

# ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

## Краткий курс лекций



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. Т. Г. ШЕВЧЕНКО»

**Естественно-географический факультет**

*Кафедра биологии и экологии*

# **ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ**

*Краткий курс лекций*

Тирасполь

*Издательство  
Приднестровского  
Университета*

2026

УДК 60(075.8)  
ББК Е087.1я73  
В24

*Составители:*

**Т. Н. Звездина, С. И. Филипенко, И. И. Игнатъев**

*Рецензенты:*

**В. А. Шептицкий**, д-р биол. наук, профессор

**Г. В. Золотарева**, канд. биол. наук, доцент

**Введение в биотехнологию:** краткий курс лекций [Электронный ресурс] / составители: Т. Н. Звездина, С. И. Филипенко, И. И. Игнатъев; Государственное образовательное учреждение «Приднестровский государственный университет им. Т. Г. Шевченко», Естественно-географический факультет. – Тирасполь: Изд-во Приднестр. ун-та, 2026. – 108 с.

Системные требования: CPU (Intel/AMD) 1,5 ГГц / ОЗУ 2 Гб / HDD 450 Мб / 1024\*768 / Windows 10 и новее / Microsoft Edge / Adobe Acrobat Reader 6 и новее.

*Краткий курс лекций по дисциплине «Введение в биотехнологию» содержит теоретический материал об основных этапах формирования биотехнологии как науки; объектах и методах биотехнологических исследований; роли биотехнологии для различных областей народного хозяйства и направлен на формирование у обучающихся знаний о значении и месте биотехнологии в мировой науке и производстве.*

*Данное издание адресуется студентам-бакалаврам направлений подготовки 06.03.01 «Биология», 44.03.01 «Педагогическое образование», профиль «биология».*

**УДК 60(075.8)**

**ББК Е087.1я73**

Рекомендовано Учебно-методическим советом ПГУ им. Т. Г. Шевченко

## ВВЕДЕНИЕ. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА

Биотехнология сегодня относится к числу приоритетных направлений науки, с которыми связывают повышение качества жизни и благополучие человечества в ближайшей перспективе. Вместе с тем ее достижения становятся реальной производительной силой лишь тогда, когда на их основе развиваются современные промышленные технологии и создаются конкурентоспособные производства.

Отличительная черта биотехнологии – выраженная междисциплинарность: она сочетает фундаментальные биологические знания с инженерно-технологическими подходами, обеспечивая переход от лабораторных результатов к масштабируемым, экономически целесообразным и эффективным производственным процессам.

Биотехнология (от греч. *bio(s)* – жизнь, *techne* – искусство, мастерство, *logos* – учение) представляет собой совокупность промышленных методов, основанных на использовании живых организмов и биологических процессов для получения различных продуктов. В более широком смысле к биотехнологии относят также применение отдельных биологических компонентов – клеток, органелл, ферментов, нуклеиновых кислот, биокатализаторов и управляемых биопроцессов для получения целевых веществ и услуг: от синтеза биопродуктов до экологической очистки и диагностических технологий.

Биотехнология тесно взаимодействует с генетикой, геной инженерией, молекулярной биологией, биохимией, физиологией растений, микробиологией, ветеринарией, инженерными дисциплинами и рядом других областей. Практическое внедрение биотехнологических разработок опирается также на биоинформатику и биостатистику, химическую технологию и биопроцессную инженерию, а также на методы аналитической химии и системы контроля качества, обеспечивающие воспроизводимость и стандартизацию получаемых результатов.

Цель изучения биотехнологических дисциплин – сформировать у будущего специалиста целостное представление о современном состоянии и перспективах развития биотехнологии и о применении биообъектов в промышленном производстве, сельском хозяйстве и здравоохранении. Одновременно курс знакомит студентов с ключевыми задачами и методами биотехнологии, подчеркивая актуальность современных исследований и значимость достижений в различных направлениях от-

расли. Важной составляющей является развитие навыков безопасной работы с биообъектами, усвоение принципов биобезопасности и биоэтики, а также формирование умения критически анализировать научные данные и технологические решения с точки зрения результативности, рисков и устойчивого развития.

В традиционном (классическом) понимании биотехнологию можно охарактеризовать как науку о методах и технологиях производства, транспортировки, хранения и переработки продукции, включая сельскохозяйственную, с использованием обычных (нетрансгенных) растений, животных и микроорганизмов в природных и искусственно созданных условиях. Классическая биотехнология охватывает ферментационные процессы, селекцию организмов-продуцентов, применение природных штаммов и оптимизацию параметров культивирования, где решающую роль играет целенаправленное управление ростом и метаболизмом продуцента.

Истоки биотехнологии уходят в глубокую древность и связаны с практическим использованием микроорганизмов в хлебопечении, виноделии, пивоварении, производстве молочнокислых продуктов, солении и копчении пищи, а также при выделке кож. Эти приемы, сложившиеся на основе эмпирического опыта, по сути представляли собой ранние варианты управляемых биопроцессов: человек применял естественные микробные сообщества и подбирал условия, при которых доминировали нужные метаболические превращения.

Новейшая современная биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения. В рамках современной биотехнологии значительное место занимают также технологии культивирования клеток и тканей, получение рекомбинантных белков и вакцин, методы редактирования генома, клеточные и тканевые культуры растений, а также развитие биофармацевтики и биомедицинских технологий.

Современная биотехнология как самостоятельная научная область сформировалась в начале 1940-х годов и особенно быстро стала развиваться после 1953 года, когда Д. Уотсон и Ф. Крик описали химическое строение и пространственную организацию двойной спирали ДНК. Расшифровка структуры ДНК заложила основу для понимания молекулярных механизмов наследственности и регуляции генетических процессов, что впоследствии привело к разработке методов целенаправленного создания и модификации генетических систем.

В 1950-е годы в биотехнологии возникает новое направление – клеточная инженерия. Основатели – П. Ф. Уайт (США) и Р. Готре (Франция). Клеточная инженерия заложила основы культивирования клеток и тканей *in vitro*, соматической гибридизации, получения клеточных линий и регенерации организмов из клеток, что стало особенно важным для биотехнологии растений и биомедицины.

Следующий этап развития биотехнологии связан с генетической инженерией, оформившейся к 1972 году: в лаборатории П. Бэрга впервые была получена рекомбинантная молекула ДНК. Это событие закрепило за биоинженерией одно из ключевых мест в системе современной науки. В дальнейшем активно развивались исследования по идентификации генов и ферментов, выделению ДНК из растительных, микробных и животных клеток, расшифровке генетического кода, а также изучению механизмов экспрессии генов и биосинтеза белка у прокариот и эукариот. Становление технологий рекомбинантной ДНК привело к созданию векторных систем и методов клонирования и экспрессии генов, что сделало возможным получение целевых белков в промышленных масштабах и расширило селекционные возможности далеко за пределы традиционных подходов.

Существенный подъем биотехнологических исследований в мировой науке пришелся на 1980-е годы, когда появление новых методологических и методических подходов обеспечило переход от экспериментальных разработок к их эффективно внедрению в науку и практику, а также создало реальные предпосылки для получения значимого экономического эффекта. В этот период интенсивно развивались технологии масштабирования биопроцессов, биореакторостроение, а также методы очистки, контроля качества и стандартизации биопродуктов, что позволило наладить промышленный выпуск широкого спектра биологически активных веществ.

К ключевым достижениям новейшей биотехнологии относятся:

- генетическая трансформация;
- перенос в клетки-реципиенты чужеродных (природных или искусственно сконструированных) донорских генов;
- получение трансгенных организмов с новыми либо улучшенными свойствами и признаками.

К числу значимых результатов также относят развитие технологий направленного изменения генома, совершенствование систем экспрессии рекомбинантных белков, создание платформ для производства вакцин и разработки диагностических тест-систем, а также широкое внедрение биокатализа и иммобилизованных ферментов в промышленные процессы.

По своим целям и потенциалу эти направления имеют стратегический характер, поскольку позволяют решать принципиально новые задачи: создавать растения, животных и микроорганизмы с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, более высокой продуктивностью и улучшенным качеством продукции, а также применять биотехнологические подходы для оздоровления экологической обстановки.

Стратегическая роль биотехнологии проявляется и в обеспечении продовольственной безопасности, разработке лекарственных средств и диагностических технологий, развитии биоматериалов и ресурсосберегающих процессов, а также в переходе к биоэкономике и принципам «зеленой» химии.

Для реализации этих целей требуется:

- повышать эффективность генетической трансформации, а также точность идентификации и клонирования генов;
- формировать и развивать банки генов;
- раскрывать механизмы полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов;
- создавать надежные векторные системы;
- обеспечивать стабильную и предсказуемую экспрессию генов.

Кроме того, необходимы совершенствование методов фенотипирования и молекулярного контроля, развитие биостатистических подходов и практик воспроизводимости экспериментов, а также внедрение стандартов качества, включая валидацию методик и прослеживаемость результатов при переходе от лабораторных исследований к опытно-промышленным разработкам.

Биотехнология и генетика в XX веке достигли поистине выдающихся успехов. Результаты исследований в этих чрезвычайно важных научных направлениях были столь значительными, что на определенном этапе их развития стали определяться термином «зеленая революция». При этом вклад биотехнологии проявился не только в увеличении урожайности, но и в создании устойчивых агросистем, улучшении качества продукции, а также в разработке биологических средств защиты растений и почвосберегающих технологий.

Генетическая и клеточная инженерия определили главные направления современной биотехнологии, методы которой получили широкое развитие и используются сегодня во многих областях науки и производства. Современные биотехнологические подходы находят применение в пищевой промышленности, фармацевтике, ветеринарии, экологическом мониторинге и очистке природных и техногенных сред, а также в создании новых материалов биологического происхождения.

Одной из ключевых задач сегодня является повышение устойчивости продукционного процесса у культурных растений при одновременном сохранении и наращивании объема и качества урожая. Наряду с давно известными ограничивающими факторами – болезнями, вредителями и неблагоприятными условиями среды, все более заметную роль играют антропогенные воздействия: применение пестицидов, уплотнение почв, нарушение их структуры и деградация плодородия. Решение этих комплексных проблем требует привлечения новых технологических подходов.

Перспективным направлением становится создание сортов и агротехнологий, позволяющих снижать химическую нагрузку на агроэкосистемы, повышать эффективность использования воды и элементов минерального питания, а также поддерживать биоразнообразие и сохранять почвенное плодородие.

Следует также учитывать, что на фоне критического восприятия биотехнологии в ряде стран сформировалось заметное общественное протестное движение. В основе настороженного отношения к генно-инженерным исследованиям, как правило, лежат два ключевых фактора:

- недостаточная информированность общества о сущности и возможностях новейшей биотехнологии, что вызывает интуитивные опасения и ожидание возможных негативных последствий;
- наличие в современном мире случаев появления очагов новых заболеваний неясной природы, усиливающих тревожность и недоверие к технологическим новациям.

Также существенную роль играют вопросы этики, прозрачности исследований, доверия к регуляторным институтам, а также необходимость понятного информирования общества о принципах оценки рисков, безопасности и контролируемости биотехнологических продуктов. В этой связи особое значение приобретают научная коммуникация, просвещение и подготовка специалистов, способных профессионально объяснять как преимущества, так и ограничения биотехнологических решений.

## **ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *in vitro*. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

Неотъемлемым условием работы с культурами изолированных клеток и тканей является строгое соблюдение стерильности. Питательная среда, богатая органическими и минеральными компонентами, служит благоприятным субстратом для развития микроорганизмов, а изолированные экспланты, помещаемые на такую среду, легко подвергаются микробной контаминации. Поэтому стерилизации подлежат как сам эксплант (или семена), так и питательная среда. На практике это предполагает одновременный контроль трех «зон стерильности»:

1. исходный материал (эксплант/семена);
2. инструменты и лабораторная посуда;
3. рабочая зона и воздух (ламинарный поток, обработка поверхностей).

Все операции с изолированными тканями – введение в культуру, пересадки на свежую питательную среду – выполняют в асептических условиях (в ламинарном боксе) с использованием стерильных инструментов. Поддержание стерильности важно и на этапе культивирования, особенно при колебаниях температуры и влажности, которые могут повышать риск загрязнения.

Перед началом работы поверхности ламинар-бокса обрабатывают дезинфицирующим раствором, расходные одноразовые материалы под-



**Рис. 1. Ламинарный бокс**

готовавливают заранее, а перемещения рук и предметов в рабочей зоне сводят к минимуму, чтобы не нарушать ламинарный поток и не вносить возможные контаминанты. Практикуется ведение журнала стерильности, где фиксируют даты обработки бокса и рабочих поверхностей, автоклавирования материалов, а также замену фильтров и/или УФ-обработку (если это предусмотрено лабораторным регламентом).

Стерилизацию эксплантов и семян выполняют путем выдерживания их в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой стерильной водой. Продолжительность обработки подбирают с учетом типа исходного материала и активности используемого раствора: для семян обычно применяют более длительную экспозицию (порядка 10–20 минут), тогда как для вегетативных частей – более короткую (около 5–10 минут). Примеры стерилизующих растворов приведены в табл. 1.

На практике эффективность поверхностной стерилизации повышают предварительным обезжириванием/смачиванием поверхности: краткая обработка 70% этанолом и/или добавление ПАВ (например, капля смачивателя) к гипохлоритным растворам облегчает контакт реагента с поверхностью и труднодоступными участками. После стерилизации эксплант обычно обсушивают на стерильной фильтровальной бумаге и, при необходимости, срезают наружные слои ткани стерильным лезвием (для снижения остаточной микрофлоры и повреждений).

*Примечание по технике безопасности:* при работе с сильнодействующими стерилизующими агентами обязательны средства индивидуальной защиты и соблюдение лабораторного регламента; соединения ртути (сулема) высокотоксичны и требуют особенно строгого обращения и утилизации согласно правилам учреждения. При оформлении таблицы рекомендуется проверить интервалы времени (мин) и привести их к единому формату записи.

Таблица 1. Стерилизация исходного растительного материала

Объект	Время стерилизации			
	Диацид, 0,1%-ный	Сулема, 0,1%-ный	Гипохлориты (Na, Ca) 5-9%-ный	Пероксид водорода, 10-12%-ный
Семена сухие	15-20	10-15	15-20	12-15
Семена набухшие	6-10	6-8	10-15	6-8
Ткани мясистого корня, клубня	20-30	15-25	15-20	-
Одревесневшие стебли	20-40	20-25	20-25	-
Листья	1-3	0,5-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	0,5-7	3-15	2-7

Растительные органы, используемые для получения эксплантов, предварительно тщательно очищают: промывают щеткой в мыльном растворе, затем ополаскивают дистиллированной водой и после этого на несколько секунд погружают в 70%-ный этанол. Семена, как правило, выдерживают в спирте дольше – около 1–2 минут. Помимо собственно стерилизующего действия этанола, такая предварительная обработка перед помещением материала в основной стерилизующий раствор усиливает общий эффект стерилизации.

При этом следует учитывать, что механическая очистка (мытьё) нередко определяет успех процедуры не меньше, чем выбранный реагент: удаление частиц почвы, восковых налетов и спор с поверхности уменьшает микробную нагрузку на стерилизующий раствор и позволяет снизить риск повреждения тканей.

После стерилизации растительные объекты должны быть тщательно промыты стерильной водой. Обычно выполняют несколько последовательных промывок (сериями) в отдельных порциях стерильной воды, чтобы минимизировать остатки реагентов, ингибирующих рост тканей.

Поверхностная стерилизация устраняет лишь внешнюю (эпифитную) микрофлору экспланта. При наличии внутренней инфекции (эндогенной контаминации) требуется дополнительная обработка антибактериальными препаратами. Особенно часто внутренняя микрофлора встречается у тканей тропических и субтропических растений, в том числе из-за особенностей их проводящей системы (крупные сосуды).

Контаминация культур грибами или бактериями обычно проявляется в течение 1–14 суток после высадки. Загрязненные культуры следует немедленно изолировать и удалить, чтобы предотвратить распространение инфекции и вторичное заражение воздуха и материалов в световой комнате.

Для раннего выявления контаминации целесообразен ежедневный визуальный контроль культур в первые 7–10 суток (помутнение среды, налет, «ватные» колонии, газообразование), а при подозрении – изоляция культуры и работа с ней отдельно от чистых образцов. Использование антибиотиков рассматривают как вспомогательную меру: оно не заменяет асептику и может маскировать скрытую контаминацию, поэтому применяют по показаниям и в минимально эффективных режимах согласно методике лаборатории.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,75–1 атм в течение примерно 20 минут. Если в состав среды входят термолabile вещества, разрушающиеся при нагревании, их стерилизуют «холодным» способом – фильтрованием через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22–0,45 мкм и затем вносят в уже проавтоклавированную основную среду, охлажденную примерно до 40 °С.

Перед стерилизацией важно заранее откорректировать pH (для большинства культур тканей растений он поддерживается в слабкокислой области) и тщательно растворить все компоненты, что повышает воспроизводимость роста и морфогенеза. К числу компонентов, которые целесообразно стерилизовать фильтрованием и добавлять после охлаждения базовой среды, обычно относят часть витаминов, некоторые регуляторы роста и аминокислоты.

Посуду, предварительно завернутую в фольгу или оберточную бумагу стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при 160°C в течение двух часов. Отдельно стерилизуют инструменты (пинцеты, скальпели) и расходные материалы; в ходе работы допускается их промежуточная обработка/дезинфекция по принятому протоколу лаборатории. Следует учитывать, что открытое пламя в ламинарном потоке может нарушать аэродинамику и повышать риск контаминации; предпочтительнее методы, совместимые с режимом работы бокса.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны содержать полный набор необходимых растениям макроэлементов (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементов (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, источник углерода (обычно углеводы) и фитогормоны либо их синтетические аналоги. В некоторых рецептурах дополнительно используют гидролизат казеина и/или отдельные аминокислоты.

В состав сред часто включают ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) или ее натриевую соль, что повышает доступность железа для клеток и способствует более стабильному росту культуры. Для воспроизводимости результатов важны качество воды (дистиллированной или деионизованной), точность дозирования компонентов, корректная маркировка маточных растворов и соблюдение сроков их хранения. В ряде протоколов также применяют антиоксиданты, особенно при работе с эксплантами, богатыми фенольными соединениями, чтобы уменьшить потемнение тканей и риск некроза на начальных этапах культивирования.

Для получения каллусной ткани в отдельных случаях к питательной среде добавляют жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), каштана и др. Подобные природные добавки могут повышать частоту каллусообразования и морфогенеза, но усложняют стандартизацию, поэтому их применение обычно сопровождают контролем по вариантам (с добавкой/без добавки) и фиксируют источник/партию.

Углеводы являются обязательным компонентом питательных сред при культивировании изолированных клеток и тканей, поскольку в большинстве случаев такие культуры не способны обеспечивать себя за счет

автотрофного питания. Наиболее часто в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2–3%. При длительном пассировании возможны накопление метаболитов и изменения осмолярности среды, поэтому оптимальную частоту пересадок и содержание сахара подбирают для каждого объекта экспериментально.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и запуска клеточных делений. Поэтому при получении каллусной ткани в состав среды обычно включают ауксины, стимулирующие дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление клеток. При индукции побегового морфогенеза долю ауксинов, напротив, снижают или полностью исключают. Классическое практическое правило состоит в том, что повышенное соотношение ауксин/цитокинин чаще способствует каллусообразованию и ризогенезу, тогда как повышенное соотношение цитокинин/ауксин – формированию побегов; при этом конкретные концентрации зависят от вида и генотипа, возраста экспланта, а также условий выращивания донорного растения.

На безгормонной среде растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток синтезировать гормоны. При работе с «привыкшими» тканями особенно важен контроль соматоклональной изменчивости и стабильности признаков при многократных пересадках.

В качестве ауксинов в составе питательных сред обычно применяют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК). Для получения рыхлого, активно растущего каллуса чаще используют 2,4-Д, поскольку ИУК по активности примерно в 30 раз уступает 2,4-Д. При выборе конкретного ауксина учитывают не только его «силу» действия, но и тип формируемого каллуса (рыхлый или компактный), склонность культуры к морфогенезу, а также степень физиологического стресса экспланта.

В качестве цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП) и зеатин. БАП и зеатин, как правило, более эффективны в поддержании роста изолированных тканей и в индукции органогенеза по сравнению с кинетином. В некоторые рецептуры дополнительно вводят аденин. Следует учитывать, что результативность цитокининов нередко зависит от сочетания с источниками азота и условий освещения, поэтому подбор оптимальных вариантов целесообразно проводить по факторной схеме (варианты гормонов  $\times$  свет/темнота).

В настоящее время разработано множество питательных сред, различающихся по составу и назначению, однако при культивировании изолированных растительных тканей *in vitro* наиболее широко применяется

среда Т. Мурасиге и Ф. Скуга (MS), предложенная в 1962 году. Она характеризуется хорошо сбалансированным набором питательных компонентов и, как правило, отличается от других сред прежде всего соотношением аммонийного и нитратного азота (табл. 2).

Таблица 2. Состав питательных сред для культивирования изолированных тканей растений

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л			
	Мурасиге-Скуга	Гамборга	Шенка-Хильдебрандта	Грессхофф-Дуу
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	2500	2500	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	300	-
$\text{KNO}_3$	1900	-	-	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	130	-	200
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	-	-
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	90
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0
KI	0,83	0,75	1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,1	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,2	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин – HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин – HCl	1,0	10,0	5,0	0,1
2,4-Д	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Глутамин	-	-	-	2,0
Сахароза	30000	30000	30000	20000

Выбор базовой рецептуры (MS, B5, SH и др.) определяется типом культуры (кallус, суспензия, меристема, протопласты) и биологическими особенностями объекта. На практике часто используют модифицированные варианты базовых сред – с коррекцией содержания форм азота, кальция, микроэлементов, витаминов и других компонентов – для достижения оптимального роста и морфогенеза.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей. Концентрация гелеобразователя и его качество влияют на доступность воды и диффузию гормонов; при необходимости используют альтернативы (геллановая камедь и др.) по принятому протоколу.

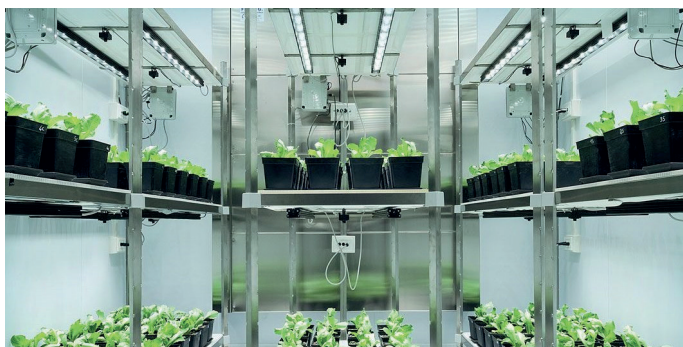
Для более рациональной организации работы растворы солей макро- и микроэлементов, а также витаминов и фитогормонов обычно готовят в виде концентрированных маточных растворов, что позволяет использовать их многократно при приготовлении сред. Маточные растворы хранят в холодильнике.

Обязательно проводят маркировку (концентрация, дата приготовления, срок годности, условия хранения), а для светочувствительных компонентов применяют темную посуду или защищают емкости от света.

**Условия культивирования.** Для успешного выращивания изолированных клеток и тканей растений необходимо поддерживать заданные параметры культивирования. Большинство каллусных тканей не требует освещения, поскольку они, как правило, не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. Исключения составляют некоторые «зеленые» каллусы, например каллусная ткань мандрагоры. В отдельных случаях даже каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию, выращивают при непрерывном освещении, если это необходимо для последующего успешного морфогенеза (например, у люцерны). Однако чаще каллус получают и поддерживают в темноте либо при рассеянном свете.

Для воспроизводимости результатов режим освещения следует строго фиксировать (фотопериод, интенсивность, тип ламп), поскольку свет влияет на гормональный баланс, фенольный обмен и направление морфогенеза.

Ткани, детерминированные к морфогенезу, переводят на световой режим и далее культивируют при освещенности порядка 1000–4000 лк. При этом нередко одновременно корректируют гормональный состав среды (снижение или исключение 2,4-Д, подбор и дозирование цитокинина), чтобы переключить программу развития клеток в сторону органогенеза.



**Рис. 2. Культуральная (факторостатная, световая) комната**

Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение, как правило, проводят при освещении. Освещенность факторостатной (световой) комнаты в зависимости от культуры поддерживают на уровне 3000–10 000 лк, при этом обязательно учитывают фотопериод, оптимальный для конкретного объекта.

Относительную влажность в культуральной комнате обычно поддерживают в пределах 60–70%. Слишком сухой воздух способствует пересыханию питательной среды в пробирках и колбах (особенно при закрытии ватными пробками), изменению ее концентрации и, как следствие, нарушению условий культивирования. Для повышения влажности используют увлажнители воздуха или простые решения, например поддоны с водой.

Для успешного микроразмножения меристем важны также качество донорного растения (прежде всего фитосанитарное состояние), размер выделяемой меристемы, режим и частота пересадок, а также этап адаптации *ex vitro* – закаливание и постепенное снижение влажности при переводе растений в нестерильные условия.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 25–26° С, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29–30° С. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18–20° С. Температура влияет не только на скорость роста, но и на частоту мутаций/вариаций при длительном культивировании, поэтому при многопассажных культурах важен стабильный режим без резких колебаний.

Наилучший световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать с помощью климатических камер. В лабораторной практике дополнительно контролируют чистоту воздуха в культуральной комнате, режим проветривания и размещение культур (раздельно: новые посевы, подозрительные, морфогенез), чтобы снизить риск перекрестного заражения.



**Рис. 3. Климатическая камера**

Культивирование изолированных клеток (суспензии) имеет ряд особенностей: культуру обычно ведут в колбах на качалке/шейкере с обеспечением аэрации, а плотность инокуляции и размер агрегатов контролируют, поскольку они определяют скорость роста и синтез метаболитов. Для получения более однородной суспензии иногда проводят фракционирование через стерильные сита/фильтры (по методике лаборатории) и подбирают интервал пассажей (часто 7–21 сутки в зависимости от объекта).

