежащих поглощению жизнеспособных клеток [46]. Рассмотрим каждый компонент отдельно:

Морфология апоптоза

а) Морфологически апоптоз начинает проявляться конденсацией хроматина: последний приобретает вид плотных и резко очерченных масс на периферии ядра (в отличие от некроза, где глыбки не являются столь четкими).

б) Объем клетки несколько уменьшается (при некрозе — увеличивается из-за набухания клетки).

в) Ядро распадается на фрагменты, окруженные мембранами и содержащие очень плотные массы хроматина.

г) В клетке образуются все более глубокие впячивания, так что контур клетки становится очень изрезанным.

д) В конце концов эти впячивания разделяют клетку на фрагменты — уже упоминавшиеся апоптотные тельца. В некоторых из них содержатся ядерные фрагменты, в других — только цитоплазматическое содержимое. В целом морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1–3 ч [48].

Внутриклеточные участники и регуляторы апоптоза

1. «Инструменты» апоптоза. В апоптозе участвует целая совокупность специальных ферментов и регуляторных белков.

а) Во-первых, это семейство из 10 каспаз — специфических ферментов, разрушающих белки. Они разрывают только те пептидные связи в белках, которые образованы с участием остатка аспарагиновой кислоты. Поэтому белки расщепляются лишь до достаточно крупных пептидов. Наиболее важные мишени каспаз — определенные ядерные белки. Каспазы находятся в цитоплазме и в обычном состоянии клетки неактивны (из-за присутствия ингибиторов).

б) Вторая группа факторов апоптоза — нуклеазы, ключевой из которых является Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая эндонуклеаза (известно, как минимум, две разновидности этого фермента). Данная нуклеаза расщепляет ДНК хромосом лишь в линкерных участках (между нуклеосомами). Поэтому ДНК тоже не подвергается полному лизису, а лишь фрагментируется (как и белки).

в) Третья группа факторов — белки, модифицирующие плазмолемму. В частности, один из таких белков переводит определенный фосфолипид в наружный слой липидного бислоя. В результате на внешней поверхности плазмолеммы оказываются вещества — «метки», по которым окружающие клетки узнают апоптотные тельца [48].

Регуляторы апоптоза

В клетке имеется также совокупность веществ, способных ингибировать или стимулировать перечисленные «инструменты» апоптоза.

а) Митохондриальные факторы. В мембранах митохондрий содержатся каналы, которые в норме закрыты специальными белками — Bcl-2 и пр.

Другие же белки (Bax и пр.) при действии апоптотических сигналов способствуют открытию данных каналов. В этом случае через каналы в гиаплазму выходят белки митохондрий (протеаза AIF и цитохром c), которые активируют систему каспаз [48].

б) Белок p53. Центральную роль в регуляции апоптоза играет белок p53.

1. Так, при «апоптозе по внутренним показаниям» активность и содержание этого белка в клетке возрастают под влиянием трех протеинкиназ, регистрирующих повреждения ДНК:

ДНК-протеинкиназы (ДНК-ПК), киназы (KK) и фермента ATM. А при «апоптозе по команде» к тому же эффекту приводят отсутствие факторов роста, связывание с плазмолеммой «негативных» сигнальных веществ и т. д., т. е. практически все то, что запускает апоптоз данного вида.

2. Сам же белок p53 оказывает следующие действия. Во-первых, он останавливает клеточный цикл (активируя гены белков, ингибирующих комплексы циклин-Cdk). Во-вторых, p53 способствует открытию митохондриальных каналов (влияя на активность белков, закрывающих и открывающих эти каналы), т. е. инициирует активацию каспаз. В-третьих, p53 активирует гены pIG, продукты которых вызывают в клетке окислительный стресс. Наконец, в-четвертых, белок p53 активирует и такие гены, чьи продукты секретируются во внешнюю среду и тормозят здесь пролиферацию соседних клеток и новообразование сосудов.

Все эти эффекты носят не только апоптотический, но и противораковый характер [48].

Схемы развития апоптоза

1. «Апоптоз по внутренним показаниям». Исходя из вышесказанного, можно представить следующую цепь событий при развитии «апоптоза по внутренним показаниям».

1. Неустойчивые повреждения хромосом, вызванные теми или иными факторами, приводят

– к активации ядерных протеинкиназ и, как следствие,

– к увеличению содержания и активности белка p53.

2. Под влиянием p53 открываются митохондриальные каналы, через которые в гиаплазму выходят протеаза AIF и цитохром c.

III. Это, в свою очередь, вызывает активацию каспаз, осуществляющих частичный протеолиз цитоплазматических и мембранных белков, а в ядре — хромосомных белков и ингибиторов эндонуклеаз.

IV. Поэтому и в цитоплазме, и в ядре развиваются процессы фрагментации. Так, в ядре:

— вначале наблюдается конденсация хроматина (из-за повреждения структурных белков),

— после чего следуют фрагментация хроматина (под действием эндонуклеаз) и затем — ядра.

V. Фрагментация ядра и цитоплазмы приводит к образованию апоптотных телец, которые затем фагоцитируются соседними клетками.

2. «Апоптоз по команде» отличается от вышеизложенной схемы начальными стадиями.

Пусть, для определенности, причиной апоптоза служит исчезновение из среды ростового фактора, стимулировавшего деления и дифференцировку клетки. Тогда начальные стадии процесса можно представить таким образом.

I. Отсутствие сигнала вызывает изменение состояния вначале рецепторных белков мембраны, а затем, как следствие, ряда внутриклеточных белков — в том числе белка Ras.

II. Данный белок инактивирует в клетке каскад MAP (митоген-активируемых протеинкиназ; см. выше).

III. Поэтому изменяется активность многих транскрипционных факторов и, соответственно, контролируемых ими генов. В их числе — гены белков, регулирующих активность и распад белка p53.

IV. В клетке увеличивается содержание и активность белка p53.

Далее процесс развивается, как в первом случае, — в соответствии с пунктами II–V предыдущей схемы [49].

Предел деления клеток по Леонарду Хейфлику (Лимит Хейфлика)

Леонард Хейфлик обнаружил границу числа делений соматических клеток, которая составляет примерно 50–52 деления. «Есть два типа человеческих клеток: половые, то есть женская яйцеклетка и сперма мужчин, и соматические, включающие порядка сотни триллионов других клеток, составляющих остальное тело. Все клетки размножаются делением [49].

