ИННОВАЦИОННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Проект 3: устойчивое развитие: человек-природа-культурное наследие

Цель: реализация инновационных образовательных программ для подготовки и переподготовки специалистов социально-экономической, медико-биологической и культурной сфер и для формирования у населения здорового образа жизни.

Федеральное агентство по образованию

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

Владимирский государственный университет

С.С. РЫБАКОВ

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ОСНОВАМ БИОТЕХНОЛОГИИ

В ДВУХ ЧАСТЯХ

ЧАСТЬ I. ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Владимир 2008

УДК 573.6 (075.8)
ББК 30.16
Р 93

Рецензенты:

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой химии Владимирского государственного педагогического университета
Н.П. Ларионов

Доктор медицинских наук, профессор Владимирского государственного университета
И.П. Бойко

Доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией биотехнологии Федерального центра охраны здоровья животных
В.В. Михалишин

Печатается по решению редакционного совета Владимирского государственного университета

Рыбаков, С. С.

Р93 Курс лекций по основам биотехнологии: В 2 ч. Ч. 1. Введение в биотехнологию / Владим. гос. ун-т. – Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2008. – 68 с. – ISBN 978-5-89368-859-7.

В первую часть учебного пособия включена информация по истории биотехнологии, генетической, клеточной и тканевой инженерии, культивированию бактерий и новому направлению – нанобиотехнологии. Эти направления изложены в первую очередь, поскольку одни из них являются перспективными, другие используются в разных областях деятельности человека.

Во вторую часть планируется включить сведения об использовании биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, а также информацию, связанную с охраной авторских прав в биотехнологии и биобезопасностью.

Предназначен для студентов специальностей «Биотехнические и медицинские аппараты и системы» (200401), «Инженерное дело в медико-биологической практике» (200402).

Ил. 10. Табл. 4. Библиогр.: 18 назв.

УДК 573.6 (075.8)
ББК 30.16

ISBN 978-5-89368-859-7

© Владимирский государственный университет, 2008

ВВЕДЕНИЕ

В большинстве стран, в том числе и в России, биотехнология рассматривается как приоритетное направление, во многом определяющее технический прогресс и развитие общества. Некоторые биотехнологические процессы, относящиеся, главным образом, к производству продуктов питания, были известны в древние времена. Традиционная биотехнология завоевала мировой рынок и в экономическом плане вносит большой вклад в развитие как отдельных фирм, так и стран в целом. Только сравнительно недавно традиционные биотехнологические процессы были тщательно изучены и проанализированы. Однако потребуется еще значительное время пока они будут модифицированы в современные научно-обоснованные технологии.

Биотехнологическая промышленность производит белки, пептиды, аминокислоты, ферменты, витамины, антибиотики, этанол, органические кислоты (лимонную, изолимонную, уксусную и др.), регуляторы роста растений, природные пестициды, биопрепараты для человека и животных. Биотехнологические процессы имеют существенные достоинства: в большинстве случаев они используют возобновляемое сырье, проводятся в мягких условиях с меньшим числом этапов, их отходы доступны переработке.

Современные биотехнологические процессы обеспечивают получение большого разнообразия новых биопрепаратов, включая вакцины и моноклональные антитела (МАт), лекарственные средства, производство которых оптимизировано благодаря использованию автоматизированных биореакторов, новых штаммов-продуцентов и др. Применение их особенно выгодно экономически и технологически при производстве относительно дорогих малотоннажных продуктов.

Биотехнология не стоит на месте, ее активный новаторский центр заметным образом смещается в сторону использования технологий, разработанных с использованием новейших методов молекулярной биологии. Она и в дальнейшем будет применяться в разных областях деятельности человека благодаря многочисленным открытиям, позволяющим вносить необходимые изменения в живые системы.

Несомненной печатью новизны отмечено создание трансгенных микроорганизмов, животных и растений. Их получение предвещает новую эру в сельском хозяйстве, здравоохранении, пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Генотерапия – новый шаг в биотехнологии – поможет искоренить многие ранее неизлечимые наследственные болезни. Революционным достижением биотехнологии последних лет являются биочипы – необычные устройства, которые за короткое время позволяют определять множество аллергенов, онкогенов, различных биологических активных веществ и генетических дефектов.

Проблема охраны окружающей среды остается делом исключительной важности, хотя она возникла давно. На конференции ООН по изменению климата, состоявшейся в декабре 2007 г., было отмечено, что использование новейших технологий, позволяющих снижать разрушающее влияние человека на природу, становится все более необходимым условием, поскольку от этого зависит существование человечества. В плане улучшения окружающей среды биотехнология должна привести к рациональному использованию лесов, водных ресурсов и почв, а также уменьшению их загрязнения.

Таким образом, биотехнология находит применение в решении многих актуальных задач и позволяет находить неожиданные решения, например, извлечение химических элементов из руд с использованием микроорганизмов – отрасль, получившая название микробиологической гидрометаллургии.

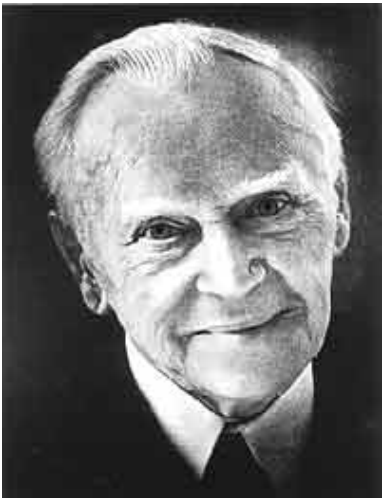
Наноинженерия с использованием молекулярного дизайна – это высокоэффективная технология, которая должна сыграть важную роль в будущем биотехнологии и в ближайшие десятилетия может изменить нашу жизнь. Прогноз развития бионанотехнологии на ближайшее будущее вселяет большие надежды.

Биотехнологическая индустрия будет основана на безотходных технологиях, адаптирована к нуждам общества, в котором, к сожалению, ощущается нехватка энергии, продуктов питания и т. д. По многим направлениям биотехнологии новые современные технологии только зарождаются, и необходимы большие инвестиции и усилия для их дальнейшего развития, но, бесспорно, области применения их разнообразны, потенциал огромен и нет сомнения, что они будут играть все возрастающую роль.

Проведенные в 2002, 2003, 2005 и 2007 гг. московские международные конгрессы «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и международные специализированные выставки «Мир биотехнологии» вызвали широкий резонанс в мировом научно-техническом и деловом сообществе. Эти конгрессы убедительно доказывают, что Россия имеет хорошую фундаментальную базу во всех областях современной биотехнологии и большие перспективы дальнейшего её развития. Важнейшим фактором успешного развития отечественной биотехнологии является дальнейшее развитие системы биотехнологического образования. Повышению уровня подготовки кадров для проведения фундаментальных исследований в области биотехнологии и созданию на их основе новых технологий способствует дальнейшее углубление процесса интеграции высшей школы и фундаментальной науки. Важным элементом научно-образовательной инфраструктуры, обеспечивающей такую интеграцию, являются учебно-научные центры и научно-образовательные комплексы. Биотехнология в нашей стране должна стать главной технологией XXI века.

Лекция 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ. КРАТКИЕ ИСТОРИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ И ВЗАИМОСВЯЗЬ ЕЕ С ДРУГИМИ НАУКАМИ

Биотехнология (от греческого bios – жизнь, techne-искусство, мастерство и logos-учение) – использование биологических процессов и систем в промышленности, сельском хозяйстве, здравоохранении и других областях деятельности человека, научное направление, объединяющее возможности биологии и техники. Термин «биотехнология» получил широкое распространение в середине 70-х гг., хотя впервые был предложен в 1917 г., а многие традиционные биотехнологические процессы известны с незапамятных времен.



А.А. Баев

Существует несколько определений биотехнологии. В химической энциклопедии (1988, Т. 1), академик А.А. Баев, который внес огромный вклад в развитие биотехнологии в нашей стране, дал одно из точных определений биотехнологии, определив ее как совокупность промышленных методов, использующих живые организмы и биологические процессы для производства различных продуктов.

Европейская федерация биотехнологии (ЕФБ) рассматривает биотехнологию «как интеграцию наук о природе организмов, клеток или их частей и молекулярных аналогов для производства и обслуживания». Данное определение применимо как к «старой», или традиционной, так и к «новой», или современной биотехнологии.

Венгерский инженер К. Эреки (1865-1933), впервые предложивший термин «биотехнология», определяет ее как: «… все виды работ, при которых те или иные продукты производятся из сырьевых материалов с помощью живых организмов».

Из приведенных определений видно, что биотехнологию можно рассматривать многопланово, но по существу всегда имеется в виду использование микроорганизмов, растительных или животных клеток,

или их компонентов для создания различных технологий, основанных на синтезе или трансформации тех или иных веществ. В последнее время понятие «биотехнология» имеет тенденцию к расширению, поскольку ряд специалистов относят к ней также целенаправленное конструирование с применением генетической и клеточной инженерии одного из главных компонентов биотехнологической системы – биологического агента. Биотехнология имеет глубокие исторические корни, а за последние 10 – 15 лет бурного развития оформилась как отдельная отрасль науки и производства. В табл. 1 и 2 приведена краткая история развития прикладной и молекулярной биотехнологии, хотя необходимо отметить, что это разделение условное.

Таблица 1

Краткая история развития прикладной биотехнологии

Дата	Событие
~ 8000 до н.э.	Появились первые культурные растения и домашние животные. Впервые начали культивировать картофель для употребления в пищу
4000 – 2000 до н.э.	В Египте и Месопотамии применяли закваску теста и пивоварение с использованием дрожжей. В Китае и Египте получали сыр и вино
500 до н.э.	В Китае появился первый антибиотик. Гомогенат сои использовали для лечения ожогов
100 н.э.	В Китае применили первый инсектицид
1590 – 1675	300 лет было затрачено на открытие и начальное изучение строения клетки; 1590 г. З. Янсен* изобрел микроскоп; 1663 г. Р. Гук открыл существование клеток; а в 1675 г. А. Левенгук – существование микоорганизмов

* Изобретатель микроскопа точно не известен. Многие считают, что его изобрел А. Левенгук. Однако следует отметить, что до него этим вопросом занимались как минимум ещё двое – Г. Галилей и З. Янсен. Создатель телескопа Г. Галилей обнаружил, что в сильно раздвинутом состоянии его зрительная труба позволяет значительно увеличивать мелкие предметы, поэтому его можно считать изобретателем микроскопа, состоящего из двух линз. Мастер по изготовлению очков З. Янсен из Миддельбурга изготовил несколько простых микроскопов. На протяжении жизни А. Левенгук изготовил около 400 микроскопов. Он более известен тем, что вместе с М. Мальпиги стал использовать микроскоп для изучения биологических объектов.

Продолжение табл. 1

Дата	Событие
1835 – 1855	М. Шлейден и Т. Шванн предположили, что все организмы состоят из клеток. Р. Вирхов провозгласил тезис: «каждая клетка происходит от клетки»
1857	Л. Пастер предположил, что ферментацию вызывают микроорганизмы
1859	Ч. Дарвин опубликовал свою теорию эволюции и естественного отбора
1865	Г. Мендель открыл закон наследственности и положил начало генетике
1870 – 1890	Селекционеры путем скрещивания получили сотни новых сортов хлопчатника лучшего качества. Получены первые гибриды кукурузы. Для повышения урожайности фермеры впервые стали вносить на поля фиксирующие азот бактерии
1917	К. Эреки предложил термин биотехнология. Впервые это слово появилось в печати в 1919 г.
1928	А. Флеминг открыл первый антибиотик ─ пенициллин. Ф. Лайбах впервые использовал метод выделения эмбрионов для получения гибридов (процесс гибридизации). Российский биолог Г.Д. Карпеченко скрестил редис и капусту и впервые получил фертильное потомство от растений разных родов
1930	Конгресс США одобрил закон о патентировании продуктов селекции растений
1942	Начато массовое производство пенициллина
1961	МСХ США зарегистрирован первый биопестицид *Bacillus thuringiensis*
1962	Дж. Гердон осуществил первое клонирование животного организма (лягушки)
1965	Харрис впервые получил гетерокарионы, образованные клетками мыши и человека
1972	Ученый из США П. Карлсон получил первый межвидовой гибрид при слиянии протопластов, полученных из клеток разных видов табака
1978	Фирма «Генентех» произвела человеческий инсулин в *E. coli*

Окончание табл. 1

Дата	Событие
1981	Одобрен для применения первый диагностический набор на основе МАт
1982	Зарегистрировано первое лекарство, полученное методами биотехнологии — человеческий инсулин, вырабатываемый бактериями. В Европе предложена первая вакцина для животных, полученная с применением генетической инженерии
1983	Получено первое генетически модифицированное (ГМ) растение (табак)
1986	С применением генетической инженерии получена первая вакцина для человека (против гепатита В)
1988	В США выдан патент на получение трансгенных мышей, чувствительных к раку
1990	Получен и зарегистрирован в Великобритании первый продукт питания из генетически модифицированного организма (модифицированные дрожжи)
1996	Продажа первого рекомбинантного белка эритропоэтина достигла 1 млрд долларов в год. Коммерциализация первых ГМ культур (кукуруза, соя, хлопчатник) в Аргентине, Австралии, Канаде, Китае, Мексике, США
1997	В Шотландии Я. Вильмут с сотрудниками впервые клонировали млекопитающее - овцу Долли
2000	Генетически модифицированные растения выращивают около 5,5 млн фермеров на общей площади 52,6 млн га в 13 странах
2004	Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращивают более 8 млн фермеров на общей площади 82 млн га в 17 странах
2006	Открыт механизм РНК-интерференции (подавления экспрессии генов двухцепочечной РНК). Американские ученые Э. Файр и К. Мелло получили за это открытие Нобелевскую премию 2006 г. по физиологии и медицине