В настоящее время практически любые клетки человека и животных могут быть введены в культуру и тем самым служить средством и объектом во многих медико-биологических исследованиях. Культивирование животных клеток требует отдельной инфраструктуры (как правило, бокс биологической безопасности, специализированные инкубаторы, стерильные одноразовые расходники) и соблюдения норм биобезопасности и биоэтики; ключевым отличием от растительных культур является необходимость строго контролируемой газовой среды и температурного режима, а также высокая чувствительность к микоплазменной контаминации.

Выделяют три основных типа культур животных клеток: первичные культуры, которые можно получать практически из любого органа и которые сохраняются лишь до первого пересева; диплоидные культуры, чаще происходящие из эмбриональных тканей и сохраняющие диплоидный набор хромосом примерно до 50 пассажей; затем они могут трансформироваться в постоянные (перевиваемые) гетероплоидные культуры, способные существовать вне организма десятилетиями.

На практике также используют разделение на «конечные» и «непрерывные» клеточные линии по способности к ограниченному или неограниченному числу пассажей. При работе с любыми линиями необходимо вести документацию по происхождению материала, номеру пассажа, условиям культивирования и результатам контроля контаминаций (включая тестирование на микоплазму), что является важным условием воспроизводимости исследований.

## ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

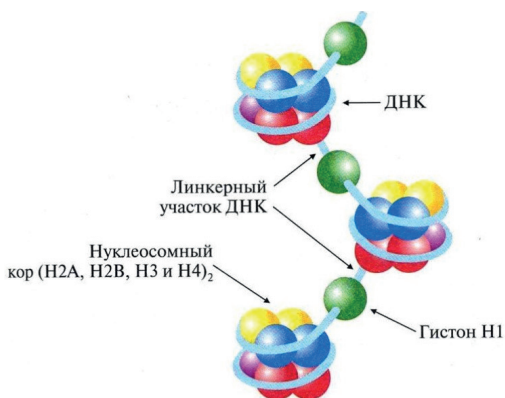
Геном эукариотических клеток устроен значительно сложнее, чем геном прокариот, что связано с большим объемом информации, необходимой для жизнедеятельности многоклеточного организма со специализированными клетками, тканями и органами. В ходе эволюции по мере усложнения клеточной организации, как правило, увеличивается масса ДНК в хромосомах и усложняются механизмы контроля и регуляции экспрессии генов. Дополнительную сложность создает распределение генетической информации между ядерным и органелльными геномами (митохондриальным и пластидным), а также наличие протяженных регуляторных областей и элементов, влияющих на экспрессию на разных уровнях.

Экспрессия генов и функционирование генома эукариот реализуются через систему генетических и биохимических процессов. В нее входят последовательные этапы: транскрипция, процессинг РНК, экспорт мРНК из ядра, трансляция, посттрансляционные модификации белков и их адресный транспорт к месту выполнения функции.

В ядерном хроматине ДНК связана с комплексами основных белков – гистонов, а также с негистоновыми белками, РНК и небольшим количеством липидов. Двойная спираль ДНК вместе с гистонами образует упорядоченную структуру, включающую нуклеосомы и межнуклеосомные участки ДНК. Нуклеосома представляет собой комплекс из восьми молекул гистоновых белков, вокруг которого уложены участки ДНК длиной примерно 140–200 пар нуклеотидов. В составе нуклеосом ДНК менее доступна действию эндонуклеаз, тогда как межнуклеосомные участки расщепляются ими значительно легче.

Степень упаковки хроматина изменчива: участки эухроматина, как правило, транскрипционно активнее, тогда как гетерохроматин чаще соответствует «молчащим» регионам генома. Существенную роль в доступности ДНК играют модификации гистонов (ацетилирование, метилирование и др.) и ремоделирующие комплексы, которые могут «разрыхлять» или «уплотнять» хроматин.

Почти все гены (цистроны) эукариот, кодирующие функционально связанные белки, находятся на разных участках хромосом. Исключение составляют только гистоновые гены и гены рРНК. Напротив, у прокариот все гены объединены в опероны. У эукариот координация экспрессии функционально связанных генов обычно обеспечивается не оперонной



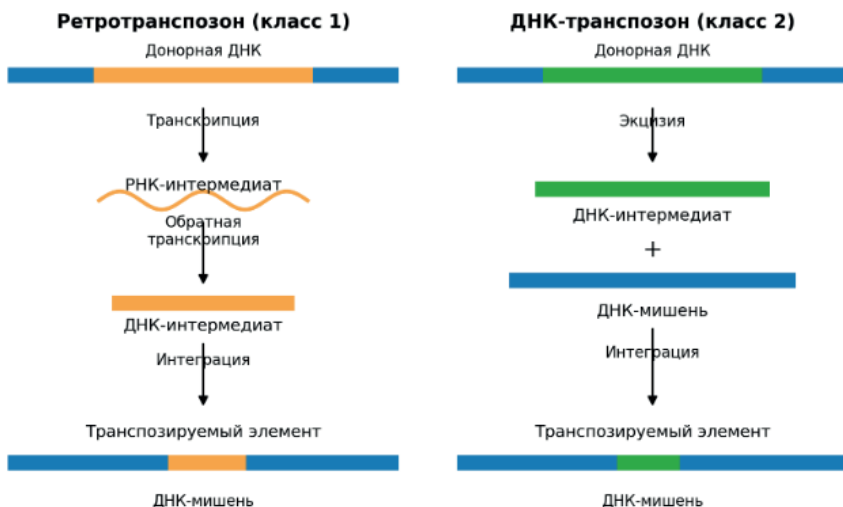
**Рис. 4. Строение нуклеосомы**

организацией, а общими регуляторными элементами, набором транскрипционных факторов, эпигенетическими метками и регуляцией стабильности/трансляции мРНК.

Почти все молекулы РНК синтезируются в виде высокомолекулярных предшественников (проРНК). После образования первичного транскрипта происходит его процессинг (созревание), который включает копирование, метилирование, полиаденилирование, расщепление (фрагментацию) и сплайсинг. Период полужизни большинства молекул мРНК у эукариот составляет примерно 3–48 часов. Важной особенностью эукариот является альтернативный сплайсинг, благодаря которому один ген может образовывать несколько вариантов мРНК и соответствующих белковых изоформ, существенно расширяя разнообразие протеома без увеличения числа генов. Дополнительный уровень регуляции обеспечивают некодирующие РНК (микроРНК и длинные некодирующие РНК), влияющие на стабильность мРНК и эффективность трансляции.

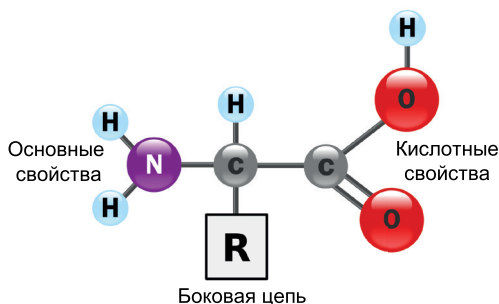
Как правило, в ДНК эукариот наряду с уникальными последовательностями присутствует большое количество повторяющихся участков. У многих растений доля уникальных последовательностей в геноме составляет лишь около 20–30%. Считается, что повторы важны не только структурно, но и функционально, поскольку могут участвовать в регуляции экспрессии генов.

Повторяющиеся элементы включают тандемные повторы, транспозоны и ретротранспозоны, которые могут участвовать в перестройках генома и формировании регуляторных сетей. У растений мобильные элементы часто составляют значительную долю генома и влияют на его размер и динамику.



Белки являются наиболее многочисленной группой органических соединений клетки: на их долю приходится не менее 50% ее сухой массы. Они играют ключевую роль в построении и функционировании клетки, поскольку выступают основными «молекулярными инструментами», через которые реализуется генетическая информация. Функциональное разнообразие белков определяется не только аминокислотной последовательностью, но и пространственной структурой, взаимодействиями с партнерами, а также посттрансляционными модификациями (фосфорилирование, гликозилирование, ацетилирование и др.), которые меняют активность, локализацию и стабильность белка.

Аминокислоты – основные структурные единицы, из которых построены молекулы всех белковых веществ. Это производные кислоты жирного или ароматического рядов, содержащие одновременно аминогруппу  $\text{NH}_2$  и карбоксильную группу –  $\text{COOH}$ .



Аминогруппа в молекуле аминокислоты может располагаться в  $\alpha$ -,  $\beta$ - или  $\gamma$ -положении по отношению к карбоксильной группе. Аминокислоты классифицируют различными способами, чаще всего – по природе их боковых радикалов (R-групп), поскольку именно они определяют химические свойства аминокислот и поведение белков. В контексте генетического кода аминокислоты выступают как «слова», соответствующие определенным кодонам. Обычно аминокислоты обозначают трехбуквенными символами.

В белках живых организмов преимущественно используются 20 «стандартных» протеиногенных аминокислот, однако иногда встречаются модифицированные и редкие аминокислоты (например, селеноцистеин), включаемые в состав белков особыми механизмами.

### ***Генетическое кодирование аминокислотных последовательностей в белках***

Последовательность аминокислот в каждом белке задается последовательностью мононуклеотидных «строительных блоков» в определенных участках линейной молекулы ДНК. Триплеты нуклеотидов, называемые кодонами, соответствуют конкретным аминокислотам. Порядок кодонов в ДНК коллинеарен аминокислотной последовательности кодируемой полипептидной цепи. Участок ДНК, содержащий информацию о синтезе одной полной полипептидной цепи, называют цистроном или геном.

Сведения о белках и их биологической активности во многом накоплены благодаря изучению молекулярных взаимосвязей между генами и белками, поскольку структура и функция белка в конечном счете определяются его аминокислотной последовательностью.

Генетический код обладает важными свойствами: триплетностью, неперекрываемостью, почти универсален, вырожден (одна аминокислота может кодироваться несколькими кодонами) и однозначен (каждый кодон соответствует одной аминокислоте или сигналу стоп). Инициация трансляции начинается со старт-кодона (обычно АУГ), а завершение обеспечивают стоп-кодона (УАА, УАГ, УГА).

В процессе биосинтеза белка возможны ошибки, приводящие к нарушению нормальной последовательности аминокислотных остатков. В результате может образоваться аномальный белок, частично или полностью утративший биологическую активность; подобные изменения часто связаны с генетической мутацией. Мутация возникает, если в ДНК, кодирующей данную полипептидную цепь, происходит химическое изменение нуклеотида, выпадение одного нуклеотидного звена или, наоборот, включение лишнего нуклеотида. В таких случаях нарушается непрерывность и «считываемость» последовательности кодонов, что

приводит к соответствующим изменениям аминокислотной последовательности синтезируемого полипептида.

Во многих ситуациях изменения ограничиваются заменой одной аминокислоты на другую. Изучение таких мутантных белков, то есть белков с аминокислотными заменами, обусловленными мутациями, имеет большое значение, поскольку позволяет выявлять аминокислотные остатки, критически важные для формирования структуры белка и выполнения им биологической функции.

Различают точечные мутации (замены), вставки и делеции; вставки/делеции, не кратные трем, вызывают сдвиг рамки считывания и, как правило, приводят к существенному изменению структуры белка. Помимо изменений в кодирующей области, важны мутации в регуляторных участках (промоторы, энхансеры), которые могут менять уровень экспрессии гена без изменения аминокислотной последовательности белка.

### ***Функция рибосом при белковом синтезе***

Рибосомы (в том числе полирибосомы) являются основным клеточным «центром», где осуществляется синтез белка. Упрощенно процесс трансляции можно представить следующими этапами:

#### **Инициация.**

а) мРНК связывается с малой субъединицей рибосомы (40S) и позиционируется так, чтобы стартовый кодон оказался в зоне считывания; взаимодействие обеспечивается комплексом рибосомных компонентов и факторов инициации.

б) инициаторная аминоацил-тРНК распознает стартовый кодон за счет комплементарного спаривания антикодона и кодона.

в) присоединяется большая субъединица рибосомы (60S), формируется функционально активный рибосомный комплекс.

**Транслокация.** Рибосома смещается по мРНК на один кодон, подготавливая место для следующей тРНК.

**Распознавание кодона.** К очередному кодону присоединяется соответствующая аминоацил-тРНК (по принципу комплементарности кодон-антикодон).

**Образование пептидной связи (перенос).** Пептидилтрансферазная активность большой субъединицы катализирует перенос растущей полипептидной цепи на аминокислоту, принесенную новой тРНК, с образованием пептидной связи; «отработавшая» тРНК покидает рибосому.

**Терминация.** При попадании стоп-кодона (например, UAG) в активный центр комплекс распадается: высвобождается полипептид, отделяются мРНК и тРНК, а рибосома диссоциирует на субъединицы 40S и 60S.

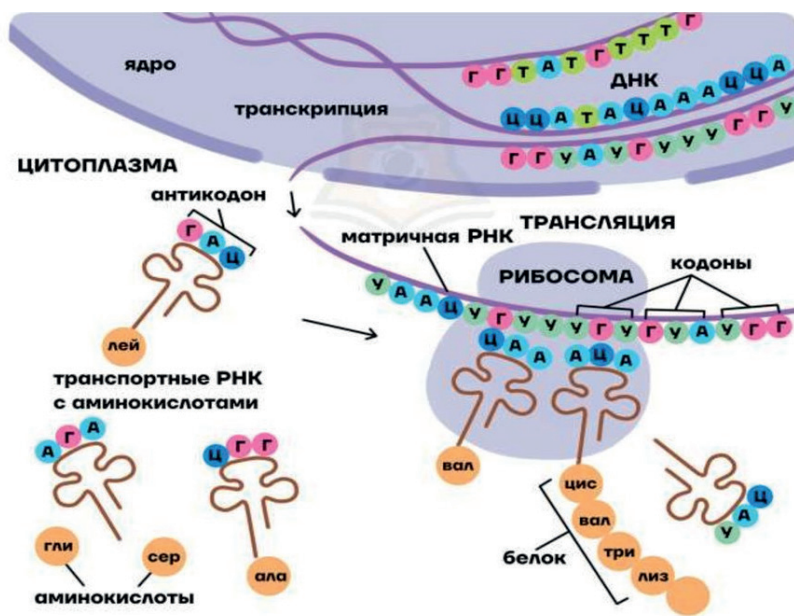
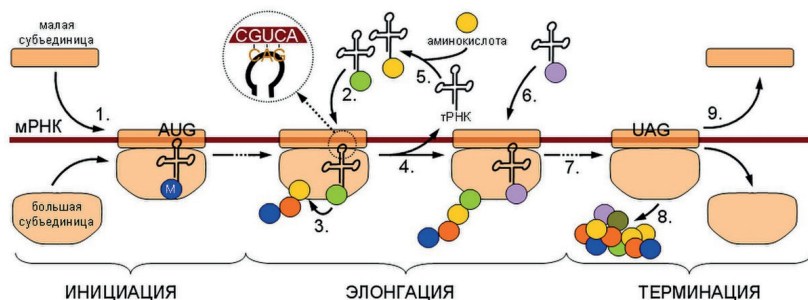


Рис. 5. Биосинтез белка

Рибосома имеет два основных активных участка с различными свойствами: акцепторный участок, или вход, и донорный участок, или выход, а также участки инициации и терминации. Функционально различают А-, Р- и Е-участки рибосомы: в А-участок входит аминоацил-тРНК, в Р-участке удерживается пептидил-тРНК, а через Е-участок выходит «отработанная» тРНК. Полисомы (полирибосомы) – комплексы, где одну молекулу мРНК одновременно транслируют несколько рибосом, что повышает скорость синтеза белка.

### ***Классификация механизмов внутриклеточной регуляции***

Механизмы, ускоряющие или замедляющие реакции отдельных путей обмена веществ, связаны с изменением активности ферментов и переключением метаболизма с одного пути на другой. Регулирующие факторы при этом могут быть различной природы: промежуточные метаболиты, образующиеся в ходе обмена; неорганические и органические вещества, поступающие извне (в том числе с пищей); факторы внешней среды; гормональные сигналы. У эукариот регуляция реализуется на нескольких взаимосвязанных уровнях:

1. доступность ДНК (состояние хроматина, эпигенетические механизмы);
2. транскрипционный контроль;
3. процессинг РНК и экспорт из ядра;
4. регуляция стабильности мРНК;
5. контроль трансляции;
6. посттрансляционные модификации и деградация белков;
7. пространственная компартментализация процессов в органеллах и внутриклеточных доменах.

Тесно переплетенную сеть метаболических реакций часто называют «картой метаболизма». Помимо сложного «лабиринта» путей, по которым движутся метаболиты, в клетке действует высоко координированная система «управления движением», обеспечивающая согласование скоростей и направлений метаболических потоков с текущими потребностями клетки. Без регуляторных механизмов, их корректной организации и согласованного функционирования огромный каталитический потенциал метаболизма оставался бы не востребуемым.

Ключевой принцип такой регуляции – поддержание гомеостаза: клетка соотносит потребности в энергии, пластических веществах и восстановительных эквивалентах и перенастраивает метаболические потоки в ответ на внутреннее и внешние сигналы.

Существует следующая классификация механизмов внутриклеточной регуляции:

1. *Метаболитная регуляция* – осуществляется за счет изменения концентраций метаболитов и, как правило, не затрагивает ни активность, ни число ферментных молекул.

2. *Ферментная регуляция* – реализуется через изменение активности уже имеющихся ферментов; в этом случае регуляторные факторы действуют непосредственно на фермент и/или его функциональное состояние.

3. *Генная регуляция* – основана на включении или выключении синтеза ферментов; регулирующие влияния направлены на генетический

материал (ДНК) либо на его непосредственный продукт (РНК), изменяя уровень экспрессии генов.

Дополнительно выделяют *посттрансляционную регуляцию* (изменение свойств белков после их синтеза) и *регуляцию деградации белков* (в том числе через убиквитин-протеасомную систему и другие пути), которые обеспечивают быстрый и во многих случаях обратимый ответ клетки.

Ферментная регуляция обычно затрагивает отдельный фермент, протекает очень быстро (в пределах долей секунды) и обеспечивает «тонкую настройку» метаболических путей. Генная регуляция, как правило, влияет сразу на несколько ферментов и потому более экономична: ненужные белки просто не синтезируются. Однако она требует больше времени, поскольку включает процессы транскрипции и/или трансляции. Такая форма регуляции обеспечивает «грубую настройку» обмена веществ и играет важную роль в развитии и дифференцировке. В эукариотических клетках быстрые ответы чаще реализуются через модификации уже существующих белков (например, фосфорилирование), а длительные – через перестройку экспрессии генов и изменения организации хроматина.

### ***Генная регуляция биохимических процессов***

Физиологическая роль генов состоит в передаче клетке наследственной информации через синтез мРНК и последующее образование белков, прежде всего ферментов. При этом в клетке никогда не реализуется одновременно весь объем генетической информации: не синтезируются сразу все потенциально возможные ферменты. Следовательно, в каждый момент времени сосуществуют активные гены, продуцирующие РНК, и неактивные гены.

Генная регуляция обеспечивает как активацию генов (индукцию), так и их подавление (репрессию). Одним из наиболее ранних и экспериментально регистрируемых проявлений такой регуляции является появление или исчезновение соответствующего белка (фермента), синтез которого контролируется данным геном, то есть индукция или репрессия ферментных систем.

У эукариот роль «включателей» и «выключателей» часто выполняют транскрипционные факторы и регуляторные участки ДНК (промоторы, энхансеры, сайленсеры), а также состояние хроматина, определяющее доступность этих элементов для регуляторных белков.

*Регуляторные ДНК-элементы* – это некодирующие последовательности ДНК, которые контролируют время, место и уровень экспрессии генов, выступая как «переключатели» и «регуляторы громкости» генетической информации. Они служат платформами для связывания специфици-

ческих белков (транскрипционных факторов), которые влияют на работу РНК-полимеразы – фермента, синтезирующего РНК с ДНК.

Основные типы:

1. Промотор – стартовая площадка для инициации транскрипции. Это короткая последовательность ДНК, расположенная непосредственно перед началом гена (обычно на расстоянии до 100 пар оснований). Функция: Узнается и связывается РНК-полимеразой и основными (базальными) транскрипционными факторами. Обеспечивает точку старта и направление транскрипции. Без активного промотора ген «молчит».

2. Эnhансер (усилитель) – последовательность ДНК, которая усиливает (повышает) уровень транскрипции гена. Ключевая особенность – действует на расстоянии (может находиться за тысячи пар оснований до или после гена, даже в интронах) и в любой ориентации. Функция: служит мишенью для активаторных белков. При связывании с ними структура ДНК изгибается, что позволяет белкам на энхансере физически взаимодействовать с белковым комплексом на промоторе (через петлеобразование хроматина), тем самым резко увеличивая вероятность и частоту инициации транскрипции.

3. Сайленсер (глушитель) – последовательность, противоположная энхансеру. Она подавляет (снижает или полностью выключает) транскрипцию гена. Также может действовать на большом расстоянии. Функция: связывает репрессорные белки. Эти белки мешают сборке транскрипционного комплекса на промоторе либо способствуют образованию плотной, неактивной структуры хроматина (гетерохроматина) вокруг гена.

Общая схема работы: Вся система представляет собой интегратор сигналов. Набор регуляторных элементов (промотор + множество энхансеров и сайленсеров) образует регуляторный модуль (цис-регуляторный модуль) гена. Комбинация транскрипционных факторов, связавшихся с этими элементами в данный момент, определяет конечный уровень экспрессии гена в ответ на потребности клетки, стадию развития или внешние сигналы. Таким образом, промоторы, энхансеры и сайленсеры – это ключевые элементы генетического «кода управления», которые обеспечивают избирательную и адаптивную работу генома, позволяя одной и той же ДНК создавать сотни разных типов клеток и гибко реагировать на изменения.

Для регуляции на уровне генов во многом справедливы те же принципы, что и для ферментной регуляции:

- активации ферментов субстратом соответствует *субстратная индукция* генов;
- торможению ферментов конечным продуктом соответствует *продуктовая репрессия* генов;

- в обоих случаях пусковыми факторами нередко выступают метаболиты, различие заключается главным образом в уровне реализации регуляции.

В то же время у эукариот, помимо метаболитов, существенную роль играют межклеточные сигналы (гормоны, факторы роста), стрессовые воздействия и сигнальные каскады, передающие информацию к ядру и изменяющие транскрипционные программы.

Генная регуляция также инициируется стимуляторами развития, например, гормонами и светом, и имеет принципиальное значение для эмбрионального развития. Особенно важно, что в ходе онтогенеза формируются устойчивые «профили экспрессии», поддерживаемые эпигенетическими механизмами и обеспечивающие закрепление клеточной дифференцировки.

### ***Репрессия ферментов***

Подавление синтеза ферментов продуктами их действия чаще всего наблюдается в анаболических процессах: репрессирующий метаболит (корепрессор), прежде всего, снижает образование ферментов, обеспечивающих его собственный синтез. Например, аргинин способен репрессировать синтез всех восьми ферментов, участвующих в его биосинтетическом пути.

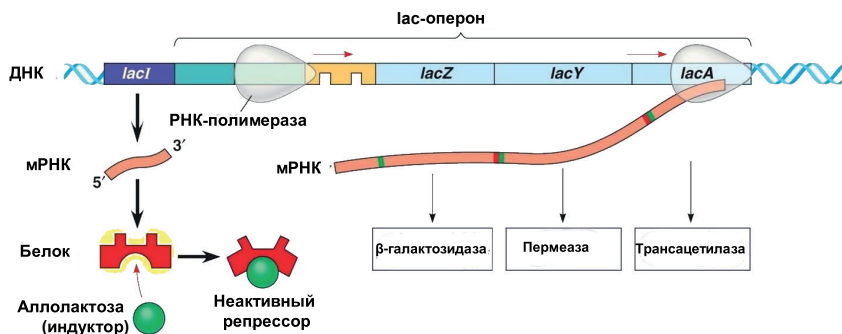
Репрессия, как и индукция ферментов, характерна для всех живых организмов. В биотехнологии эти механизмы имеют прикладное значение: за счет целенаправленного подавления или активации отдельных метаболических путей можно регулировать биосинтез целевых соединений и повышать выход продукта.

*Механизм генной регуляции: модель Жакоба-Моно.*

Согласно модели Жакоба-Моно, в ДНК прокариот существуют группы нескольких *структурных генов*, объединенных в *оперон* и регулируемых совместно. Классический пример – *лактозный (lac) оперон*, включающий гены трех ферментов, индуцируемых лактозой:  $\beta$ -галактозид-пермеазы,  $\beta$ -галактозидазы и ацетилтрансферазы.

Оперон транскрибируется как единое целое, поэтому образующаяся мРНК несет информацию сразу для синтеза нескольких полипептидов (то есть является *полицестронной*). Моногенная мРНК образуется лишь в том случае, если оперон представлен одним структурным геном.

Транскрипция начинается не непосредственно со структурных генов: перед ними располагаются две ключевые регуляторные области – *промотор*, с которым связывается РНК-полимераза и где инициируется транскрипция, и *оператор*, служащий участком приложения регуляторных воздействий.



**Рис. 6. Механизм генной регуляции: модель Жакоба-Моно**

Вне оперона находится регуляторный ген, функционально связанный с опероном. Он кодирует белок-репрессор (апорепрессор), который специфически связывается со «своим» оператором и тем самым блокирует транскрипцию оперона.

Следует подчеркнуть, что модель Жакоба-Моно описывает главным образом прокариотическую регуляцию. У эукариот аналогами «операторов» в функциональном смысле выступают регуляторные элементы ДНК и комплексы белков, однако пространственная организация хроматина и удаленные энхансеры делают регуляцию более многоуровневой.