В 1961 году Леонард Хейфлик открыл, что у соматических клеток есть верхний предел общего числа делений, и число возможных делений уменьшается с возрастом клеток. Существует не одна теория, объясняющая, почему существует этот так называемый предел Хейфлика. В основе главной из них лежит накопление случайных повреждений гена при репликации

клетки. При каждом клеточном делении действуют факторы среды, например, дым, радиация, химикаты, известные под названием свободных гидроксильных радикалов, и продукты распада клеток, которые мешают точному воспроизведению ДНК в следующем поколении клетки. В организме существует много ферментов восстановления ДНК, которые следят за процессом копирования и устраняют неполадки транскрипции по мере их возникновения, но все ошибки они отловить не в состоянии. При неоднократной репликации клетки повреждения ДНК накапливаются, приводя к неверному синтезу белков и неправильному функционированию. Эти ошибки функционирования являются, в свою очередь, причиной болезней, характерных для старения, например, артериосклероза, заболеваний сердца и злокачественных опухолей. Ещё одна теория утверждает, что барьер Хейфлика связан с теломерами, то есть некодирующими участками ДНК, присоединенными к концу каждой хромосомы. Теломеры действуют как лидеры киноплёнки, обеспечивая точную репликацию ДНК.

Предел деления клеток по Леонарду Хейфлику (Лимит Хейфлика)

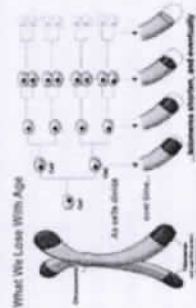
• В 1961 году Леонард Хейфлик открыл, что у соматических клеток есть верхний предел общего числа делений, и число возможных делений уменьшается с возрастом клеток. Существует не одна теория, объясняющая, почему существует этот так называемый предел Хейфлика. В основе главной из них лежит накопление случайных повреждений гена при репликации клеток. При каждом клеточном делении действуют факторы среды, например, дым, радиация, химикаты, известные под названием свободных гидроксильных радикалов, и продукты распада клеток, которые мешают точному воспроизведению ДНК в следующем поколении клетки.



В процессе деления клетки происходит расщепление двух нитей ДНК и создание новых полных копий этой молекулы в дочерних клетках. Но при каждом делении клетки теломеры становятся чуть короче, и в итоге они уже не в состоянии защитить концы нитей ДНК; тогда клетка, сочтя короткие теломеры за поврежденные ДНК, прекращает рост. У овечки Долли, клонированной из соматической клетки взрослого животного, оказались укороченные теломеры взрослого организма, а не теломеры новорожденного ягнёнка, и, возможно, она не проживёт столь же долго, сколь её нормально рожденные братья и сестры [49].

Предел или лимит Хейфлика — число делений соматических клеток

Максимальное число делений различно в зависимости от типа клеток и ещё сильнее различается в зависимости от организма. Для большинства человеческих клеток предел Хейфлика составляет 52 деления.

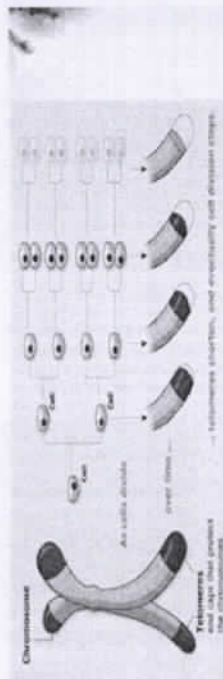


Граница Хейфлика связана с сокращением размера теломера - участков ДНК на концах хромосом

Раковые клетки производят фермент теломеразу, которая наращивает теломеры на концах ДНК хромосом

2009 г. - присуждение Нобелевской премии за исследования в области применения теломеразы.

Есть три основных типа клеток, для которых не существует лимита Хейфлика: половые клетки, раковые клетки и некоторые типы стволовых клеток. Причина, из-за которой эти клетки способны к бесконечному размножению, связана с наличием фермента теломеразы, впервые выделенного в 1989 году - этот фермент препятствует укорочению теломер. Вот что позволяет клеткам зародышевого пути продолжаться через поколения, и вот что лежит в основе взрывного роста раковых опухолей [49].



• Есть три основных типа клеток, для которых не существует лимита Хейфлика: половые клетки, раковые клетки и некоторые типы стволовых клеток. Причина, из-за которой эти клетки способны к бесконечному размножению, связана с наличием фермента теломеразы, впервые выделенного в 1989 году - этот фермент препятствует укорочению теломер. Вот что позволяет клеткам зародышевого пути продолжаться через поколения, и вот что лежит в основе взрывного роста раковых опухолей

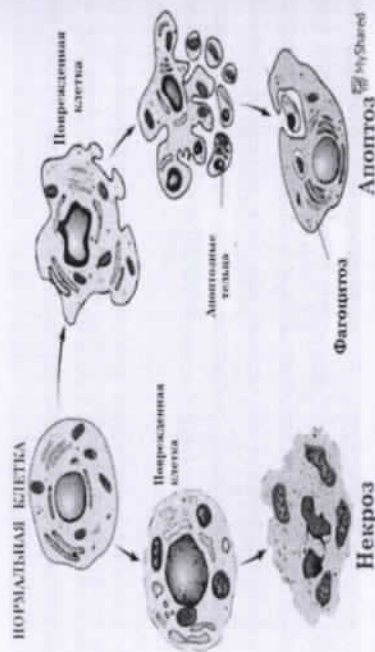
Регуляция апоптоза

Апоптоз принимает участие в следующих физиологических и патологических процессах:

1. Запрограммированном разрушении клеток во время эмбриогенеза (включая имплантацию, органогенез). Несмотря на то, что при эмбриогенезе апоптоз не всегда является отражением "запрограммированной смерти клетки", это определение апоптоза широко используют различные исследователи.
2. Гормон-зависимой инволюции органов у взрослых, например, отторжение эндометрия во время менструального цикла, атрезии фолликулов в яичниках в менопаузе, и регрессия молочной железы после прекращения лактации.
3. Удалении некоторых клеток при пролиферации клеточной популяции
4. Гибели отдельных клеток в опухолях, в основном при ее регрессии, но также и в активно растущей опухоли.
5. Гибели клеток иммунной системы, как В-, так и Т-лимфоцитов, после истощения запасов цитокинов, а также гибели аутореактивных Т-клеток при развитии в тимусе.
6. Патологической атрофии гормон-зависимых органов, например, атрофии предстательной железы после кастрации и истощении лимфоцитов в тимусе при терапии глюкокортикоидами.
7. Патологической атрофии паренхиматозных органов после обтурации выводных протоков, что наблюдается в поджелудочной и слонных железах, почках.
8. Гибели клеток, вызванных действием цитотоксических Т-клеток, например, при отторжении трансплантата и болезни "трансплантат против хозяина".
9. Повреждении клеток при некоторых вирусных заболеваниях, например, при вирусном гепатите, когда фрагменты апоптотических клеток обнаруживаются в печени, как тельца Каунсильмана.
10. Гибели клеток при действии различных повреждающих факторов, которые способны вызвать некроз, но действующих в небольших дозах, например, при действии высокой температуры, ионизирующего излучения, противоопухолевых препаратов [46].

Апоптоз может регулироваться:

- 1) внешними факторами,
- 2) автономными механизмами.



Воздействие внешних факторов. Апоптоз может регулироваться действием многих внешних факторов, которые ведут к повреждению ДНК. При невозможном повреждении ДНК путем апоптоза происходит элиминация потенциально опасных для организма клеток. В данном процессе большую роль играет ген супрессии опухолей p53. К активации апоптоза также приводят вирусные инфекции, нарушение регуляции клеточного роста, повреждение клетки и потеря контакта с окружающими или основным веществом ткани. Апоптоз – это защита организма от персистенции поврежденных клеток, которые могут оказывать потенциально опасными для многоклеточного организма [46].

• Морфологические преобразования в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов. Конечными этапами апоптоза является уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д. Апоптотические клетки и тельца экспонируют на поверхности сигнальные и адгезивные молекулы, которые узнаются соседними клетками или макрофагами и способствуют фагоцитозу. К таким молекулам относятся фосфатидилсерин, лизофосфолипиды, витронектин, тромбоспондин и др. Процессу фагоцитоза способствует также инактивация на поверхности умирающих клеток молекул типа CD31, необходимых для распознавания не подлежащих поглощению жизнеспособных клеток.



Феномен апоптоза является результатом действия различных факторов, приводящих к гибели клетки. Это могут быть неспецифические факторы,

такие как температура, токсические агенты, свободные радикалы, гамма- и УФ-излучение, бактериальные токсины и др. Во всех этих случаях происходит индукция апоптоза, но при увеличении дозы соответствующего агента развивается некроз клетки. Поскольку апоптоз физиологическое явление, то в организме должны быть факторы, приводящие к апоптозу клетки. Установлено, что апоптоз могут вызывать как внутриклеточные сигналы, так и внешние, опосредующие свое действие через рецепторные системы, которые сами по себе не являются токсическими или деструктивными. В целом, если идет речь о физиологических факторах, то следует применять термин регуляция апоптоза клетки, поскольку известна группа физиологических активаторов и ингибиторов апоптоза. При стимуляции тканей каким-либо митогеном ее клетки переходят в состояние повышенной митотической активности, которая обязательно сопровождается некоторой активацией апоптоза. Судьба дочерних клеток (выживут они или подвергнутся апоптозу) зависит от соотношения активаторов и ингибиторов апоптоза:

- ингибиторы включают факторы роста, клеточный матрикс, половые стероиды, некоторые вирусные белки;
- активаторы включают недостаток факторов роста, потерю связи с матриксом, глюкокортикоиды, некоторые вирусы, свободные радикалы, ионизирующую радиацию.

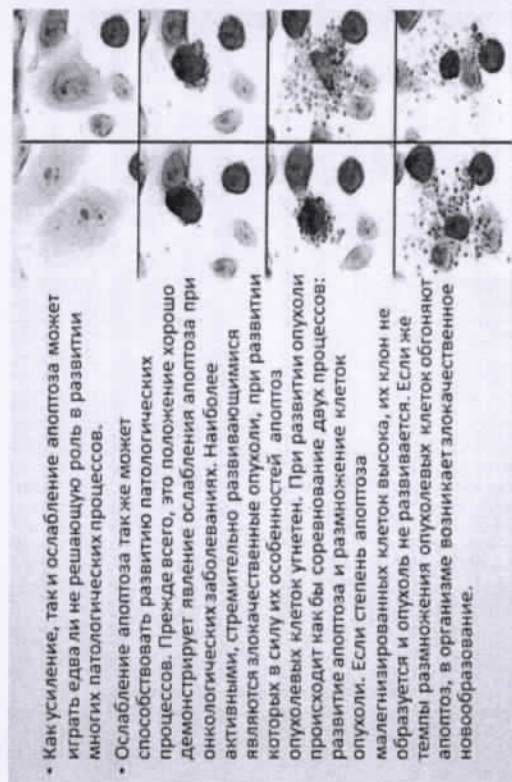
При воздействии активаторов или отсутствии ингибиторов происходит активация эндогенных протеаз и эндонуклеаз. Это приводит к разрушению цитоскелета, фрагментации ДНК и нарушению функционирования митохондрий. Клетка сморщивается, но клеточная мембрана остается интактной, однако повреждение ее приводит к активации фагоцитоза. Погибшие клетки распадаются на небольшие, окруженные мембраной, фрагменты, которые обозначаются как апоптотические тельца. Воспалительная реакция на апоптотические клетки не возникает [47].

Роль усиления или ослабления апоптоза в развитии патологических процессов

Как усиление, так и ослабление апоптоза может играть едва ли не решающую роль в развитии многих патологических процессов.

Ослабление апоптоза так же может способствовать развитию патологических процессов. Прежде всего, это положение хорошо демонстрирует явление ослабления апоптоза при онкологических заболеваниях. Наиболее активными, стремительно развивающимися являются злокачественные опухоли, при развитии которых в силу их особенностей апоптоз опухолевых клеток угнетен. При развитии опухоли

происходит как бы соревнование двух процессов: развитие апоптоза и размножение клеток опухоли. Если степень апоптоза малегнизированных клеток высока, их клон не образуется и опухоль не развивается. Если же темпы размножения опухолевых клеток обгоняют апоптоз, в организме возникает злокачественное новообразование. Повышенная продукция в клетках иммунной системы факторов, тормозящих апоптоз, а также образование внеклеточных факторов, блокирующих апоптоз (например, появление растворимых рецепторов некоторых цитокинов, способных индуцировать апоптоз) может приводить к развитию ряда аутоиммунных процессов, вплоть до проявления системной аутоиммунной патологии (например, системной красной волчанки). При СКВ обнаружена повышенная предрасположенность к апоптозу лимфоцитов и усиление экспрессии Fas-L гранулоцитами [57].