Таблица 2

Краткая история развития молекулярной биотехнологии

Дата	Событие
1943	О. Эйвери, С. Маклеод и М. Маккарти показали, что ДНК является генетическим материалом
1951	Р. Франклин получила первую рентгенограмму молекулы ДНК
1953	Ф. Крик и Дж. Уотсон, опираясь на результаты опытов биохимиков и на данные рентгеноструктурного анализа, создали структурную модель ДНК в форме двойной спирали
1956	А. Корнберг обнаружил первый фермент, способный синтезировать ДНК в пробирке - ДНК-полимеразу
1958	Молекула ДНК впервые синтезирована в лаборатории
1961-1966	Расшифрован генетический код
1969	Х.Г. Корана и сотрудники синтезировали химическим путем первый ген
1970	Открыты ферменты, позволяющие разрезать молекулу ДНК в определенных местах (рестриктазы)
1973	С. Коэн и Г. Бойер разработали технологию рекомбинантной ДНК
1975	С. Мильштейн, Г. Келер и Н.К Ерне предложили технологию получения МАт
1976	Приняты первые законодательные акты по работе с рекомбинантными ДНК. Д. Хогнесс, Г.П. Георгиев и В.А. Гвоздев открыли подвижные генетические элементы у дрозофилы
1977	У. Гилберт, Ф. Сенгер и А. Максам опубликовали быстрые методы определения (секвенирования) длинных нуклеотидных последовательностей ДНК. Секвенирован первый ген человека
1980	Вручена Нобелевская премия за синтезирование первой рекомбинантной молекулы
1981	Появление коммерческих автоматизированных синтезаторов ДНК
1983	Сконструированы Ti-плазмиды для трансформации растений
1988	Опубликован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Создан международный проект “Геном человека”, поставивший своей целью полное секвенирование ДНК человека

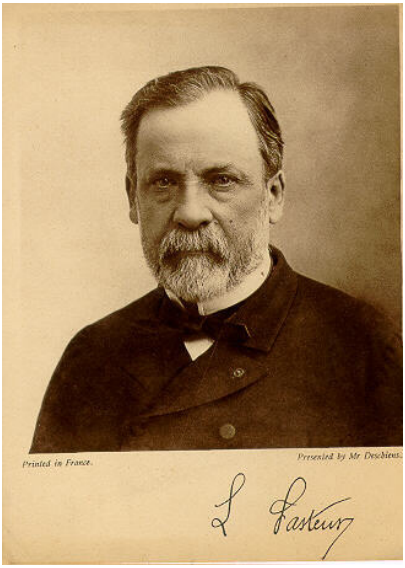
Окончание табл. 2

Дата	Событие
1990	Создана Международная организация по изучению генома человека (HUGO)
1994-1995	Опубликовано генетическое и физическое картирование хромосом человека
1996	Определена последовательность ДНК всех хромосом одного из эукариотических организмов – дрожжей *Saccharomyces cerevisia*
1997	С. Прузинер получил Нобелевскую премию за открытие прионов, возбудителей прионных инфекций животных и человека
2000	Первое полное картирование генома растения: Arabidopsis thaliana (Резуховидка Таля). Сообщено о черновой расшифровке генома человека и дрозофилы
2001	Компания «Синджента» заявила об успешном окончании картирования генома риса
2002	Нобелевскую премию по физиологии и медицине получили С. Бреннер, Р. Хорвиц и Дж. Салстон за открытие в области генетического регулирования развития органов и запрограммированной клеточной смерти - апоптоз
2007	М. Эванс, О. Смитис и М. Капекки – удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины за разработку методики получения живых организмов с целенаправленно изменённой структурой генов

Биотехнологические процессы вначале проводили при нестерильных условиях. Этанол, уксусную кислоту, бутанол и ацетон производили в конце 19 в. путем открытых ферментативных процессов. Примером таких процессов может служить обработка сточных вод, которую во всем мире проводят с помощью микроорганизмов.

Затем биотехнологические процессы стали проводить в стерильных условиях. В 1940-х г. была предложена сложная технология культивирования бактерий в условиях, исключающих попадание посторонней микрофлоры. В качестве примеров можно привести производство антибиотиков, аминокислот, стероидов, полисахаридов, а в последующем культивирование in vitro клеток животных и репродукцию вирусов для производства вакцин, а также получение МАт.

Исторически биотехнология была скорее искусством, чем наукой. Примером этому могут служить производство вин, пива, сыров и т.д., где техника производства была хорошо отработана, но молекулярные механизмы не были понятны. В результате огромных достижений в микробиологии, биохимии, генетике и других науках эти процессы становились более понятными и постоянно совершенствовались. Научные основы биотехнологии появились благодаря работам её основателя Л. Пастера.



Л. Пастер

Основные успехи биотехнологии достигнуты за последние 40 лет. Это фактически начало пути и следует ожидать, что использование биотехнологических процессов внесет свой вклад в разработку новых подходов к решению таких проблем, как загрязнение окружающей среды, нехватка продовольствия, регулирование репродукции и сохранение животного мира, повышение эффективности здравоохранения, поиск новых источников энергии и т. д.

Как отмечалось выше, дать исчерпывающее определение биотехнологии очень сложно, так как она тесно связана с другими разделами науки и техники. Она базируется на многих науках, включая молекулярную биологию, генетику и генетическую инженерию, биохимию и микробиологию, физическую химию и электрохимию, химическую технологию и др. (рис. 1).

Однако следует признать, что биотехнология не есть что-то новое, а представляет собой совершенствование и внедрение серии технологий, пришедших к нам в большинстве случаев из глубины веков, когда люди начали неосознанно использовать микроорганизмы для получения продуктов питания и напитков, например хлеба, сыра, пива, и модифицировать в желаемом направлении растения и животных путем длительной селекции.

Характерной чертой развития науки и технологии за последние десятилетия является увеличение мультидисциплинарной стратегии в решении различных проблем. Это привело к появлению новых междисциплинарных областей науки с выделением новых дисциплин, имеющих характерные концепции и методологии. Биофизика и биохимия являются двумя характерными примерами дисциплин, которые внесли много в наше понимание физических процессов и биохимических основ биологических систем.

Рис. 1. Взаимосвязь биотехнологии и других наук

В отличие от отдельных научных дисциплин биотехнология применяет широкий ряд смежных наук и весь перечень биопроцессорных технологий.

Расширение сферы приложения биотехнологии приводит к поиску новых режимов и технологий проведения процессов, которые во многом зависят от свойств компонентов биотехнологической системы, в первую очередь биологического агента, от требований, предъявляемых к продукту (от назначения продукта), и от технико-экономических показателей, которых необходимо достигнуть.

Биотехнолог может использовать методы химии, микробиологии, биохимии, химической инженерии, информатики и т.д. Главными целями будут нововведения, разработка и оптимальная работа процессов, в которых биохимический катализ играет фундаментальную и незаменимую роль. Для успешной работы биотехнологи должны добиться тесного сотрудничества со специалистами других родственных областей, таких как медицина, пищевая промышленность, фарминдустрия и химическая индустрия, экология и др.

Таким образом, биотехнологию можно рассматривать как набор всевозможных технологий, которые могут найти применение во многих отраслях народного хозяйства. Как описано ниже, она включается в поиск принципиально новых технологий, которые должны сыграть основную роль в будущем.

Новая биотехнологическая революция началась в середине 1970-х и в начале 80-х гг., когда ученые научились точно изменять генетическую конституцию живых организмов благодаря использованию генетической инженерии (технология рекомбинантных молекул ДНК). В дальнейшем она затронула практически все важнейшие направления биотехнологии и в будущем позволит совершить переворот в медицине, сельском хозяйстве и других сферах деятельности человека, в частности, в тех отраслях, где традиционные методы были бессильны. Некоторые из наиболее выдающихся достижений будут использованы в терапии генов для лечения ранее неизлечимых болезней, в производстве лекарственных средств и экологически чистых продуктов, безопасных пестицидов, в разработке новейших технологий охраны окружающей среды и в поиске новых источников энергии.

Во второй части курса лекций будут приведены примеры широкого использования биотехнологии в различных областях деятельности человека, начиная от самых простых и традиционных, таких как производство пива, сыров, вин, и заканчивая более сложными молекулярными процессами, такими как использование технологии рекомбинантных ДНК в получении новых препаратов, ПЦР в диагностике или применение МАт в диагностике и лечении болезней.

Развитие биотехнологии неразрывно связано с успехами биоинженерии, включающей создание аппаратуры для проведения биопроцессов и средств их контроля, внедрением компьютерной техни-

ки и осуществлением постоянной глобальной коммуникации между разработчиками новых технологий. Будущие успехи биотехнологии связывают с нанобиотехнологией, с целенаправленным созданием новых молекул ферментов (белковая инженерия) и с использованием различных биополимерных структур в электронных устройствах (биоэлектроника). Главная причина успехов биотехнологии кроется в огромных достижениях и быстром прогрессе молекулярной биологии, в частности в разработке клеточной и генетической инженерии.

Контрольные вопросы

1. Кем и когда был введен термин “биотехнология”?
2. Что изучает биотехнология?
3. Назовите основные этапы развития биотехнологии?
4. Кто из ученых внес наибольший вклад в развитие биотехнологии?
5. С какими науками связана биотехнология?
6. Что такое междисциплинарная область науки?
7. Приведите примеры междисциплинарных наук.

Лекция 2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Как уже отмечалось выше, новый импульс биотехнология получила в середине 70-х гг. благодаря появлению такого направления в науке, как генетическая инженерия, которая представляет собой совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот, выделения генов из организма (клеток), проведения манипуляций с ними и введения их в другие организмы. Генетическая инженерия служит для получения организмов с нужными качествами. Её нельзя назвать наукой в обычно принятом смысле. Она является инструментом биотехнологии и использует информацию, накопленную такими биологическими науками, как молекулярная биология, биохимия, цитология, генетика, микробиология и др. Создание генетической инженерии невозможно было без серии открытий, результатом которых явилась разработка методов управления наследственностью живых организмов путём проникновения в их генетический аппарат.

К таким открытиям следует отнести прежде всего:

– получение изолированного «химически чистого» гена. Первоначально гены пытались выделять из соответствующих клеток, но потом оказалось, что, зная строение, проще получать их путем химического и молекулярно-биологического синтеза. Затем необходимо было разработать методику введения гена в клетку. Причём нужно было научиться не просто вводить ген в цитоплазму, а встраивать его в молекулу ДНК клетки так, чтобы новая информация могла быть «прочитана» биосинтетическим аппаратом клетки, вырабатывающим белки и воспроизводящим гены при делении клетки. Осуществление этих двух этапов – получение гена и введение его в клетку – и составляет основу той отрасли биотехнологии, которая получила название технологии рекомбинантных ДНК;

– разработку методов «чтения» биологической информации, которая «записана» в генах. Эта работа была проделана английским учёным Ф. Сенгером и американским учёным У. Гилбертом. За неё учёные в 1980 г. были удостоены Нобелевской премии по химии;

– открытие структуры и функции генетического аппарата клетки;

– открытие механизмов рекомбинации гомологичной и негомологичной ДНК;

– обнаружение в бактериальных клетках внехромосомных кольцевых ДНК, способных к репликации. Они впервые были обнаружены в начале 50-х гг. и получили название “плазмид”. Плазмиды обладают способностью к автономной от хромосомы репликации и содержатся в клетке в виде нескольких копий. Различаются плазмиды по генетическим детерминантам. Очень важно, что плазмиды из-за своих малых размеров могут быть выделены из клетки в неповрежденном, нативном состоянии;

– открытие рестриктаз и лигаз. В 1970 г. американцы С. Келли и Г. Смит с сотрудниками выделили первую рестриктазу — фермент, который вызывает гидролитическое расщепление ДНК в строго определенных местах. Существование таких ферментов-рестриктаз было доказано в опытах швейцарских ученых С. Линна и В. Арбера в конце 60-х гг. С помощью рестриктаз ген можно разрезать на отдельные фрагменты, а с помощью лигаз их можно соединять в иной комбинации, конструируя новый ген. В настоящее время описано множество ферментов, которые применяются в генетической инженерии.

Таким образом, к началу 70-х гг. были сформулированы основные принципы функционирования нуклеиновых кислот и белков в живом организме и созданы теоретические предпосылки для возникновения генетической инженерии.

В 1972 г. американский ученый П. Берг опубликовал сообщение о получении *in vitro* рекомбинантной ДНК, состоящей из фрагментов ДНК вируса и бактерии. Так, развитие технологии рекомбинантных ДНК ознаменовало рождение новой отрасли молекулярной биологии – генетической инженерии. Основными этапами генетической инженерии являются выделение нужного гена из клетки; получение вектора (плазмида) из бактерии; встраивание *in vitro* выделенного гена в вектор; введение полученной рекомбинантной ДНК в бактерию; получение бактерий, экспрессирующих данный ген (рис. 2).

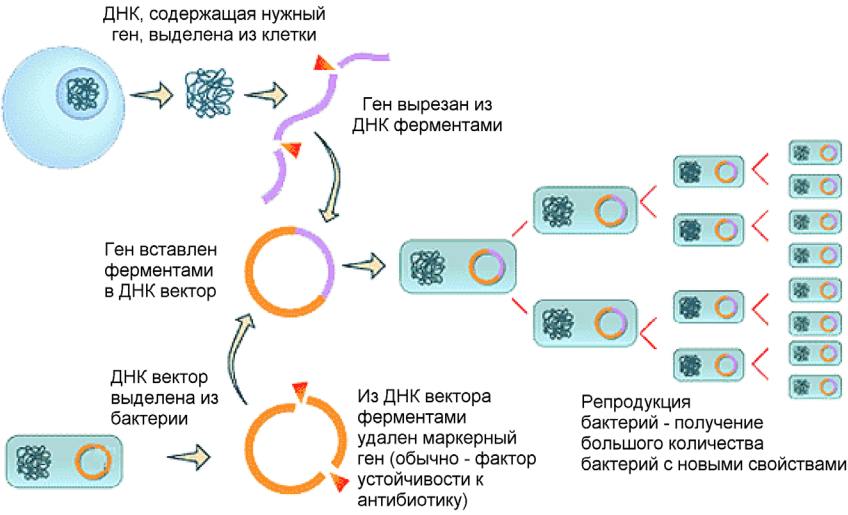


Рис. 2. Схема основных этапов генетической инженерии

Генная инженерия изучает механизмы функционирования генетического аппарата клеток, что другими приемами сделать невозможно. Вместе с тем она ставит перед собой обширные практические задачи, некоторые из них в настоящее время решены. Прежде всего это получение путем бактериального синтеза ряда препаратов, например инсулина (рис. 3) и интерферонов.

Одним из первых ученых в нашей стране, который поверил в перспективность генетической инженерии и возглавил исследования в этой области, был А.А. Баев По его определению, генетическая инженерия занимается конструированием *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе созданием искусственных генетических программ.

Важнейшим достижением генетической инженерии является создание диагностических наборов. Получение трансгенных организмов открывает принципиально новые возможности для получения новых штаммов микроорганизмов-продуцентов, трансгенных животных или растений, имеющих нужные для человека свойства. Это далеко не полный перечень практического приложения генетической инженерии.