*Свойства репрессоров.* Репрессор представляет собой аллостерический белок, способный менять свою конформацию и, соответственно, способность связываться с оператором. Репрессор может находиться в неактивном состоянии и активироваться при взаимодействии с корепрессором: в этом случае он приобретает конформацию, позволяющую специфически связываться с операторной последовательностью ДНК, что приводит к подавлению транскрипции (репрессии синтеза ферментов). В других системах репрессор изначально образуется в активной форме, а действие индуктора заключается в изменении его структуры так, что связь с оператором нарушается – транскрипция возобновляется (индукция синтеза ферментов).

Гены, продукты которых синтезируются независимо от регуляции (конститутивные ферменты), либо не контролируются репрессором, либо соответствующий репрессор функционально неактивен.

Выделенные бактериальные репрессоры обычно представляют собой кислые белки с молекулярной массой порядка 30 000-150 000; в клетке их содержится немного – примерно 5-10 молекул. Репрессоры специфически связываются с двухцепочечной ДНК (оператором) и, как правило, не взаимодействуют с одноцепочечной (денатурированной) ДНК.

В эукариотических системах репрессия часто реализуется через белки-репрессоры и ко-репрессоры, которые действуют совместно с транскрипционными факторами и изменяют состояние хроматина (например, посредством привлечения гистондеацетилаз), что снижает уровень транскрипции.

*Реализация регуляторных механизмов.* Ключевым условием эффективной внутриклеточной регуляции является относительная «быстрота обновления» информационных и исполнительных молекул – прежде всего мРНК и белков (включая ферменты). Если бы мРНК и ферменты сохранялись слишком долго, репрессия ранее активных генов практически не давала бы эффекта, а однократная индукция приводила бы к длительному, плохо управляемому сохранению синтеза.

У бактерий, которые быстро перестраивают метаболизм в ответ на изменения среды, мРНК обычно имеет очень короткий срок жизни (порядка 1-2 минут). У высших организмов, для которых характерна более стабильная организация обмена, встречаются как короткоживущие, так и долгоживущие мРНК: например, у хлопчатника мРНК может сохраняться более 16 часов, а у зеленой водоросли *Acetabularia* – в течение нескольких недель. Период полужизни ферментов у высших растений варьирует широко – от примерно одного часа до пяти суток.

Наряду со стабильностью мРНК и белков важное значение имеет механизм «быстрого выключения» клеточных сигналов за счет направленной деградации молекул – включая протеолиз, а также регуляцию на уровне РНК (в том числе с участием малых некодирующих РНК), что обеспечивает оперативность и обратимость ответа клетки.

Доказательства генетической роли ДНК были получены разными путями.

1. Показано, что количество ДНК в клетках данного организма обычно строго определено и в норме не зависит от условий среды, питания или факторов, влияющих на обмен веществ. Такое постоянство хорошо согласуется с функцией ДНК как носителя наследственной информации. Вместе с тем существуют специальные случаи, когда содержание ДНК может изменяться (например, эндоредупликация у растений, полиплоидия, а также отдельные варианты дифференцированных тканей), что связано с особенностями развития и функциональной специализации.

2. В целом содержание ДНК в клетке, как правило, возрастает по мере усложнения организмов и увеличения объема генетической информации. Так, у бактерий на клетку приходится порядка  $0,01 \times 10^{-6}$  мкг ДНК (примерно 1% сырой массы), тогда как у высших организмов – около  $6 \times 10^{-6}$  мкг на клетку. ДНК-содержащие вирусы с небольшим числом генов также содержат очень малые количества ДНК. При этом между размером генома

и «сложностью» организма нет строгой линейной зависимости (парадокс С-значения): значительная доля геномной ДНК может приходиться на повторы и некодирующие области, особенно у растений и ряда животных.

3. Важные подтверждения генетической функции ДНК получены в экспериментах по репликации бактериофагов, прежде всего в опытах Херши и Чейза. Они раздельно метили либо белок, либо ДНК вирусных частиц, выращивая инфицированные бактерии на средах с соответствующими радиоактивными предшественниками. Было показано, что в бактериальную клетку проникает именно вирусная ДНК, тогда как вирусный белок остается снаружи. Позднее было установлено, что очищенная от белковых примесей вирусная нуклеиновая кислота обладает инфекционностью: при введении в бактериальную клетку она обеспечивает образование полноценных вирусных частиц.

В пользу генетической функции ДНК свидетельствуют также следующие факты:

- препараты ДНК, выделенные из разных тканей одного и того же организма, характеризуются одинаковым (видоспецифичным) нуклеотидным составом;
  - у разных видов нуклеотидный состав ДНК различается;
  - у организмов одного и того же вида нуклеотидный состав ДНК, как правило, не зависит от возраста, особенностей питания и условий внешней среды;
  - для большинства исследованных образцов ДНК выполняются соотношения Чаргаффа: число остатков аденина равно числу остатков тимина ( $A = T$ ), а гуанина – числу остатков цитозина ( $G = C$ ); соответственно, суммарное количество пуринов равно суммарному количеству пиримидинов ( $A + G = C + T$ );
  - ДНК близкородственных видов имеет сходный нуклеотидный состав, тогда как у эволюционно удаленных организмов он заметно различается, что позволяет использовать показатели состава ДНК как один из таксономических признаков.

*Дополнительно важнейшим подтверждением роли ДНК как носителя наследственной информации являются: принцип комплементарности оснований, обеспечивающий точное копирование (репликацию); возможность направленной передачи признаков при переносе ДНК (трансформация у бактерий); а также корреляция между изменениями в последовательности ДНК и изменениями наследуемых признаков. В современной молекулярной генетике генетическую функцию ДНК подтверждают также методы секвенирования и сравнительного анализа геномов, позволяющие напрямую связывать вариации последовательности с фенотипом и эволюционными взаимоотношениями организмов.*

## КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Клеточные культуры с каждым годом все шире применяются в биологии, медицине и сельском хозяйстве. Их используют для решения фундаментальных общебиологических задач, включая изучение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, процессов адаптации и старения, клеточной подвижности, злокачественной трансформации и ряда других явлений. Существенную роль клеточные культуры играют и в биотехнологии, прежде всего при производстве вакцин и различных биологически активных веществ.

Культуры клеток служат исходным материалом для получения клеток-продуцентов, применяются для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и создания новых сортов растений. Они востребованы в диагностике и лечении наследственных заболеваний, используются как тест-системы при оценке эффективности и безопасности новых фармакологических препаратов, а также в задачах сохранения генофонда редких и исчезающих видов животных и растений. Дополнительно клеточные и тканевые культуры широко применяют в токсикологии и экотоксикологии (биотестирование загрязнителей), в фундаментальных исследованиях, а также как платформу для получения рекомбинантных белков и моноклональных антител.

### ***Предпосылки и условия возникновения метода культуры клеток и тканей высших растений***

Человек начал возделывать растения более 10 тысяч лет назад. Практически одновременно с окультуриванием дикорастущих форм возник и целенаправленный отбор по признакам, повышающим их хозяйственную ценность. Первоначально этот процесс опирался на естественное разнообразие исходных популяций. Переход к научной селекции сопровождался развитием представлений о наследственности и изменчивости, а также совершенствованием методов контролируемого размножения, что в дальнейшем подготовило основу для внедрения биотехнологических подходов.

Со временем селекция стала опираться на научные, прежде всего генетические закономерности, среди которых особенно важны:

1. применение гибридизации;
2. открытие законов наследования и расщепления признаков в потомстве;

3. хромосомная теория наследственности, объяснившая сцепление признаков и механизмы их рекомбинации;

4. изучение строения хромосом и процессов рекомбинации;

5. разработка методов экспериментальной полиплоидии и мутагенеза.

К важным предпосылкам следует также отнести развитие фитопатологии и вирусологии растений, поскольку именно необходимость оздоровления посадочного материала стала одним из мощных стимулов для практического внедрения культуры меристем и микрোকлонального размножения.

Создание новых растительных форм основывается на двух базовых принципах:

1 – создание генетического разнообразия;

2 – отбор желательных генотипов.

Культура клеток и тканей дополняет эти принципы, позволяя получать и фиксировать новые варианты (в т.ч. соматоклональные), проводить селекцию на клеточном уровне и ускорять размножение уже отобранных генотипов.

В настоящее время становится очевидным, что потенциал дальнейшего качественного улучшения растительных форм исключительно традиционными методами во многом исчерпывается. Технология получения новых форм, основанная преимущественно на половом скрещивании как основном способе генетической рекомбинации, имеет ряд ограничений, часть из которых носит фундаментальный характер и принципиально не устраняется. Кроме того, классическая селекция часто сопровождается «балластным» переносом нежелательных признаков вместе с полезными (эффект сцепления), а также зависит от сезонности и длительности онтогенеза.

Можно выделить, по крайней мере, три ключевых ограничения:

1. половое скрещивание, как правило, возможно лишь между филогенетически близкими формами (обычно в пределах одного рода), поэтому многие ценные признаки потенциальных доноров остаются недоступными для переноса из-за нескрещиваемости донора и реципиента;

2. на практике селекционная задача нередко сводится к интрогрессии небольшого числа генов от дикого вида в культурный генотип, что требует многократных обратных скрещиваний и длительного отбора;

3. селекционный процесс на основе половой гибридизации занимает много времени: для выведения новой формы часто необходимо провести до десяти и более последовательных скрещиваний.

Дополнительно у ряда культур серьезными ограничителями выступают стерильность гибридов, несовместимость при оплодотворении и абортивность зародышей, что делает особенно востребованными мето-

ды эмбриокультуры и оплодотворения *in vitro*. Таким образом, половой процесс во многих случаях оказывается недостаточно эффективным, хотя остается естественным механизмом генетической реконструкции высших организмов.

Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* клеток, тканей и органов, способны существенно облегчить и ускорить формообразовательный процесс. К ним относят:

- оплодотворение *in vitro*;
- культуру незрелых зародышей и гибридных семян;
- регенерацию растений из тканей летальных гибридов;
- экспериментальную гаплоидию;
- клональное микроразмножение;
- криосохранение генофонда.

Кроме того, в этот комплекс включают культуру пыльников (микроспор) для получения гаплоидов и двойных гаплоидов, культуру протопластов и соматическую гибридизацию (соматические гибриды, цибриды), а также технологии генетической трансформации (в том числе агробактериальную) как логическое продолжение клеточно-тканевых подходов.

Клеточные методы эффективны и для получения посадочного материала вегетативно размножаемых растений, тестированного на отсутствие вирусов и других патогенов. Оздоровление обычно достигается сочетанием культуры апикальных меристем с термотерапией и/или химиотерапией, а фитосанитарный контроль проводят серологическими и молекулярными методами диагностики.

Важное практическое направление – сохранение генетических ресурсов в криобанке при температуре  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , что обеспечивает сохранение генетической идентичности материала при последующем восстановлении и использовании. Криосохранение применяют не только для семян, но и для меристем, эмбриоидов, пыльцы, клеточных суспензий и протопластов, что особенно важно для видов с «нехранимыми» (рекальцитрантными) семенами.

Важнейшие задачи, в решении которых можно помочь клеточные технологии:

- создание форм с множественной толерантностью к ряду болезней и неблагоприятных факторов среды;
- увеличение количества белка и обогащение его незаменимыми АК у зерновых культур;
- повышение качества сырья (масличность, содержание крахмала/сахаров, вторичные метаболиты);
- ускорение селекционного цикла;

– сохранение редких генотипов и создание высокопродуктивных линий-продуцентов метаболитов.

В перспективе возможно появление технологий, которые позволят увеличить продуктивность фотосинтеза, создать формы злаков, способных к симбиотической азотфиксации, а также растений, усваивающих элементы почвенного питания в оптимальных количествах. Отдельное направление – формирование устойчивости к абиотическим стрессам (тепловой/холодовой, засухе) за счет управления регуляторными путями, отвечающими за водный режим, антиоксидантную защиту и стресс-ответ.

Клеточная технология, сама возможность существования и размножения клеток *in vitro*, базируется на свойстве тотипотентности клеток и их способности к регенерации. Тотипотентность реализуется при наличии соответствующих условий: стерильности, адекватного минерального питания, источника углерода, оптимального гормонального баланса и факторов среды (свет, температура), а также при сохранении жизнеспособности и «компетентности» клеток.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии целесообразно рассматривать по трем основным направлениям.

Первое направление связано со способностью изолированных растительных клеток синтезировать и накапливать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей вещества вторичного метаболизма – алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, такие соединения получают из каллусных культур, выращиваемых на твердых (агаризованных) или жидких (суспензионных) питательных средах. На основе клеточных технологий получают, например,



Рис. 7. Лекарственные растения

диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, а также тонизирующие вещества из клеток женьшеня, применяемые в медицинской и парфюмерной практике.

Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в данных конкретных условиях, и получать продукцию круглый год. Дополнительное преимущество – стандартизируемость сырья: при стабильных условиях культивирования проще обеспечивать воспроизводимое содержание целевых соединений по сравнению с полевым сырьем, зависящим от климата и сезона.

Второе направление – это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год. Метод включает стадии: введение экспланта, пролиферация побегов, укоренение, акклиматизация *ex vitro*; ключевыми задачами являются предотвращение контаминаций, минимизация соматической изменчивости и контроль сортовой идентичности.

Третье направление связано с использованием изолированных клеток и тканей в селекции растений, что позволяет ускоренно получать формы с высокой скоростью роста и устойчивостью к неблагоприятным факторам среды – засухе, засолению, экстремальным температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др. В рамках этого направления также развиваются методы создания новых генотипов посредством слияния изолированных протопластов и получения неполных (соматических) гибридов. Перенос чужеродных генов в протопласты методами генной инженерии открывает возможность последующего получения растений с новыми наследуемыми признаками.

Культивирование изолированных пыльников и семяпочек на искусственных питательных средах позволяет получать гаплоидные растения, а культура зародышей – «спасать» гибриды, формирующие невсхожие семена (например, при слабом развитии эндосперма). Оплодотворение *in vitro* помогает преодолевать нескрещиваемость отдельных видов и форм.

Практический эффект этих подходов заключается в ускоренном получении гомозиготных линий (через технологии удвоенных гаплоидов), расширении генетической базы за счет соматической гибридизации и повышении точности переноса признаков при трансформации.

*DH-технологии (Doubled Haploids, удвоенные гаплоиды)* – это комплекс биотехнологических методов, позволяющих быстро (за 1–2 поко-

ления) получать полностью гомозиготные линии растений: диплоидные формы, у которых оба набора хромосом идентичны, полученные из исходных гаплоидных клеток.

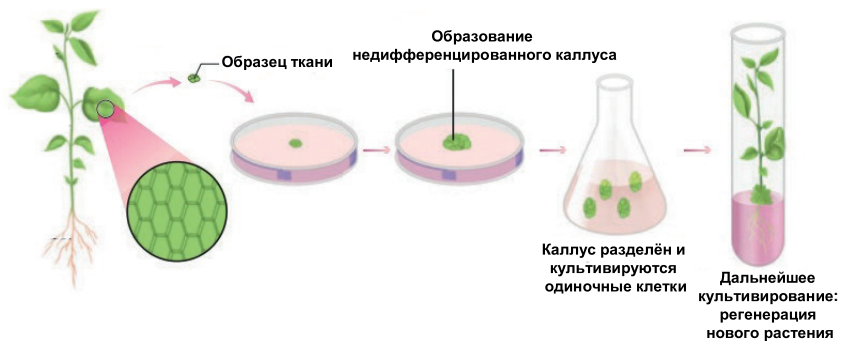
Эффективность применения культур клеток и тканей в первую очередь определяется оптимизацией физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и последующую регенерацию взрослых растений. Наиболее трудоемким и методически сложным этапом остается получение целого растения из отдельных клеток, особенно у злаковых культур. Поэтому первостепенное значение имеет изучение механизмов морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

В практической работе со злаками критическими факторами нередко являются выбор донорного материала (часто – незрелые зародыши), получение и поддержание эмбриогенного типа каллуса, подбор режимов 2,4-Д и цитокининов, а также оптимизация освещения и температурных «переключателей» на этапах индукции морфогенеза и регенерации.

### ***Каллусогенез как основа создания клеточных культур***

Культуры изолированных растительных тканей чаще всего представлены каллусными, реже – опухолевыми тканями.

*Каллусная культура* – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем такие клетки приобретают специфическую «каллусную» специализацию, то есть становятся особым образом дифференцированными. В зависимости от объекта и условий культивирования различают *морфогенный (регенерационно-способный)* и *неморфогенный* каллус, что принципиально важно для задач микроразмножения и селекции.



**Рис. 8. Основные этапы технологии культивирования растительных тканей**

Каллус может формироваться как *in vitro* на изолированных фрагментах ткани (эксплантах), так и на целом растении в ответ на повреждение. Каллусная ткань *in vitro* обычно имеет белую или желтоватую окраску, реже – светло-зеленую; интенсивно зеленая встречается значительно реже. Потемнение до темно-коричневого цвета чаще наблюдается при старении каллусных клеток и связано с накоплением фенольных соединений, которые окисляются до хинонов. Для уменьшения их образования и снижения потемнения в состав питательных сред нередко вводят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет выраженной анатомической организации, однако в зависимости от происхождения и условий культивирования она различается по консистенции:

1. *рыхлая* – образована сильно оводненными клетками и легко распадается на мелкие агрегаты;

2. *средней плотности* – характеризуется наличием хорошо выраженных меристематических очагов;

3. *плотная* – в ней могут дифференцироваться элементы камбия и проводящей системы.

Необходимым условием дедифференцировки растительных клеток и их перехода к каллусному росту обычно является присутствие в среде фитогормонов двух групп – *ауксинов* и *цитокининов*. Ауксины инициируют дедифференцировку, подготавливая клетку к делению, тогда как цитокинины стимулируют пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток. Если эксплант, состоящий из специализированных клеток (фрагмент стебля, листа, корня без верхушки и т.п.), поместить на среду без гормонов, деления, как правило, не происходят и каллус не формируется, поскольку дифференцированные клетки утрачивают способность к пролиферации.

Клеточный рост условно включает три фазы: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. В заключительной фазе формируется вторичная клеточная стенка, и клетка теряет способность к делению. Для восстановления пролиферативной активности требуется дедифференцировка – возвращение клеток к состоянию, близкому к меристематическому. Размножение дедифференцированных клеток приводит к неорганизованному росту, в результате чего и образуется каллусная ткань. Таким образом, переход специализированной клетки в каллусное состояние связан с повторной индукцией деления, способность к которому была утрачена в ходе дифференцировки.

На модели сердцевинной паренхимы табака (СПТ) показано, что отсутствие цитокининов блокирует клеточный цикл в премитотическом периоде: при наличии только ауксина клетки не делятся и после четы-

рехдневной латентной фазы переходят преимущественно к росту растяжением. Цитокинины без ауксинов вызывают сходное старение тканей СПТ, как и среда без гормонов. Вместе с тем результаты, полученные на СПТ, не универсальны: известны случаи каллусообразования при наличии одного гормона, например на среде с 2,4-Д без цитокининов у незрелых зародышей пшеницы или на семядолях подсолнечника на среде с цитокининами без ауксинов. Это объясняют влиянием *эндогенных гормонов* экспланта, то есть особенностями его исходного гормонального статуса. Также обсуждаются представления о возможной роли других индукторов (в том числе полисахаридов) в запуске клеточного деления и каллусогенеза.

Переход к каллусному росту в базальной части апекса может начинаться с остановки клеточных делений. Лаг-фаза длится примерно 24–48 часов: в этот период клетки увеличиваются, ткань разрыхляется, после чего запускаются интенсивные деления и формируется каллус. Следовательно, если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под действием фитогормонов, то дедифференцировка делящейся меристематической клетки может включать предварительную остановку делений, деспециализацию и лишь затем повторную индукцию пролиферации, приводящую к каллусообразованию. Один и тот же гормональный сигнал может вызывать разные эффекты в зависимости от физиологического состояния ткани-мишени; ее «компетентность» во многом определяется степенью дифференцировки клеток.

Переход клетки *in vitro* от дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным делениям сопровождается перестройкой экспрессии генов (включая эпигенетические изменения). Активация одних генов и репрессия других приводит к изменению белкового состава: в каллусных клетках появляются специфические белки, а содержание белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листа, уменьшается или они исчезают.

У двудольных растений процессы репрессии и дерепрессии генов, лежащие в основе дедифференцировки, как правило, протекают легче, чем у однодольных.

При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному, «анархическому» размножению, приводящему к формированию каллуса, в клетках разворачиваются выраженные биохимические и цитологические перестройки. Дедифференцировка начинается с мобилизации запасных веществ и деградации специализированных органелл. Через 6–12 часов после индукции наблюдаются разрыхление и набухание клеточной стенки, увеличение числа свободных рибосом, элементов аппарата Гольджи, а также размеров и количества ядрышек. Эти изменения

предшествуют началу митотических делений, которые обычно стартуют через 48–72 часа. Следует учитывать, что на ранних этапах культивирования метаболические сдвиги могут быть обусловлены не только дедифференцировкой, но и реакциями на травмирование тканей (травматическое синтеза).

Каллусная клетка проходит собственный цикл развития, в котором последовательно проявляются этапы деления, растяжения и дифференцировки, после чего наступают старение и отмирание. Каллусную дифференцировку можно рассматривать как вторичную, однако ее не следует смешивать со вторичной дифференцировкой, лежащей в основе морфогенеза.

Чтобы предотвратить старение, утрату способности к делению и гибель клеток, первичный каллус, образующийся на эксплантах, через 4–6 недель переносят на свежую питательную среду. Эта операция называется *пассированием*. При регулярном пассировании пролиферативная активность культуры может поддерживаться в течение десятков лет.

Рост каллусных клеток характеризуется S-образной (сигмоидной) кривой, наиболее наглядной для суспензионных культур. Ростовая кривая включает пять фаз:

1. *латентная (лаг-фаза)* – увеличение числа клеток или массы практически отсутствует; клетки подготавливаются к делению;

2. *логарифмическая (экспоненциальная)* – максимальная митотическая активность и ускоряющееся нарастание массы культуры;

3. *линейная* – скорость роста становится постоянной;

4. *фаза замедленного роста* – митотическая активность резко снижается;

5. *стационарная* – кривая выходит на плато: начинается деградация клеток, но она еще компенсируется делением, поэтому суммарный прирост клеточной массы близок к нулю.

После стационарной фазы наступает этап отмирания (деградации), в ходе которого число и масса живых клеток постепенно уменьшаются.

### **Особенности каллусных клеток**

Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические свойства, присущие клеткам растения *in vivo*. В частности, они способны синтезировать вторичные метаболиты. Устойчивость к низким температурам и способность к закаливанию сохраняются у каллусных культур, полученных от морозостойких растений, тогда как каллусы тропических и субтропических видов, как правило, такими свойствами не обладают. Следовательно, холодоустойчивость может сохраняться при переходе клетки к каллусному росту. Для каллусных тканей характерна

и фотопериодическая реакция, что связывают с сохранением активности фитохромной системы. Общими с нормальными клетками растения остаются также устойчивость к высоким температурам, осмотически активным веществам и засолению.

Одновременно каллусные клетки приобретают ряд особенностей, отличающих их от специализированных клеток органов растения. В них появляются специфические белки, а содержание белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листа, снижается или исчезает. Каллусные культуры нередко характеризуются выраженной генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью. Поскольку рост выходит из-под контроля организма, пролиферация каллусных клеток становится неорганизованной, асинхронной и потенциально неограниченной; при этом клеточный цикл у каллусных клеток обычно более длительный, чем у растений, растущих в естественных условиях.

Каллусная ткань гетерогенна и по «возрасту» клеток: одновременно присутствуют клетки, находящиеся на разных стадиях клеточного цикла (в частности, в G1-, S- и G2-фазах), что дополнительно усиливает асинхронность культуры.

Значимые отличия отмечаются и в энергетическом обмене. Каллусные клетки, как правило, потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными тканями; аналогичная особенность характерна и для меристематических клеток, то есть может рассматриваться как признак активно делящихся клеток. Дыхательный коэффициент (ДК) у каллусных клеток часто превышает 1, что указывает на смещение баланса между дыханием и брожением в сторону усиления брожения и, соответственно, на ослабление эффекта Пастера. *Эффект Пастера* – это подавление брожения дыханием в присутствии кислорода. При его ослаблении даже при наличии  $O_2$  наряду с аэробным дыханием заметно протекает анаэробное расщепление углеводов (брожение), о чем может свидетельствовать накопление этанола в делящихся клетках.

Митохондрии в каллусных клетках, как и в меристематических, часто развиты слабее: в них меньше крист, что отражается на эффективности аэробного дыхания. У животных опухолевых клеток наиболее выраженное нарушение «аэробного подавления брожения» описано как эффект Варбурга: аэробный гликолиз (интенсивный гликолиз при наличии кислорода) сопровождается резким ростом потребления углеводов. Для активно пролиферирующих растительных клеток также характерны сдвиги путей катаболизма, включая усиление пентозофосфатного пути как источника пентоз и восстановительных эквивалентов, необходимых для деления.

Для уменьшения потемнения эксплантов и некроза, помимо антиоксидантов, часто используют адсорбенты (например, активированный

уголь) и более частые пересадки в первые недели культивирования. Успешность каллусообразования существенно зависит от физиологического состояния донорного растения (возраст, сезон, условия выращивания), поэтому в методических рекомендациях целесообразно отдельно фиксировать требования к донорному материалу.

### ***Гормонезависимые растительные ткани***

Как правило, деление каллусных клеток поддерживается только при наличии фитогормонов в питательной среде. Однако при длительном культивировании в ряде случаев клетки приобретают способность расти на среде без гормонов, то есть становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам. Такие клетки называют «привыкшими», а ткани, сформированные ими, нередко рассматривают как «химические опухоли». В большинстве случаев «привыкшие» ткани, как и опухолевые, утрачивают способность к нормальной регенерации и чаще формируют тератомоподобные структуры, хотя иногда описаны случаи получения нормальных регенерантов.

Следует учитывать, что у многих каллусных культур в процессе пассирования (иногда уже с 4-го пассажа) снижается, а затем утрачивается регенерационная способность; из «старых» пересадочных культур получить растения-регенеранты обычно не удается. Причины «привыкания» однозначно не установлены; вероятно, оно связано с длительным действием гормонов, поддерживающих клетки в дедифференцированном и/или активно пролиферирующем состоянии.