- Как усиление, так и ослабление апоптоза может играть едва ли не решающую роль в развитии многих патологических процессов.
- Ослабление апоптоза так же может способствовать развитию патологических процессов. Прежде всего, это положение хорошо демонстрирует явление ослабления апоптоза при онкологических заболеваниях. Наиболее активными, стремительно развивающимися являются злокачественные опухоли, при развитии которых в силу их особенностей апоптоз опухолевых клеток угнетен. При развитии опухоли происходит как бы соревнование двух процессов: развитие апоптоза и размножение клеток опухоли. Если степень апоптоза малегнизированных клеток высока, их клон не образуется и опухоль не развивается. Если же темпы размножения опухолевых клеток обгоняют апоптоз, в организме возникает злокачественное новообразование.

Ненормальное усиление апоптоза в процессе развития плода может приводить к эффекту «минус ткань», что весьма часто не совместимо с жизнью и заканчивается внутриутробной гибелью плода. Повышенный апоптоз кардиомиоцитов при болезни Дауна способен привести к развитию кардиомиопатии. Многие виды патологии системы крови так же объясняются повышением уровня апоптоза кровяных клеток-предшественниц. В результате возникают такие заболевания как тяжелые комбинированные иммунодефициты, апластические анемии, панцитопении. Чаще всего эта патология является следствием недостаточной выработки так называемых «факторов выживания», например, интерлейкина 7 (ИЛ-7), который является

цитокином, тормозящим апоптоз стволовых и других клеточных предшественников [57].

Усиление апоптоза Т-хелперов при СПИДе является основным патогенетическим механизмом этого иммунодефицита. С другой стороны, усиление апоптоза клеток, инфицированных вирусами или поврежденных микробными токсинами, играет положительную роль, прерывая прогрессирование вирусных и микробных инфекций. Наиболее выраженные формы нарушений, при которых в процесс апоптоза тотально вовлекаются клетки любых типов, наблюдаются при беременности. Они обычно несовместимы с развитием плода и приводят к внутриутробной гибели. Известны также более ограниченные нарушения такого типа, которые проявляются как дефекты развития с формированием «минус-тканей». Другим примером могут служить некоторые врожденные поражения сердца. Во II триместре развития плода в сердце происходит перестройка тканевых структур, в которой важная роль принадлежит апоптозу. Эти процессы нарушаются при синдроме Дауна, что влечет за собой формирование миопазии. Другой пример, относящийся к патологии сердца, — аритмогенная кардиопатия правого желудочка, при которой в значительной степени вследствие усиленного апоптоза кардиомиоцитов происходит их замещение жировой тканью [57].

Другим примером болезней, связанных с усилением апоптоза, являются заболевания нервной системы, вызываемые атрофией ее определенных участков. Как правило, атрофия является следствием индукции апоптоза соответствующих клеток в неположенное время или в чрезмерно выраженном масштабе. К таким заболеваниям относятся боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, спинальная мышечная атрофия и другие заболевания нервной системы. Идентифицирован «ген болезни Альцгеймера», продукт которого оказался транскрипционным фактором ALG-2. При этом заболевании идентифицированы факторы, накопление которых способствует развитию апоптоза нервных клеток, — пептид Aa, b-амилоид и другие [57].

Примеры заболеваний, связанных с апоптозом.

Злокачественные опухоли и апоптоз.

При изучении проблем канцерогенеза было отмечено, что одним из наиболее эффективных методов борьбы организма с малегнизацией клеток является их апоптоз. Если иммунные механизмы борьбы с клетками злокачественных опухолей включаются только тогда, когда в организме уже появились ненормальные клетки-мутанты, то апоптозный механизм реагирует на возможность малегнизации клетки уже в тот момент, когда

обнаруживается первичное повреждение ДНК. В этом случае предпосылкой к активации механизмов апоптоза является отсутствие эффекта от деятельности репарационных систем, пытающихся «залечить» повреждение ДНК. Непарированное повреждение ДНК благодаря пока еще мало изученным механизмам обеспечивает включение и активацию гена опухолевого супрессора p53 [49].

Роль опухолевого супрессора p53 в борьбе с малегнизацией клеток

- активацию гена p21 и выработку белка p21, блокирующего митотический цикл на уровне G1 и G2;
- блокирование антиапоптозных факторов (в частности, белка Bcl-2 и некоторых других);
- запуск митохондриального механизма апоптоза;
- повышенный синтез «рецепторов смерти» клетки;
- завершение апоптоза благодаря активации каскада «казнящих каспаз».

Так развиваются события в том случае, если развитие апоптоза опережает интенсивность пролиферации малегнизированных клеток. Однако, если антиапоптозные механизмы сохраняют жизнь клетки-мутанта, если она успевает дать начало клону своих потомков, опухоль стремительно растет со всеми печальными последствиями этого процесса [50].

Апоптоз Т-хелперов при СПИДе

Цитопатогенное действие вируса СПИДа на иммунные CD4 (Т-хелперы) реализуется несколькими путями.

Во-первых, от действия ВИЧ погибают CD4 клетки, инфицированные этим вирусом. Следует отметить, что их число относительно не велико, так как один из вирусных белков – белок Nef способен тормозить апоптоз.

Во-вторых, при контакте ВИЧ с рецепторным аппаратом зрелых, неинфицированных этим вирусом клеток CD4 в них запускается механизм апоптоза. Кроме того, апоптоз активируется и в гемопоэтических предшественниках клеток CD4 – клетках CD34, что резко снижает образование новых Т-хелперов.

И, наконец, в-третьих, мембранный гликопротеин вируса gp120 способен блокировать рецепторы Т-хелперов. После этого Т-клетки распознают Т-хелперы как чужеродные клетки и уничтожают их. В результате происходит резкое снижение числа Т-хелперов. Иначе говоря, развивается иммунодефицит [49].