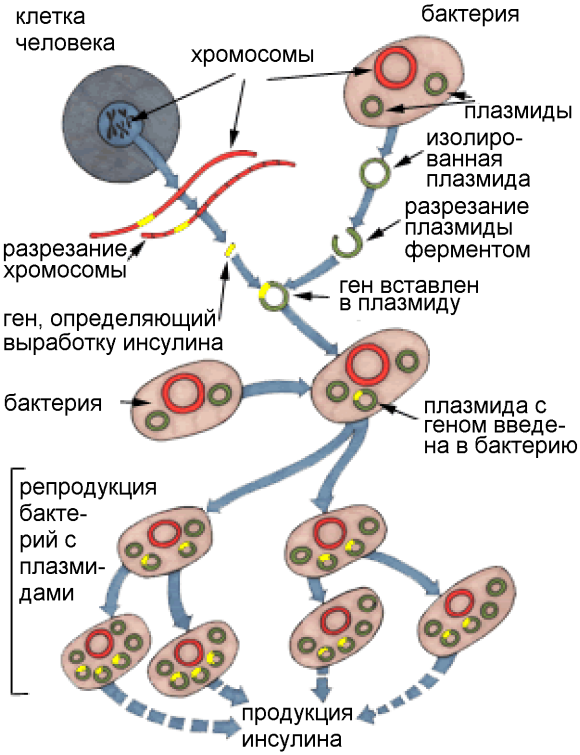


Рис. 3. Схема получения инсулина методом бактериального синтеза

Контрольные вопросы

1. Что такое генетическая инженерия?
2. Какие открытия способствовали появлению и развитию генетической инженерии?
3. Кто является основоположником генетической инженерии?
4. Назовите основные этапы проведения технологии рекомбинантных ДНК.

Лекция 3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Клеточная инженерия – раздел современной биологии, изучающий процесс и последствия переноса всего или значительной части генетического материала от одной клетки к другой. Она позволяет создавать клетки нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. В случае эукариотических организмов и в зависимости от объекта генетических манипуляций процесс может подразделяться на хромосомную (перенос больших групп генов или хромосом) и геномную (полный перенос генома) инженерию.

Базовым методом клеточной инженерии служит слияние (гибридизация) клеток микроорганизмов или соматических клеток животных и растений. Слияние клеток может быть проведено с использованием факторов слияния различного происхождения: физического (переменное электрическое или магнитное поле), химического (катионы, полиэтиленгликоль и др.), биологического (вирусы).

Растительные клетки перед слиянием превращают в протопласты клетки, лишенные внешней жесткой клеточной стенки. Последующий скрининг полученных гибридных клеток позволяет отобрать те из них, которые объединили геномы или фрагменты ДНК родительских клеток. Клеточная инженерия позволяет получать гибридные клетки или даже целые растения (растения-регенераты), скрещивая между собой филогенетически (т. е. эволюционно) отдаленные организмы. В случае неполного слияния клеток клетка-реципиент получает отдельные участки ядерного генетического материала или части клетки-донора (органеллы) с образованием асимметричнх гибридов.

Клеточная инженерия расширяет возможности получения новых ценных штаммов микроорганизмов, сортов культурных растений и пород сельскохозяйственных животных, для создания которых ранее использовались методы классической селекции, требующие десятилетий. За последнее время создан ряд межвидовых и межродовых гибридов табака, картофеля, томата и других растений. Использование достижений клеточной инженерии позволило разработать технологии получения безвирусных растений (например картофеля) путем регенерации целого растения из одной соматической клетки.

На рис. 4 представлена схема регенерации растения из протопластов. При получении клеток используется комплекс методов, включающий культивирование, клеточную гибридизацию и генетическую инженерию. Однако основой является гибридизация, позволяющая конструировать клетки с новыми свойствами.

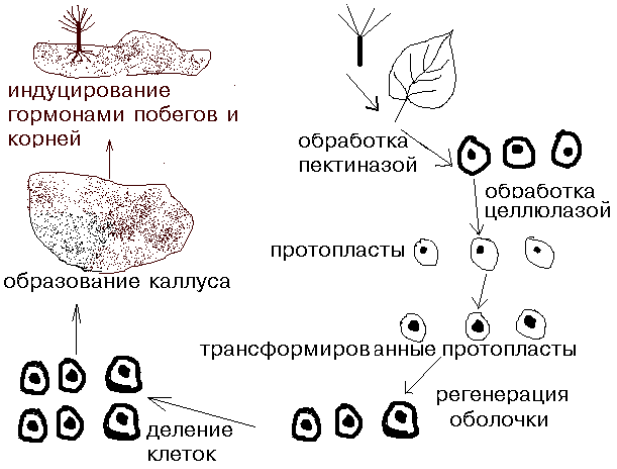


Рис. 4. Схема регенерации растения из протопластов

Иногда применение клеточной инженерии ограничивают только слиянием протопластов.

В настоящее время культуры клеток широко применяются для производства противовирусных вакцин. Они дополняют, а возможно, когда-нибудь и заменят использование животных для тестирования безопасности и эффективности вакцин и лекарственных препаратов. Клетки насекомых, так же как растительные клетки и клетки животных, могут быть использованы для производства живых рекомбинантных противовирусных вакцин, сконструированных, например, на основе бакуловирусов. Их применение позволяет решить проблему безопасности, возникающую при получении и применении живых вакцин традиционным методом на основе аттенуированных штаммов. Кроме того, с их помощью можно синтезировать лекарственные вещества, особенно некоторые белки животных, слишком сложные для того, чтобы синтезировать их с помощью генетически модифицированных микроорганизмов.

3.1. Гибридизация соматических клеток

В основе метода лежит слияние клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. Впервые были получены гетерокарионы клеток мыши и человека. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам, и даже между растительными и животными клетками. Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека и в анализе причин злокачественного перерождения клеток. Первый межвидовой гибрид был получен в 1972 г. П. Карлсоном при слиянии протопластов из клеток разных видов табака.

Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют важные отличия от половых гибридов поскольку несут цитоплазму обоих родителей. Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены мужской стерильности, устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам, полученным от дикорастущих видов. Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, получить соматический гибрид картофеля с томатами и т.д. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии-продуценты нужных веществ, используемых в различных отраслях народного хозяйства и в первую очередь в здравоохранении.

Одним из способов модификации клеток является введение в них индивидуальных генов. Встраивание активного гена на место отсутствующего или поврежденного открывает путь для лечения генетических заболеваний человека. Реконструкцию клеток проводят также при слиянии клеточных фрагментов друг с другом или с

интактными клетками. В результате получают клетки с различными свойствами, например, гибриды либо клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра.

Таким образом, клеточная инженерия является одним из основных методов биотехнологии.

Отдельным направлением клеточной инженерии, имеющим огромное практическое значение, является получение гибридов, т.е. клеток, возникающих при слиянии родительских клеток из одного организма, но с разными программами дифференциации и развития. Это могут быть клетки из разных типов ткани или опухолевые клетки. В качестве примера можно привести слияние клеток селезенки и миеломы с образованием гибридом при получении МАт.

Получение моноклональных антител

Традиционная технология получения иммуноглобулинов сводится к иммунизации животных-продуцентов (лошадей, баранов, кроликов, морских свинок и т.д.) соответствующими антигенами, получению от животных поликлональных сывороток. Кроме антигенов для иммунизации могут быть использованы гаптены, которые являются веществами, имеющими низкую молекулярную массу. Они способны индуцировать иммунный ответ только после соединения с подходящим белком-носителем или искусственным полимером. В этом случае антитела вырабатываются как на гаптен, так и на молекулу-носитель. При повторном попадании в организм этого же гаптена или антигена они связывается с антителами и элиминируются.

У антител, вырабатываемых организмом в ответ на антигены, имеются:

– стабильные (константные) участки, характерные для всех антител данного класса, вырабатываемых всеми организмами данного вида – изотипы;

– стабильные участки, характерные для всех антител данного класса, вырабатываемых данным конкретным организмом, но отличающиеся по аминокислотной последовательности от аналогичных участков таких же антител другого организма этого же вида – аллотипы;

– вариабельные участки, аминокислотная последовательность которых специфична для антител против конкретного антигена – идиотипы.

Особым видом антител являются так называемые антиидиотипические антитела. Эти антитела синтезируются против антител, введенных в организм. Антиидиотипические антитела специфичны к вариабельныому участку антитела, так называемому идиотипу. Они играют важную роль в связывании и элиминации избытка антител, т.е. в иммунной регуляции количества антител. Кроме того, они зеркально повторяют пространственную конфигурацию исходного антигена, против которого было выработано исходное антитело, и служат для организма фактором иммунологической памяти, аналогом исходного антигена. Этот фактор остаётся в организме и после уничтожения исходных антигенов. В свою очередь, против антиидиотипических антител могут вырабатываться анти-антиидиотипические антитела и т. д.

Попытки культивировать *in vitro* антителопродуцирующие клетки оказались неудачными, поскольку их невозможно длительно культивировать вне организма и получать достаточное количество антител. Более того, такая система обычно продуцировала множество клонов антител.

Значительные успехи биотехнологии за последние 15 – 20 лет были достигнуты благодаря разработанному в 1975 г. С. Мильштейн, Г. Келер и Н.К. Ерне методу получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МАт). В 1984 г. за это открытие им присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины. Основная идея состояла в использовании линии миеломных клеток, которые потеряли способность секретировать антитела, и путем слияния их с *В*-клетками, продуцирующими антитела, получить гибридомы с последующей их селекцией.

Получение МАт включает в себя ряд этапов (рис. 5):

– выделение или синтез антигенов, необходимых для иммунизации BALB C мышей (при этом антиген не обязательно должен быть высокоочищенным);

– взятие клеток селезенки у иммунизированных мышей, имеющих наиболее высокие титры антител к введенному антигену;

– слияние клеток селезенки с клетками миеломы (опухолевыми клетками). От опухолевой клетки гибридоме передается способность к неограниченному размножению, а от лимфатической – способность к синтезу антител.

– смесь клеток высаживают на среду ГАТ для отбора гибридом.

Рис. 5. Схема получения моноклональных антител

Прежде всего был получен штамм опухолевых клеток, который не содержал ферментов, обеспечивающих запасной путь синтеза нуклеотидов при блокировании аминоптерином основного пути. Другие клетки, используя гипоксантин и тимидин, могли включать резервный путь синтеза нуклеотидов, следовательно, среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), являлась селективной. На ней погибали клетки плазмоцитомы, но выживали нормальные лимфоциты и гибридомы. Поскольку лимфоциты не могут долго размножаться в культуре и гибнут, остаются только гибридомные клетки.

Следующим этапом является отбор нужных клонов. Для этого проводят их скрининг. Клоны, продуцирующие нужные антитела, могут быть размножены в культуре ткани или *in vivo*. В последнем случае их трансплантируют в брюшную полость сингенных мышей, в которой они размножаются и выделяют

асцитическую жидкость, содержащую антитела. Клоны можно длительное время хранить замороженными при минус 70 °С. Все антитела, синтезированные одним клоном гибридом, имеют одинаковую специфичность.

Последний этап состоит в наработке больших количеств МАт. Их можно получить или в виде асцитной жидкости на мышах, или путем культивирования в биореакторах.

В настоящее время с помощью данной технологии получены МАт к множеству антигенов, включая возбудителей многих инфекционных болезней.

В последние годы сформировалась новая область иммунологии – инженерия антител, т.е. получение неприродных иммуноглобулинов с заданными свойствами. Для этого обычно используются два основных направления: биосинтез полноразмерных антител и получение минимальных фрагментов молекулы антител, которые необходимы для эффективного и специфического связывания с антигеном.

По первому направлению получен химерный иммуноглобулин – мышь/человек. Его вариабельные домены, которые и определяют специфичность, взяты из антитела мыши (IgG1), а константная часть – из человеческого IgE. По второму направлению сконструированы и экспрессированы в клетках *E.coli* гены “мини-антител”, которые не содержат константных доменов.

3.2. Стволовые клетки

Существование стволовых клеток в некоторых тканях сначала было предсказано теоретически. Американский цитолог Э. Вильсон в 1896 г. предположил существование клеток, обеспечивающих поддержание сперматогенеза. Но предсказание и начало работ непосредственно со стволовыми клетками разделил немалый промежуток времени, что связано было с несовершенством экспериментальных методик. Стволовые клетки надо было сначала выделить из общей массы клеток зародыша, что явилось весьма нелегкой задачей, поскольку они составляют лишь сотые доли процента от общего числа клеток зародыша организма.

Стволовые клетки разделяются на эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты, и региональные стволовые клетки (РСК), получаемые из органов эмбрионов на более поздних стадиях или из органов взрослых особей. Поэтому их часто называют взрослыми стволовыми клетками. В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Они называются бластными клетками. Например, частично созревшие клетки мозга – это нейробласты, клетки кости – остеобласты и так далее.

Дифференцировку могут инициировать как внутренние, так и внешние факторы. Стволовые клетки преобразуются в клетку того или иного органа в присутствии определенного химического вещества, дифференцированного по составу и, возможно, по концентрации для каждого отдельного вида клеток. Однако природа этих веществ и источник их происхождения пока точно не установлены.

Известно, что геномы всех клеток одного организма идентичны, но режим их работы в разных клетках различен. Следовательно, ДНК во всех клетках (кроме половых) одного организма, в том числе и стволовых, одинакова. Клетки различных органов и тканей, например клетки кости и нервные клетки, различаются включенными и выключенными генами, то есть разным регулированием экспрессии генов. Механизмов такого регулирования очень много, один из них – метилирование ДНК.

Многоклеточные организмы научились также прицельно отключать свои собственные гены с помощью РНК-интерференции (РНКи), прерывая процесс синтеза кодируемых ими белков. Работы по РНК-интерференции были выполнены в 1997 г. и опубликованы в феврале 1998 г. в журнале «Nature». Указанный механизм ингибиции очень древний. По всей видимости, биологическая эволюция создала его более миллиарда лет назад, когда нашу планету населяли только бактерии. С его помощью они получили возможность защищаться от многих вирусов. Позже эту способность у них переняли далекие потомки, грибки и растения, а потом животные и человек. Кроме того, такой механизм позволяет клетке вырезать и уничтожать подвижные элементы ее генома, которые могут перемещаться на неположенные места и давать начало опасным мутациям.

Наконец, РНКи участвует в регуляции экспрессии функциональных генов и способствует стабилизации хромосомного вещества – хроматина. За открытие этого механизма Нобелевскую премию 2006 г. по физиологии и медицине получили американские ученые Э. Файр и К. Мело После открытия зрелых и незрелых клеток был обнаружен новый уровень управления клетками.