Помимо «привыкших» тканей, существуют *истинные опухоли растительного происхождения*, вызываемые микроорганизмами (бактериями, вирусами), а также *генетические опухоли*, возникающие, например, у некоторых межвидовых гибридов. Наиболее распространены и наиболее изучены *корончатые галлы*, индуцируемые у двудольных растений агробактериями *Agrobacterium tumefaciens*. Также описаны *бородатый корень* (заболевание, вызываемое *A. rhizogenes*) и *стеблевой галл*, вызываемый *A. rubi*, сходный по проявлениям с корончатым галлом.

Общее свойство «привыкших» и опухолевых тканей – *гормонезависимость*, то есть способность расти на средах без гормонов, что отличает их от обычных каллусных культур, для которых гормональная подпитка является необходимым условием пролиферации и дедифференцировки. В «привыкших» и опухолевых тканях обычно наблюдается интенсивный *эндогенный синтез* собственных гормонов, поэтому внешнее внесение ауксинов и цитокининов не требуется. Внешне гормонезависимые ткани часто мало отличаются от обычного каллуса; их ключевое отличие – приобретенная автономность за счет собственного гормоногенеза.

Механизмы формирования гормонезависимости различаются:

- у «привыкших» тканей автономность связывают с изменениями регуляции генов, контролирующих синтез ферментов гормонального метаболизма (эпигеномные перестройки), хотя возможность мутаций полностью не исключают. Для различения эпигенетической и генетической природы предлагают проверку в ряду «клетка → растение → клетка»: если после регенерации и повторного введения экспланта в культуру автономность сохраняется, признак, вероятно, наследуем (генетичен); если не сохраняется – более вероятен эпигенетический характер. Ограничение метода в том, что большинство «привыкших» культур как раз плохо регенерирует.

- у *агробактериальных опухолей* гормонезависимость обусловлена переносом бактериального генетического материала в растительную клетку. Было показано, что даже после удаления бактерий опухолевая ткань сохраняет способность к автономному росту. Позднее установлено, что опухолеобразование связано с Ti-плазмидой: определенный фрагмент Т-ДНК интегрируется в ядерную ДНК растения и становится частью наследственного аппарата трансформированных клеток, обеспечивая экспрессию генов, контролирующих синтез ауксинов и цитокининов. Именно эта гормональная автономность запускает дедифференцировку и пролиферацию, приводя к формированию опухоли.

Ti-плазида рассматривается как *природный вектор* переноса генов в растения. Мутагенез и генетический анализ показали, что опухолевый рост обусловлен не одним локусом, а комплексом генов в составе Т-ДНК, влияющих на гормональный статус клетки.

Помимо гормонов, Т-ДНК детерминирует синтез специфических соединений – *опинов*, которые практически не встречаются в нормальных тканях и могут рассматриваться как биохимические маркеры корончатых галлов. Опины служат питательными веществами для агробактерий, однако их синтез продолжается и в стерильных опухолевых культурах. Описаны различные типы опинов (например, нопалин, октопин, агропин), причем разные штаммы могут индуцировать опухоли с различными профилями опиногенеза.

Таким образом, первое общее свойство «привыкших» и агробактериально-индуцированных опухолевых тканей – *гормональная автономность*, связанная со способностью интенсивно синтезировать ауксины и цитокинины: в галлах – вследствие интеграции бактериальной Т-ДНК, в «привыкших» тканях – преимущественно вследствие перестроек регуляции генов (чаще эпигенетической природы). Второе общее свойство – *снижение или утрата регенерационной способности*: галловые опухоли обычно не регенерируют нормальные растения и иногда формируют тератомы; «привыкшие» ткани также часто теряют потенциал морфогенеза,

хотя в отдельных случаях подбор сред позволяет отодвинуть порог «привыкания» и получить регенеранты.

В биотехнологии агробактериальные системы, включая культуры «бородатого корня» (*hairy roots*, индуцированные *A. rhizogenes*), важны не только как модели патогенеза, но и как удобные и относительно стабильные платформы для получения вторичных метаболитов, поскольку такие корневые культуры часто быстро растут *in vitro* и сохраняют высокий уровень синтеза целевых соединений.

### **Культура клеточных суспензий**

Клеточную суспензию обычно получают из каллуса, перенося его в жидкую питательную среду и обеспечивая автоматическое перемешивание (встряхивание). Суспензионную культуру можно получать и непосредственно из ткани экспланта (лист, стебель, корень и т.п.) при использовании ферментов, например пектиназы: первоначально на поверхности экспланта формируется каллус, после чего от него отделяются отдельные клетки и небольшие агрегаты, образуя суспензию. Для приготовления 100 мл клеточной суспензии, как правило, используют около 2–3 г свежей каллусной ткани.

Обязательное условие культивирования суспензий – постоянное перемешивание или встряхивание. При отсутствии движения среды деление клеток приводит к образованию каллусной ткани и выпадению агрегатов в осадок. Пролиферация суспензионных клеток поддерживается при наличии ауксинов и цитокининов, то есть тех же гормонов, которые необходимы для индукции и роста каллуса; поэтому суспензионные культуры по сути представлены типичными каллусными клетками и сохраняют основные свойства каллусных культур.

Суспензии лучше формируются из рыхлого каллуса, получаемого на средах с 2,4-Д. Суспендирование может облегчаться при снижении содержания кальция в среде; еще более выраженный эффект дает добавление пектиназы, разрушающей пектат кальция, «склеивающий» соседние клетки.

В биотехнологии суспензионные культуры используют:

- для получения вторичных метаболитов (в том числе лекарственных веществ);
- для промышленного наращивания клеточной биомассы;
- для клеточной селекции;
- как исходный материал для получения изолированных протопластов.

При использовании суспензий как продуцентов вторичных соединений применяют закрытые и открытые системы культивирования, работающие в периодическом или проточном (непрерывном) режимах. В *закрытой* системе суспензия не получает притока свежей среды до конца

цикла выращивания, тогда как в *открытой* системе среду частично или полностью заменяют на свежую. При замене среды в открытых системах вместе с питательной средой неизбежно удаляется и часть клеток, что учитывают при расчетах режима культивирования.

Для работы с суспензиями важно контролировать их основные характеристики:

- жизнеспособность;
- плотность клеток;
- степень агрегированности;
- скорость роста.

Жизнеспособность часто оценивают по окрашиванию (метиленовая синь, синь Эванса): живые клетки, как правило, не окрашиваются из-за непроницаемости мембран, тогда как мертвые клетки легко поглощают краситель и становятся синими. Плотность клеток определяют в счетной камере Фукса-Розенталя под микроскопом после мацерации (разделения клеток). В качестве мацерирующего агента используют 10–20%-ную хромовую кислоту, гидролизующую срединные пластинки, соединяющие клетки.

Хорошо растущая суспензия, как и каллус, характеризуется S-образной кривой роста. Обычно длительность пассажа составляет 14–16 дней, при этом плотность клеток может возрастать от порядка  $5 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. Для субкультивирования суспензию обычно отбирают в конце экспоненциальной фазы. Увеличение числа клеток, сырой и сухой массы – основные критерии оценки роста.

Качество суспензии во многом определяется агрегированностью: желательно, чтобы агрегаты не превышали 10–12 клеток. Для удаления крупных агрегатов суспензии фильтруют через марлю, нейлоновые или металлические фильтры; это одновременно позволяет удалить остатки экспланта и плотные фрагменты каллуса.



Рис. 9. Биореактор

Суспензионные культуры могут быть источником как «классических», так и необычных вторичных метаболитов (например, камптотецина, харрингтонины и других соединений с противоопухолевой активностью), а также некоторых пептидов (ингибиторы протеаз, ингибиторы фитовирусов и др.). Важно учитывать, что рост (накопление биомассы) и синтез вторичных метаболитов часто разобщены во времени: максимум синтеза вторичных соединений обычно приходится на стационарную фазу.

При промышленном культивировании суспензий в биореакторах критичны параметры аэрации, перемешивания и сдвиговых нагрузок: чрезмерное перемешивание может разрушать клетки и агрегаты, а недостаточное – ухудшать газообмен и приводить к оседанию биомассы.

Также важно различать рост биомассы и накопление вторичных метаболитов: часто применяют двухстадийные схемы (I стадия – рост; II стадия – «продукционная», с изменением гормонов/сахара/стресс-факторов), чтобы повысить выход целевого продукта.

### ***Культура одиночных клеток***

Для генетических и физиологических исследований, а также для задач клеточной селекции особую ценность представляет культивирование отдельных клеток. Получение клона – потомства одной клетки – позволяет анализировать причины генетической неоднородности каллусных культур, поскольку наблюдения ведутся не на ткани, сформированной из гетерогенного экспланта, а на потомстве одной исходной клетки.

Культивирование одиночной гибридной клетки, выделенной из культуры протопластов, дает возможность получить клон гибридных клеток. Это существенно упрощает работу, так как устраняет необходимость трудоемкого отбора гибридного потомства среди негибридных клеток, а также делает более наглядным сам процесс соматической гибридизации при наблюдении за одиночными протопластами.

Одиночные клетки выделяют:

- из клеточных суспензий;
- из тканей растений (например, из мезофилла листа после мацерации ферментами);
- из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

Для получения одноклеточной фракции суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15–30 минут: крупные агрегаты оседают, а надосадочная фракция содержит одиночные клетки или мелкие агрегаты. Если этого недостаточно, используют:

- мацерирующие ферменты;
- центрифугирование в градиенте сахарозы;
- фильтрация через нейлоновые или металлические сита.

Основная трудность культивирования одиночных клеток связана с тем, что изолированная клетка часто не делится в условиях, при которых хорошо растет каллусная ткань. Для стимуляции делений разработаны специальные подходы. В 1960 г. Джонсон предложил метод «няньки», когда роль стимулирующего фактора выполняют кусочки каллуса, отделенные фильтровальной бумагой: в присутствии такой «няньки» одиночная клетка начинает делиться и образует индивидуальную колонию – клон.

Другой метод основан на культивировании в очень малых объемах богатой питательной среды – в микрокапле (около 20 мкл) в чашке Купрака; этот подход предложен академиком Ю. Ю. Глебой и удобен для наблюдения за делением клеток, в том числе при соматической гибридизации.

Для индукции делений применяют также «*кормящий слой*» – активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида, а также *кондиционирование среды*: добавляют фильтрат среды от интенсивно растущей культуры (обычно суспензию в экспоненциальной фазе, профильтрованную через бактериальный фильтр). По сути, все эти методы опираются на действие комплекса выделений делящихся клеток – «кондиционирующего фактора», представляющего собой не одно соединение, а совокупность факторов, поддерживающих пролиферацию одиночной клетки.

### **Морфогенез каллусных тканей**

После дедифференцировки развитие клетки может идти по нескольким направлениям. Первый путь – *вторичная дифференцировка с регенерацией растения*, когда возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей и органов вплоть до восстановления целого растения. Второй путь – *утрата способности к вторичной дифференцировке и регенерации* при стойкой дедифференцировке и приобретении гормонанезависимого роста (переход к «опухоловому» типу); такие признаки нередко характерны для клеток старых пересадочных культур. Третий путь – «*нормальный*» цикл каллусной клетки, завершающийся старением и отмиранием: клетка проходит вторичную дифференцировку, прекращает деление (стационарная фаза), однако эта дифференцировка не приводит к морфогенезу, а закрепляет признаки «старой» каллусной клетки.

Наибольший практический и теоретический интерес представляет регенерация целого растения из одной клетки; иногда этот процесс реализуется через промежуточное образование отдельных органов.

В культуре каллусных тканей *морфогенез* понимают как возникновение организованных структур из неорганизованной клеточной массы. Выделяют два основных типа морфогенеза:

- *органогенез* – формирование монополярных структур, то есть отдельных органов (корней, побегов/стеблей, реже листьев или цветочных структур). Как правило, сначала формируются органы, а затем из них – целые растения (исключение составляет корневой органогенез, который чаще не ведет к восстановлению полноценного растения);

- *соматический эмбриогенез* – образование биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток. В отличие от органогенеза, здесь сразу формируется «зародыш» с меристемой корня и меристемой побега, из которого затем развивается целое растение.

Способность отдельной соматической клетки реализовать полный потенциал развития и дать начало новому организму называют *тотипотентностью*. Потенциально любая растительная клетка содержит полный набор генов и, следовательно, «программу» развития, аналогичную зиготе. Однако на практике тотипотентность реализуется не всегда: у разных типов клеток степень репрессии генов различна, что ограничивает проявление этого потенциала. Идея тотипотентности была предложена Г. Хаберландтом еще в 1902 г.: по его представлениям, каждая клетка способна дать начало новому организму, а отсутствие регенерации в норме связано с «подавлением» потенциалов клеток целостным организмом; изоляция клеток способствует их проявлению.

Клеточной основой морфогенеза является *цитодифференцировка*. Регенерация начинается со *вторичной дифференцировки*, при которой клетки вновь приобретают специализированные структуры и функции. Однако вторичная дифференцировка не всегда приводит к морфогенезу: иногда она ограничивается формированием тканей (*гистодифференцировка*).

В основе дифференцировки и морфогенеза лежит *последовательное включение и выключение генов*; клеточная специализация определяется дифференциальной активностью генов. Изменения активности структурных генов могут быть связаны с их депрессией, репрессией или амплификацией, а важнейшую роль в переключении программ развития играют фитогормоны. В онтогенезе высших организмов активна лишь небольшая доля генов (порядка нескольких процентов), при этом набор активных генов включает «обязательные» гены клеточного метаболизма и гены, специфичные для органа, ткани, типа клеток, стадии развития или ответа на условия среды.

Молекулярные механизмы передачи информации от гена к белку (транскрипция, транспорт РНК, трансляция) изучены достаточно под-

робно, тогда как регуляция экспрессии по всей цепочке – от сигналов, запускающих активацию (репрессию), до формирования устойчивых программ дифференцировки и развития – во многих аспектах остается недостаточно раскрытой. Расширение знаний о структуре геномов растений, клонирование функционально значимых генов и применение методов точной генетической инженерии способствуют более глубокому пониманию регуляции развития.

Морфогенез в культуре каллусных тканей в значительной степени управляем. На способность клеток к морфогенезу влияют:

- *внутренние факторы*: видовые особенности исходного растения, орган-донор, возраст и физиологическое состояние экспланта;
- *внешние факторы*: состав питательной среды (включая гормональные соотношения), температура, свет (интенсивность и фотопериод).

Наиболее сильным индуктором морфогенеза (стимулом, или сигналом морфогенеза) считается изменение соотношения цитокининов и ауксинов в питательной среде. При преобладании цитокининов над ауксинами чаще запускается *побеговый (стеблевой) органогенез*, тогда как при преобладании ауксинов над цитокининами – *корневой органогенез*. Следует учитывать, что из корней, формирующихся в каллусной культуре, целое растение регенерирует крайне редко. При побеговом органогенезе сначала образуется побег, который затем при переносе на среду с повышенной долей ауксинов укореняется и дает начало полноценному растению.

Таким образом, баланс экзогенных ауксинов и цитокининов, с одной стороны, определяет вероятность дедифференцировки и перехода к неорганизованной пролиферации (каллусный рост), а с другой – индукцию вторичной дифференцировки и направление морфогенеза. Следовательно, ауксины и цитокинины выступают не только регуляторами роста, но и важными регуляторами дифференцировки.

Если органогенез удастся целенаправленно индуцировать изменением уровней ауксинов и/или цитокининов, то *соматический эмбриогенез* во многих случаях значительно менее зависим от экзогенных фитогормонов. Эмбриогенные зоны нередко формируются на той же среде, которая использовалась для каллусообразования, а развитие соматических зародышей часто начинается после устранения из среды дедифференцирующего фактора (например, 2,4-Д или других ауксинов). Развивающийся зародыш, как правило, не нуждается во внешнем гормональном обеспечении, поскольку способен формировать собственный гормональный статус.

Относительная независимость соматического эмбриогенеза от добавленных гормонов рассматривается как аргумент в пользу того, что

сама изоляция клетки от целостного организма может стимулировать проявление тотипотентности и переход к морфогенезу. В итоге основными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей выступают:

1. изменение соотношения фитогормонов в питательной среде;
2. сам факт изоляции клеток/тканей *in vitro*.

К дополнительным факторам, способным усиливать морфогенез, относят добавление в среду нитрата серебра и нитрата аммония, некоторых аминокислот (пролин, тирозин, иногда серин), а также полиаминов (путресцин, спермидин). Гибберелловая кислота обычно стимулирует рост зачатков побегов, тогда как абсцизовая кислота может ускорять созревание и дифференцировку органов соматических зародышей.

Под действием того или иного стимула каллусная клетка должна перейти в детерминированное состояние, однако на путь регенерации становится лишь небольшая доля клеток – порядка одной из 400–1000. Следовательно, одного наличия индуктора морфогенеза недостаточно: клетка должна быть готова ответить на сигнал. Способность воспринимать морфогенетические стимулы называют компетентностью. Считают, что формирование компетентности носит во многом случайный характер, чем и объясняется ее редкость.

Возникает вопрос о судьбе тех каллусных клеток, которые остаются некомпетентными и не способны детерминироваться. В пересадочной культуре такие клетки продолжают делиться и нередко, вероятно, смещаются в сторону гормоннезависимого роста. Однако далеко не все каллусные ткани со временем приобретают гормоннезависимость: многие из них, сохраняя зависимость от экзогенных гормонов, постепенно полностью утрачивают регенерационную способность. Подобные культуры занимают промежуточное положение между «свежими» каллусами и «привыкшими» тканями.

Морфогенез в каллусной ткани начинается с того, что при соответствующих условиях детерминирования клетка обособляется от окружающих клеток, формируя утолщенную клеточную стенку. Инициальная клетка при соматическом эмбриогенезе дает начало зародышеподобной структуре, а при органогенезе – меристематическому очагу. От недетерминированных каллусных клеток инициальная отличается более крупным ядром и меньшими вакуолями; ядро чаще занимает центральное положение. В таких клетках обычно накапливаются запасные вещества (крахмал, иногда липиды).

Некоторое время инициальные клетки остаются в лаг-фазе, что необходимо для перестройки и подготовки к последующим быстрым делениям. Затем они делятся по типу дробления, формируя массу мелких изодиаметрических клеток. При органогенезе эту массу называют

*меристематическим очагом*, а при соматическом эмбриогенезе – *глобулярным проэмбрио*. Далее в меристематическом очаге закладываются органы (побег, корень, лист или цветочная почка), что определяет соответствующий тип органогенеза. В глобулярном проэмбрио формируется биполярная эмбриоидная структура. В развитии соматических эмбриоидов обычно выделяют последовательные стадии: *глобулярную*, *«сердечка»*, *«торпедо»* и *соматического зародыша*. Меристематические очаги и проэмбрио могут располагаться как на периферии каллуса, так и внутри его массы; выраженной закономерности локализации, как правило, не наблюдают.

Переход каллусных клеток к морфогенезу сопровождается существенной перестройкой метаболизма. Морфогенезу может предшествовать появление специфических белков-антигенов. Гликопротеид, выделенный из эмбриогенных культур, рассматривают как вариант *кондиционирующего фактора*: при частых пересадках на свежую среду, где он не успевает накапливаться, эмбриогенез может не развиваться. Если такой белок выделить и внести в длительно пассируемые (неэмбриогенные) каллусные культуры, у которых «гены морфогенеза» не активны или утрачены, то в ряде случаев удастся индуцировать переход к морфогенезу.

Клетки меристематических очагов и клетки, иницирующие эмбриоидные структуры, отличаются от типичных каллусных клеток повышенной интенсивностью синтеза РНК и ДНК, что отражает особенности их белкового обмена. Биохимические изменения в этих клетках во многом сходны с процессами, наблюдаемыми при дедифференцировке, однако приводят к иным результатам – запуску программ морфогенеза.

Переход к морфогенезу в каллусных культурах сопровождается перестройкой дыхательного метаболизма: в целом усиливается дыхание (по выделению  $\text{CO}_2$ ), но изменяется его направленность в сторону интенсификации пентозофосфатного пути, а также возрастает активность дыхательных ферментов. За биохимическими изменениями следует структурная реорганизация: биохимическая дифференцировка всегда предшествует структурной. В клетках, вступивших на путь морфогенеза, увеличивается число рибосом и митохондрий, изменяется их внутренняя организация.

Процессы в каллусных тканях протекают асинхронно и растянуты во времени: в одной и той же культуре могут одновременно присутствовать как уже сформированные организованные структуры, так и клетки, только начинающие переход к морфогенезу.

Высокая синтетическая активность клеток меристематического очага и глобулярного проэмбрио делает их своеобразными «аттрагирующи-

ми центрами», к которым направляются питательные вещества. Окружающие каллусные клетки при этом часто деградируют, а формирующиеся эмбриониды нередко легко отделяются и «выпадают» из каллусной массы.

Каллусные клетки обычно слабо связаны между собой: плазмодесмы отсутствуют либо резко редуцированы. При формировании зародышеподобных структур или меристематических очагов межклеточные контакты могут восстанавливаться, в том числе за счет повторного формирования плазмодесм.

Изменения, сопровождающие морфогенез и завершающиеся регенерацией растения из каллусной клетки, контролируются определенными генами. Генетическая обусловленность морфогенетической активности объясняет, почему для ряда генотипов *in vitro* регенерация не удается или идет крайне слабо. Повышению регенерационной способности может способствовать скрещивание генотипов, демонстрирующих высокую морфогенетическую активность в культуре.

Для увеличения частоты регенерации применяют приемы «стресс-индукции» (контролируемые температурные и/или осмотические воздействия), а также добавление отдельных факторов (например, полиаминов или ионов серебра). Однако эффективность строго видоспецифична и требует экспериментальной оптимизации.

### **Клонирование**

Клонирование – это процесс получения клонов, то есть организмов (или клеточных культур) с одинаковым генотипом. Оно открывает широкие возможности для целенаправленной модификации геномов микроорганизмов, растений и животных, поскольку позволяет воспроизводить выбранный биологический объект в виде множества генетически идентичных копий.

В биотехнологии термин «клонирование» используют в двух основных значениях:

1. *клональное размножение* организмов или клеток (получение генетически одинаковых особей/культур);

2. *молекулярное клонирование* – получение множества копий определенного фрагмента ДНК в составе вектора (например, плазмиды) для последующего анализа или экспрессии.

Для генетиков растений получение клонов, как правило, не представляет сложности. В природе генетические копии материнского организма могут формироваться при *апомиксисе*, однако этот механизм характерен лишь для ограниченного числа видов; у большинства растений преобладает половое размножение. Вместе с тем методы искусственного клонирования растений разработаны давно: при удалении клеточной

стенки (получении протопласта) и последующей обработке ростовыми факторами клетка способна делиться, образуя колонии и каллус, а затем, при соответствующих условиях, регенерировать целое растение.

У животных естественное клонирование возможно при *партеногенезе*, то есть развитии без оплодотворения. Клоны получают и в экспериментальной эмбриологии: например, если зародыш морского ежа на ранней стадии дробления разделить на отдельные бластомеры, каждый из них может дать начало целому организму.

Ключевым этапом в развитии технологий модификации геномов животных стало клонирование на основе *переноса ядра соматической клетки* в энуклеированную (лишенную ядра) яйцеклетку – фактически замены генома ооцита геномом, взятым от другого животного.

Истоки экспериментов по клонированию животных восходят к работам 1940-х годов, когда российский ученый Г. Лопашов разработал метод пересадки ядер в яйцеклетки лягушки; в результате могли развиваться особи, генетически соответствующие донору ядра. В дальнейшем были получены клоны у млекопитающих, включая мышей.

В 1997 году было сообщено о создании в Эдинбурге (Шотландия) овцы Долли – первого широко известного успешного случая клонирования млекопитающего методом переноса ядра соматической клетки. Ооциты овец породы шотландская черномордая подвергали энуклеации (удалению ядра), затем с энуклеированными яйцеклетками сливали ядро соматической клетки, взятое из молочной железы лактирующей овцы. Полученную реконструированную яйцеклетку активировали электрическим импульсом, культивировали около 6 дней и переносили в матку суррогатной матери. Из 236 попыток успешной оказалась одна, что подчеркивает низкую эффективность метода. Она во многом определяется качеством ооцитов, стадией клеточного цикла донора ядра и успешностью «перепрограммирования» соматического генома в цитоплазме яйцеклетки; основные трудности связаны именно с неполным эпигенетическим перепрограммированием.

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Проблема генетической вариабельности или стабильности объектов *in vitro* исключительно важна при выборе используемых клеточных технологий. Она определяет как возможность «клонального» сохранения ценных генотипов (микроразмножение, криосохранение), так и эффективность получения новых форм (клеточная селекция, соматическая гибридизация, мутагенез *in vitro*).

В зависимости от цели представляют ценность:

- технологии, позволяющие стабильно воспроизводить исходный генотип,
- технологии, использующие спонтанную и индуцированную вариабельность генотипов.

При этом важно разграничивать «желательную» вариабельность (как источник селекционного материала) и «нежелательную» (как фактор, ухудшающий сортовую чистоту и воспроизводимость результатов).

Клеточные технологии открывают принципиально новые возможности для создания генетического разнообразия и отбора форм с заданными признаками. Они позволяют формировать вариабельность и проводить селекцию вне рамок полового процесса, а также отбирать, фиксировать и стабилизировать ценные генотипы методами, отличающимися от традиционных подходов. В практическом отношении это означает возможность ускорения селекции, расширения доступного генофонда и преодоления барьеров нескрещиваемости, а также проведения отбора на ранних этапах – на уровне клеток и тканей.

В эту группу входят следующие виды технологий:

- использование соматоклональных вариантов и получение индуцированных мутантов на клеточном уровне; клеточная селекция;
- гибридизация соматических клеток;
- перенос чужеродных цитоплазматических генов;
- перенос чужеродной генетической информации в виде бактериальных клеток, вирусов и макромолекул;
- адресованный перенос ядерных генов.