Апоптоз в тканях, перенесших ишемию и гипоксию (инфаркт миокарда, инсульт, сердечная недостаточность).

Клиницисты и патологи уже давно отмечали, что помимо клеток, погибающих от гипоксического некроза в зоне ишемии (например, при инфаркте миокарда или при инсульте), в перинфарктной зоне, имеющей относительно достаточное кровоснабжение, клетки так же погибают, что значительно осложняет патогенез этих заболеваний. В дальнейшем в ряде исследований было выяснено, что гибель клеток в перинфарктной зоне объясняется развитием механизмов апоптоза. При этом, апоптоз этих клеточных элементов был подтвержден как морфологическими методами, так и за счет воздействия на некоторые звенья апоптозного механизма (например, благодаря введению в перинфарктную зону ингибиторов каспаз). Кроме того, апоптоз был выявлен и в ремоделированном миокарде на заключительных стадиях сердечной недостаточности [49].

Факторы, обеспечивающие запуск механизмов апоптоза при ишемии и гипоксии органов и тканей:

Во-первых, это клеточный стресс, возникающий благодаря образованию активных форм кислорода и интенсивному перекисному окислению липидов в очаге ишемии. Вызвать развитие некроза эти факторы не могут, а вот запустить внутриклеточный механизм апоптоза вполне способны.

Во-вторых, образование очагов некроза в зоне инфаркта (инсульта) приводит к развитию воспаления, при котором в больших количествах синтезируются провоспалительные цитокины, в частности, ФНОα и ФНОβ, которые, как известно, способны запускать механизм апоптоза за счет их соединения с «рецепторами смерти» клетки. В последнее время появились исследования, в которых было показано, что молекулы ангиотензина II, соединяясь с рецепторным аппаратом кардиомиоцитов, способны активировать гены апоптоза этих клеток.

Таким образом, и этот фактор может вносить свой «вклад» в апоптоз клеток ишемизированных тканей. Аналогичным образом механизмы апоптоза протекают и в сердце, находящимся в состоянии декомпенсации на поздних стадиях развития хронической сердечной недостаточности [50].

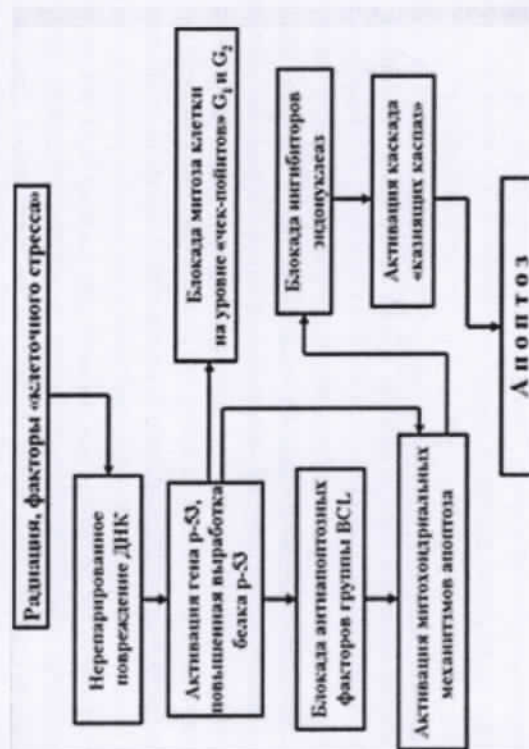
Апоптоз – это запрограммированный процесс уничтожения клетки, вызванный внутренними (внутриклеточными) или внешними (внеклеточными) как физиологическими, так и патологическими факторами, активизирующими генетическую программу гибели клетки и ее удаление из ткани» [52].

Разбирая это определение, можно сделать несколько выводов:

- во-первых, процесс гибели клетки запрограммирован в ее генетическом аппарате. Иначе говоря, клетка при рождении уже несет в себе механизмы

своей гибели, то есть в геноме клетки содержатся гены, активация которых запускает механизм ее гибели;

- во-вторых, апоптоз может инициироваться как при протекании нормальных физиологических процессов, так и при развитии определенной патологии;
- в-третьих, механизм клеточной гибели может запускаться как факторами, образующимися в самой клетке (то есть, внутриклеточными факторами), так и сигналами, передаваемыми клетке от других клеток [56].



В заключение следует отметить, что апоптоз – это один из фундаментальных процессов в жизни клеток организмов, находящихся на самом различном уровне эволюционного развития. Изучение молекулярного механизма апоптоза и его регуляции способствует более глубокому полному пониманию патофизиологии множества заболеваний, что, в свою очередь, необходимо для выработки новых подходов к лечению этих состояний. Несомненно, исследования в области патофизиологии апоптоза открывают широкие возможности для предупреждения, прогнозирования и лечения многих до сих пор трудно управляемых и порой безнадежных состояний [51].

Ход занятий.

1. Повторение ранние изученных тем. Беседа.
2. Изучение нового материала.
3. Закрепление изученного материала.
4. Задание на дом.

5. Подвести итог занятия, сделать выводы. (ознакомить студентов с баллами)

Задачи занятия: Изучить Биохимические основы апоптоза: пусковые сигналы: индукторы и ингибиторы апоптоза, эффекторы апоптоза.

Оборудование. Демонстрационный материал: таблицы по микробиологии и биотехнологии, по генетике, учебники.

Задание: Определение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов в тесте спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана

Принцип метода: Тимус зависимые Т-лимфоциты имеют рецепторы для эритроцитов барана (CD2 антиген), которые выступают, маркером для их распознавания.

Ход работы: Кровь, взятую из вены, вносят в пробирку с гепарином.

I этап. Гепаринизированную кровь разводят фосфатным буфером pH 7,4 в соотношении 1:2. Эту смесь осторожно настилают на раствор фиколин-верографина с плотностью 1,077 г/мл. Пробирку центрифугируют 30 мин. После центрифугирования, слой лимфоцитов осторожно пипеткой извлекают из интерфазы и дважды отмывают буферным раствором. После последнего отмывания к осадку добавляют 0,3—0,5 мл среды. Он и является первым этапом.

II этап. Для постановки реакции розеткообразования берется 0,1 мл суспензии лимфоцитов и добавляется 0,1 мл суспензии эритроцитов барана. Равные объемы суспензии смешивают и центрифугируют в течение 5 мин. и ставят на 30 мин в холодильник. После этого в пробирку добавляют 50 мкл 3% глотарового альдегида и оставляют на столе 20 мин. Затем добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 мл физиологического раствора.