Все стволовые клетки независимо от их происхождения и источника выделения обладают уникальными свойствами. Они не специализированы, то есть не имеют каких-либо тканеспецифических маркеров, ответственных за выполнение специальных функций, но способны дифференцироваться в любые специализированные клетки и образовывать из одной первоначальной стволовой клетки линии генетически идентичных клеток. Их можно культивировать в течение длительного времени.

Отличие зрелых клеток от стволовых состоит в том, что первые обычно имеют ограниченное количество циклов деления. Процесс созревания стволовых клеток протекает в несколько стадий, что приводит к возникновению в организме популяций стволовых клеток различной степени зрелости. Образование соматических клеток из ЭСК идет в обход органогенеза и многих событий, происходящих при естественном развитии зародыша в матке. Чем более зрелой является клетка, тем меньше вероятность её превращения в клетку другого типа.

Как известно, специализированные клетки взрослого организма необратимо утрачивают способность к повторению эмбриогенеза. При культивировании *in vitro* большинство специализированных клеток, изолированных из тканей, быстро дедифференцируется, теряя фенотип и присущие им функции. Науке пока неизвестны способы получения стволовых клеток из дифференцированных. Тем не менее, это возможно благодаря процессу трансдифференцировки клеток. Разработка методов такого клеточного репрограммирования, т.е. возвращения зрелых клеток организма, например клеток кожи, в недифференцированное состояние и последующей стимуляции дифференциации их в клетки необходимого типа ткани, является перспективным направлением.

Однако полное репрограммирование генома соматических клеток взрослых тканей пока технически невыполнимо. В геноме соматических клеток отсутствуют «программы» репарации. В случае возникновения аномальных клеток используется несколько вариантов апоптоза для их аутоэлиминации. После пересадки стволовых клеток они ускоряют самообновление клеток в органах, в том числе элиминацию патологически измененных клеток.

В изучении стволовых клеток особое значение, кроме РНКи, приобрели следующие молекулярно биологические подходы: протеомный анализ, генетическая трансформация, техника биочипов (microarray технология), метод генных ловушек и др.

3.2.1. Эмбриональные стволовые клетки

Любой многоклеточный организм берет начало с зиготы – клетки, возникшей в результате слияния двух родительских половых клеток – отцовской и материнской. Однако и взрослый организм несет в себе своего рода двойники зиготы, так называемые ЭСК.

Принципиально важное свойство ЭСК в том, что эти клетки изначально не имеют специализации, но могут «выбрать» один из 200 возможных типов клеток, приняв информацию от соседних клеток в тканях организма. Можно сказать, что эмбриональная стволовая клетка лишь ждет особых сигналов, чтобы начать одно из своих превращений в специализированные клетки.

Изучение эмбриональных стволовых клеток было начато с концепции стволовой клетки, предложенной русским гистологом А. Максимовым применительно к кроветворной ткани. Он же в 1908 г. на съезде гематологического общества в Берлине предложил термин «стволовая клетка». Вторая половина XX в. ознаменовалась крупным успехом в изучении клеточного состава костного мозга и открытием в его строме мезенхимальных стволовых клеток. В 1981 г. английскому ученому М. Эвансу впервые удалось выделить недифференцированные стволовые клетки из зародыша мыши и лишь в 1998 г. американские ученые Д. Томпсон и Д. Герхарт изолировали первую линию ЭСК человека. В 1999 г. журнал «Science» признал открытие эмбриональных стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».

В результате проведенных исследований определился ряд этапов, предшествующих использованию ЭСК в клинической практике:

– выделение ЭСК и получение их в виде культуры клеток с направленной дифференцировкой;

– проведение теста на их физиологическую функциональность в культуре;

– проведение теста на функциональную эффективность и безопасность на животных;

– тестирование полученных клеток на возможность развития реакции отторжения.

Хотя первые методы выделения и пассирования ЭСК появились около 20 лет назад, выделение их из зародышей остается, скорее, искусством, чем стандартной процедурой. В настоящее время ученые пытаются разработать методы выделения стволовых клеток из плаценты и жировой ткани.

Имеются лишь отдельные достоверные сообщения об успешном применении ЭСК в клинике. Как отмечает академик М.А. Пальцев, имеются следующие серьезные трудности в использовании ЭСК для лечения заболеваний:

– иммунологическая несовместимость клеток, пересаживаемых реципиенту;

– неполное соответствие условий клеточной дифференцировки *in vivo* и *in vitro*;

– невозможность обнаружения генетических дефектов до пересадки эмбриональных стволовых клеток;

– недостаточно доказательств эффективности и безопасности применения ЭСК;

– пересадка ЭСК, подобно трансплантации органов, не излечивает больного, а продлевает его жизнь;

– этические проблемы.

Одну из основных проблем при трансплантации ЭСК – иммунологическую несовместимость клеток – можно решить с помощью генетической инженерии. Однако изменения иммунных характеристик эмбриональных стволовых клеток с целью снижения риска развития реакции отторжения трансплантата не дают возможности обеспечить 100 %-ную безопасность пациенту. Риск появления генетических изменений в этом случае вполне реален. Тем более, что их очень сложно обнаружить до трансплантации.

Терапевтическое клонирование, при котором генетическая информация ЭСК замещается генетической информацией, взятой от пациента, также не решает проблемы, поскольку в таких клонах велика вероятность возникновения артефактов, делающих невозможным их использование в лечении.

На дифференцировку ЭСК влияют многочисленные факторы, и полное воспроизведение необходимых условий практически невозможно. В то же время трансплантация пациенту некорректно дифференцированных клеток представляет серьезный риск, связанный с их высоким туморогенным потенциалом. После оплодотворения яйцеклетка начинает делиться, образуя первые тотипотентные стволовые клетки (рис. 6), способные воспроизводить любую из 200 специализированных клеток взрослого организма.

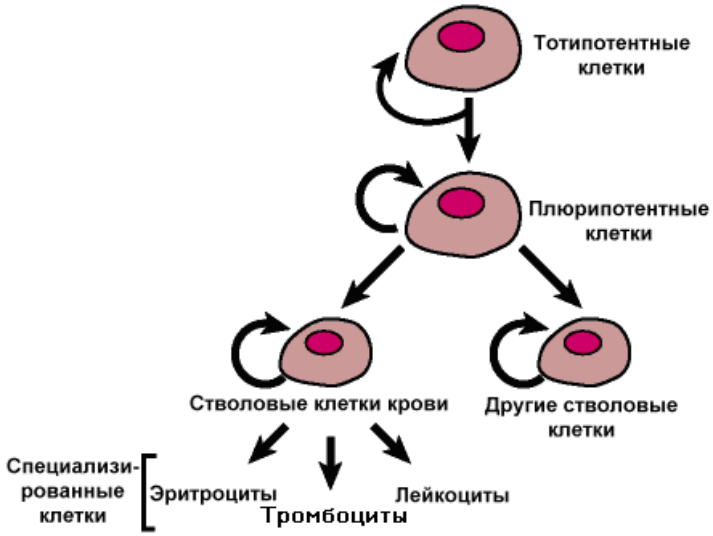


Рис. 6. Схема дифференцировки эмбриональных стволовых клеток

Клетки развивающегося эмбриона изначально тотипотентны, но теряют это свойство после нескольких клеточных делений в результате дифференцировки. Некоторые из клеток организма не дифференцируются окончательно, а становятся плюрипотентными, т.е. способны давать лишь отдельные типы клеток организма. Тотипотентные клетки эмбриона называют также эмбриональными

стволовыми клетками, а плюри- и мультипотентные клетки организма – взрослыми стволовыми клетками. Функция первых в организме очевидна, из одной клетки должен развиться целый организм с большим числом клеточных типов, каждый из которых выполняет свою функцию. Взрослые стволовые клетки необходимы организму для восполнения погибших клеток в процессе жизни. Они способны заменять практически все ткани в организме. Кроме того, они способны к самоподдержанию и производству клеток-предшественников, которые затем дифференцируются.

РСК при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань. История изучения регионарных стволовых клеток началась более 40 лет назад. Они используются организмом для восстановления поврежденных участков только в данном месте и для определенного вида ткани (костные, мышечные, нервные и т. д.). Такие монопотентные (унипотентные) стволовые клетки созревают, образуя один фенотип клеток.

Стромальные стволовые клетки костного мозга являются универсальными. Поступая с кровотоком в поврежденный орган или ткань, под влиянием различных сигнальных веществ они превращаются в нужные специализированные клетки, которые замещают погибшие. Они не только играют важную роль в развитии плода, но и сохраняются в детском и взрослом организме. Поскольку их доля в тканях взрослого организма очень мала, то возможности органов по регенерации сильно ограничены. Когда человек рождается, то у него в костном мозге на 10 тысяч стволовых кроветворных клеток приходится одна стромальная клетка. У подростков стромальных клеток уже в 10 раз меньше. К 50 годам на полмиллиона стволовых – одна стромальная клетка, а в 70 лет отбирать пробу костного мозга просто бессмысленно – там содержится всего лишь одна стромальная клетка на миллион стволовых.

Открытие и изучение свойства пластичности РСК, стромальных и соматических стволовых клеток имело огромное значение. Исследования последних лет показали не только возможность выделения соматических стволовых клеток, но и их направленную дифференцировку *in vitro* и *in vivo*. Дифференцировка ЭСК в специализированные классы соматических клеток открывает большие возможности для изучения функциональных программ генома.

Использование эмбриональных стволовых клеток рассматривается в качестве потенциального метода терапии многих наследственных заболеваний, которые не удается лечить методами молекулярной генетики, включая средства генной терапии. Доказано, что всего 3 – 5 % генетически нормальных клеток достаточно, чтобы восстановить утраченную биохимическую функцию поврежденной печени, скелетной мышцы или желез внутренней секреции.

Важной особенностью ЭСК является то, что внутрихромосомная рекомбинация и эндоредупликация отдельных сегментов хромосом полностью блокированы строением хроматина. Поэтому общая частота мутаций в геноме у них ниже в несколько раз, чем у соматических клеток.

ЭСК оказались незаменимым объектом для изучения особенностей функционирования генов организма на всех этапах его существования. Они позволили получать живые организмы как с «выключенными», так и с вновь введенными генами. Направленное «выключение» в организме определенного гена называется генным нокаутом, или таргетингом (от англ. target – цель). Животные, имеющие в своем составе «нокаутированные» или дополнительные гены, служат моделью для понимания того, как отдельные гены влияют, например, на развитие тех или иных патологий у человека – сердечно-сосудистых заболеваний, нарушений функций иммунной системы, некоторых форм рака. Генный нокаут в корне изменил подход к получению живых организмов с измененными генами. Еще совсем недавно ученым приходилось кропотливо отбирать из многих сотен, а то и тысяч экземпляров особи, обладающие генами с иной структурой, возникшей в результате мутаций. В настоящее время такой путь сменился активным модифицированием генов непосредственно в составе живых клеток.

В 2007 г. английский ученый М. Эванс и американские ученые С. Оливер и М. Капекки были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины (см. табл. 2) за разработку методики получения живых организмов с целенаправленно изменённой структурой генов. Отмеченная высокой наградой работа этих учёных фактически возникла на стыке двух направлений биологической науки – клеточного, которое связано с манипуляциями непосредственно с ЭСК, и молекулярной генетики. Разработанная ими методика позволила многим исследователям продвинуться вперёд в самых разных сферах биологии и медицины.

3.2.2. Соматические стволовые клетки

Соматические стволовые клетки – это клетки взрослого организма, которые присутствуют во всех органах и тканях. ЭСК способны реплицироваться, оставаясь недифференцированными в течение длительного времени, что для стволовых клеток из взрослых организмов невозможно. Стволовые клетки из взрослых организмов присутствуют во всех тканях и активируются при заболевании или повреждении ткани, они более дифференцированы, чем эмбриональные. В случае тяжелых повреждений в организме не хватает эндогенных стромальных клеток. Для устранения таких повреждений необходимо вырастить большое количество стромальных клеток, затем ввести их и с помощью специальных сигнальных веществ направить для восстановления поврежденных тканей.

Стромальные стволовые клетки широко применяются для лечения ревматоидных заболеваний, в реконструктивной хирургии и ортопедии, в косметической хирургии, неврологии, кардиологии, диабетологии, в регенеративной медицине и др.

Необходимость преодоления ограничений по использованию ЭСК привела к поиску альтернативных путей. В последние годы наметился значительный прогресс в области исследований соматических стволовых клеток. Преимущества их использования вместо эмбриональных очевидны: соматические стволовые клетки получают из тканей самого пациента, поэтому проблемы иммунологического отторжения не существует.

Стволовые клетки из дифференцированных (взрослых) тканей не вызывают образования тератом. Терапевтическое использование соматических стволовых клеток самого пациента, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, не ставит серьезных этических вопросов.

Несмотря на некоторые преимущества соматических стволовых клеток, существует ряд проблем, связанных не только с их применением, но и получением:

– соматические стволовые клетки, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, плохо растут в культуре и имеют ограничения в дифференцировке в другие типы клеток;

– несмотря на многочисленные публикации, пока не ясно, как долго можно поддерживать и коммитировать соматические стволовые клетки из дифференцированных тканей в зрелые клетки других тканей;

– использование стволовых клеток в регенеративной медицине сопряжено с проблемой их идентификации, поскольку не существует надежных маркеров, позволяющих достоверно определять соматические стволовые клетки в различных тканях.

Контрольные вопросы

1. Что изучает клеточная инженерия?
2. Что такое гетерокарионы и в чем их отличие от половых гибридов?
3. Кем был получен первый межвидовой гибрид растительных клеток?
4. Какие преимущества имеет клеточная инженерия перед классическими методами селекции?
5. В чем отличие поликлональных и моноклональных антител?
6. Кто впервые получил моноклональные антитела?
7. Назовите основные этапы получения моноклональных антител.
8. Какова роль антиидиотипических антител в организме?
9. Какие вещества называют гаптенами? Перечислите их основные свойства.
10. Какими свойствами обладают разные виды стволовых клеток?
11. Какие проблемы возникают при получении и применении стволовых клеток?

Лекция 4. ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

В современной трансплантологии в большинстве случаев используются донорские ткани и органы человека, из-за чего после трансплантации возникает ряд неизбежных осложнений. Хотя по сравнению с основным заболеванием они могут показаться незначительными, но все же некоторые из них доставляют определенные неудобства реципиенту. К ним можно отнести необходимость пожизненной иммуносупрессии – подавления иммунных реакций пациента для предотвращения или ослабления тканевой несовместимости (реакции «трансплантат против хозяина» и «хозяин против трансплантата») и опасность передачи пациенту инфекционных заболеваний вместе с пересаженными органами.