Отдельным пунктом можно выделить технологии получения гаплоидов и двойных гаплоидов (DH) как способ быстрого «фиксирования» полученного разнообразия в виде гомозиготных линий.

Термин «*сомаклональная изменчивость*» (изменчивость, возникающая в культуре клеток и тканей) вошел в употребление в 1981 г., хотя само явление неоднократно описывалось и ранее. Соматические изменения, проявляющиеся у регенерантов, могут иметь *генетическую* или *эпигенетическую* природу. Генетические отклонения наследуются и нередко отражают уже имеющиеся изменения в клетках исходного экспланта, хотя возможны и новые мутации. Эпигенетические изменения (например, перестройки метилирования ДНК и модификаций гистонов) часто обратимы и не всегда сохраняются при прохождении цикла «клетка → растение → клетка», но при этом способны существенно влиять на фенотип регенерантов.

Сомаклональная изменчивость можно определить как *фенотипическое проявление нестабильности ядерного и органелльного (цитоплазматического) геномов*, возникающее у растений, полученных путем регенерации из клеток, культивируемых *in vitro*. Сомаклоны, в которых изменения закреплены на генетическом уровне, называют *сомаклональными вариантами*. Сомаклональная изменчивость рассматривается как важный источник генетического разнообразия при создании новых форм растений, поскольку сомаклональные варианты могут быть генетически стабильными и наследственно передавать хозяйственно ценные признаки.

Важно подчеркнуть, что спектр сомаклональных изменений очень широк: он включает точечные мутации, хромосомные перестройки, изменения числа хромосом (плоидности), вариации органелльных геномов и изменения их взаимодействия с ядерным геномом.

Сомаклональные варианты получены у многих сельскохозяйственно значимых культур, включая пшеницу, рис, кукурузу, картофель, люцерну, лен, томаты и др. Наиболее результативным этот подход обычно оказывается для объектов, у которых отработаны эффективные схемы регенерации (получение эмбрионного каллуса, соматический эмбриогенез, высокая частота морфогенеза).

Использование соматического пути вместо полового для создания генетического разнообразия зависит от:

- возможности регенерировать растение из генетически измененных клеток
- способности экспериментально манипулировать состоянием стабильности или изменчивости генетического материала клеток и тканей *in vitro*.

В методическом отношении это означает необходимость: 1) контролировать условия, повышающие/снижающие вариабельность; 2) использовать инструменты мониторинга стабильности (кариотипирование,

проточная цитометрия, молекулярные маркеры); 3) выстраивать схему подтверждения наследуемости признака на уровне потомства.

Условия культивирования, прежде всего нарушение гормонального баланса питательной среды, являются одной из причин формирования генетического разнообразия в культурах клеток. Соотношение фитогормонов в среде во многом определяет цитогенетическую структуру клеточных популяций. Повышенные концентрации БАП, 2,4-Д, кинетина и НУК могут способствовать полиплоидизации клеток (увеличению доли тетраплоидных и октоплоидных клеток) и появлению триплоидных и анеуплоидных форм. Существенную роль играют также длительность поддержания культуры и частота пересадок: чем дольше каллус или суспензия культивируются *in vitro*, тем выше вероятность накопления кариотипических и молекулярных изменений.

Морфологическая и цитогенетическая неоднородность клеточных популяций может быть обусловлена видовой и возрастной спецификой экспланта, а также влиянием отдельных компонентов среды – минеральных солей, сахарозы (или иного источника углерода), витаминов, растительных экстрактов и режимов культивирования. Изоляция тканей от исходного растения и длительное выращивание *in vitro* представляют собой стресс для клеток. Различные стрессовые воздействия (осмотическое, окислительное, температурное, световое) способны активировать мобильные генетические элементы и повышать частоту генетических перестроек, что нередко рассматривают как один из механизмов соматической изменчивости.

Цитологические исследования показывают, что вариабельность, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*, во многих случаях связана с генетическими изменениями, включая нарушения в программах экспрессии генов, и может носить наследственный характер. Для объяснения механизмов соматической изменчивости предложен ряд гипотез: изменения кариотипа, микроперестройки хромосом, перестройки генома вследствие перемещения мобильных генетических элементов, соматический кроссинговер, генные перестройки, связанные с процессами дифференцировки, и др.

Основным источником фенотипических изменений чаще всего считают кариологические сдвиги и хромосомные перестройки. Однако заранее определить, какие именно изменения дадут выраженный фенотипический эффект и будут наследоваться как стабильные мутации, трудно. Существенные изменения признаков могут вызывать как «грубые», так и «тонкие» aberrации – небольшие делеции и дупликации, транслокации, инверсии и другие перестройки, проявляющиеся у растений-регенерантов и в последующих поколениях. В целом соматическая изменчивость

может обнаруживаться на кариотипическом, морфологическом, биохимическом и молекулярном уровнях.

С практической точки зрения важно включать этап верификации: признак, выявленный *in vitro*, должен подтверждаться у растений-регенерантов, а затем – в последующих поколениях (самоопыление/скрещивание) и/или в полевых испытаниях. Это особенно важно потому, что часть вариаций может быть «культура-специфичной» и проявляться преимущественно в условиях *in vitro*.

Введение соматических клеток в культуру *in vitro* за счет процессов соматональной изменчивости потенциально может приводить к восстановлению у регенерантов широкого спектра генетического полиморфизма, характерного для вида (а иногда и для более высокого таксономического уровня). Это открывает возможности для выявления и сохранения вариативности, которая могла быть утрачена или «сужена» при длительной селекции. Вместе с тем корректная оценка таких вариантов требует последовательной проверки как в лабораторных условиях, так и на этапах выращивания растений *ex vitro* и в полевых испытаниях.

Вместе с тем соматональная изменчивость может быть серьезной проблемой при размножении ценных генотипов и их длительном хранении, когда требуется максимальная генетическая идентичность регенерированных клонов. Поэтому изучение факторов, индуцирующих вариативность, важно как для целенаправленного повышения, так и для снижения соматональной изменчивости.

Для уменьшения изменчивости обычно применяют комплекс мер: минимизируют длительность каллусной стадии, отдают предпочтение меристемной культуре, снижают концентрации 2,4-Д и ограничивают срок его использования, сокращают число пассажей, стандартизируют донорный материал (возраст, физиологическое состояние, условия выращивания), а также регулярно контролируют ploидность и диагностические (маркерные) признаки.

Напротив, для расширения спектра изменчивости у растений, культивируемых *in vitro*, часто используют длительно пассируемые каллусные культуры. Каллусная ткань – доступный и удобный объект, поэтому она наиболее широко применяется в клеточной селекции. В природных условиях каллус является одним из типов тканей, формирующихся при заживлении механических повреждений, и способность к его образованию присуща всем высшим растениям. Каллусная культура *in vitro* представляет собой неорганизованную пролиферирующую ткань, состоящую из дедифференцированных клеток. На практике обычно работают с первичным или пересадочным каллусом, который сохраняет регенерационную способность в течение ряда субкультивирований.

### **Генетика каллусных клеток**

Долгое время считалось, что каллусные клетки генетически однородны. Однако уже в 1960-е годы было показано, что клетки каллусной ткани характеризуются выраженной генетической гетерогенностью.

Геномы клеток, интегрированных в организованные ткани, как правило, относительно стабильны: при культивировании даже на средах со стимуляторами роста спонтанные мутации возникают не чаще, чем в популяциях растений того же вида. Однако в процессе каллусообразования у экспланта появляются генетические варианты. Вероятно, утрата стабильности связана с переходом дифференцированной клетки, находившейся под контролем межклеточных взаимодействий, в пролиферирующую каллусную клетку, рост и деление которой в большей степени определяются условиями культивирования.

В популяциях каллусных клеток, особенно при длительном выращивании *in vitro*, изменчивость нарастает, а фенотипы, лучше приспособленные к данным условиям, получают селективное преимущество и постепенно «вытесняют» другие варианты.

Генетическая неоднородность каллуса проявляется прежде всего в изменениях пloidности – различиях по числу хромосом. Наиболее генетически стабильными *in vitro* обычно остаются меристематические ткани. В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки с диплоидным набором, соответствующим исходному растению, а также полиплоидные клетки (3-, 4-, 5-кратные и более наборы хромосом). Наряду с полиплоидией нередко наблюдается анеуплоидия – увеличение или уменьшение числа хромосом на несколько единиц.

Чем дольше поддерживается культура, тем выше степень разнообразия по пloidности. Например, в длительно культивируемых каллусах табака через несколько лет могут практически исчезать диплоидные клетки, уступая место полиплоидным и анеуплоидным формам. Это можно объяснить влиянием условий культивирования (включая состав питательной среды), которые способствуют кариотипическим сдвигам. Возможна и другая интерпретация: полиплоидные клетки часто имеют более короткую лаг-фазу и быстрее переходят к делению, вследствие чего получают преимущество при последующих пассажах. На практике, вероятнее всего, действуют оба механизма одновременно – и индукция изменений средой, и отбор более «быстрорастущих» вариантов в культуре.

Помимо изменений пloidности, культивирование клеток и тканей растений *in vitro* нередко сопровождается возникновением *хромосомных aberrаций*. Такие нарушения отражаются на биологических свойствах культуры: изменяются внешний вид ткани, особенности обмена веществ

и скорость роста. Наряду с абберациями, различимыми при микроскопировании, могут возникать и изменения, которые цитологически не являются: они затрагивают небольшие участки хромосом или структуру отдельных генов. *Генные мутации* обычно обнаруживают по изменениям морфологии, физиологических и биохимических характеристик клеток и регенерантов.

Основные причины генетической нестабильности культивируемых клеток:

1. *Генетическая неоднородность исходного материала (гетерогенность экспланта)*. У многих растений в дифференцированных тканях могут присутствовать клетки с различной ploидностью, тогда как активно пролиферирующие ткани в онтогенезе (верхушечные меристемы, камбий и др.) обычно сохраняют диплоидность и потому более стабильны *in vitro*.

2. *Длительное пассирование культур*. Продолжительное поддержание каллусных и суспензионных культур способствует накоплению генетических изменений, включая неравномерные сдвиги ploидности, появление анеуплоидий и различных перестроек.

3. *Нарушение коррелятивных связей при изоляции тканей*. Отрыв участка ткани от целостного организма и перенос на искусственную среду приводит к разрыву регуляторных взаимодействий (межклеточных и гормональных), что может запустить нестабильность генетического аппарата и перестройки.

4. *Воздействие компонентов питательной среды, прежде всего фитогормонов*. Для каллусообразования в среду обязательно вводят ауксины и цитокинины; их потенциальное мутагенное действие описано в ряде работ. Особенно часто подчеркивают роль 2,4-Д как одного из наиболее «активных» факторов, а цитокинины (например, кинетин) связывают с тенденцией к полиплоидизации. Кроме фитогормонов, на стабильность влияют и другие параметры среды: источник и концентрация углерода (включая осмотический компонент), а также азотное питание (соотношение аммония и нитрата), определяющее интенсивность метаболизма и выраженность стресс-ответа.

Сформированное таким образом генетическое разнообразие каллусных клеток имеет прикладное значение: оно позволяет использовать клеточные культуры в клеточной селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам среды и фитопатогенам, а также на признаки повышенной продуктивности.

Неорганизованно растущая каллусная ткань обычно включает три группы клеток – мелкие, средние и крупные. При пассировании на среды с индукторами органогенеза именно мелкие клетки чаще всего первыми

вступают в деление и формируют *меристематические очаги*. Дальнейшая пролиферация клеток этих очагов может приводить либо к образованию почек с последующим развитием побегов, либо к ризогенезу. Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом, как правило, более компактны и структурированы; нередко они имеют зеленые, хлорофиллсодержащие участки.

При длительном культивировании каллуса и особенно при индукции побегообразования в клеточных популяциях могут накапливаться кариотипические изменения (структурные перестройки хромосом, анеуплоидия, полиплоидия), что повышает вероятность получения форм, измененных по комплексу морфологических, биохимических и физиологических признаков.

Любой фрагмент растения представляет собой мозаичную систему тканей. Поэтому в зависимости от того, какая ткань фактически инициирует каллусообразование, даже каллусы, полученные из «одинаковых» эксплантов, будут гетерогенны и могут заметно различаться. Полностью идентичных эксплантов в строгом смысле в природе не существует; следовательно, неоднородность исходного материала (видовая, возрастная, физиологическая) заранее предопределяет разнокачественность клеток в культуре *in vitro*.

Соматоклональная вариабельность – особое явление, при котором частота изменений в популяции культивируемых клеток может существенно превосходить частоту спонтанных мутаций в природных популяциях. При изоляции клетки от целого организма и переносе в условия *in vitro* в значительной мере ослабляется действие тканевых и организменных регуляторных систем, поддерживающих стабильность генома. «Выключение» этих уровней контроля сопровождается ростом цитогенетической вариабельности клеток. В результате, даже без введения в среду сильных мутагенов, сам перевод клеток в культуру может обеспечить широкий спектр наследуемой изменчивости.

Высокая частота соматоклональной изменчивости делает ее удобным инструментом отбора по простым клеточным фенотипам (устойчивость к токсинам, гербицидам, солям, осмотическим воздействиям и т.п.). Однако для сложных, количественно наследуемых признаков обычно требуется многоэтапная селекция с обязательной регенерацией растений и последующей проверкой признаков у регенерантов и их потомства.

Соматоклональные варианты могут отличаться от исходного прототипа не только по моногенным качественным признакам, но и по полигенным количественным характеристикам – таким как интенсивность роста, продуктивность и толерантность к стрессовым факторам среды. Использование соматоклональных вариантов в селекции нередко позво-

ляет ускорить создание нового сорта примерно вдвое. В ряде случаев удается выделить формы, сочетающие признаки, которые традиционными методами трудно объединить в одном генотипе, например высокую урожайность, улучшенные биохимические показатели и повышенную устойчивость к стрессам.

Для выявления соматоклональных изменений применяют комплекс подходов:

- *морфологическую оценку* (фенотипирование растений-регенерантов);
- *цитологические методы* (кариотипирование, проточная цитометрия для контроля пloidности и анеупloidий);
- *анализ с использованием молекулярных маркеров* (оценка полиморфизма и подтверждение генетической стабильности отобранных линий).

Одних исследований *in vitro* обычно недостаточно для полной идентификации отклонений и оценки хозяйственной ценности признаков: необходима проверка регенерантов и их потомства в условиях выращивания *ex vitro* и в полевых испытаниях.

Для подтверждения генетической природы изменения и его стабильности применяют схему: «культура → регенерант (R0) → потомство (R1/R2)», при необходимости дополняя анализом молекулярных маркеров и оценкой пloidности (проточная цитометрия) с целью исключения псевдовариантов, обусловленных полипloidией или химерностью.

Соматоклональные мутанты можно отбирать в культуре *in vitro* по устойчивости к патотоксинам, гербицидам и различным стресс-факторам. При этом решающее значение имеет корректный выбор *селективного агента* и режима селекции. Применение селективных сред заметно экономит время и площадь: в одной чашке Петри можно разместить до миллионов отдельных клеток – потенциальных родоначальников клонов.

Для выделения форм, устойчивых к грибным заболеваниям, в питательную среду вводят очищенный токсин гриба или культуральную жидкость, на которой выращивали патоген. Затем отбирают выжившие регенеранты и получают соматклоны, проявляющие устойчивость к соответствующей инфекции.

При получении растений, толерантных к водному дефициту, важно подобрать селективный фактор, который адекватно моделирует действие засухи на целое растение в условиях *in vitro*. Обезвоживание клеток, характерное для засухи, можно имитировать осмотиками (например, хлоридом натрия, пролином, полиэтиленгликолем). При этом полиэтиленгликоль удобен тем, что как правило, не проникает в клетку и снижает водный потенциал среды преимущественно за счет

осмотического эффекта; в отличие от NaCl, который одновременно вызывает ионный стресс. Это позволяет отдельно оценивать «осмотическую» и «солевую» составляющие устойчивости. Поскольку засуха и низкие температуры сопровождаются повышением уровня абсцизовой кислоты, которая запускает защитные реакции, способность к быстрому накоплению АБК рассматривают как важный компонент стрессоустойчивости. В этой логике АБК может использоваться и как агент отбора *in vitro* для получения форм, устойчивых к засухе и высокой температуре.

Использование соматональной изменчивости имеет ряд преимуществ:

- это богатый источник генетической вариабельности (значительная доля регенерантов может отличаться от исходных форм);
- технология клеточной селекции сравнительно проста по сравнению с геной инженерией;
- совершенствование методов регенерации расширяет круг видов, доступных для таких подходов;
- в отличие от трансгенных технологий, применение соматоклонов обычно не подпадает под те же регуляторные ограничения.

Основной недостаток метода связан с созданием корректных селективных условий и ограниченной информативностью клеточного отбора для многих признаков. Механизмы устойчивости и ключевые реакции адаптации известны не полностью, что затрудняет выбор селективных факторов. Кроме того, ряд хозяйственно важных характеристик (урожайность, сроки цветения и созревания, высота растения, интенсивность фотосинтеза, общая продуктивность) не проявляются на клеточном уровне. Поэтому соматональная изменчивость по таким признакам может быть реально полезной только при обязательной последующей оценке целых растений – сначала у регенерантов, затем в поколениях и в полевых испытаниях.

Несомненно, далеко не все генетические вариации, наблюдаемые на клеточном уровне, сохраняются в дальнейшем процессе морфогенеза, часть из них реализуется только на клеточном уровне, но не на уровне целостного организма. Однако, те качества, которые обнаруживают соматональные варианты растений, указывают на их уникальность.

В сравнении с геной инженерией, соматональная селекция не требует внесения заранее известного гена, но и не позволяет заранее предсказать характер мутации; поэтому подход относят к «направленному отбору случайного разнообразия», где ключевым элементом является качественный селективный тест и строгая последующая верификация признака.

### **Соматическая гибридизация**

*Соматическая гибридизация* – это получение гибридных клеток и растений путем **слияния протопластов** (соматических клеток без клеточной стенки), то есть вне полового процесса. Этот подход существенно расширил возможности клеточной биологии и селекции, поскольку позволил исследовать поведение объединенных геномов при различной таксономической удаленности родителей.

Показательным примером стала межродовая соматическая гибридизация картофеля и томата. В результате были получены гибридные растения двух типов – «томато» и «помато», различающиеся по происхождению хлоропластов: в первом случае преобладали хлоропласты томата, во втором – картофеля. Хотя такие гибриды не обладали хозяйственно ценными качествами, они оказались важны как модель для наблюдения проявления признаков обоих партнеров и взаимодействия ядерного и органелльного геномов.

При межвидовой соматической гибридизации могут формироваться как *стерильные*, так и *фертильные* растения. В случае фертильности появляется возможность получения потомства – через самоопыление или обратное скрещивание с культурными формами, что делает метод потенциально полезным для интрогрессии признаков.

В прикладной практике различают два основных результата соматической гибридизации:

1. *соматические гибриды* – происходит объединение ядерного материала обоих родителей и формируется общий ядерный геном;

2. *цибриды* (цитоплазматические гибриды) – ядро в основном принадлежит одному родителю, а органеллы (митохондрии и/или хлоропласты) – другому.

Различие между соматическими гибридами и цибридами принципиально важно, поскольку цибридизация позволяет переносить *цитоплазматически наследуемые признаки*, включая *цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС)*, широко используемую в гибридной селекции.

### **Гаплоидная гибридизация**

*Гаплоидная гибридизация* (получение гаплоидов и последующее создание ДН-линий) широко используется как способ быстрого получения полностью гомозиготных линий, однако практическое применение культуры пыльников часто ограничивается низкой эффективностью метода. Эффективность обычно оценивают по двум показателям:

1. доля изолированных пыльников, которые в культуре сформировали эмбриониды или каллус из микроспор;

2. доля гаплоидных растений-регенерантов в расчете на один изолированный пыльник.

Существенным недостатком, особенно у злаков, является также появление большого числа *альбиносных регенерантов*, что снижает выход жизнеспособных растений и усложняет дальнейшую работу.

Несмотря на эти ограничения, получение гаплоидных растений различными методами *in vitro* ценно тем, что позволяет быстро формировать *гомозиготные линии* (через удвоение хромосом у гаплоидов), существенно сокращая сроки селекционного процесса. Вместе с тем высказывается и скептицизм: при использовании растений поколения F1 рекомбинация происходит только в одном мейотическом цикле, и этого может быть недостаточно для «перетасовки» признаков, контролируемых полигенно. В качестве выхода предлагают либо работать с F2, где рекомбинационное разнообразие выше, либо проводить половую гибридизацию регенерантов разных генотипов (полученных *in vitro*), а затем повторять цикл получения гаплоидов *in vitro* уже у отобранных половых гибридов.

Получение двойных гаплоидов (DH) после индукции гаплоидов (через микроспоры/пыльники или гиногенез) обеспечивает быструю фиксацию комбинаций аллелей и резко сокращает время выведения линий. DH-технология особенно ценна для селекции гибридов, где требуется быстрое получение стабильных родительских линий.

В целом клеточные технологии создают два комплементарных инструмента селекции:

1) генерация/расширение генетического разнообразия (соматоклональная изменчивость, соматическая гибридизация, индуцированный мутагенез *in vitro*);

2) ускоренная фиксация и тиражирование отобранных генотипов (гаплоидные технологии, микроразмножение, криосохранение).

Рациональная схема работы предполагает сочетание этих инструментов с обязательной оценкой регенерантов на уровне целого растения и подтверждением наследуемости признаков.

## ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Технология рекомбинантных ДНК (ее называют также молекулярным клонированием или геной инженерией) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (дезоксирибонуклеиновой кислоты, ДНК) из одного организма в другой.

В более широком смысле генетическая инженерия включает также целенаправленное конструирование генов и регуляторных элементов, сборку экспрессионных кассет, введение их в клетки, а также проверку наследуемости и функциональной активности внесенных изменений.

Чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме:

- из организма-донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная

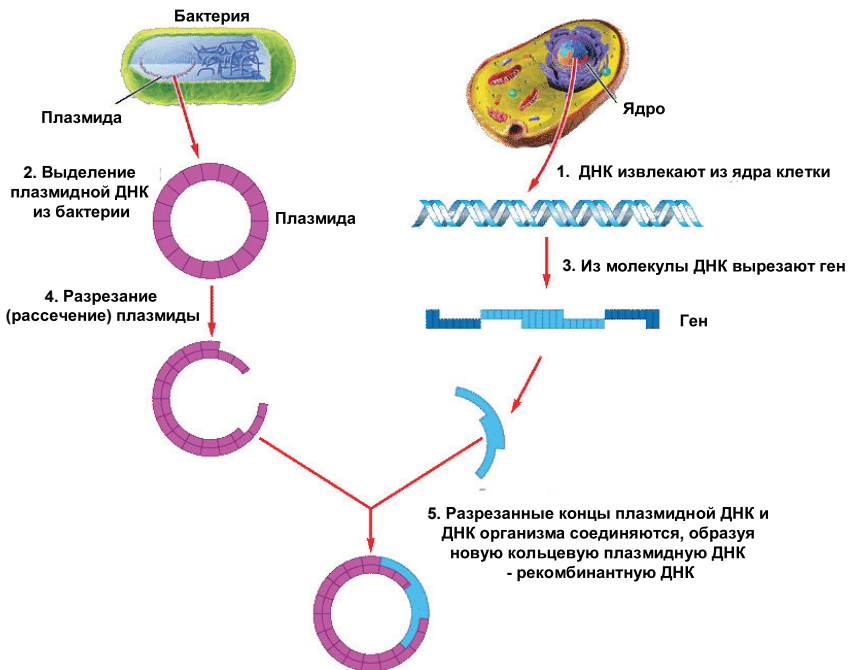


Рис. 10. Схема получения рекомбинантной ДНК

ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонированный вектор-встроенная ДНК»);

- эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией;

- идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки);

- получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

На практике между «вводом» и «получением продукта» обычно включают дополнительные этапы: проверку правильности вставки (ПЦР/рестрикционный анализ), подтверждение последовательности (секвенирование), оценку уровня экспрессии (RT-ПЦР/вестерн-блот/ферментативные тесты) и анализ стабильности конструкции при культивировании.

Предпосылками к созданию технологии рекомбинантных ДНК послужили многие открытия в области:

- молекулярной биологии;
- энзимологии нуклеиновых кислот;
- молекулярной генетики бактериальных вирусов и внехромосомных элементов бактерий (плазмид).

К числу ключевых предпосылок относят также: открытие рестриционно-модификационных систем бактерий, разработку методов электрофореза и визуализации ДНК, создание селективных маркеров и систем экспрессии, а также появление методов секвенирования и ПЦР (полимеразной цепной реакции), радикально упростивших поиск и идентификацию нужных последовательностей.

Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью целого арсенала ферментов, в первую очередь, с помощью ферментов рестрикции (рестрицирующих эндонуклеаз, рестриктаз), которые узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК. Помимо рестриктаз широко применяют ДНК-полимеразы (в т.ч. термостабильные и «высокой точности»), обратные транскриптазы, щелочные фосфатазы, терминальные трансферазы, топоизомеразы и рекомбинационные ферменты, позволяющие собирать конструкции без рестрикционных сайтов (рекомбинационное/«бесшовное» клонирование).

### Рестрицирующие эндонуклеазы

Для молекулярного клонирования принципиально важно, чтобы донорная и векторная ДНК расщеплялись в строго заданных участках (сайтах), формируя дискретный и воспроизводимый набор фрагментов.

Если же хромосомную ДНК механически фрагментировать (например, пропустить через шприц с тонкой иглой) или обработать ультразвуком, разрывы двухцепочечной молекулы возникают случайно. В результате получают смесь фрагментов примерно от 0,3 до 5 тыс. пар нуклеотидов, причем при каждой обработке формируется новый, неповторяющийся набор.