Ресуспензируют. Центрифугируют 5 мин., затем суспензию сливают максимально и мягко ресуспензируют. После чего делают мазок (фиксация, окраска по Романовскому-Гимзе) и подсчитывают количество розеток. При подсчете РОК учитываются лимфоциты, адгезировавшие 3 и более эритроцитов. В норме должно образовываться 40-90% розеток. (РОК-розеткообразующие клетки).

Зарисуйте E-РОК →



П Р И Л О Ж Е Н И Я

Приложения № 1

В приложении приведены несколько задач по данному предмету, для самостоятельного решения магистров, обучающихся в биологических направлениях.

Задача 1.

Фрагмент одной цепи ДНК, имеющую следующую последовательность нуклеотидов:

A - T - T - Ц - Г - А - Ц - Г - Г - Ц - Т - А - Т - А - Г -

1. Постройте вторую цепочку молекулы ДНК, объясните, каким свойством ДНК вы при этом руководствовались?
2. Определите ее длину, если один нуклеотид составляет 0,34 нм. по длине цепи ДНК.
3. Сколько водородных связей в данном фрагменте ДНК?

Задача 2.

В молекуле ДНК тимидиловый нуклеотид (Т) составляет 16% от общего количества нуклеотидов. Определите количество (в процентах) каждого из остальных видов нуклеотидов.

Задача 3.

Фрагмент молекулы ДНК состоит из 3000 нуклеотидов, из них цитидиловых нуклеотидов 650. Определите длину данного фрагмента и количество адениловых, тимидиловых и гуаниловых нуклеотидов.

Задача 4.

Длина участка молекулы ДНК составляет 272 нм, адениловых нуклеотидов в молекуле 31%. Определите молекулярную массу молекулы, процентное содержание других нуклеотидов.

Задача 5.

Молекула ДНК состоит из 3500 нуклеотидов. Определите число полных спиральных витков в данной молекуле.

Задача 6.

Химический анализ показал, что 28% от общего числа нуклеотидов данной и-РНК приходится на адениловые, 6% - на гуаниловые, 40% - на уридилловые нуклеотиды. Каков должен быть нуклеотидный состав соответствующего участка одной цепи гена, информация с которого «переписана» на данную и-РНК.

Задача 7.

В белке содержится 51 аминокислота. Сколько нуклеотидов будет в цепи гена, кодирующей этот белок, и сколько - в соответствующем фрагменте молекулы ДНК?

Задача 8.

В кодирующей цепи гена содержится 600 нуклеотидов. Сколько аминокислот содержится в молекуле белка, информация о которой закодирована в этом гене, если в конце гена имеются два стоп - триплета?

Задача 9.

В белке содержится 25 аминокислот. Сколько нуклеотидов содержится в кодирующей цепи гена, если три «знака препинания» стоят в конце гена?

Задача 10.

Длина фрагмента молекулы ДНК бактерии равняется 20,4 нм. Сколько аминокислот будет в белке, кодируемом данным фрагментом ДНК?

Задача 11.

Длина гена 34,68 нм. Какова масса молекулы белка, кодируемой данным геном если по одному регуляторному триплету находится в начале и в конце гена, длина одного нуклеотида - 0,34 нм, а масса одной аминокислоты - 100 а. е.?

Задача 12.

Участок ДНК содержит последовательно расположенные нуклеотиды ААГТТТТАЦЦТА. Укажите аминокислотный состав белковой цепи, кодируемой этим участком ДНК.

Задача 13.

В молекуле белка следующая последовательность аминокислот: тре-лей-тир-лиз-сер-гли. Постройте участок и-РНК, на котором закодирован этот белок.

Задача 14.

Начальная часть молекулы белка имеет следующую структуру: цис - фен - тир. Какие т-РНК (с какими антикодонами) могут участвовать в синтезе этого белка?

Приложения № 2

Приведите пояснения следующим терминам.

Клетка	→	
Ген	→	
Генная инженерия	→	
Биотехнология	→	
Плазмида	→	
Транспозон	→	

Вопросы для проверки знаний студентов:

1. Общая характеристика нуклеиновых кислот
2. Структурные компоненты нуклеиновых кислот: структуры пиримидиновых и пуриновых оснований; нуклеозиды
3. Структурные компоненты нуклеиновых кислот: нуклеотиды, циклические нуклеотиды
4. Первичная структура ДНК, РНК
5. Правила Чаргаффа, выводы из правил Чаргаффа
6. Вторичная структура ДНК
7. Третичная структура ДНК
8. Виды РНК, характеристика и-РНК, т-РНК
9. Виды РНК, характеристика р-РНК, гя-РНК, мя-РНК
10. Общая характеристика процесса репликации, полуконсервативный механизм репликации
11. Инициация репликации у прокариот
12. Элонгация репликации у прокариот
13. Терминация репликации у прокариот
14. Репликация ДНК в клетках эукариот
15. Репликация теломерных отделов: проблема концевой недорепликации
16. Удлинение теломер с помощью теломеразы, механизм действия теломеразы
17. Метафазные хромосомы, структура теломер
18. Функции теломерных участков хромосомы
19. Распространение теломеразы в клетках и тканях
20. Биосинтез белков. Характеристика белоксинтезирующей системы
21. Транскрипция. Общая характеристика и схемы
22. Характеристика РНК-полимераз эукариот; компоненты транскрипции
23. Инициация и элонгация транскрипции
24. Терминация транскрипции. Модификация РНК: фрагментация длинноцепочечных предшественников
25. Кэпирование РНК
26. Полиаденилирование РНК. Сплайсинг
27. Общая характеристика биосинтеза белков. Трансляция. Генетический код
28. Основные черты генетического кода
29. Рибосомы эукариот и прокариот
30. РНК-связывающие участки рибосом. Функции рибосом
31. Активирование и отбор аминокислот
32. Инициация трансляции у прокариот

33. Инициация трансляции у эукариот
34. Элонгация трансляции, терминация
35. Компартиментализация трансляции у эукариот
36. Посттрансляционная модификация белков