С учетом того, что имеется острый дефицит донорских органов, который, по-видимому, сохранится в ближайшие годы, учеными интенсивно разрабатывается новое самостоятельное междисциплинарное направление – тканевая инженерия. Основной задачей данного направления является выращивание тканей и целых органов посредством культивирования стволовых клеток и управления их дифференциацией в клетки различных видов соматической ткани. Источниками стволовых клеток являются не только недиффиренцированные зародышевые клетки, но и постоянно регенерирующиеся ткани взрослого человека. Например, стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки выделяют из костного мозга, а стволовые клетки эпидермиса кожи берут из волосяных фолликул – специализированных структур, ответственных за рост волос. При замене пораженных органов и тканей применяют принципы биологии и инженерии, с помощью которых поддерживают или улучшают функции органов и тканей. Отличие тканевой инженерии от стандартной терапии состоит в том, что сформированную ткань вводят в организм пациента с целью постоянного и специфического лечения болезни.

Принято считать, что работы в области тканевой инженерии ведут свой отсчет от пионерских исследований профессора Г. Грина (Гарвардская медицинская школа, США), который в 1975 г. предложил оригинальный способ культивирования и размножения клеток кожи человека *in vitro*. Ему удалось получить многослойные пласты клеток, которые по своему строению были близки к нормальной коже человека, а именно ее эпидермису. В 1980 г. в США был получен патент на создание из коллагена и глюкозамингликана аналога кожи человека.

Хотя некоторые специалисты считают, что современная тканевая инженерия начала оформляться в самостоятельную дисциплину после работ Д. Уолтера и Ф. Мейера (1984), которые впервые предложили термин тканевая инженерия. Им удалось восстановить поврежденную роговицу глаза с помощью пластического материала, искусственно выращенного из клеток, взятых у пациента. Они использовали один из общих подходов, часто применяемых в настоящее время – использование клеток аутологичного типа. При трансплантации, кроме клеток аутологичного типа, используются клетки

аллогенного типа, полученные от особи того же биологического вида, и ксеногенного типа, полученные от особи другого биологического вида. Указанные типы клеток заметно отличаются по основной характеристике – иммунологической совместимости.

Возможность гистотипического восстановления поврежденных тканей и органов представляет значительный интерес. Современные методы изоляции клеток и подходы к их культивированию предполагают использование как специализированных зрелых клеток, так и их предшественников на любых этапах дифференцировки. Многообещающие перспективы развития тканевой инженерии связаны с возможностью использования в качестве исходного материала не только ксено- и аллогенных источников, но и аутогенных клеток. При этом выделенные стволовые клетки можно имплантировать пациенту в виде суспензии или в структурном матриксе, или после коммитирования их *in vitro*. Такой подход в самом ближайшем будущем может стать реальной альтернативой классической трансплантологии.

Перспективы применения клеточных технологий во многих областях медицины, включая трансплантацию органов, испытание лекарственных препаратов, лечение и восстановление поврежденных тканей, очень заманчивы, но до начала полного использования потенциала клеточных технологий необходимо разрешить следующие проблемы:

– стволовые клетки должны быть доступны в достаточных количествах;

– дифференциация стволовых клеток должна быть строго направленной и специфичной;

– стволовые клетки должны быть жизнеспособны в организме реципиента;

– после трансплантации стволовые клетки должны быть способны интегрироваться в ткани реципиента;

– трансплантант должен функционировать в течение всей жизни реципиента;

– трансплантация не должна наносить какого-либо вреда реципиенту (включая иммунную реакцию отторжения). В настоящее время тканевая инженерия является самостоятельным бурно развивающимся междисциплинарным направлением в биотехнологии.

Контрольные вопросы

1. Какие сложности могут возникать при трансплантации тканей и органов?
2. Какие подходы используются для получения клеток и тканей с целью их трансплантации?
3. Работы каких ученых в области тканевой инженерии можно назвать пионерскими?

Лекция 5. ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, РАСТЕНИЯ И ЖИВОТНЫЕ

Выдающимся достижением современной генетики является создание способов направленной модификации геномов животных, растений и микроорганизмов. Имеется в виду направленное воздействие на геном – изменение структуры генов, введение в геном чужеродных генов в виде природных или искусственно созданных генных конструкций, а также конструирование новых, не существовавших в природе геномов. В 1982 г. создан Международный центр по генной инженерии и биотехнологии, объединяющий 32 государства. Исследования были начаты с трансгенеза, т.е. с переноса генов из одного организма в другой.

В последние годы благодаря развитию техники рекомбинантных ДНК трансгенез превратился в стратегическое направление исследований, дающее ответы на многие фундаментальные и прикладные вопросы. С его помощью получают трансгенных животных, растения и микроорганизмы с необходимыми человеку характеристиками. Гены можно вводить в микроорганизмы, соматические клетки, в оплодотворенную яйцеклетку, а также в стволовые эмбриональные клетки, культивируемые *in vitro*. Методы введения генов разнообразны, и выбор их зависит от клеток, которые подвергаются трансгенезу.

Растения имеют одно очень важное преимущество перед животными, а именно легко осуществима их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических клеток с получением нормальных фертильных растений. Это обусловлено тотипотентностью растительных клеток.

Наиболее распространенный метод получения трансгенных растений – это перенос генов с помощью Ti-плазмиды *Agrobacterium tumifaciens*-бактерии, которая поражает растения с образованием на корнях опухолеподобных разрастаний – корончатых галлов. При этом из их плазмид вырезают гены, ответственные за образование корончатых галлов, и вносят нужные генетические конструкции. Однако этот метод эффективен только для двудольных растений. В однодольные, в основном злаковые, для введения плазмидной ДНК в лишенные оболочки клетки растений (протопласты) применяют вирусы, электропорацию клеток, прокалывание их путем встряхивания в суспензии микроигл или бомбардирование клеток микрочастицами, покрытыми ДНК.

Вместе с нужным геном встраивают обычно и так называемый репортерный ген (ген устойчивости к канамицину), по которому судят, встроилась ли конструкция в клетку.

Эти новые методы возникли благодаря фундаментальным исследованиям, проведенным в молекулярной биологии за последние два десятилетия. В ходе манипуляций улучшенные микроорганизмы должны поддерживаться в стабильной неизмененной форме, что требует другого набора методов, обеспечивающих не только сохранение их жизнедеятельности, но и оценки основных характеристик в течение всего биотехнологического процесса.

Главным достижением генетической инженерии является создание способов модификации геномов животных. Речь идет о направленном изменении структуры генов животного или введении в геном чужеродных природных и искусственных генов, т. е. о направленном конструировании новых геномов. Для выполнения этой процедуры оплодотворенные яйцеклетки выделяют из яйцевода животного и с использованием микроманипулятора вводят ДНК (рис. 7, метод 2). Введенная таким способом экзогенная ДНК способна интегрироваться в геном реципиента случайным образом и зачастую в виде множества копий. Вследствие этого экспрессия одного и того же трансгена может варьировать в широких пределах, от полного ее отсутствия до уровня, превышающего экспрессию аутентичного гена. Тем не менее этот метод активно используется для получения как лабораторных, так и сельскохозяйственных трансгенных животных.

В последующем техника введения чужеродной ДНК в геном животных усовершенствовалась так, что стало возможным вводить ДНК направленно в конкретную часть генома. Основой этой технологии послужило использование ЭСК (рис. 7, метод 1). Известно, что они сохраняют высокие плюрипотентные свойства при длительном культивировании *in vitro* и, будучи вновь введенными в эмбрион, способны формировать химеры. Эта уникальная способность ЭСК открыла широкие возможности для манипуляции с их генами. Адресное введение гена достигается благодаря возможности рекомбинации между экзогенной ДНК и ДНК реципиента. В результате этого происходит адресное встраивание гена в ДНК-мишень ЭСК. После этого ЭСК внедряют в бластоцисту животных на ранних стадиях развития. В результате трансгенные эмбриональные стволовые клетки принимают участие в формировании тканей развивающегося плода, который представляет собой химеру. У химерных животных до 50 % клеток составляют клетки-потомки введенных трансгенных ЭСК. Показано, что они присутствуют во всех тканях, в том числе и в зародышевом пути.

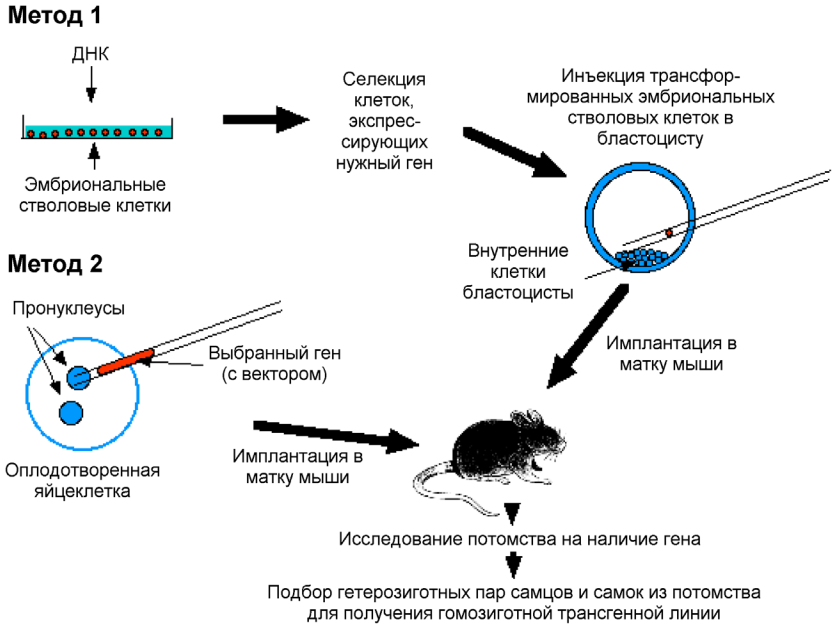


Рис. 7. Технология получения трансгенных животных

В ЭСК гены вводят с помощью ретровирусов, электропорации, липосом в виде "голой" плазмидной ДНК, в виде искусственных конструкций на основе полисахаридов и др. К настоящему времени получено более 2000 трансгенных мышей, в геноме которых находятся различные введенные генетические конструкции. Получены трансгенные козы, овцы, свиньи, коровы и другие сельскохозяйственные животные.

Контрольные вопросы

1. Что такое трансгенез и какова его роль в современной биотехнологии?
2. Назовите основные этапы получения трансгенных организмов.

Лекция 6. КЛОНИРОВАНИЕ

Клонирование — процесс создания клонов. Клонами в биологии называют организмы, имеющие совершенно одинаковый генотип, т.е. набор генов.

В комбинации с методами трансгенеза клонирование открывает огромные возможности для генетической модификации геномов микроорганизмов, растений и животных. В процессе клонирования достигается воспроизведение того или иного живого объекта в каком-то количестве копий. Для генетиков растений получение клонов не составляет никаких проблем. Апомиксис – не что иное, как специфический способ размножения, позволяющий получать генетические копии материнского организма. Однако такая созданная природой технология в естественных условиях используется только некоторыми растениями (например кукурузой). Для многих сельскохозяйственных растений характерен половой способ размножения. Но и для них метод клонирования разработан давно. Если любую растительную клетку лишить прочной оболочки, а потом обработать ростовыми факторами, она начинает делиться, образуя колонии клеток, каллус, из которых каждая может дать начало целому растению (см. рис. 5). Для селекционеров эта технология представляет большой практический интерес, так как дает возможность вводить определенные гены в клетки каллуса и впоследствии получать серию растений, модифицированных по желанию экспериментатора.

Генетики животных получают клоны, если животные размножаются партеногенезом, то есть бесполым путем, без предшествующего оплодотворения. Получают клоны и в экспериментальной эмбриологии. Если зародыш морского ежа на ранней стадии дробления разделить на составляющие его клетки – бластомеры, то из каждого бластомера разовьется целый организм. У человека известны случаи своеобразного естественного клонирования. Это так называемые однояйцевые близнецы, которые возникают сравнительно редко из-за разделения оплодотворенной яйцеклетки на два бластомера, каждый из которых потом развивается самостоятельно.

Новая страница в модификации геномов животных – это клонирование, основанное на переносе в энуклеированную яйцеклетку ядер соматических клеток, т. е. замене генома созревающей яйцеклетки на геном, взятый от другого животного.

История клонирования животных началась в 40-х гг. с исследований российского ученого Г. Лопашова, который разработал метод пересадки ядер в яйцеклетку лягушки. В результате развития такие модифицированные яйцеклетки превращались во взрослые особи, точные копии лягушки, от которой взяты ядра соматических клеток. Затем были получены клоны мышей, однако опыты воспроизвести не удалось. В настоящее время проведен ряд опытов по успешному получению клонов мышей.

В 1997 г. появилось сообщение о том, что в Эдинбурге (Шотландия) разработан эффективный метод клонирования млекопитающих и на его основе получена овечка Долли. Схема эксперимента представлена на рис. 8.

Ооциты были извлечены из овец породы Шотландская черномордая и помещены в культуральную среду, после чего на них была проведена операция энуклеации – удаления клеточного ядра. Ядро соматической клетки взяли для трансплантации из молочной железы лактирующей овцы, слили с энуклеированной яйцеклеткой и получили модифицированную яйцеклетку. Затем активировали её деление электрическим током и после культивирования в течение 6 дней в питательной среде трансплантировали в матку овцы - суррогатной матери. Из 236 опытов успешным оказался один, в результате которого и появилась Долли.

Эти работы, безусловно, являются выдающимся достижением молекулярной генетики, поэтому можно сделать заключение, что техническая задача получения клонов животных и человека решена, остается решить только этические проблемы.