Реальные возможности молекулярного клонирования появились после выделения высокоспецифичных бактериальных ферментов, которые распознают определенные последовательности оснований в двухцепочечной ДНК и разрезают обе ее цепи. Такие ферменты называют *рестрицирующими эндонуклеазами II типа*.

Одна из первых рестриктаз II типа была получена из *Escherichia coli* и названа *EcoRI*. Она узнает участок ДНК с определенной *палиндромной* последовательностью длиной 6 пар оснований и вносит разрыв между гуанином и аденином в каждой цепи, расщепляя фосфодиэфирную связь между 3'-кислородом сахарного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, связанной с 5'-углеродом сахарного остатка соседнего нуклеотида.

*Палиндром* (Palindrome, «перевертыш») – это участок двухцепочечной ДНК, в котором обе цепи имеют одинаковую нуклеотидную последовательность при чтении в направлении 5'→3'. Именно такие участки часто служат сайтами распознавания для рестрицирующих эндонуклеаз II типа.

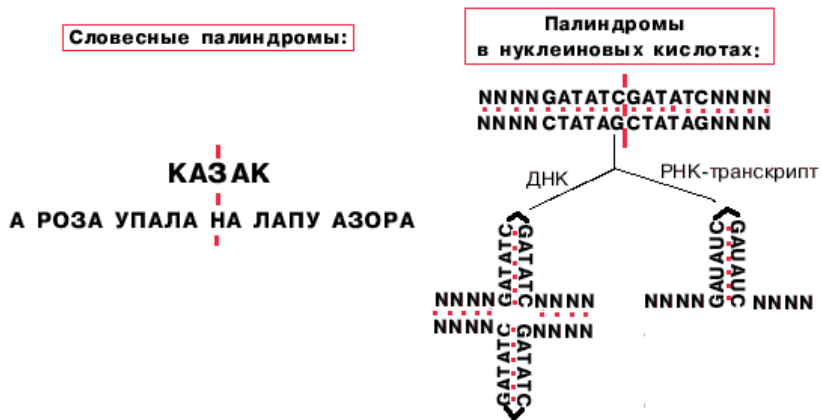


Рис. 11. Схема палиндромов

Разрезы в двухцепочечной ДНК при действии многих рестриктаз располагаются со смещением относительно друг друга («наискось»), поэтому на концах фрагментов возникают короткие одноцепочечные комплементарные выступы – «липкие концы». Обычно такие «хвосты» состоят из нескольких нуклеотидов (например, у EcoRI – из четырех). При этом выступающий одноцепочечный участок имеет на конце *5'-фосфат*, тогда как *3'-гидроксильная группа* на противоположной цепи остается «уплненной», то есть не выступает за край комплементарной цепи.

*Липкие концы* – это взаимно комплементарные одноцепочечные участки, образующиеся на концах двухцепочечной ДНК в результате ступенчатого разреза. Рестриктазы рассекают ДНК в строго определенных сайтах так, что формируются такие выступы; благодаря комплементарности «липкие концы» могут спариваться с соответствующими концами другой ДНК, разрезанной тем же ферментом, что лежит в основе удобного соединения (сшивания) фрагментов при молекулярном клонировании.

Помимо EcoRI из бактериальных клеток выделены сотни рестрицирующих эндонуклеаз II типа. Их обозначают по тому же принципу, что и EcoRI: первая буква названия рода микроорганизма пишется прописной, две следующие буквы (вид) – строчными; обозначение штамма, как правило, не приводят. Римская цифра показывает порядковый номер фермента среди рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма. Так, HpaI и HpaII – соответственно первая и вторая рестрицирующие эндонуклеазы II типа, полученные из *Haemophilus parainfluenzae*.

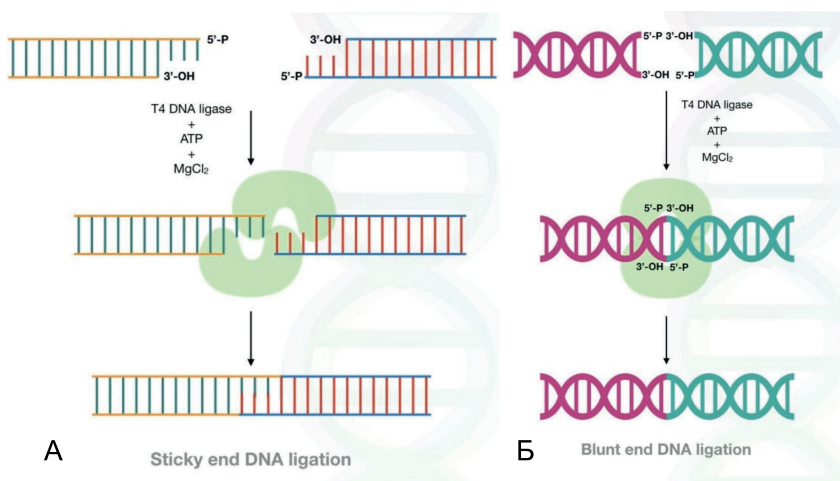


Рис. 12. Схема липких (А) и тупых (Б) концов ДНК

Среди рестриктаз II типа различают ферменты, которые образуют «липкие» концы (ступенчатый разрез), и ферменты, рассекающие обе цепи строго напротив друг друга. В последнем случае формируются фрагменты с «тупыми» концами.

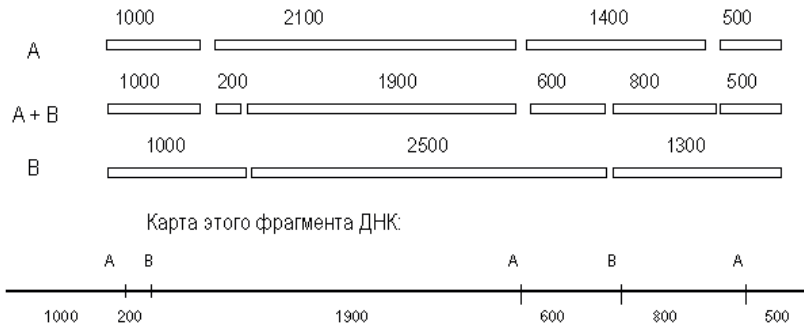
*Тупой конец* – это конец двухцепочечной ДНК, у которого ни одна из цепей не выступает за пределы другой.

Палиндромные последовательности, распознаваемые рестриктазами II типа и содержащие место разреза, называют *сайтами узнавания*. Сайты узнавания могут включать 4, 5, 6, 8 и более пар нуклеотидов; их длина определяет частоту встречаемости в ДНК. На практике чаще используют рестриктазы, распознающие тетра- и гексануклеотидные последовательности.

Рестрицирующие эндонуклеазы II типа играют ключевую роль в геномном клонировании: обработка ДНК одной и той же рестриктазой при полном расщеплении по всем сайтам узнавания всегда приводит к получению воспроизводимого набора фрагментов.

Если применять несколько рестриктаз и проводить расщепление ДНК каждым ферментом по отдельности, а затем их комбинациями, можно построить *физическую (рестрикционную) карту* – определить порядок расположения сайтов рестрикции вдоль молекулы. После разделения фрагментов методом гель-электрофореза и определения их размеров становится возможным локализовать положения рестрикционных сайтов и восстановить их взаимное расположение.

Рестрикционная карта – это последовательности ДНК с нанесенными на них сайтами разрезания для различных рестриктаз. Использование рестрикционных карт облегчает выбор ферментов и стратегию сборки конструкций (вставка, ориентация, число сайтов), а также позволяет контролировать продукт клонирования с помощью диагностического рестрикционного анализа.



**Рис. 13. Схема рестрикционной карты ДНК**

Для построения *рестрикционной карты* сравнивают размеры фрагментов, полученных при расщеплении ДНК каждым ферментом по отдельности, и при расщеплении смесью (двойной рестрикции). Если при обработке исходного фрагмента ДНК каждой из двух рестриктаз (например, EcoRI и BamHI) образуются по три фрагмента, это означает, что в исходной молекуле присутствуют *по два сайта узнавания* для каждой из этих рестриктаз. При этом отдельные фрагменты, возникающие после раздельной рестрикции, могут оказаться **нерасщепляемыми** при действии второго фермента (например, фрагмент 300 п.н., полученный после EcoRI, не содержит сайта BamHI и поэтому остается целым).

Расщепление рестрицирующими эндонуклеазами используется и для получения *рекомбинантных молекул ДНК*. Если два разных образца ДНК обработать одной и той же рестриктазой так, чтобы образовались *липкие концы*, а затем смешать, то комплементарные выступы могут спариваться, формируя новые сочетания фрагментов, то есть рекомбинантные конструкции.

Однако для молекулярного клонирования одних рестриктаз недостаточно: водородные связи между комплементарными нуклеотидами липких концов слишком слабы, чтобы надежно удерживать фрагменты вместе. Нужно восстановить непрерывность сахарофосфатного остова – сформировать связь между *3'-гидроксильной группой* одного фрагмента и *5'-фосфатной группой* другого.

Эту задачу выполняет *ДНК-лигаза бактериофага T4*. Она катализирует образование *фосфодиэфирных связей* между концами полинуклеотидных цепей, которые уже сближены и ориентированы благодаря спариванию липких концов. Кроме того, T4 ДНК-лигаза способна «сшивать» и *тупые концы*, хотя для них эффективность обычно ниже, поскольку комплементарного спаривания, стабилизирующего контакт, нет; сближение концов обеспечивается взаимодействием фрагментов с ферментом.

Лигирование – образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также при соединении тупых концов и при образовании

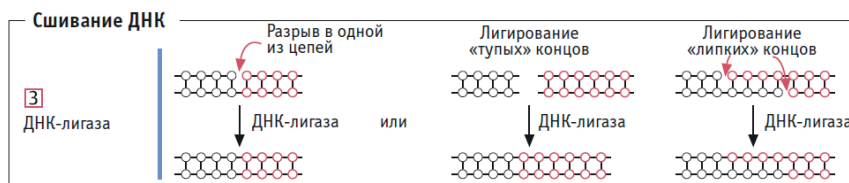


Рис. 14. Схема лигирования ДНК

связи в РНК. Эффективность лигирования зависит от концентрации ДНК, соотношения «вектор : вставка», температуры и типа концов (липкие/ тупые); для уменьшения самолигирования вектора используют дефосфорилирование 5'-концов и подбор несовместимых концов.

Важно учитывать, что само по себе соединение различных молекул ДНК не имеет практического смысла, если получившиеся рекомбинантные конструкции не смогут реплицироваться в клетке-хозяине. Поэтому рекомбинантная молекула должна включать два функциональных компонента: фрагмент с нужным геном (который требуется клонировать) и участок, обеспечивающий репликацию этой ДНК в реципиентной клетке. Для решения этой задачи применяют *клонирование векторы*.

После рестрикции ДНК обычно образуется смесь многочисленных фрагментов, и при их лигировании с векторной ДНК возникает множество разных комбинаций. Следовательно, необходимо уметь выявлять те клетки-реципиенты, которые получили конструкцию с нужной нуклеотидной последовательностью. Для этого используют различные *системы скрининга* (отбор и/или идентификацию рекомбинантов по маркерам и методам анализа).

### **Плазмидные векторы**

*Плазмидный вектор* – это небольшая, кольцевая молекула ДНК бактериального происхождения (плазида), которая была генетически сконструирована (модифицирована) для использования в качестве инструмента в молекулярной биологии и генной инженерии. Его основная функция – быть «транспортным средством» (вектором) для доставки чужеродной генетической информации (целевого гена или фрагмента ДНК) в живую клетку (бактериальную, растительную, животную), его стабильного поддержания и экспрессии.

*Плазмиды* – это внехромосомные, автономно реплицирующиеся, обычно двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Они встречаются у большинства бактерий и могут выполнять разные функции:

- *F-плазмиды* – содержат гены, обеспечивающие перенос (конъюгацию) из одной клетки в другую;
- *R-плазмиды* – несут гены устойчивости к антибиотикам;
- *плазмиды деградации* – включают гены, позволяющие утилизировать необычные субстраты и метаболиты;
- *криптические плазмиды* – плазмиды, в которых не выявлено явно выраженных функциональных генов.

Размеры плазмид сильно варьируют – от менее 1 до более 500 тыс. пар нуклеотидов. Обязательным элементом любой плазмиды является

*ori* (сайт начала репликации): без него плаزمиды не может воспроизводиться в клетке-хозяине.

По числу копий в клетке плазмиды делят на:

- *высококопийные* (обычно десятки–сотни копий, примерно 10–100),
- *низкокопийные* (как правило 1–4 копии).

Вклад плазмидной ДНК в суммарную ДНК клетки обычно составляет порядка 0,1–5%.

Если две или более плазмиды не способны устойчиво сосуществовать в одной клетке, их относят к одной *группе несовместимости*. Плазмиды разных групп несовместимости, напротив, могут одновременно поддерживаться в клетке. У некоторых бактерий обнаруживали одновременно до 8–10 различных плазмид; при этом каждая имела «свой» уровень копийности, собственные функции и принадлежала к отдельной группе несовместимости.

По *спектру хозяев* различают плазмиды:

- с узким спектром (реплицируются только в близких/определенных видах),
- с широким спектром (способны реплицироваться в разных бактериальных клетках).

Благодаря автономной репликации плазмиды обладают ключевыми свойствами, необходимыми для использования в качестве *векторов* переноса клонируемой ДНК. Однако природные (немодифицированные) плазмиды нередко не имеют ряда характеристик, которые требуются от «удобного» лабораторного вектора (например, развитой системы селекции/скрининга, удобных уникальных сайтов рестрикции, оптимальной копийности и т.п.).

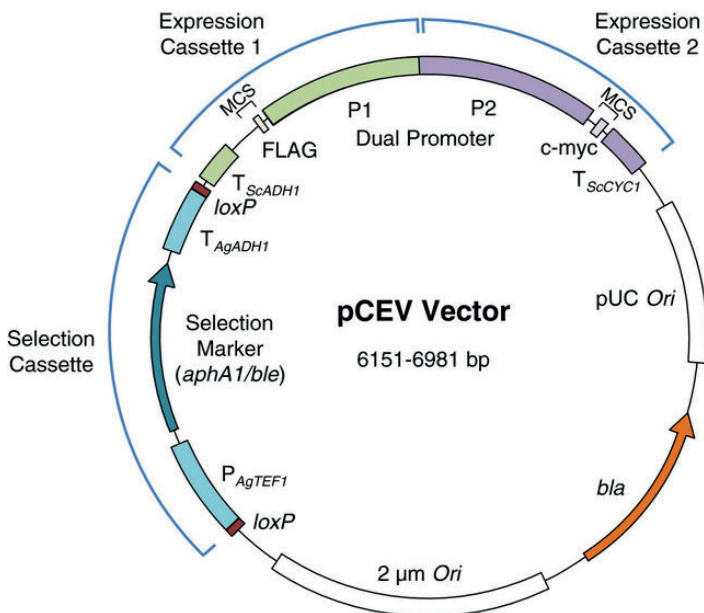
К ключевым требованиям, предъявляемым к плазмидным векторам, относятся:

1. *Небольшой размер*. Эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* заметно падает, если длина плазмиды превышает примерно 15 тыс. пар нуклеотидов.

2. *Наличие уникального сайта рестрикции (или набора уникальных сайтов)*. Это обеспечивает возможность целенаправленной вставки фрагмента ДНК в строго определенное место вектора.

3. *Селективные генетические маркеры*. Один или несколько маркеров нужны для распознавания и отбора клеток-реципиентов, несущих рекомбинантную ДНК (например, по устойчивости к определенному антибиотику или по системе скрининга).

Поскольку природные плазмиды часто не удовлетворяют этим требованиям, плазмидные векторы обычно конструируют методами генной инженерии.



**Рис. 15. Общая карта плазмидного вектора для экспрессионных векторов pCEV с двумя генными кассетами.**

В зависимости от цели используют разные типы векторов:

1. *клонировующие* – предназначены для стабильного поддержания вставки;
2. *экспрессионные* – обеспечивают синтез белка и/или РНК-продукта;
3. *шаттл-векторы* – способны реплицироваться в двух системах (например, *E. coli* и дрожжи);
4. *интегративные* – вводят фрагмент ДНК путем встраивания в геном клетки-хозяина.

Каждая плаزمида содержит две экспрессионные кассеты, каждая из которых контролируется собственным промотором (P1 или P2), а также селективную кассету с генами либо *aphA1*, либо *ble*. Каждый целевой ген может быть опционально мечен с помощью либо эпитопной метки FLAG (Экспрессионная кассета 1), либо эпитопной метки *c-myc* (Экспрессионная кассета 2). Селективная кассета контролируется промотором TEF и терминатором из *Ashbya gossypii* (P<sub>AgTEF1</sub> и T<sub>AgTEF1</sub>). Терминатор для Экспрессионной кассеты 1 происходит из гена алкогольдегидрогеназы дрожжей (ADH1). Терминатор для Экспрессионной кассеты 2 происходит из гена цитохрома С дрожжей (CYC1).

## Секвенирование

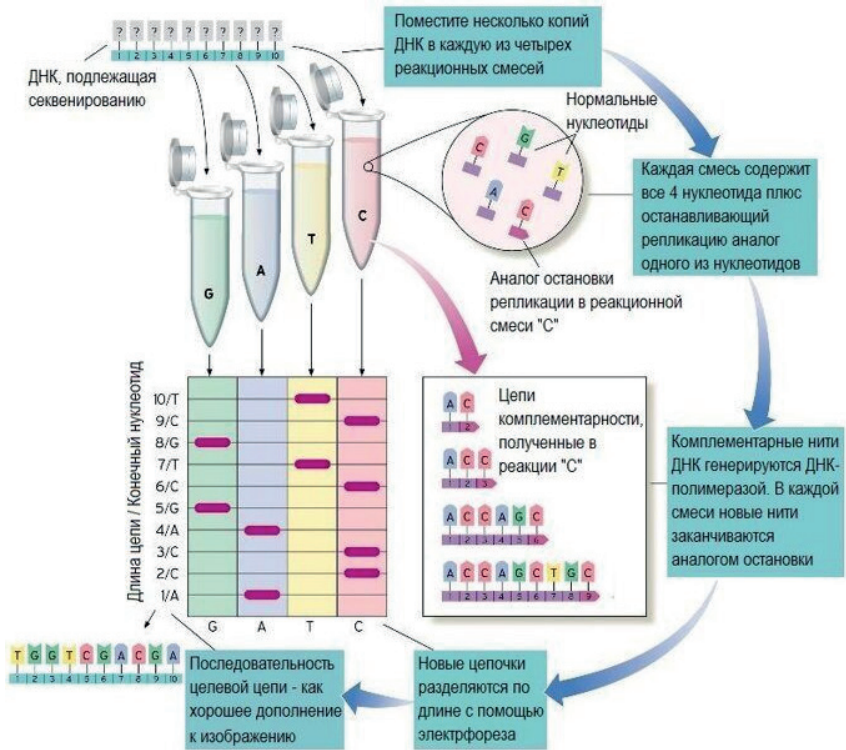
*Секвенирование* – это определение точного порядка нуклеотидов в молекуле ДНК (или РНК). Классически выделяют два базовых подхода: *химический* и *ферментативный*.

1) *Химическое секвенирование* (Максам-Гилберт, 1977). Метод основан на селективном химическом разрушении определенных оснований. Для работы получают одноцепочечную ДНК, один конец которой мечают (обычно радиоактивным фосфором). Затем меченую ДНК делят на четыре пробы и каждую обрабатывают реагентом, вызывающим расщепление в местах, соответствующих одному или двум типам оснований (например, муравьиная кислота преимущественно модифицирует/разрушает пурины – А и Г). В результате в каждой пробе образуется набор фрагментов разной длины; длина каждого фрагмента определяется расстоянием от места разрыва до меченого конца. Фрагменты из всех четырех реакций разделяют электрофорезом, затем выполняют радиоавтографию: меченые фрагменты дают полосы на пленке. Сопоставляя положение полос между дорожками, восстанавливают последовательность нуклеотидов исходного фрагмента.

2) *Ферментативное секвенирование* (Сэнгер, 1977; «*терминация цепи*»). Этот метод опирается на синтез комплементарной цепи на одноцепочечной матрице с участием *ДНК-полимеразы*, но так, чтобы в разных точках происходило преждевременное прекращение удлинения цепи (терминация). В итоге формируется набор фрагментов, отличающихся длиной на один нуклеотид; по их распределению после разделения электрофорезом определяют последовательность матрицы.

Ферментативный метод секвенирования Сэнгера с дидеокси-обрывом цепи основан на линейной амплификации одноцепочечной матричной ДНК с использованием 5'-флуоресцентно меченого праймера и модифицированной Taq полимеразы. Синтез комплементарной ДНК-цепи начинается на специфическом праймер-сайте и заканчивается включением обрывающего цепочку ddNTP, который случайным образом введен вместо соответствующего dNTP. При использовании четырех разных ddNTP в четырех отдельных реакционных пробирках, получается набор цепей удлинённых праймеров, терминированных в каждой позиции А, С, G и Т. Когда эти фрагменты разделены на подходящей гелевой матрице, последовательность ДНК определяется по порядку смещения полос (снизу вверх).

В настоящее время расшифрованы последовательности большинства прокариотических организмов. Из эукариот полностью секвенированы геномы дрожжей, нематоды, арабидопсиса, дрозофилы и человека.



**Рис. 16. Метод терминирующих аналогов трифосфатов**

Секвенирование в биоинженерии выполняет две ключевые функции: подтверждение правильности собранной конструкции и выявление нежелательных мутаций, возникших при амплификации/сборке. В прикладной работе чаще всего используют метод Сэнгера для коротких фрагментов и высокопроизводительное секвенирование (NGS) для библиотек и сложных геномных задач.

Технология рекомбинантных ДНК представляет собой совокупность экспериментальных процедур, позволяющих выделять (клонировать) фрагменты ДНК, содержащие заданные гены. Успех клонирования во многом определяется возможностью *воспроизводимо расщеплять* ДНК на фрагменты нужного размера. Для точного расщепления используют *рестрицирующие эндонуклеазы II типа*, которые распознают специфические нуклеотидные последовательности и разрезают фосфодиэфирные связи в обеих цепях ДНК.

Типичный эксперимент по клонированию генов включает следующие этапы:

1. *Рестрикция донорной ДНК* (выделенной из организма, содержащего искомым ген) с использованием выбранной рестриктазы/рестриктаз.

2. *Подготовка вектора для клонирования* (чаще плазмиды, способной реплицироваться в клетке-хозяине) – разрезание теми же рестриктазами, что применялись для донорной ДНК.

3. *Смешивание донорных фрагментов с вектором и лигирование* с помощью ДНК-лигазы бактериофага T4, в результате чего образуются рекомбинантные молекулы.

4. *Трансформация клеток-хозяина* полученными конструкциями и амплификация рекомбинантной ДНК в трансформированных клетках.

### **Амплификация**

*Амплификация* – образование дополнительных копий хромосомных последовательностей ДНК. Амплификация может происходить как на уровне вектора (увеличение числа копий плазмиды), так и на уровне генома (например, при нестабильности повторов или при селективном давлении), что важно учитывать при анализе стабильности штамма-продуцента.

Для выделения (отбора) клеток, несущих рекомбинантную ДНК, применяют специальные приемы, поскольку после лигирования образуется смесь молекул, включая «самозамкнувшиеся» плазмиды без вставки. Чтобы снизить долю таких кольцевых молекул, рестрицированную плазмидную ДНК часто обрабатывают *щелочной фосфатазой*, которая удаляет *5'-концевые фосфатные группы*. В результате вектор хуже самолигируется, тогда как лигирование с вставкой становится возможным при наличии фосфатных групп на донорных фрагментах.

Для отбора трансформированных клеток с гибридными плаزمидами используют несколько подходов:

1. *Селекция по маркерам* – тестирование на устойчивость к определенным антибиотикам и/или колориметрические системы скрининга.

2. *Поиск экспрессии гена* – иммунологические тесты или выявление специфического белка, являющегося продуктом клонированного гена.

3. *Гибридизация с ДНК-зондом* – обнаружение клонов с помощью зонда, комплементарного участку искомого гена.

Чтобы обеспечить возможность клонирования полного гена, донорную ДНК часто подвергают *частичной рестрикции*. Тогда формируется набор фрагментов различной длины, из которых создают *библиотеку*.

Различают:

- *геномные библиотеки* – представляют весь геном (включая интроны и межгенные участки);
- *кДНК-библиотеки* – получают по матрице мРНК, они отражают экспрессируемые гены и, как правило, не содержат интронов. Это принципиально важно при клонировании эукариотических генов для экспрессии в прокариотах.

Для клонирования крупных фрагментов ДНК разработаны векторы на основе бактериофагов  $\lambda$  и P1, а также конструкции на основе F-плазмид.

При получении фрагментов, кодирующих эукариотические белки, исходят из очищенной мРНК: на ее матрице синтезируют первую цепь кДНК с помощью *обратной транскриптазы*, затем по этой цепи достраивают вторую; после ферментативной обработки двухцепочечную кДНК встраивают в выбранный вектор.

Независимо от выбранной стратегии, после идентификации клонированной последовательности необходимо доказать, что она соответствует *нативному структурному гену* (то есть действительно кодирует функциональный продукт в исходной системе).

### **Полимеразная цепная реакция**

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР)* – это метод *in vitro*, позволяющий быстро получать большое число копий строго определенного участка ДНК. Амплификация целевой последовательности (иногда в миллионы раз) обеспечивается *многократным повторением* трех стадий одного цикла:

1. *Денатурация* – разъединение двух цепей ДНК при нагревании.
2. *Отжиг праймеров* – присоединение коротких синтетических праймеров к комплементарным участкам матрицы.
3. *Элонгация* – достраивание новых цепей ДНК термостабильной ДНК-полимеразой.

Повторение циклов приводит к экспоненциальному накоплению ампликона, ограниченного праймерами.

Для проведения ПЦР требуется следующий набор компонентов и соблюдение принципиальной схемы реакции.