Глоссарий

№	Термин	Значение
1	Апоптоз	Регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро (в среднем за 90 минут) фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции.
2	Белок Bcl-2	Внутриклеточный белковый фактор, основной представитель семейства Bcl-2. Подавляет апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогемапоэтические и нейрональные клетки.
3	Белок p53	Это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген TP53 является антионкогеном.
4	Белок Ras	Кодирует так называемые малые G-белки (малые ГТФазы). Ras являются мембраносвязанными белками, участвующими в передаче сигнала. Они осуществляют один из первых этапов передачи сигнала извне клетки и, как правило, регулируют размножение клеток.
5	Вещества – «метки»	Внеклеточные лиганды с рецепторами смерти на поверхности клетки, которые приводят к образованию сигнального комплекса, индуцирующего смерть (DISC).
6	Гомеостаз	Саморегуляция, способность открытой системы сохранять постоянство своего внутреннего состояния посредством скоординированных реакций, направленных на поддержание динамического равновесия. Стремление системы воспроизводить себя, восстанавливать утраченное равновесие, преодолевать сопротивление внешней среды.
7	Каспазы	Протеолитические ферменты, относящиеся к семейству цистеиновых протеаз, расщепляющих белки исключительно после аспарата. Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах.
8	Лимит Хейфлика	Граница количества делений соматических клеток, названа в честь её открывателя Леонарда Хейфлика. В 1961 году Хейфлик наблюдал, как клетки человека, делящиеся в клеточной культуре, умирают

Список использованной литературы

1. *Edmund B. Wilson. An Atlas of the Fertilization and Karyokinesis of the Ovum.* - N. Y.: Macmillan, 1895. - P. 4.
2. Аппель Б., Бенке И., Бенсон Я., под ред. С. Мюллер. Нуклеиновые кислоты от А до Я. - М.: Бинном, 2012. - 352 с.
3. Франк-Каменецкий М. Д. Самая главная молекула. - М.: Наука, 1983, 160 с.
4. J. D. Watson, F. H. C. Crick. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid//Nature. - 1953. - Vol. 171. - P. 737 - 738
5. Protein and Amino Acids // Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. - Washington, DC: The National Academies Press, 2002. - P. 589 - 768.
6. Бартон Д., Оллис У. Д. Общая органическая химия. - М.: Химия, 1986. - Т. 10. - С. 32, 215. - 704 с.
7. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика/Под ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева.-Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. - 479 с.
8. Абрамова З.И. Введение в генетическую инженерию//Казань, Казанский университет, 2008 - 169 с.
9. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии//СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. -522 с.
10. Вишневец А.В. и др. Основы генетической инженерии и биотехнологии// Витебск: УО «ВГАВМ», 2010. - 76 с.
11. Алимова Ф.К., Невзорова Т.А. Обмен нуклеиновых кислот//Учебное пособие для вузов// Казань: КГУ, 2009. - 62 с.
12. Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В., Силаева С. А. Биологическая химия: Учебник. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. - 368с.
13. Кольман Я., Рем К-Г. Наглядная биохимия//Москва, Изд. «Мир», 200 г., 304 с.
14. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск. «Сибирское университетское издательство», 2004 г.
15. Bettencourt-Dias et al, Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression//Nature. 2004 Dec 23; **432** (7020): p. 980-987.
16. Goldstein G., Scheid M., Hammerling U., Schlesinger D. H., Niall H. D., Boyse E. A. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: jourm.- 1975.- January (vol. 72, no.1).- P. 11-5.

	приблизительно после 50 делений и проявляют признаки старения при приближении к этой границе.
9	Некроз Патологический процесс, выражающийся в местной гибели ткани в живом организме в результате какого-либо экзо- или эндогенного её повреждения. Некроз проявляется в набухании, денатурации и коагуляции/коллекции цитоплазматических белков, разрушении клеточных органелл и, наконец, всей клетки.
10	Онкогенез Сложный патофизиологический процесс зарождения и развития опухоли, глубокая реорганизация нормальных клеток организма.
11	Проплиферация Разрастание ткани организма путём размножения клеток делением.
12	Протеазы АIF Эффекторы апоптоза. Высвобождаются из межмембранного пространства митохондрий, действует по независимому от каспаз пути. Попадая в клеточное ядро, АIF вызывает конденсацию хроматина и активирует эндонуклеазы, которые участвуют во фрагментации ДНК.
13	Теломеры Концевые участки хромосом. Теломерные участки хромосом характеризуются отсутствием способности к соединению с другими хромосомами или их фрагментами и выполняют защитную функцию.
14	Фагоцитоз Процесс, при котором клетки (простейшие, либо специально предназначенные для этого клетки крови и тканей организма — фагоциты) захватывают и переваривают твёрдые частицы.
15	Эндонуклеазы Белки из группы нуклеаз, расщепляющие фосфодиэфирные связи в середине полинуклеотидной цепи.