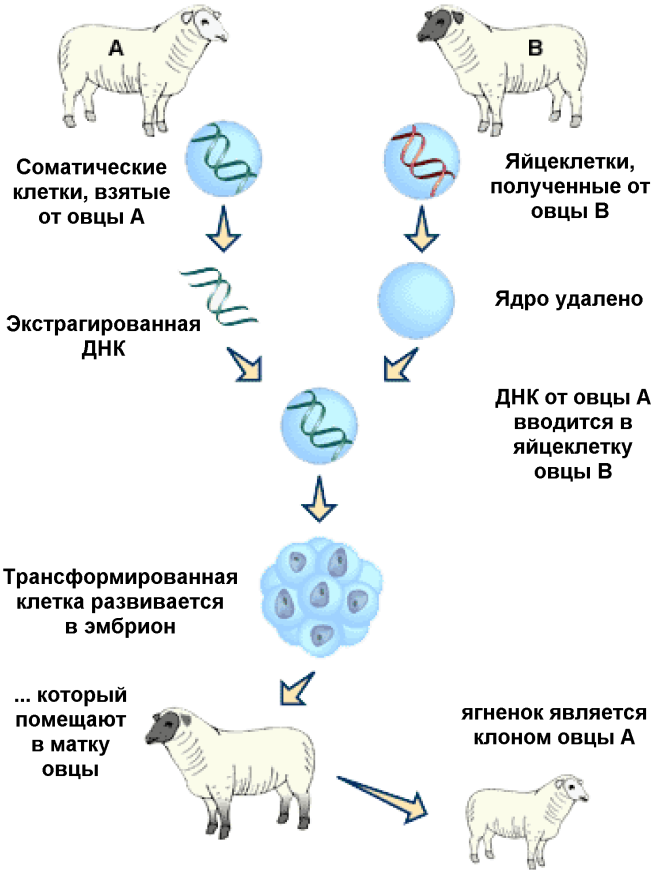


Рис. 8. Схема клонирования, примененная при получении овцы Долли

Контрольные вопросы

1. Что такое клонирование животных?
2. Назовите основные этапы клонирования.

Лекция 7. ОСНОВНЫЕ СОСТАВЛЯЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Основными компонентами биотехнологического процесса являются биологический агент, субстрат, совокупность устройств для управления процессом и целевой продукт (рис. 9). Первая составляющая биотехнологического процесса – биологический агент или его компоненты, выполняющие основную специфическую функцию, вторая – субстрат, третья – биореактор (ферментер), который с помощью средств управления обеспечивает лучшие условия для функционирования биологического агента или его компонентов. Четвертая часть связана с очисткой и разделением необходимого продукта или продуктов, полученных в ходе биотехнологического процесса.

Рис. 9. Основные составляющие биотехнологического процесса

В большинстве технологий, применяемых в настоящее время, наиболее стабильной, эффективной и удобной формой биологического агента является целый микроорганизм, поэтому так много биотехнологий используют микробные процессы.

На их основе создана и развивается микробиологическая промышленность, основной задачей которой является производство необходимых веществ, аминокислот (лизина, треонина, триптофана, глютамина и др.), витаминов, ферментов, антибиотиков, биопестицидов для нужд сельского хозяйства, а также многих других препаратов, применяемых в различных отраслях народного хозяйства.

Новейший период развития биотехнологии связан с открытием и использованием фундаментальных процессов жизнедеятельности, протекающих на молекулярном уровне. Это не исключает использования более высокоорганизованных структур, в частности, культуры клеток растений и животных, которые играют все возрастающую роль в биотехнологии. Микроорганизмы могут быть рассмотрены с двух позиций: как первичные фиксаторы фотосинтетической энергии и как системы, участвующие в химическом изменении почти всех типов природных и синтетических органических молекул. В комплексе они имеют большой пул генов, который обладает почти неограниченным синтетическим и деградативным потенциалом. Более того, микроорганизмы могут сохранять очень высокую скорость роста, благодаря этому огромные количества их могут быть получены при благоприятных условиях в короткий промежуток времени.

Методология, которая обычно используется, связана с селекцией нужных форм микроорганизмов из имеющихся в природе, модификацией микроорганизмов с помощью мутаций или изменением их с помощью генетической инженерии. Во многих технологиях используется не целый микроорганизм, а выделенные из него и очищенные ферменты. Имеется большое количество информации по крупномасштабной наработке, выделению и очистке отдельных ферментов и их стабилизации в искусственной среде.

Используемые в биотехнологии субстраты и получаемые продукты весьма многообразны. Нередко продукт одного биотехнологического процесса становится субстратом другого. Примером может служить получение этанола, который является субстратом в других биотехнологических процессах.

Третья составная часть биотехнологического процесса включает все аспекты поддерживающей системы, например биореактор, внутри которого для биологического агента или его составных частей создаются оптимальные условия. Здесь воплощены знания биологов и инженеров, обеспечивающих дизайн и приборное оформление, необходимое для создания и контроля физико-химических параметров, таких как температура, аэрация, pH и т.д. Таким образом, развитие биотехнологии неразрывно связано с успехами биоинженерии, т. е. с созданием аппаратуры и средств контроля этих процессов, включая компьютерную технику.

Достигнув по окончании биотехнологического процесса желаемого результата, например накопления в реакторе биомассы или другого целевого продукта, в большинстве случаев необходимо нужный продукт отделить от компонентов, содержащихся в водной фазе. Этот четвертый этап биотехнологического процесса, названный процессом выделения и очистки целевого продукта, может быть технически трудновыполнимым и дорогостоящим. Он первоначально сводится к разделению содержимого биореактора на жидкую и твердую фазы с последующей концентрацией и очисткой нужного продукта. Процесс обычно состоит более чем из одной стадии. Стоимость его значительно варьирует, например, с биомассой дрожжей, пенициллина G и некоторых ферментов, доля от цены реализации составляет от 20 до 70 %. Конечным критерием любой промышленной биотехнологии является себестоимость целевого продукта.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные компоненты биотехнологического процесса.
2. Какова роль каждого из них?

Лекция 8. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

Общие принципы процесса выращивания *in vitro* микроорганизмов клеток растений и животных практически мало чем отличаются, поэтому его можно рассмотреть на примере культивирования бактерий.

Культивирование продуцента обычно называют ферментацией. Она может быть аэробной и анаэробной, глубинной и поверхностной, периодической и непрерывной, с иммобилизованным продуцентом и находящимся в суспензии и т.д. Периодическое глубинное культивирование представляет собой закрытую систему, в которой скорость роста биомассы стремится к нулю в результате усвоения субстрата и накопления ингибиторов. Такие системы всегда нахо-

дятся в неустойчивом состоянии. Ж. Моно модифицировал процесс периодического культивирования посредством непрерывного введения в хорошо перемешиваемую культуру свежей питательной среды при одновременном удалении из системы эквивалентного количества культуральной жидкости с содержащимися в ней микробными клетками и продуктами биосинтеза. В такой культуре рост может поддерживаться длительное время.

Рост культуры можно охарактеризовать временем удвоения количества клеток или биомассы. Однако эти величины могут различаться, так как биомасса может увеличиваться и без деления клеток. Рост числа клеток сопровождается изменением содержания биополимеров в биомассе, в частности ДНК и РНК. Для количественной характеристики роста клеток анализируются основные параметры роста: удельная скорость роста, время удвоения, степень размножения, метаболический эффект, влияние концентрации субстрата на скорость роста.

После попадания клеток в свежую полноценную среду они не размножаются сразу, проходит определенный период, называемый **лаг-фазой**. Спустя некоторое время клетки начинают приспосабливаться к окружающей среде. В этот момент активизируются ферменты, возрастает количество нуклеиновых кислот, особенно РНК, что необходимо для биосинтеза белков.

После **лаг-фазы** следует **логарифмическая** фаза роста (рис. 10). Клетки размножаются с максимальной для данной культуры скоростью. В результате этого в среде уменьшается запас питательных веществ, что приводит к снижению скорости роста. Кроме того, накапливаются продукты метаболизма, которые при повышении концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов, связанных с обменом веществ.

Таким образом, наиболее интенсивно рост и размножение происходят в логарифмической фазе, где ещё не действуют лимитирующие факторы. Однако в ходе интенсивного роста и размножения внутри закрытой системы возрастает негативное влияние лимитирующих факторов, в результате скорость роста уменьшается и наступает **фаза замедленного роста**. Через определённое время в стационарной фазе масса клеток в питательной среде достигает

максимального уровня и наступает период, когда число отмерших и автолизованных клеток превышает прирост. В результате количество биомассы уменьшается, т.е. наступает **фаза отмирания**.

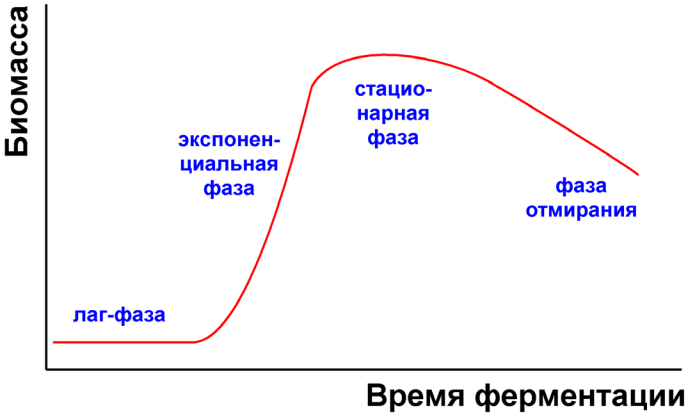


Рис. 10. Фазы роста культуры клеток

Математическое описание процесса культивирования бактерий

Одним из методов исследования процесса культивирования является математическое моделирование, основанное на получении алгебраических соотношений между входными и выходными переменными. К важным аспектам применения математических методов моделирования относится возможность прогнозирования основных показателей процесса культивирования клеток. Применение математических методов позволяет сократить срок освоения новых процессов культивирования и интенсифицировать имеющиеся процессы.

Очень часто процесс культивирования бактерий используют в качестве объекта моделирования. При построении математической модели процесса необходимо определить цели ее применения. В соответствии с этим круг рассматриваемых моделей обычно ограничивается теми из них, которые используются для решения задач управления процессом непрерывного культивирования тех или

иных клеток. Вид алгебраических соотношений между входными и выходными переменными из-за отсутствия или игнорирования знаний о закономерностях процесса принимается универсальным. Чаще эти соотношения представляют в виде полиномов различной степени. В рамках терминологии системного подхода это прежде всего означает, что более крупную систему, какой является процесс в целом, мы разбиваем на ряд более мелких систем (подсистем или блоков), связанных друг с другом общими входными или выходными параметрами.

Специфичными для микробиологических процессов являются уравнения кинетики роста, образования продуктов метаболизма, потребления субстратов и частично также кинетики автолиза биомассы и инактивации продуктов метаболизма. Блоки кинетики массообмена, теплообмена, материального и теплового баланса подобны аналогичным блокам при моделировании непрерывных химических процессов.

Почему лучше изучать процесс путем разделения на блоки вместо получения общего уравнения процесса? Каждый из блоков в большей мере отражает реальный и познавательный объект, чем процесс в целом. Число вариантов для каждого блока меньше, чем число вариантов для процесса, снижается размерность уравнений. Подлежащие анализу процессы поддаются систематизации. Возможен перенос опыта из смежных отраслей промышленности или из аналогичных процессов, хотя обычно трудно представить два совершенно одинаковых с точки зрения математического описания процесса.

Ниже рассмотрены конкретные виды уравнений, позволяющие описать перечисленные блоки процесса.

Основным физиологическим показателем, характеризующим кинетические свойства культуры, является удельная скорость роста $ju=1/ч$, величина которой зависит от концентрации субстрата и константы K_s.

Существует много кинетических моделей роста клеток и одна из них модель Ж. Моно, уравнение которой отражает влияние одного субстрата на скорость изменения концентрации биомассы.

Уравнения материального баланса. Эти уравнения являются выражением закона сохранения вещества и записываются как баланс всех статей прихода и расхода данного вещества в единицу времени. Так, например для **биомассы**:

$$dx/dt = D(X_{\text{ВХ}} - x) + mx - mx,$$

где dx/dt– скорость изменения концентрации биомассы во времени; $D(XBX - x)$ – разница скоростей подачи и удаления биомассы из аппарата; $+mx$ – скорость роста биомассы в аппарате; $-mx$ – скорость автолиза биомассы.

В этом выражении D – скорость разбавления, $X_{\text{ВХ}}$ – концентрация биомассы на входе в аппарат (в случае, если моделируется одиночный или первый по ходу каскада аппарат, $X_{\text{ВХ}}=0$); x – концентрация биомассы на выходе.

Для **субстратов** уравнение материального баланса записывается в виде $ds/dt = D(S_{\text{ВХ}} - s) - qsx + Qs$, где Qs – член уравнения, появляющийся для газообразных субстратов (кислород, метан и т.д.) и характеризующий скорость растворения этого субстрата в культуральной жидкости, S_{BX} и s – концентрация субстрата на входе и на выходе соответственно, qs – удельная скорость потребления субстрата.

На скорость роста биомассы может оказывать влияние концентрация продуктов метаболизма в среде, окружающей клетку. Тогда к двум уравнениям, описывающим динамику концентрации биомассы и субстрата в непрерывном процессе культивирования, следует добавить третье уравнение, выражающее динамику концентрации продуктов метаболизма

$$dp/dt = 1)(p_{\text{вх}} - p) + qp \cdot x - Qp,$$

где dp/dt – скорость изменения концентрации продуктов метаболизма в среде во времени; Qp – скорость инактивации продуктов в ходе процесса (в случае, если продукт нестабилен); $p_{\text{вх}}$ – концентрация продуктов на входе (она равна нулю, если это первый аппарат в каскаде или одиночный аппарат); p – концентрация продуктов на выходе; qp – удельная скорость образования продукта.

Должно быть столько уравнений для метаболитов, сколько имеется в культуральной жидкости продуктов метаболизма, существенно влияющих на ход процесса (субстрат) или являющихся полезным (вредным) продуктом с точки зрения потребностей человека. Для летучих (газообразных) метаболитов типа растворенного CO_2 в правую часть уравнения добавляется отрицательный член Qp массообмена.

В нашей стране основоположником математического моделирования процессов культивирования в микробиологии является академик Н.Д. Иерусалимский. Установлено, что на скорость роста биомассы может оказывать влияние концентрация продуктов метаболизма в среде, окружающей клетку. Тогда к двум уравнениям, описывающим динамику концентрации биомассы и субстрата в непрерывном процессе культивирования, следует добавить третье уравнение, выражающее динамику концентрации продуктов метаболизма. Полученное уравнение известно как формула Моно-Иерусалимского

$$\mu(S)= \frac{\mu_m = S}{(K_m = S)+(K_r+P)},$$

где $\mu(S)$ – прирост биомассы за счет поглощения субстрата.

Уравнения кинетики роста, образования продуктов, потребления субстратов, автолиза биомассы и инактивации продуктов являются специфическими для микробиологических процессов. Математическое описание кинетики этих процессов отличается от традиционной химической кинетики, поскольку все процессы осуществляются с участием биокатализаторов-ферментов. Причем субстрат в процессе превращения в организованную биомассу или продукт метаболизма проходит весьма большое число промежуточных стадий биохимических ферментативных реакций.