#### **Что необходимо для ПЦР**

1. *Два синтетических олигонуклеотидных праймера* (обычно ~18–25 нуклеотидов). Они комплементарны участкам на противоположных цепях ДНК, *фланкирующим* (расположенным по краям) целевую последовательность. После отжига *3'-ОН-концы* праймеров ориентированы навстречу друг другу – именно от них начинается достраивание новых цепей.

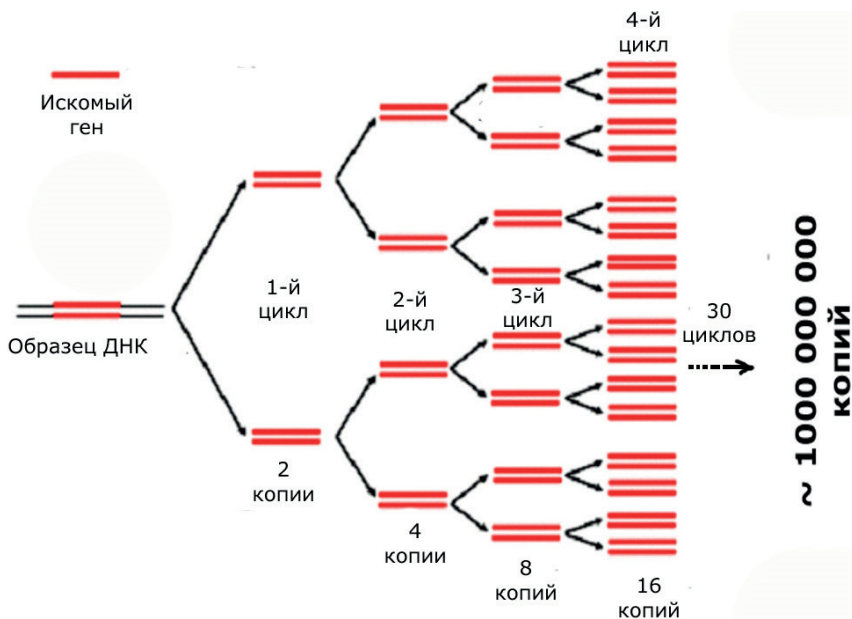


Рис. 17. Схема ПЦР

*Фланкирующая последовательность* – участок ДНК, находящийся перед или после интересующей (целевой) последовательности; *фланкировать* – располагаться «по флангам», обрамлять.

2. *ДНК-матрица (мишень)*, содержащая нужный участок (типично – сотни/тысячи пар нуклеотидов; в учебных описаниях указывают диапазон вплоть до десятков тысяч пар нуклеотидов).

3. *Термостабильная ДНК-полимераза*, сохраняющая активность после нагревания до температур денатурации (например, Taq-полимераза из *Thermus aquaticus*).

4. *Четыре дезоксирибонуклеотида (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)* – «строительный материал» для синтеза ДНК.

(В практической постановке обычно также нужны буфер,  $Mg^{2+}$  и вода, но в приведенном фрагменте акцент сделан на основных компонентах.)

### Как проходит ПЦР

Подбирают праймеры, которые гибридизуются с участками ДНК, фланкирующими мишень. Далее реакция идет циклически, обычно около 30 циклов: с каждым циклом число копий целевого фрагмента увеличивается, и постепенно начинают доминировать продукты, ограниченные с двух сторон праймерными последовательностями.

### Три стадии одного цикла

1. *Денатурация* – нагревание (примерно до 95 °С) для разъединения цепей ДНК. Часто первый прогрев длительнее (порядка нескольких минут).

2. *Отжиг (ренатурация) праймеров* – понижение температуры (например, до ~55 °С), чтобы праймеры спарились с комплементарными участками матрицы.

3. *Элонгация (синтез)* – повышение температуры до оптимума полимеразы (для Taq обычно около 72–75 °С), после чего идет достраивание цепи от 3'-ОН-конца праймера.

Циклы выполняют в термоциклере, который автоматически меняет и поддерживает температурные режимы; типичная длительность цикла – несколько минут.

Чтобы ясно представить механизм амплификации заданного фрагмента ДНК при ПЦР, необходимо отслеживать расположение праймеров и комплементарных им участков на матрицах на каждом цикле реакции.

На *первом цикле* каждая вновь синтезированная цепь получается значительно *длиннее*, чем целевой интервал между праймерами: полимеразы достраивает цепь дальше участка, комплементарного «второму» праймеру. Такие продукты рассматривают как «*длинные матрицы*» – именно они затем служат шаблоном для дальнейшего синтеза.

На *втором цикле* двухцепочечную ДНК (исходная цепь + новосинтезированная «длинная матрица») снова денатурируют, затем проводят отжиг праймеров и синтез. В результате вновь образуются «*длинные матрицы*», а также появляется часть цепей, которые с одной стороны ограничены праймером, а с другой – заканчиваются участком, комплементарным второму праймеру. Эти продукты называют «*короткими матрицами*» (то есть фрагментами, по длине уже соответствующими целевому ампликону).

На *третьем и последующих циклах* все ранее образовавшиеся гетеродуплексы одновременно проходят денатурацию и отжиг с праймерами, после чего реплицируются. Доля «*коротких матриц*» быстро возрастает, и при многократном повторении циклов именно они начинают преобладать; к ~30-му циклу их количество может превышать число исходных цепей на порядки (в учебных оценках – около  $10610^6$ ).

*Отжиг* – это образование двухцепочечных молекул (ДНК–ДНК или ДНК–РНК) из комплементарных одноцепочечных полинуклеотидов.

ПЦР в генной инженерии используется не только для амплификации фрагментов, но и как инструмент конструирования: для *сайт-направленного мутагенеза*, добавления *рестрикционных сайтов* или *гомоло-*

гичных «хвостов» для сборки конструкций, а также для оценки экспрессии (например, RT-qPCR) при анализе трансгенных линий.

Поскольку ПЦР – метод высокочувствительный, даже следовые количества посторонней ДНК могут дать *ложноположительный результат*, поэтому необходим строгий контроль чистоты реагентов и посуды. К стандартным мерам против контаминации относят отдельные зоны для приготовления смесей и анализа продуктов, использование *фильтр-наконечников*, постановку *отрицательных контролей*, а также применение ферментативных систем, снижающих риск переноса ампликонов между реакциями.

Метод ПЦР широко применяют для идентификации патогенных микроорганизмов, выявления делеций (вставок) и других изменений в генах, связанных с наследственными заболеваниями, обнаружения спонтанных мутаций, сборки полноразмерных генов из синтетических олигонуклеотидов, а также как вспомогательный этап при секвенировании.

Таким образом, к числу наиболее важных для биоинженерии методов, помимо клонирования генов, относятся методы химического синтеза ДНК, секвенирование ДНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР). В современных лабораториях часто применяют и «модульную» сборку конструкций (сборка нескольких фрагментов в заданном порядке), а также методы целенаправленного редактирования генома (геномная инженерия), которые позволяют изменять эндогенные гены без обязательного введения полноразмерных трансгенов.

Цель *химического синтеза ДНК* – получить *in vitro* одноцепочечные молекулы. Ключевое условие успеха — высокая эффективность образования *фосфодиэфирных связей*; иначе выход полноразмерного продукта будет низким, а в смеси будут преобладать укороченные фрагменты. Поэтому длина синтезируемых *in vitro* олигонуклеотидов обычно составляет 20–30 нуклеотидов и лишь изредка превышает ~100 нуклеотидов.

ПЦР стала технологией, радикально изменившей практику молекулярной биологии и биотехнологии: она позволяет многократно (вплоть до миллионов раз) *амплифицировать* выбранные участки ДНК *in vitro*, быстро получая достаточное количество материала для анализа и конструирования.

Разработка методов *направленной модификации геномов* животных, растений и микроорганизмов – одно из ключевых достижений современной генетики. Под направленным воздействием понимают:

- изменение структуры генов (включая точечные изменения и перестройки),
- введение в геном чужеродных генов в виде природных либо искусственно созданных генных конструкций,

- создание новых геномных конфигураций, не существовавших в природе.

При работе с растениями принципиально важны:

- регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в растительной клетке (растительные промоторы, терминаторы, сигналы полиаденилирования);

- способы доставки ДНК (*Agrobacterium*-опосредованная трансформация, биобаллистика и др.);

- последующий отбор и регенерация трансформантов.

В 1982 г. был создан Международный центр по геной инженерии и биотехнологии, объединивший 32 государства. Исследования начинались с трансгеноза – переноса генов из одного организма в другой.

В прикладной биотехнологии результатом инженерного цикла является не просто факт переноса гена, а получение *стабильных линий* (штаммов/культур/сортов) с предсказуемым уровнем экспрессии и воспроизводимыми свойствами. Поэтому этапы *стабилизации*, *селекции по уровню экспрессии* и оценка *биобезопасности* являются обязательными.

С развитием технологий рекомбинантных ДНК трансгеноз стал стратегическим направлением: создают трансгенных животных, растения и микроорганизмы с заданными свойствами. Гены вводят в микроорганизмы, соматические клетки, оплодотворенную яйцеклетку или эмбриональные стволовые клетки, культивируемые *in vitro*; выбор метода зависит от типа клеток и цели эксперимента.

Важное преимущество растений – возможность относительно эффективно получать целое фертильное растение из соматических клеток *in vitro* благодаря *тотипотентности*. Однако эффективность трансформации и регенерации сильно зависит от вида и генотипа, типа экспланта и протокола культивирования. Поэтому на практике критична оптимизация *морфогенеза* и *системы отбора* (селективный агент, маркерные гены), чтобы повышать долю истинных трансформантов и снижать вероятность получения химерных растений.

## ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии целесообразно рассматривать в трех основных направлениях.

*Первое направление* связано со способностью изолированных растительных клеток синтезировать и накапливать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности продукты вторичного метаболизма – алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, такие соединения получают из каллусных культур, выращиваемых на твердых (агаризованных) или жидких (супензионных) питательных средах.

На основе клеточных технологий получают, например, диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, а также тонизирующие вещества из клеток женьшеня, применяемые в медицине и парфюмерии.

Продуктивность культивируемых клеток после клеточной селекции нередко существенно превосходит продуктивность целых растений. Дополнительными преимуществами такого подхода являются возможность использовать редкие или не произрастающие в конкретной местности виды и получать сырье круглогодично, независимо от сезона и климатических условий.

Дополнительным преимуществом является стандартизация сырья: культуру клеток можно вести при постоянных условиях (свет, температура, состав среды), получая более стабильный выход целевого продукта по сравнению с полевым сырьем. Для повышения выхода вторичных метаболитов используют клеточную селекцию высокопродуктивных линий, а также приемы элицитации (внесение индукторов синтеза метилжасмоната, салициловой кислоты, хитозана, дрожжевого экстракта и др.) и «подкормку предшественниками» биосинтеза.

В ряде случаев более стабильными «фабриками» вторичных метаболитов служат культуры «бородатых корней» (hairy roots), полученные с участием *Agrobacterium rhizogenes*; они быстро растут и часто накапливают метаболиты на уровне целого растения.

Важной стадией промышленного процесса является выделение и очистка продукта (экстракция, сорбция на смолах, мембранные методы, хроматография), от которой во многом зависит себестоимость препарата.

*Второе направление* связано с использованием культуры изолированных тканей для массового размножения и оздоровления посадочного материала. Этот подход, известный как микроразмножение (микроразмножение), позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Во многих странах микроразмножение стало основой промышленной биоиндустрии и реализуется на поточных производствах. Так, во Франции значительная часть продукции цветочных культур (до 94%) выращивается с применением культуры изолированных тканей. В США действует порядка 100 коммерческих предприятий, выпускающих посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений считается Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика – Италия (примерно 250–500 тыс. ежегодно).

Микроразмножение обычно включает последовательные этапы: введение экспланта в стерильную культуру, мультипликация побегов, укоренение, акклиматизация (адаптация *ex vitro*) и доращивание.

Оздоровление посадочного материала достигается сочетанием меристемной культуры с термотерапией и/или химиотерапией и обязательным контролем наличия патогенов методами ИФА и ПЦР.

Для снижения риска соматической изменчивости при массовом клональном размножении предпочитают меристемные культуры, ограничивают число пассажей и проводят периодический контроль сортовой идентичности (морфологический, цитологический или с использованием молекулярных маркеров).

*Третье направление* связано с использованием изолированных клеток и клеточных технологий в селекции растений, что позволяет получать формы с ускоренным ростом и повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды – засухе, засолению, низким и высоким температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др.

В рамках этого направления развиваются подходы, основанные на слиянии протопластов и получении неполовых (соматических) гибридов, что расширяет возможности комбинирования признаков вне полового процесса. Перенос чужеродных генов в изолированные протопласты методами генной инженерии открывает путь к созданию растений с новыми наследуемыми свойствами.

Ключевое место занимают и технологии, помогающие преодолевать ограничения традиционной гибридизации:

- культивирование пыльников и семяпочек на искусственных питательных средах для получения гаплоидных растений;

- культура зародышей для выращивания растений из гибридных семян с плохо развитым эндоспермом;
- оплодотворение *in vitro*, позволяющее обходить барьеры нескрещиваемости у некоторых растений.

Клеточная селекция проводится на селективных средах (с солями, осмотиками, токсинами патогенов, гербицидами, ионами тяжелых металлов и др.), что позволяет быстро отбирать устойчивые клеточные линии и затем получать из них растения-регенеранты.

Культура микроспор и пыльников используется для получения гаплоидов и последующих дигаплоидов (удвоение хромосом), что резко ускоряет создание гомозиготных линий в селекции.

Культура зародышей («спасение эмбрионов») позволяет преодолеть постзиготическую несовместимость и получать жизнеспособные растения из межвидовых и межродовых гибридов.

При соматической гибридизации, помимо объединения ядерных геномов, возможен перенос цитоплазматических признаков (митохондриальных и хлоропластных генов), что используют, например, для получения цитоплазматической мужской стерильности и повышения эффективности гибридного семеноводства.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию из них взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это касается злаковых растений. Поэтому важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

Критически важны генотип исходного растения, гормональный баланс среды (соотношение ауксинов и цитокининов), источник углерода, а также условия культивирования (свет, температура, газообмен); для многих культур требуются строго видо- и сортоспецифичные протоколы регенерации.

Вещества вторичного метаболизма чаще всего получают из *сuspензионных культур*, которые выращивают в *биореакторах*. По конструктивному принципу биореакторы подразделяют на:

- *барботажные*, где перемешивание обеспечивается аэрацией: поднимающиеся пузырьки воздуха одновременно улучшают газообмен и создают циркуляцию среды;
- *аппараты с механическим перемешиванием*, в которых однородность суспензии поддерживается мешалками (при необходимости – с более точным контролем режима перемешивания).

Также используют *аэрифтные биореакторы* и системы с *иммобилизованными клетками* (на носителях или в гелях), что позволяет повысить плотность культуры и в ряде случаев поддерживать более стабильный синтез целевых метаболитов.

Выбор типа биореактора определяется, прежде всего, чувствительностью клеток к сдвиговым нагрузкам, требованиями к аэрации, а также необходимостью точного контроля pH, температуры и концентрации растворенного кислорода.

Критически важной характеристикой клеточной популяции является ее *стабильность* по отношению к синтезу, транспорту и накоплению (депонированию) вторичных метаболитов. Возможны три типичных сценария:

- стабильность сохраняется на протяжении длительного времени существования культуры;
- продуктивность постепенно снижается из-за накопления клеток с пониженным уровнем синтеза;
- наблюдается выраженная нестабильность, когда способность к синтезу вторичных метаболитов утрачивается быстро.

Для поддержания стабильности продуктивных линий используют криоконсервацию «маточных» культур, ограничение числа пассажей и периодическую проверку продуктивности (биохимический контроль, хроматография, спектрофотометрия). Часто применяют двухстадийные режимы выращивания: сначала наращивание биомассы, затем индукция синтеза вторичных метаболитов (элициторы, изменение минерального питания, ограничение азота/фосфора и др.).

Количественный и качественный состав вторичных веществ возможно менять за счет изменения состава питательной среды при выращивании клеток *in vitro*.

На метаболический профиль влияют не только фитогормоны, но и форма азота (нитрат/аммоний), источники углерода (сахароза, глюкоза), микроэлементы, витамины, а также стресс-факторы (световой режим, осмотический стресс), запускающие вторичный метаболизм.

Как правило, синтез вторичных метаболитов происходит во внутриклеточных органеллах: пластидах, хлоропластах, митохондриях, ЭПР, лейкопластах; транспорт в соседние клетки или питательную среду не происходит, а вакуоли и свободное пространство клетки часто используются для накопления (депонирования) метаболитов.

Если метаболиты накапливаются преимущественно внутриклеточно, то на промышленном этапе возрастает роль методов разрушения клеток и эффективной экстракции; при секреции продукта в среду упрощается очистка и повышается экономичность процесса.

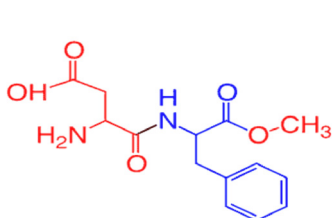
## Биотехнология в медицине

Биотехнологическими методами получают широкий спектр медицинских препаратов, в том числе:

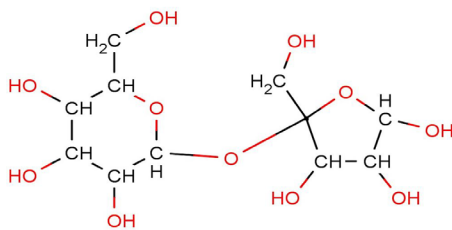
- вакцины;
- антибиотики;
- витамины ( $B_2$ ,  $B_{12}$ , D; при производстве витамина С химическим способом обычно используется одна биотехнологическая стадия);
- гормональные препараты: инсулин, гормон роста (соматотропин);
- иммуномодуляторы и иммунодепрессанты;
- кровезаменители;
- медицинские ферменты, например: стрептокиназа (применяется для растворения тромбов), протеазы (используются для очищения гнойных очагов и при лечении ожогов);
- коферменты – вещества, усиливающие действие ферментных систем организма (например, рибоксин применяют при сердечно-сосудистых и ряде других заболеваний);
- аминокислотные препараты медицинского назначения, которые используют как компонент парентерального (энтерального) питания при лечении, а также в программах восстановительной терапии и спортивной подготовки.

Важнейшее направление современной медицинской биотехнологии – получение рекомбинантных белков (интерфероны, факторы свертывания, ферменты заместительной терапии) и терапевтических моноклональных антител, а также создание диагностических тест-систем на их основе.

Подсластители получают на основе аминокислот. Например, аспартам в 160–200 раз слаще сахара.



Аспартам  $C_{14}H_{18}N_2O_5$



Сахароза  $C_{12}H_{22}O_{11}$

Настойка из корня женьшеня повышает тонус человека, снижает утомляемость. Биотехнология позволяет получить это лекарство путем культивирования изолированных клеток.

Клеточные культуры (в том числе культуры животных клеток) широко используют и для производства вакцин и вирусных векторов, что особенно важно для современных профилактических и терапевтических технологий.

Применение биотехнологических методов позволяет синтезировать следующие соединения:

– *биоразлагаемые полимеры* (полигидроксibuтират) – в хирургии из него формируют нити, штифты для соединения костей;

– *моноклональные антитела* – на их основе созданы диагностические препараты по определению беременности, предрасположенности к диабету, ревматоидному артриту, по установлению ряда наследственных заболеваний.

– *препараты против комаров* – созданы биопрепараты на основе микроорганизмов, которые патогенны для личинок комаров и безвредные для человека и других животных.

– *косметические токсины* – известны микроорганизмы, которые продуцируют ботулины – сильнодействующие яды паралитического действия. Их вводят в состав омолаживающих косметических средств.

Кроме того, биотехнология обеспечивает получение пробиотиков и метабитиков для медицины, а также биосовместимых материалов и покрытий для имплантов, ускоряющих регенерацию тканей.

### **Биотехнология в животноводстве и ветеринарии**

Недостаток кормового белка можно восполнить биотехнологическим путем. Так, продуцентами кормового белка могут быть бактерии, дрожжи, микроскопические водоросли, микро- и макромицеты, которые можно выращивать на различных отходах.



Один из способов сохранения скошенной травы и увеличения ее питательной ценности – силосование. При этом растительную массу уплотняют в специальных силосных ямах и вводят в нее специальные закваски (смесь микроорганизмов).

Биотехнологическим путем производят кормовые витамины (А, D, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, С и др.), пробиотики – биологические препараты, которые представляют собой культуры симбионтных микроорганизмов или продукты их ферментации, которые способствуют росту последних, подавляют рост патогенных и условно-патогенных ми-

кроорганизмов, нормализуют пищеварение, обладают антитоксическим и антиаллергическим действием.

В ветеринарии биотехнология используется для производства вакцин, диагностических тестов (ИФА, ПЦР) и ферментных кормовых добавок, повышающих усвоение питательных веществ и продуктивность животных.

### **Биотехнология в растениеводстве**

Биотехнологическими методами получают ростовые вещества для растений (гиббереллины).



**Рис. 18. Гиббереллины**

*Гиббереллины* – это большой класс природных фитогормонов (дитерпеновых кислот), регулирующих рост и развитие растений.

Основные функции:

1. Стимуляция роста стебля (удлинение междоузлий) – главный эффект;
2. Прерывание покоя семян и клубней, стимуляция прорастания.
3. Индукция цветения у некоторых растений (например, заменяют яровизацию или длинный день).
4. Участие в половой дифференцировке (у огурцов способствуют формированию мужских цветков).
5. Увеличение размеров плодов (особенно бессемянных, например, винограда).

Механизм действия: Гиббереллин связывается с рецептором, что запускает разрушение DELLA-белков – ключевых репрессоров роста. Это снимает «тормоз» с факторов транскрипции, что приводит к активации генов, ответственных за:

- Синтез ферментов, разрыхляющих клеточную стенку (экпансины).
- Мобилизацию запасных веществ в семенах (например, синтез  $\alpha$ -амилазы в алейроновом слое злаков – классический пример, используемый в пивоварении для солодования).

Практическое применение в сельском хозяйстве и биотехнологии:

1. Получение бессемянного винограда крупных размеров (опрыскивание кистей).
2. Ускорение и синхронизация прорастания в семеноводстве.
3. Увеличение урожая солода в пивоварении (обработка ячменя).
4. Регуляция пола цветков у двудомных растений.
5. Ускорение роста декоративных и технических культур.

Существует более 130 различных гиббереллинов ( $GA_1$ ,  $GA_2$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$  и т.д.), но биологической активностью обладают лишь немногие ( $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$ ,  $GA_7$ ). Гибберелловая кислота ( $GA_3$ ) – самый распространенный коммерческий препарат.

Разработаны оригинальные способы борьбы с насекомыми-вредителями растений (энтомопатогенные препараты). Для этого выращивают специальные микроорганизмы, которые заражают и убивают насекомых, но не вредят человеку, животным и самому растению.



**Рис. 19. Феромонные ловушки**

Еще один способ борьбы с насекомыми – обработка участков поля феромонами (половыми аттрактантами насекомых).

Феромоны насекомых – это выделяемые наружу химические сигнальные вещества, которые вызывают специфические поведенческие или физиологические реакции у особей того же вида. Они играют ключевую роль в коммуникации: привлечении партнера, маркировке троп, оповещении об опасности и т.д.

Их использование для защиты растений основано на прерывании нормальной коммуникации вредителей, что дезориентирует их и снижает численность. Это один из методов биотехнологической защиты растений.



**Рис. 20. Бактериальные удобрения**

Бактериальные удобрения – препараты на основе микроорганизмов, которые способны потреблять азот из воздуха и переводить его в аммонийную и органическую форму.

Биотехнология предлагает метод создания безвирусной рассады. Например, изолированные клетки клубней картофеля размножают в суспензии. Затем выращенные клетки «пересаживают» в искусственный грунт и из каждой клетки вырастает «клубенок» размером не более горошины. Эти горошины высевают в поле как рассаду, из которой нормальным путем вырастает растение картофеля с множеством клубней.



**Рис. 21. Микрклональное размножение растений**

Также широко применяют микрклональное размножение плодовых и декоративных культур, а в селекции – получение дигиплоидов и «спасение зародышей» для ускорения выведения новых сортов.

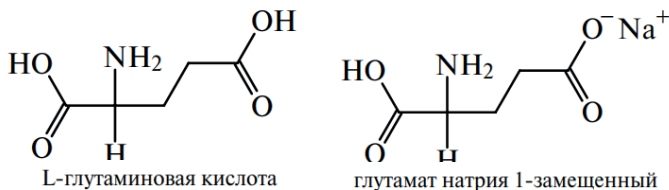
## Биотехнология в пищевой промышленности

Биотехнологическим путем также получают пищевые подкислители: лимонная, яблочная, молочная и другие кислоты.

Микроорганизмами синтезируется глутаминовая кислота (глутамат), которая используется для усиления аромата мясных, рыбных, грибных изделий.

Глутаминовая кислота и ее соль (глутамат натрия) – это одно и то же соединение в разных формах, ключевой компонент вкуса умами. Их получают в промышленности двумя основными способами: химическим (менее экономичен, требует разделения изомеров, используется реже) и микробиологическим синтезом.

Микробиологический синтез (биотехнологический, основной метод). Используют промышленные штаммы бактерий, чаще всего *Corynebacterium glutamicum*. Эти микроорганизмы генетически оптимизированы для сверхпродукции глутаминовой кислоты. Бактерии выращивают в биореакторах на дешевой питательной среде (часто из мелассы, гидролизатов крахмала). Специально нарушают их клеточный барьер (например, ограничивая биотином), чтобы кислота легко выделялась в среду. Из культуральной жидкости ее очищают, кристаллизуют и нейтрализуют щелочью для получения глутамата натрия.



Глутаминовая кислота ( $C_5H_9NO_4$ ), плохо растворима в воде. Глутамат натрия – это ее натриевая соль ( $C_5H_8NO_4Na$ ), хорошо растворима и именно она является той самой вкусовой добавкой. В настоящее время свыше 2 млн. тонн глутамата в год производят в основном биотехнологически с помощью бактерий-продуцентов, что делает его одним из крупнейших продуктов промышленной ферментации.