17. Wilkinson K. D. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: journal*. 2005. October (vol. 102, no. 43). P. 15280 - 15282.
18. Гольдман И.Л., Разин С.В., Эрст Л.К., Кадулин С.Г., Грашук М.А. Молекулярно-биологические аспекты проблемы позиционно-независимой экспрессии чужеродных генов в клетках трансгенных животных // *Биотехнология*. 1994. № 2.
19. Томили Н.В., Глебов О.К. Генетическая трансформация клеток млекопитающих // *Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии*. Л.: Наука, 1986. С. 62 - 82.
20. Рындич А. В., Герик И., Лготак В., Яцула Б. А., Свобода Я. Отсутствие генов вирусов саркомы птиц в трансформированных ими клетках млекопитающих // *Биополимеры и клетка*, 1985, т. 1, № 23.
21. Блажевич О. В. Культивирование клеток: Курс лекций / О. В. Блажевич Мн.: БГУ, 2004. - 78 с.
22. Концевая, И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. - Чернигов: Десна Полиграф, 2017. - 44 с.
23. Герман Н.В., Владимцева И.В., Соколова И.В., Колотова О.В. глубинное культивирование микроорганизмов – деструкторов загрязнений сточных вод кожевенного производства // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 2-1. С. 49-52;
24. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах / Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др. - М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. - Т. I. - С. 1 - 68. - 808 с.
25. Кунин Е. В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции / Пер. с англ. = *The Logics of Chance. The Nature and Origin of Biological Evolution*. - М: ЗАО Издательство Центрполиграф, 2014. - 527 с.
26. Fiers W.; Contreras, R.; Ducrinck, F.; Haegeman, G.; Iserentant, D.; Merregaert, J.; Min Jou, W.; Molemans, F.; Raeymaekers, A.; Van Den Berghe, A.; Volckaert, G.; Ysebaert, M. Complete nucleotide-sequence of bacteriophage MS2-RNA – primary and secondary structure of replicase gene // *Nature: journal*. 1976. Vol. 260, no. 5551. P. 500 - 507.
27. PELLICER, JAUME; FAY, MICHAEL F.; LEITCH, ILIA J. The largest eukaryotic genome of them all? (англ.) // *Botanical Journal of the Linnean Society: journal*. 2010. 15 September (vol. 164, no. 1). P. 10 - 15.
28. Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М.С. Гиляров. М.: Сов. энциклопедия, 1986. 831 с.
29. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. - 5. - Garland Science, 2008. - 1392 с.
30. Эрст Либерман Эйден. Распутать геном / В мире науки. 2019. - № 5 - 6. с. 58-66.
31. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. Учебник для вузов. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: ИКЦ "Академкнига", 2004. - 495 с.
32. <http://www.chem.msu.su/zorkii/istkhim/antibiotic1.html>
33. Шемякин М. М. [и др.], *Химия антибиотиков*, 3 изд., т. 1-2, М., 1961;
34. Применение антибиотиков в растениеводстве. Труды I Всесоюзной конференции по изучению и применению антибиотиков в растениеводстве, Ереван, 1961;
34. Леонов Н. И., Скрябин Г. К., Солнцев К. М., Антибиотики в животноводстве, М., 1962; Сазыкин Ю. О., Биохимические основы действия антибиотиков на микробную клетку, М., 1965;
35. Ермольева З. В., Антибиотики. Интерферон. Бактериальные полисахариды, М., 1965;
36. Плanelьес Х. Х., Харитонов А. М., Побочные явления при антибиотикотерапии, бактериальных инфекций, [2 изд.], М., 1965;
37. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kurylowicz W., *Antibiotics*, v. 1-2, Oxf. - Warsaw, 1967.
38. Mateo, Cesar; Fernandez-Lorente, Gloria; Guisan, Jose; Fernandez-Lafuente, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques // *Enzyme and Microbial Technology: journal*. - 2007. - Vol. 40, no. 6. - P. 1451-1463.
39. Walker, John. *Methods in Molecular Biology - New Protein Techniques - Humana Press*, 1988. - P. 495-499.
40. Lizhou Zhang, et al. // *The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity* // *bioRxiv preprint*, 2020
41. Справочник по онкологии / Под ред. С. А. Шалимова, Ю. А. Гриневича, Д. В. Мясоедова. - К., 2000. - 558 с.
42. Дурнов Л.А., Ещё раз об истории детской онкологии // *Детская онкология*, 2003, №3, с.5.
43. Агеенко А. И. Липо рака // М.: Медицина, 2014. - 240 с.
44. Коничев А. С. Молекулярная биология: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования 4-е изд., перераб. и доп. М.: Издательский центр «Академия» 2012. - 400 с.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Практическое занятие №1.	Нуклеиновые кислоты. Роль нуклеиновых кислот в биосинтезе белков	3
Практическое занятие №2	Методы генной инженерии	54
Практическое занятие №3	Ферменты, используемые в генной инженерии	60
Практическое занятие №4	Методы выращивания микроорганизмов	77
Практическое занятие №5	Расположение генетического материала	98
Практическое занятие №6	Технологии производства аминокислот	115
Практическое занятие №7	Производство кормовых витаминов и антибиотиков	129
Практическое занятие №8	Производство ферментов	145
Практическое занятие №9	Заболевания генома белка	156
Практическое занятие №10	Запрограммированная клеточная смерть	164
Приложения		184
Вопросы для проверки знаний студентов		187
Глоссарий		189
Список использованной литературы		191

45. Кузнецов С.Л., Мушамбаров Н.Н. Гистология, цитология и эмбриология: Учебник - 3-е изд., испр. и доп. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2016. — 640 с.

46. Абрамова З.И. Текст лекций по дисциплине «Теория апоптоза», федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (приволжский) федеральный университет», Казань-2010.

47. Lockshin R. A., Zakeri Z. (eds.). When cells die II: A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. — John Wiley & Sons, 2004. — 572 p.

48. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: в 2 т. — 2-е изд. перераб. и доп. — СПб: Наука, 2008 — 481с.

49. Alberts B. at al. Molecular biology of the cell. — 5th edition. — Garland science, 2008. — 1601 p.

50. Фрэнсис Фукуяма, Наше постчеловеческое будущее: последствия биотехнологической революции, М., «Астр», 2004 г., с. 89-90.

51. Абраменко И.В., Фильченков А. Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии// Вопросы онкологии. -2003.-т.47. с.21-30.

Интернет ресурсы

52. <https://viken.ru/en/1711/>

53. <https://studfile.net/preview/2783586/page:8/>

54. <https://pandia.ru/text/78/350/32.php>

55. <https://unotices.com/page-answer.php?id=4951>

56. <https://www.oncology.kiev.ua/ru/article/6584/vizualizaciya-i-ocenka-apoptoza-vyzvannogo-protivoprukovolevoj-terapijei-klinicheskie-perspektivy-2>

57. <http://medbiol.ru/medbiol/apon/00029da8.htm>

- 13699 / 31 -



К.Давранов, П.Мирхамидова, Д.Туйчиева, В.Файзиев

КЛЕТОЧНАЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Учебное пособие к практическим занятиям

(Учебное пособие для магистров естественно-научных
направлений высших учебных заведений)

Издательство "History and page"

Лицензия № 1940. 29.01.2022 г.

Подписано к печати 30.07.2022 г.

Гарнитура "Times New Roman". Формат 60x84¹/₁₆.
учет-изд. л. 11,8. услов. печ. л. 11,4.

Печать офсетная. Тираж 100 экз.

Ташкентский область, г. Чирчик, ул. А.Темур, дом 91.

Отпечатано в типографии ООО "HISTORY AND PAGE".
Ташкентский область, г. Чирчик, ул. А.Темур, дом 91.



ISBN 978-9943-7653-2-0



9 789943 765320