Поскольку большинство биохимических реакций осуществляется в клетках микроорганизмов, в микробиологической кинетике принято в качестве выходных параметров использовать не абсолютные значения скоростей реакций, а удельные, отнесенные к единице веса микробной массы. Определенный компромисс в использовании

теоретических представлений о процессе и имеющихся результатов его экспериментального изучения обусловил широкое применение экспериментально-аналитического метода составления моделей. Применительно к математическому описанию непрерывного процесса культивирования микроорганизмов это означает построение моделей на основе упрощенного представления о механизме микробиологического синтеза культуры в целом и использования балансовых соотношений: баланса по веществам, образуемым и расходуемым, т.е. материального баланса, и баланса по теплу, т.е. теплового баланса ферментера.

Выбор той или иной схемы протекания процесса означает принятие определенных допущений, упрощающих реальный процесс. Допущения могут быть следующими: 1) скорость процесса массопередачи в культиваторе не лимитирует роста и развития микроорганизма; 2) изменением состава популяции за счет мутации исходного штамма, эффекта отмирания и других причин нестандартности свойств популяций можно пренебречь; 3) учитываются только основные результирующие процессы жизнедеятельности организма – процесс потребления лимитирующего субстрата и процесс роста популяции клеток; 4) термодинамические (температура и давление) и параметрические (pH, Eh, и др.) переменные стабилизируются; 5) гидродинамический режим близок к идеальному смешению; 6) рабочий объем культиватора меняется несущественно.

Основные факторы, влияющие на рост и развитие микробов, можно разделить на две группы: внутриклеточные факторы, обусловленные структурой и специфическими особенностями бактерии, и внеклеточные факторы, т.е. условия внешней среды (табл. 3).

В зависимости от числа учитываемых факторов внешней среды, влияющих на удельную скорость роста, кинетические уравнения можно подразделить на две большие группы: однофакторные и многофакторные.

В некоторых случаях в уравнениях можно учитывать только один из факторов, так как остальные либо не изменяются в моделируемых рабочих условиях культивирования, либо изменяются в таких пределах, что их изменение не отражается на скорости роста.

Таблица 3

Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцента

Фактор	Роль фактора
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивает метаболизм
Концентрация продукта (ингибиторов)	Замедляет биохимические реакции
pH (логарифм концентрации водородных ионов)	Оптимизирует скорости биохимических реакций (3,5-9,0)
Температура	Оптимизирует скорости биохимических реакций (20-70°C)
Осмотическое давление	Определяет границы жизни (0,6-0,998 МПа)
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает метаболизм, является акцептором ионов водорода, ингибирует развитие анаэробов
Содержание CO_2	Источник углерода для автотрофов. Большинство гетеротрофов замедляют рост в его присутствии
Перемешивание среды	Равномерное распределение компонентов по всему объему среды в биореакторе
Вязкость среды	Опеделяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента

Оценка альтернативных путей получения продукта через себестоимость нередко представляет собой весьма сложную задачу, так как компоненты этой величины в различных странах и регионах в значительной степени различаются. Себестоимость трудно определить на ранних стадиях разработки. Поэтому оценкой эффективности биотехнологических процессов может служить сопоставление экспериментального выхода продукта с теоретическим выходом, рассчитанным по материально энергетическому балансу процесса. Это положение в первую очередь относится к производству крупнотоннажных про-

дуктов, так как специфика производства биохимических реактивов и медикаментов (кроме основных антибиотиков и некоторых других препаратов сравнительно крупномасштабного производства) такова, что целевой продукт нередко производится в небольших количествах и имеет высокую стоимость. При использовании высокопродуктивных рекомбинантных продуцентов основная доля затрат относится к созданию и поддержанию продуцента и разработке условий его культивирования. Экономичность использования сырья и энергоресурсов в этих процессах играет второстепенную роль.

Контрольные вопросы

1. На чем основано математическое моделирование процесса культивирования бактерий?
2. Кто из российских ученых является основоположником в разработке и применении математических методов для описания процессов культивирования?
3. Напишите уравнение материального баланса для субстрата, биомассы и продукта метаболизма.
4. Назовите факторы, влияющие на рост и биосинтетическую активность продуцента.

Лекция 9. НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

Биотехнология главным образом известна своим применением в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве, но в последние годы все большее внимание уделяется созданию новых биологических материалов и машин с самыми разнообразными структурами, функциями и назначением. Эта тенденция усилилась с приходом нанотехнологий.

Слово нанотехнология произошло от единицы измерения нанометр (10^{-9} метра), составляющей одну тысячную микрометра (микрона), что является приблизительным размером молекулы. Нанотехнология – изучение, производство и работа со сверхмалыми структурами и приспособлениями возникла благодаря созданию микроскопических приборов.

В настоящее время более 20 тысяч ученых по всему миру проводят исследования в сфере нанотехнологий. Примеры потенциального применения наноматериалов и нанотехнологий дают возможность подсчитать, что в течение ближайших 15 лет они по всему миру позволят создать более 2 млн рабочих мест. Сегодня много молодых компаний работают в направлении развития нанотехнологий. На рынке наноматериалов и их обработки действуют более 50 компаний. Все их можно можно разделить на шесть категорий: 1) обработка и получение наноматериалов; 2) нанобиотехнология; 3) программное обеспечение; 4) нанофотоника; 5) наноэлектроника; 6) наноприборостроение.

Наиболее многообещающими могут быть исследования компаний в области нанобиотехнологии, наноэлектроники и в создании новых материалов.

Нанобиотехнология – область нанонауки и наноинженерии, применяющей методы и подходы нанотехнологии для создания биоструктур и изучения биологических систем. Нанотехнологи также используют способность биомолекул к самосборке в наноструктуры. Так, например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы. Молекулы пептидов в воде формируют правильные нановолокна, которые, в свою очередь, связываются и образуют каркасы. “ПюраМатрикс” – это коммерчески реализованный каркасный материал из нановолокон, который получил свое название благодаря идеальности в качестве биотехнологически разработанного биологического каркаса. Ученые-биомедики во всем мире сейчас используют его для изучения раковых и стволовых клеток и для воссоздания костной ткани. Наличие в каркасах из нановолокон пор размером от 5 до 200 нанометров и чрезвычайно высокое содержание воды обусловливают возможность их использования при трехмерном выращивании клеток и тканей в восстановительной медицине. Помимо этого благодаря малым размерам пор этих каркасов, очевидно, их можно будет использовать для постепенного выделения медикаментов для пролонгирования их действия. Устройство с нанокаркасом для медленного выделения может имплантироваться в кожу с запасом лекарства на месяцы и даже годы.

ДНК используется не только для создания наноструктур, но и в качестве важного компонента наноустройств. Вполне вероятно, что ДНК, представляющая собой молекулу, хранящую информацию, может стать основным компонентом компьютеров следующего поколения. Вместо того чтобы создавать кремниевую основу микросхемы, нанотехнологи смогут использовать двухцепочечную молекулу ДНК, которая представляет собой натуральный каркас для создания наноструктур, а ее способность к высокоспецифичному связыванию позволяет объединять атомы в предсказуемой последовательности, необходимой для создания наноструктуры. К тому времени, как микропроцессоры и микросхемы превратятся в нанопроцессоры и наносхемы, молекулы ДНК могут заменить используемые в настоящее время неорганические полупроводники. Такие биочипы будут представлять собой ДНК-процессоры, использующие исключительную способность ДНК к хранению информации.

Другие биологические молекулы также используются для создания способов передачи как можно большего количества информации. Например, некоторые исследователи изучают возможность использования поглощающих свет молекул подобных тем, что содержатся в сетчатке глаза, для тысячекратного увеличения объема хранящейся на компакт-дисках информации. Применение нанобиотехнологии будет способствовать развитию экологически чистых производственных процессов.

Исследования по практическому применению нанобиотехнологии в медицине направлены на совершенствование средств и методов диагностики, профилактики и лечения. К ним можно отнести:

– повышение чувствительности и экспрессности анализа, что позволит осуществлять раннюю диагностику заболеваний и уже в ближайшее время может быть использовано для обнаружения онкологических, эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний, вирусных и бактериальных инфекций. Особым типом наноустройств являются биочипы, основанные на применении полимеразной цепной реакции. Они позволяют оценить генетический статус обследуемого пациента и/или патогенного микроорганизма и спланировать мероприятия по профилактике и лечению;

– повышение производительности позволяет проводить комплексное обследование по набору диагностических критериев, что может быть использовано для индивидуального подхода к лечению и профилактике;

– создание биосенсоров путем объединения биологического и электронного компонентов в один миниатюрный прибор;

– разработка молекулярных детекторов на основе нанопор;

– изучение возможности получения и применения эффективных фармпрепаратов и вакцин в виде наночастиц;

– создание на основе наноструктур системы адресной доставки лекарств, позволяющей повысить специфичность и скорость доставки функциональных молекул в клетки-мишени.

Технологии биосистем перспективны с точки зрения контролируемого создания наноустройств различного назначения, таких как получение биосовместимых наноматериалов, конструирование медицинских нанороботов, создание минимальной искусственной биосистемы, способной самостоятельно воспроизводить саму себя и др.

Нанобактерии

В 1981 г. Д. Торелла и Р. Морита описали очень маленькие клетки размером менее 300 нм – ультрамикробактерии. В следующем году М. Мак Донелл и М. Худ обнаружили, что некоторые из них могут проходить через фильтры размером 200 нм. Термин нанобактерии впервые ввёл Р. Морита в 1988 г., однако "отцом" нанобактерий считается геолог Техасского университета Р. Фольк, который, исследуя горные породы, расположенные вблизи геотермальных источников в окрестностях Рима, в 1989 г. обнаружил подобные структуры в туфе и дал им название «нанобактерии», для того чтобы подчеркнуть их геологическую принадлежность. Начиная с 1992 г. им была опубликована серия работ по этому вопросу. Несколько лет спустя, в 1996 г. доктор К. Романек из НАСА, исследуя осколок марсианского метеорита, упавшего в Антарктиде, обнаружил в нем структуры, напоминающие нанобактерии. При этом размеры неизвестных частиц составляли около 50 нм. В почвах, осадочных породах и минералах они встречаются в значительных количествах и, очевидно,

представляют промежуточную форму жизни между бактериями и вирусами. По мнению ученых, нанобактерии играют важную роль в образовании минералов, превращении вулканических пород в почву и коррозии металлов.

Проявление некоторых патологических состояний почек у человека, в частности образование камней, исследователями из университета города Копио (Финляндия) во главе с О. Кайяндером было объяснено наличием *Nanobacterium sanguineum*. В ходе дальнейших экспериментов финским ученым удалось получить МАт, которые связываются с поверхностными белками нанобактерии, присутствие которых легко определить в любой среде, в том числе и в почечных камнях. С их помощью нанобактерии были найдены в 90 % почечных камней у больных мочекаменной болезнью. После введения нанобактерий кроликам и крысам у них быстро развилась мочекаменная болезнь. В 1998 г. ученые показали, что обнаруженная ими бактерия может реплицироваться в бактериальной среде и имеет ДНК.

Группа американских специалистов из клиники Мейо в Рочестере под руководством доктора Д. Лиски обнаружила в органах некоторых больных людей бактерии, обладающие странными свойствами. Изучая кальцинированные артерии и сердечные клапаны, они обнаружили на их стенках крошечные сферы диаметром 30 – 100 нм. Как показали исследования, эти наносферы выделяли некоторые аминокислоты, но какие пока неизвестно. Эти частицы способны к самовоспроизведению, хотя способ репликации пока неизвестен.

В табл. 4 нанобактерии сравнены по ряду свойств с другими микроорганизмами – вирусами, прионами и типичными бактериями.

Таким образом, в настоящее время известно, что нанобактерии:

– имеют клеточное строение, включая цитоплазму, в которой выделяются электроннoплотные участки и клеточная стенка, похожая на клеточную стенку грамотрицательных бактерий;

– имеют исключительно малый размер, сопоставимый с размером мельчайших вирусов;

– в отличие от вирусов способны размножаться как внутри эукариотических клеток, так и в окружающей среде, в том числе на искусственных питательных средах. Одну из первых выделенных линий удается культивировать в течение 6 лет. Поскольку скорость роста нанобактерий примерно в 10 000 раз меньше, чем скорость роста типичных бактерий, смену среды проводят один раз в месяц;

Таблица 4

Уникальные свойства нанобактерий в сравнении с вирусами, прионами и типичными бактериями*

Наличие или отсутствие свойства

Свойства	Нанобактерии	Вирусы	Прионы	Типичные бактерии
Размер, нм	50-300	20-250	<250	>250
Клеточная стенка	Атипичная, фосфат кальция	−, Белково-липидный слой	−	+
Нуклеиновые кислоты	Малое количество, атипичные	+, Атипичные	−	+
Белки	+	+	+	+
Углеводы	+	+	+	+
Саморепликация	+	−	−	+
Рост на DMEM	+	−	−	+
Включение уридина	+	−/+	−	+
Устойчивость к γ-излучению, Мрад	≈2,5	<2,5	>2,5	<0,1->6,0
Устойчивость к температуре кипения воды	+	−/+	+	−
Устойчивость к дезинфектантам	+	−/+	+	−
Устойчивость к антибиотикам	−/+	+	+	−/+
Чувствительность к 5-фторурацилу	+	−/+	−	−/+
Чувствительность к цитозин арабинозиду	+	+	−	Неизвестно
Чувствительность к бисфосфонатам	+	−	−	−
Иммуногенность	+	+	−	+
Способность вызывать воспалительный процесс	+	+	−	+
Содержание липополисахаридов	+	−	−	+ (грам-отриц.)
Способность вызывать гибель клеток	+	+	Специфических	+ Отдельные
Способность вызывать патологическую кальцификацию	+	+ Некоторые	−	+ Некоторые
Образование биопленок	+	−	−	+
Обнаружение в атеросклеротических бляшках	+	+ Отдельные	−	+ Некоторые

+ да; − нет;. *адаптировано из Kajander E.O. и др. 2003.

– содержат нуклеиновую кислоту, структура которой до сих пор не установлена, и небольшой набор специфических белков. Если геном типичных бактерий кодирует несколько тысяч белков, то нанобактерии, по разным данным, содержат всего от нескольких до нескольких десятков белков.

Для объяснения указанных выше особенностей нанобактерий финский исследователь О. Кайяндер и его коллеги выдвинули следующие предположения:

1. Нанобактерии не синтезируют собственные аминокислоты, жирные кислоты (и, возможно, нуклеотиды), а используют готовые, получая их из окружающей среды. При нехватке экзогенных жирных кислот мембранные липиды могут частично заменяться фосфатом кальция.

2. У нанобактерий отсутствуют энергоемкие системы активного транспорта, характерные для про- и эукариотических клеток. Транспорт веществ осуществляется за счет диффузии и броуновского движения, чему способствуют ультрамикроскопические размеры бактерии.

3. Концентрация растворенных веществ и, следовательно, осмотическое давление внутри нанобактерий не отличается от окружающей среды. В связи с этим нанобактериям не требуются энергозатратные системы поддержания внутриклеточного гомеостаза.

Несколько микробиологов уже повторили опыты О. Кайяндера и его коллег и подтвердили существование нанобактерий. Первый из них – Д. Колтон из университета Макгилла в Монреале. Ему удалось выделить медленно растущие нанобактерии, которые одновременно с ростом строили вокруг себя оболочку из кальция. Их белки оказались похожими на белки других бактерий.

Но многие учёные тем не менее сомневаются в том, что нанобактерии действительно являются жизненной формой, и утверждают, что с большей вероятностью это органические структуры, а не биологические. Д. Цисар из Национального института здравоохранения в Бетесде (США) считает, что недостаточно убедительных подтверждений существования нанобактерий и наличия в них ДНК. Расчеты, выполненные Д. Манилоффым из Рочестерского университета (штат Нью-Йорк), показали: для того чтобы содержать ДНК и белки, необходимые клетке для обеспечения функционирования и

главное репликации, ее размер должен быть не менее 140 нм. В то же время, по данным разных ученых, большинство нанобактерий имеют диаметр от 30 до 100 нм, т.е. в 10 раз меньший диаметр и в 1000 раз меньший объем, чем типичные бактерии.

Несмотря на то что со времени первого обнаружения бактерий прошло около 20 лет, существование нанобактерий на данное время является одним из спорных научных вопросов, поскольку открытие этой новой формы жизни имеет не только академическое, но и практическое значение. Исследования в данном направлении проводятся во многих лабораториях мира и можно надеяться, что в ближайшее время полученные результаты позволят разрешить возникшие вопросы.

Контрольные вопросы

1. Что такое нанобиотехнология?
2. Каковы перспективы ее применения в диагностике и лечении болезней?
3. История обнаружения нанобактерий.
4. Чем отличаются нанобактерии от типичных (обычных) бактерий, вирусов и прионов?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная часть курса лекций, по мнению автора, должна явиться началом цикла, посвященного основам биотехнологии, методам, аппаратам и приборам, используемым как в лабораторной практике, так и при промышленном производстве различных биопрепаратов. В этой части кратко описаны процессы «старой» классической биотехнологии и большее внимание уделено комплексу современных методов, обеспечивающих не только разработку новых технологий, но и позволяющих модифицировать процессы, известные несколько столетий.

Важность освоения знаний биотехнологии подчеркивалась неоднократно в докладах на форумах разных уровней, в статьях, постановлениях и других документах. Так, на секции «Биотехно-

логия и образование» IV Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» была принята резолюция, в которой отмечается, что неотъемлемым условием успешного развития отечественной биотехнологии является обеспечение высококачественного биотехнологического образования в стране. Углубление процесса интеграции науки и образования способствует дальнейшему повышению уровня подготовки кадров для проведения фундаментальных исследований в области биотехнологии и разработки новых технологий. Создание учебно-научных центров и научно-образовательных комплексов на базе ведущих научно-исследовательских институтов и вузов обеспечивает их эффективную интеграцию. Важнейшим элементом современной системы подготовки специалистов-биотехнологов для работы в сфере науки и производства является опережающее образование, состоящее в постоянном глубоком анализе новейших тенденций и направлений фундаментальной биотехнологической науки и своевременной корректировке образовательных программ и учебных планов с учетом требований времени. Важным фактором динамичного развития современного биотехнологического образования является использование передовых информационных технологий, создающих принципиально новые возможности в получении современных знаний и приобретении профессиональных навыков в области биотехнологии. Бесспорно, что прогресс биотехнологии нереален без разработки специализированных аппаратных, алгоритмических и программных средств, а соответствующая отрасль кибернетики вошла в состав биоинформатики.

Для получения новых знаний необходимы передовые информационные технологии, поскольку в результате очень быстрого прогресса биотехнологии информация, изложенная в учебных пособиях, очень быстро стареет и, кроме того, ни один учебник не может вместить весь объем знаний, накопленный биотехнологией за ее многовековую историю и особенно в последние десятилетия. Поэтому автор попытался изложить основные понятия, необходимые для студентов, пытающихся в море информации найти необходимые им сведения.

Список сокращений

БАВ - биологически активные вещества

ГАТ - среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин

ГМ - генетически модифицированный

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

МАт - моноклональные антитела

НАСА - Национальное управление аэронавтики и космонавтики США

нм - нанометр (10^{-9} м), одна миллиардная метра

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РСК - региональные стволовые клетки

РНКи - РНК-интерференция

ЭСК- эмбриональные стволовые клетки

Eh - окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал)

HUGO (Human Genome Organization) - Международная организация по расшифровке генома человека.

DMEM – среда Игла, модифицированная Дульбекко

IgG, IgE, IgA, IgM, IgD - классы иммуноглобулинов, отличающихся изотипами антител.

МПа - мегапаскаль

Список терминов

Аллогенные клетки – выделенные от особи того же биологического вида.

Антибиотики – вещества с молекулярной массой менее нескольких кДа природного или полусинтетического происхождения, оказывающие сильное подавляющее действие на рост и размножение микроорганизмов и при этом относительно мало повреждающие или вовсе не повреждающие клетки макроорганизма.

Антиген – высокомолекулярное вещество, которое при введении в организм животных и человека вызывает образование специфических реагирующих с ними антител.

Антитело – белок, относящийся к иммуноглобулинам, то есть к подклассу γ-глобулинов (гамма-глобулин), образующийся в организме при попадании в него чужеродного вещества (антигена).

Апоптоз – запрограммированная гибель клетки.

Аттенуированный – ослабленный, характеризующийся аттенуацией штамм, применяется для изготовления живой вакцины.

Биосенсор – аналитические устройства, использующие биологические материалы для узнавания определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала.

Биочип – многоканальное устройство, на котором в определенном порядке размещены различные биологические молекулы, ДНК или белки. Подобно электронным микрочипам, обрабатывающим массивы цифровой информации, предназначены для молекулярного считывания и обработки больших объемов биологической информации при проведении многопараметрического анализа микрообразца биологического материала.

Вакцина – биопрепарат, предназначенный для создания активного иммунитета в организме людей или животных.

Вектор – молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для переноса генетической информации.

Ген – материальный носитель наследственной информации, совокупность которых родители передают потомкам во время размножения.

Гено́м – совокупность всех генов организма; его полный хромосомный набор.

Домен – элемент третичной структуры белка, представляющий собой достаточно стабильную и независимую подструктуру.

Зародышевый путь (зачатковый путь) — ряд поколений клеток от первичных половых клеток зародыша до половых продуктов взрослого организма.

Каллус – ткань растения, которая характеризуется быстрым ростом и отсутствием строгой пространственной организации веретен деления.

Клонирование – это обобщающий термин для процесса создания в лабораторных условиях генетически точных копий гена, клетки или целого организма.

Коммитирование – процесс, в результате которого клетка становится способной дифференцироваться лишь в одном направлении.

Ксеногенный материал – выделенный от особи другого биологического вида.

Лигазы (синтетазы) – класс ферментов, катализирующих соединение двух различных молекул.

Липиды (от греч. lípos - жир) – жироподобные вещества, входящие в состав всех живых клеток и играющие важную роль в жизненных процессах.

Метилирование ДНК – присоединение метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции N5 пиримидинового кольца.

Моноклональные антитела – гомогенные антитела, продуцируемые гибридными клетками, в которых сочетаются способность синтеза специфических иммуноглобулинов одного изотипа с неограниченной пролиферацией.

Мультипотентные – клетки, способные образовывать клетки тканей из которых они были взяты.

Наночастица – объект с нанометровым размером.

Нанотехнология – технология, оперирующая величиной порядка нанометра, т.е. одной миллиардной доли метра.

Ооцит – женская половая клетка в период её роста в яичнике (ооцит 1-го порядка) и созревания (ооцит 2-го порядка).

Пептиды – органические вещества, состоящие из остатков аминокислот, соединенных пептидной связью.

Плазмиды – дополнительные факторы наследственности, расположенные в клетках вне хромосом и представляющие собой кольцевые (замкнутые) или линейные молекулы.

Плюрипотентные – клетки, способные образовывать множество различных клеток, но не целый организм.

Протеомика – наука о строении и функциях белков.

Протеомный анализ – анализ смеси белков методом масс-спектрометрии после предварительного их разделения по молекулярной массе и изоэлектрической точке.

Репарация – механизм исправления повреждений в молекуле ДНК, возникающих в ходе ее биосинтеза или под влиянием внешних воздействий.

Рестриктазы – ферменты бактериального происхождения, распознающие специфические нуклеотидные последовательности длиной от 4 до 10 пар нуклеотидов и "разрезающие" молекулу ДНК в этом месте.

РНК-интерференция – механизм, имеющий место в большинстве эукариотических клеток, для избавления от чужеродных двухцепочных молекул РНК.

Сингенные мыши – генетически идентичные.

Соматические клетки – все клетки организма, кроме половых (мужских и женских).

Тератома – эмбриома, дизэмбриома, опухоль человека и животных, возникающая в результате нарушения эмбрионального развития тканей.

Тотипотентность – свойство генома эмбриональных стволовых клеток макромасштабировать программы эмбриогенеза, в том числе воспроизводить любую из 200 специализированных клеток взрослого организма.

Трансгенез – перенос генов из одного организма в другой.

Туморогенный – продуцирующий опухоли.

Унипотентные – клетки дающие начало только одному типу клеток.

Фермент (энзим) – биологический катализатор; по химической природе – белок или рибонуклеиновая кислота.

Ферментёр – аппарат для глубинного культивирования клеток.

Фертильное потомство – потомство, способное к воспроизводству.

Физическая карта генома – отражает реальное расстояние между маркерами, выражаемое в парах оснований.

Электропорация – создание пор в бислойной липидной мембране под действием электрического поля.

Энуклеированная яйцеклетка – яйцеклетка с удаленным ядром.

Эукариотические клетки – клетки, которые имеют ядро, органеллы, ограниченные мембранами, и хромосомы, состоящие из ДНК и белков.

in vitro – в пробирке, в условиях эксперимента.

in vivo – в живом организме.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Антипова, Л. В. Прикладная биотехнология: учеб. пособие / Л. В. Антипова. – СПб.: ГИОРД, 2003. – 288 с. – ISBN 5-901065-58-1

2. Воронин, Е. С. Биотехнология: учебник / Е. С. Воронин. – М.: ГИОРД, 2005. – 792 с. – ISBN: 5-98879-005-4.

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с. – ISBN 5-03003-328-9.

4. Головин, Ю. И. Введение в нанотехнику / Ю. И. Головин. – М.: Машиностроение, 2007. – 496 с. – ISBN: 5-21703-378-9.

5. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – М.: Академия, 2005. – 288 с. – ISBN: 5-7695-2808-7.

6. Евтушенков, А. Н. Введение в биотехнологию: курс лекций / А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. – Минск: БГУ, 2002. – 105 с.

7. Квеситадзе, Г. И. Введение в биотехнологию / Г. И. Квеситадзе, А. М. Безбородов. – М.: Наука, 2002. – 284 с. – ISBN 5-02-002749-9.

8. Пальцев, М. А. Медицина XXI века в свете клеточной биологии / М. А. Пальцев // Вестник РАМН. – 2004. – № 9. – С. 3 – 12.

9. Попова, Н. А. Введение в биологию: учеб. пособие /Н. А. Попова. – Новосибирск: НГУ, 2002. – 150 с.

10. Пул, Ч. Нанотехнологии: моногр. / Ч. Пул, Ф. Оуэнс; пер. с англ; под ред. Ю. И. Головина, В. В. Лучинина. – 2-е изд., доп. – М.: Техносфера, 2006. – 336 с. – ISBN: 5-94836-081-4.

11. Репин, В. С. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина / В. С. Репин, А. А. Ржанинова, Д. А. Шаменков. – М.: Реметэкс, 2002. – 176 с. – ISBN: 5-72130-306-9.

12. Романовский, Ю. М. Математическая биофизика / Ю. М. Романовский, Н. В. Степанова, Д. С. Чернавский. – М.: Наука, 1984. – 304 с.

13. Сазыкин, Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М.: Академия, 2007. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4040-0.

14. Биотехнология / под ред. А. А. Баева. – М.: Наука, 1984. – 320 с.

15. Сергеев, Г. Б. Нанохимия: учеб. пособие / Г. Б. Сергеев. – М.: Изд-во МГУ, 2006. – 333 с. – ISBN 5-98227-185-3.

16. Турчинович, А. А. Трансгенные растения как биопродуценты белков медицинского назначения / А. А. Турчинович [и др.]. // Информационный вестник ВОГиС. – 2004. – № 28. – С. 2 – 9.

17. Шевелуха, В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с. – ISBN - 5-06-004264-2.

18. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия: учеб. пособие / С. Н. Щелкунов. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с. – ISBN 5-94087-098-8.

Электронные адреса баз данных в области биотехнологии

Научно-библиографические БД:
Научная электронная библиотека (НЭБ) www.elibrary.ru
Medline www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
Science Citation Index www.isinet.com, http://wos.elibrary.ru
DERWENT Biotechnology Abstracts http://thomsonderwent.com
Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» http://www.cbio.ru/
Патентные БД:
USPATFULL www.uspto.gov
JAPIO http://library.dialog.com
INPADOC www.european-patent-office.org
РОСПАТЕНТ www.fips.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3
Лекция 1. Биотехнология. Краткие исторические сведения и взаимосвязь ее с другими науками 6
Лекция 2. Генетическая инженерия 15
Лекция 3. Клеточная инженерия 19
3.1. Гибридизация соматических клеток 21
3.2. Стволовые клетки 25
Лекция 4. Тканевая инженерия 34
Лекция 5. Трансгенные микроорганизмы, растения и животные 37
Лекция 6. Клонирование 40
Лекция 7. Основные составляющие биотехнологического процесса 43
Лекция 8. Культивирование бактерий 45
Лекция 9. Нанобиотехнология 53
Заключение 60
Список сокращений 62
Список терминов 62
Библиографический список 66

Учебное издание

Рыбаков Сергей Сергеевич

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ОСНОВАМ БИОТЕХНОЛОГИИ

В двух частях

Ч. 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Подписано в печать 16.06.08.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 3,95. Тираж 100 экз.
Заказ
Издательство
Владимирского государственного университета.
600000, Владимир, ул. Горького, 87.