В пищевой промышленности используют витамины, получаемые биотехнологическим путем. Например, бета-каротин (провитамин А) применяют как пищевой краситель (оранжевого цвета).

Возможно получение пищевого белка из микроорганизмов. Так, пищевой продукт микопротеин получают на основе биомассы мицелиальных грибов рода *Fusarium*. Для вкуса и цвета в него вводят специальные пищевые добавки. Стало возможным культивировать мицелий высших

съедобных грибов (вешенки, опят, маслят и др.) глубинным способом, т.е. в ферментере.

Для получения сырокопченых колбас в фарш вводят закваски на основе молочнокислых микроорганизмов, которые способствуют созреванию и приданию продукту специфического приятного вкуса.

Ферменты микробного происхождения находят широкое применение в пищевой промышленности. Так, целлюлаза применяется при приготовлении растворимого кофе, для улучшения консистенции грибов и овощей; глюкозооксидаза – для удаления кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, соков; протеаза – для размягчения мяса; бета-галактозидаза – для получения «безлактозного» молока; пектиназа – для осветления соков и др.

Микроорганизмы или изолированные клетки высших грибов используют для получения пищевых красителей ярко-желтого, красного, синего цвета. Такие красители безопасны в использовании для пищевых целей.

В качестве пищевых загустителей биотехнология предлагает использовать полисахариды микробного происхождения. Например, декстран – стабилизатор при производстве мороженого.

Пищевые консерванты – вещества, которые добавляют в пищевые продукты для увеличения срока их хранения. Известны консерванты биотехнологического происхождения. Например, низин – выделяется специальными штаммами молочнокислых бактерий.

Современная пищевая биотехнология включает также производство ферментированных продуктов (йогурты, сыры, хлеб, напитки) с использованием стандартизованных заквасок, а также получение безаллергенных и функциональных пищевых ингредиентов (пребиотики, пищевые волокна, биопептиды).

### ***Экологическая биотехнология***

В начале XX века предложен метод аэробной биологической очистки сточных вод с помощью активного ила. Активный ил – это смесь микроорганизмов, которые способны перерабатывать хозяйственно-бытовые, промышленные и другие загрязнения.

В результате анаэробного сбраживания жидких концентрированных отходов получают газ, содержащий 65 % метана и 30 % диоксида углерода, который может быть использован для отопления. Сброженный осадок используют как удобрение.

Для очистки газовых выбросов применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. При этом вредные примеси сорбируются на насадке, а затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

Разработаны биотехнологические способы восстановления загрязненных территорий при разливах нефти; методы деградации химических пестицидов и инсектицидов; методы снижения концентрации метана в шахтах; стиральные порошки с ферментами микробного происхождения (протеазами).

Определенные виды микроорганизмов способны осаждать на себе (сорбировать) тяжелые металлы из стоков (медь, никель, хром, свинец и др.). Такая биомасса является сырьем для получения цветных металлов.

Перспективным направлением является биоремедиация. Это биотехнологический метод очистки почвы, воды и воздуха от загрязняющих веществ с использованием живых организмов – бактерий, грибов, растений (фиторемедиация), водорослей или их ферментов, а также биовыщелачивание металлов из бедных руд и техногенных отходов с помощью бактерий-литотрофов.

В экологическом мониторинге применяют биосенсоры (микробные, ферментные, ДНК-сенсоры), позволяющие быстро выявлять токсиканты и патогены в воде и почве.

### ***Нанобиотехнология***

Наиболее многообещающими могут быть исследования в области нанобихотехнологии, 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.

ДНК используется для создания наноструктур и в качестве важного компонента наноустройств. Вполне вероятно, что ДНК, представляющая собой молекулу, хранящую информацию, может стать основным компонентом компьютеров следующего поколения.

К практическим приложениям нанобиотехнологии относят создание наночастиц для адресной доставки лекарств, нанопокровов с антимикробными свойствами, а также высокочувствительных диагностических платформ (наносенсоры) для выявления биомаркеров и патогенов.

#### **Фундаментальные исследования и инструменты**

- *ДНК-нанотехнология:* Использование молекул ДНК не только как носителя генетической информации, но и как программируемого «строительного материала». Метод ДНК-оригами позволяет создавать заданные двух- и трехмерные нанообъекты (коробочки, трубки, решетки) для доставки лекарств или организации наноэлектронных компонентов.

- *Биомиметика и самосборка:* Изучение и копирование природных наноструктур (например, листья лотоса для создания супергидрофоб-

ных поверхностей, раковины моллюсков для сверхпрочных материалов) и использование принципов самосборки биомолекул (белков, липидов) для конструирования новых материалов «снизу вверх».

- *Нанороботы и молекулярные моторы*: Разработка наноразмерных устройств на основе ДНК или белков, способных выполнять механическую работу внутри клетки (например, доставлять груз в строго определенное место).

### **Приложения в медицине и фармакологии**

- *Таргетная (адресная) терапия*: Наночастицы (липосомы, дендримеры, полимерные мицеллы) служат «контейнерами» для лекарств, антител или генетического материала (ДНК, РНК). Их поверхность функционализируют лигандами (антителами, пептидами) для точного наведения на клетки-мишени (например, раковые), что резко повышает эффективность и снижает побочные эффекты.

- *Тераностика*: Создание мультифункциональных наночастиц, которые объединяют диагностику и лечение. Частица может одновременно нести контрастный агент для МРТ, лекарство и флуоресцентную метку для отслеживания.

- *Регенеративная медицина*: Разработка нанопористых скаффолдов (каркасов) и функциональных наноматериалов, имитирующих внеклеточный матрикс, для направленной регенерации тканей (костей, нервов, хрящей).

### **Диагностика и аналитика**

- *Наносенсоры и биосенсоры*: Устройства на основе углеродных нанотрубок, графена, квантовых точек или металлических наночастиц (золота, серебра) для сверхчувствительного (вплоть до детекции единичных молекул) и быстрого обнаружения: *Биомаркеров* (онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний); *Патогенов* (вирусов, бактерий, их токсинов); *Загрязнителей* в окружающей среде.

- *Лаборатория-на-чипе (Lab-on-a-Chip)*: Миниатюрные диагностические платформы, интегрирующие нанобиосенсоры и микрофлюидные каналы для экспресс-анализа малых объемов биологических жидкостей в режиме реального времени.

### **Создание новых материалов и покрытий**

- *Антимикробные нанопокрyтия*: На основе наночастиц серебра, меди, оксида цинка или графена для больничных поверхностей, имплантатов, упаковки пищевых продуктов. Механизм действия – повреждение мембран бактерий или генерация активных форм кислорода.

- *«Умные» материалы*: Поверхности, меняющие свойства (смачиваемость, адгезию) в ответ на внешние стимулы (свет, температура, pH), что востребовано в имплантологии и тканевой инженерии.

## **ДНК-вычисления и наноэлектроника**

- *Молекулярные компьютеры:* Использование ДНК-молекул для хранения и обработки информации благодаря их огромной плотности записи и принципам комплементарности. Хотя это пока фундаментальные исследования, потенциал для создания биогибридных систем огромен.

- *Биоэлектроника:* Интеграция биомолекул (ферментов, ДНК) с электронными компонентами для создания биосенсоров нового поколения или нейроморфных компьютеров, имитирующих работу мозга.

Несмотря на огромный потенциал, область сталкивается с вызовами: потенциальная токсичность некоторых наноматериалов, сложность масштабирования производства, этические вопросы и необходимость междисциплинарной подготовки кадров. Будущее нанобиотехнологии связывают с конвергенцией технологий (NBIC-конвергенция), где нано-, био-, информационные и когнитивные технологии объединятся для создания принципиально новых решений в медицине, экологии и энергетике.

Таким образом, нанобиотехнология – это не просто применение наноинструментов в биологии, а создание принципиально новых гибридных систем и материалов, стирающих границу между живым и неживым, с потенциалом для революции в здравоохранении, промышленности и IT.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

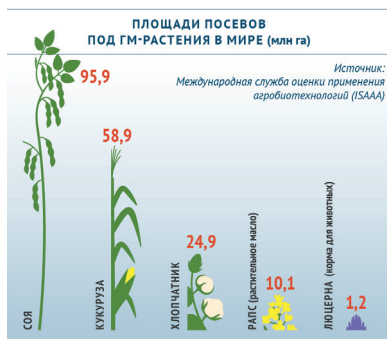
Современная биотехнология обладает значительным потенциалом для удовлетворения ключевых потребностей человечества, обеспечивая разработку и производство широкого спектра биотехнологических препаратов медицинского и ветеринарного назначения, пищевых продуктов, средств защиты растений и биоудобрений, биопрепаратов для природоохранных мероприятий, технологий для добычи минерального сырья, получения новых материалов, создания возобновляемых источников энергии, а также разработки электронных устройств различного назначения.

В широком смысле биобезопасность включает систему научных, организационных и правовых мер, направленных на предотвращение или минимизацию неблагоприятных последствий для человека и окружающей среды при работе с биологическими агентами и биотехнологическими продуктами; при этом биоохрана/биозащита чаще рассматривается как предотвращение несанкционированного доступа, умышленного неправомерного использования и утечек биоматериалов и технологий.

По оценкам ФАО (Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН), к 2050 году биотехнологические разработки способны внести существенный вклад в рост продовольственного производства, вплоть до его удвоения и помочь смягчить последствия климатических изменений. В материалах ФАО также акцентируется ожидаемое увеличение мирового спроса на продовольствие и необходимость значительно наращивания сельхозпроизводства к 2050 г.; при этом биотехнологии рассматриваются как один из ключевых инструментов повышения продуктивности и устойчивости агросистем в условиях климатических рисков.

Во многих развитых странах приняты национальные программы развития биотехнологии, предусматривающие высокий уровень финансирования соответствующих исследований и разработок. Так, Китай по объему финансирования биотехнологических исследований занимает второе место в мире после США, причем около 40% государственных инвестиций в этом направлении приходится на агrobiотехнологические исследования.

Параллельно с финансированием в разных странах формируются национальные системы управления рисками: регламенты по обращению ГМО и продуктов их переработки, процедуры государственной реги-



**Рис. 22. Выращивание ГМ-растений в мире**

страции/допуска, требования к мониторингу и маркировке, а также стандарты лабораторного контроля (валидированные методы ПЦР/секвенирования и др.).

В коммерческое производство вовлечены, главным образом, ГМ формы таких культур как соя (53%), кукуруза (30%), хлопчатник (12%), рапс (5%). В США доля генетически модифицированной сои превышает 90% в общем производстве данной культуры, а биотехнологическая кукуруза составляет более 75% от валового производства данного продукта.

Структура посевных площадей и доли отдельных культур со временем меняются, однако «ядро» коммерческих ГМ-культур обычно составляют перечисленные культуры, у которых наиболее распространены признаки устойчивости к гербицидам и устойчивости к насекомым-вредителям, в т.ч. в «стекованных» (совмещенных) вариантах.

С помощью методов трансгенеза получены растения с улучшенными пищевыми характеристиками, включая изменения аминокислотного и липидного состава. Так, трансгенные линии сои способны синтезировать и накапливать в семенах лизин в количествах, примерно в 5 раз превышающих уровень у исходных форм; у ряда других ГМ-растений повышение содержания этой аминокислоты может достигать и существенно более высоких значений – вплоть до стократного.

Генно-инженерные подходы также позволяют целенаправленно изменять степень насыщенности и длину цепей жирных кислот. Примером служит трансгенный рапс с модифицированным составом масла, что повышает его ценность для косметической промышленности. Кроме того, ведутся разработки по получению моноклональных антител и их фрагментов с использованием трансгенных растений в качестве биофабрик.

Отдельным направлением стала «молекулярная фармацевтика растений» (pharming): получение в растениях белков медицинского назначения (антител, вакцинных антигенов, ферментов), где ключевое значение имеют требования к биоконтейнменту (биологической безопасности), прослеживаемости и исключению попадания фарм-продукции в пищевые/кормовые цепи.

Использование генетически модифицированных (ГМ) растений в агропрактике может давать заметный экономический эффект за счет снижения потерь урожая от вредителей, болезней и стрессов, а также за счет оптимизации затрат на средства защиты и технологию возделывания. Исторически одним из ключевых игроков на рынке ГМ-семян была компания Monsanto, однако в 2018 г. она была приобретена Bayer, а бренд Monsanto выведен из обращения. При анализе выгод и рисков важно учитывать высокую степень консолидации отрасли: крупные сделки и реструктуризации приводят к концентрации портфелей семян и агрохимии у ограниченного числа компаний (например, Corteva была сформирована в 2019 г. после реструктуризации DowDuPont).

При этом корректнее говорить, что полевые испытания ГМ-растений начались еще в середине 1980-х, а разные организации получали разрешения на испытания в разные годы: в США первые разрешения на полевые высвобождения выдавались с 1985 г.; далее, например, Calgene получала разрешения в 1988 г., а Monsanto – в 1989 г.

Обсуждение ГМ-продуктов остается дискуссионным из-за сочетания биологических/экологических вопросов (безопасность, устойчивость, возможные эффекты для агроэкосистем) и социально-экономических факторов (доступ к технологиям, патентование, структура рынка, регуляторные подходы в разных регионах).

Дополнительный источник напряженности – неординарные регуляторные подходы разных юрисдикций: одни страны делают акцент на «процессном» регулировании (как получено), другие – на «продуктовом» (какими свойствами обладает конечный продукт), что влияет на требования к регистрации, маркировке и оценке рисков.

Безусловно, биотехнологическое производство может представлять опасность для человека и экосистем, и основными факторами риска, которые могут вызвать неблагоприятные последствия, являются: 1) потенциальная патогенность ГМО; 2) потенциальная токсичность ГМО и новых продуктов питания; 3) потенциальная аллергенность ГМО и новых продуктов питания; 4) возможность горизонтального переноса генов.

В экологическом блоке рисков дополнительно выделяют:

а) перенос трансгенов (поток генов) в родственные дикие/сорные формы;

б) эффекты на нецелевые организмы и трофические связи;  
в) эволюцию устойчивости у вредителей и сорняков при масштабном применении одной технологии;

г) изменения агротехнологий (например, схемы гербицидных обработок), способные опосредованно влиять на биоразнообразие.

В научной среде нет единого подхода к оценке выгод и рисков генетически модифицированных организмов (ГМО): разные школы по-разному расставляют акценты в вопросах продовольственной безопасности, экологии, экономики и регулирования. Поэтому обеспечение биобезопасности при введении ГМО в обращение предполагает: 1) понимание технологий получения модифицированных организмов, 2) разработку процедур контроля и мониторинга последствия, 3) наличие прозрачной нормативной базы и научно обоснованных экспертных заключений.

Международная рамка биобезопасности включает, в частности, International Technical Guidelines for Safety in Biotechnology (UNEP, 1995) и Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии (принят 29 января 2000 г., вступил в силу 11 сентября 2003 г.), регулирующий трансграничные перемещения, обращение и использование живых модифицированных организмов.

Практически значимым инструментом управления является формализованная оценка рисков, которая обычно включает: идентификацию опасности, оценку вероятности экспозиции, оценку последствий и итоговую характеристику риска; далее следуют меры управления рисками и коммуникация рисков (обмен информацией между экспертами, регуляторами, производителями и обществом).

Подходы к маркировке (раскрытию) информации различаются по странам и зависят от порогов «случайной/технически неизбежной примеси», перечней культур и формы раскрытия. Например, в ЕС действует порог 0,9% для случайного или технически неизбежного присутствия разрешенных ГМО, при соблюдении условий, предусмотренных регла-



ментами. В США действует федеральный стандарт раскрытия информации о био-инженерных продуктах (National Bioengineered Food Disclosure Standard), введенный через правила USDA (обязательное раскрытие в установленной форме). В Японии правила маркировки опираются на систему обязательной (добровольной) маркировки и критерии по «непреднамеренной примеси» при идентификационно-сохраненных цепочках поставок (в материалах профильных обсуждений приводится ориентир 5% для непреднамеренного смешивания при IP-подходе). В Бразилии судебная практика подтверждала правомерность правила, связывающего обязанность информирования на этикетке с уровнем присутствия трансгенного компонента выше 1%.

Позиция ВОЗ о безопасности ГМ-продуктов. ВОЗ отмечает, что разработка генно-модифицированных продуктов может прямо или косвенно способствовать укреплению здоровья (например, через улучшение состава пищи или устойчивости культур), а имеющиеся на рынке ГМ-продукты, прошедшие оценку, «вряд ли представляют опасность» для здоровья человека.

Ключевой принцип ВОЗ – case-by-case: безопасность не является свойством самого метода (генной инженерии как таковой), а должна подтверждаться отдельно для каждого конкретного продукта и области применения.

Что обычно включает оценка:

- токсикологическая и аллергологическая оценка нового белка (продукта) экспрессии;
- анализ пищевой ценности и состава (сравнение с традиционным аналогом);
- проверка стабильности генетической вставки и уровня экспрессии;
- оценка возможных экологических эффектов и меры управления рисками;
- при необходимости – пострегистрационный мониторинг.

По данным, представленным в научных докладах о российской системе регистрации и контроля, за период проведения полного цикла медико-биологических исследований (с 1999 по 2021 гг.) ни один из ГМО, проходивших регистрационные исследования в России, впоследствии не был признан опасным для здоровья человека или животных.

Интересен тот факт, что фармацевтический рынок генно-инженерных препаратов в десятки раз больше сельскохозяйственного. Биотехнологии в медицине и фармацевтике развиваются особенно быстро: мировой рынок биологических лекарственных средств оценивается примерно в \$400 млрд (2024 г.). Для сравнения, мировой рынок ГМ-культур оценивается около \$24,8 млрд (2024 г.).

Биотехнологическим способом производят генно-инженерные белки (интерфероны, интерлейкины, инсулин, вакцины против гепатита и т.п.), ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотики, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины, антибиотики, биодеградируемые пластмассы, биосовместимые материалы. При этом общественное мнение по данному вопросу носит явно позитивный характер, не ведутся полемические споры, связанные с биотехнологической фармацевтикой, наоборот, подчеркивается, что использование предложенных подходов позволяет существенно модернизировать, сделать более эффективными и безопасными методы диагностики и лечения. Биотехнология и биофармацевтика рассматриваются как будущее мирового здравоохранения.

Для биофармацевтики ключевыми элементами биобезопасности выступают система строгих норм, правил и требований, регулирующих производство лекарственных средств, биологических препаратов, медицинских изделий и пищевых добавок с целью гарантировать их безопасность, качество и эффективность, инактивации/удаления возможных контаминантов, биологическая и физическая изоляция производственных штаммов, контроль отходов и выбросов, а также регламентация уровней биологической защиты для лабораторных и производственных работ.

Таким образом, при всей неоднозначности суждений, высказываемых как мировым научным сообществом, так и общественностью по вопросам получения и использования биотехнологической продукции, неоспоримым остается тот факт, что биотехнология относится к числу важнейших приоритетов XXI столетия. Ключевыми направлениями биотехнологических исследований являются молекулярное конструирование новых видов животных, растений, лекарственных препаратов, генная и протеиновая инженерия, тканевая инженерия на основе стволовых клеток, новые поколения промышленной биотехнологии.

В ближайшей перспективе биобезопасность будет все чаще обсуждаться в контексте редактирования генома, синтетической биологии и «дизайна» биосистем: это потребует уточнения критериев оценки рисков, обновления нормативной базы, развития лабораторной диагностики и повышения качества научной коммуникации с обществом.

## КРАТКАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ

**In vitro** – выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в асептических условиях. *In vivo* – процессы, протекающие в живом организме (в естественных условиях). *Ex vitro* – этап адаптации растений, полученных *in vitro*, к условиям вне стерильной культуры (теплица/грунт).

**Агрегаты** – группы клеток в суспензии, сохраняющие частичную связанность и влияющие на рост и дифференцировку.

**Акклиматизация** – постепенное приспособление растений-регенерантов к условиям пониженной влажности, измененной освещенности и микробного окружения вне стерильной культуры.

**Андрогенез** – процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна либо через гаметический эмбриогенез, либо с образованием каллуса.

**Биоконтейнмент (Biocontainment)** – это комплекс стратегий и методов, направленных на предотвращение неконтролируемого распространения генетически модифицированных организмов (ГМО), патогенов или синтетических биологических систем за пределы лаборатории или целевой области применения, а также их передачу другим организмам в окружающей среде.

**Вектор** – ДНК-конструкция (плазмида/вирусный вектор и др.), используемая для переноса гена в клетку.

**Время генерации клетки** – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

**Время удвоения популяции** – интервал времени, за который число клеток в популяции увеличивается вдвое.

**Гаплоид** – организм/клетка с одинарным набором хромосом ( $n$ ).

**Гиногенез** – процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.

**Двойной гаплоид (DH)** – организм, полученный удвоением хромосом у гаплоидов, генетически полностью гомозиготный.

**Дедифференциация** – переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

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

**Дифференцировка** – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

**Зиготический эмбриогенез** – развитие зародыша из зиготы при половом размножении.

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

**Индукция** – запуск определенного пути развития (каллусообразование, органогенез, эмбриогенез) под действием факторов среды и регуляторов роста.

**Индуцированное слияние** – слияние протопластов, стимулированное химическими или физическими (электрофузия) методами.

**Инициация культуры** – получение устойчиво растущей культуры из исходного экспланта.

**Инокулюм** (трансплант) – часть суспензионной (каллусной) культуры, используемой для пересадки в свежую среду.

**Каллус** – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений. *Первичный каллус* – каллус, полученный непосредственно из экспланта на индуцирующей среде. *Морфогенный каллус* – каллус, способный к органогенезу и/или соматическому эмбриогенезу. *Неморфогенный каллус* – каллус, не проявляющий способности к регенерации органов/эмбриоидов.

**Клеточная линия (культуральная линия)** – популяция клеток, поддерживаемая при многократных пассажах и характеризующаяся относительной стабильностью признаков.

**Клеточная селекция** – метод выделения мутантных клеток из соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

**Клон** – культура, возникшая из одной клетки.

**Клональная популяция** – популяция клеток, происходящая от одной исходной клетки.

**Клональное размножение** – процесс формирования организма, полученного *in vitro*, неполовым путем, генетически идентичного исходному.

**Компетентность** – способность клетки/ткани отвечать на морфогенетический сигнал (гормоны, стресс, условия среды) переходом к определенному пути развития.

Контаминация – загрязнение чего-либо биологическим материалом (микроорганизмами, вирусами, токсинами, клетками), которого там быть не должно.

**Криоконсервация** – длительное хранение клеток/тканей при сверхнизких температурах (обычно в жидком азоте) для сохранения свойств культуры.

**Культура изолированных протопластов** – выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризированной среде, содержа-

щей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации.

**Культура каллусных тканей** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных фрагментов органов или самих органов растений.

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

**Культура отдельных клеток** – выращивание одиночных клеток при низкой плотности посева на очень богатых питательных средах с помощью культуры-«няньки» или питающего слоя.

**Культура эксплантов** – инкубация в стерильных условиях на питательных средах, вызывающих или не вызывающих пролиферацию фрагментов, изолированных из разных органов растений.

**Культура-«нянька»** – вспомогательная культура, обеспечивающая одиночные клетки факторами роста и метаболитами.

**Лag-фаза (адаптационная)** – период приспособления клеток к новой среде перед началом активного деления.

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

**Маркерный признак** – наследуемая или устойчиво проявляющаяся характеристика (морфологическая, биохимическая, молекулярная), используемая для идентификации линии.

**Микроклональное размножение** – ускоренное клональное размножение растений в культуре *in vitro* (обычно через культуру меристем/ побегов).

**Митотический индекс** – доля клеток в митозе, характеризующая пролиферативную активность культуры.

**Многопассажные культуры** – это клеточные культуры, способные к многократному пассированию (пересеву) в лабораторных условиях без потери своих жизненно важных функций или с сохранением заданных свойств.

**Непрерывная культура** – выращивание с постоянным поступлением свежей среды и удалением равного объема культуральной жидкости.

**Непрямой органогенез** – образование органов через стадию каллусной ткани.

**Органогенез** – процесс возникновения *de novo* в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

**Осмотический стабилизатор** – вещество (например, маннитол/сорбитол), поддерживающее осмотическое давление и предотвращающее лизис протопластов.

**Пассаж (пересадка)** – один цикл культивирования культуры между двумя последовательными субкультивированиями. Это единица измерения "возраста" культуры *in vitro*.

**Пассирование** (от англ. *subculture* или *passage*) – это стандартная процедура в культивировании клеток и тканей, при которой часть биомассы (каллусной ткани или суспензионных клеток) переносят (пересевают) на свежую питательную среду для поддержания и продолжения роста.

**Первичная культура** – культура, полученная непосредственно из экспланта до первого субкультивирования.

**Периодическая культура** – выращивание без добавления свежей среды и удаления культуры до окончания цикла.

**Питающий слой** – слой клеток/тканей, стимулирующий рост одиночных клеток за счет выделяемых веществ.

**Плотность инокуляции** – количество клеток/масса ткани, вносимые на единицу объема (или на сосуд) при закладке культуры.

**Подпиточная культура** – выращивание с добавлением субстрата/компонентов среды без удаления основной массы культуры.

**Популяция клеток** – совокупность культивируемых клеток.

**Пролиферация** – новообразование клеток и тканей путем размножения.

**Прямой органогенез** – образование органов непосредственно из экспланта без стадии каллуса.

**Регенерация** – восстановление целого растения из клеток/тканей в культуре *in vitro* через органогенез или соматический эмбриогенез.

**Регенерация клеточной стенки** – восстановление стенки протопласта в культуре, необходимое для последующих делений и морфогенеза.

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

**Репортерный ген** – ген, продукт которого легко детектируется и используется для контроля экспрессии (например, по активности фермента/флуоресценции).

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

**Селективный агент** – фактор (токсин, соль, гербицид, антибиотик, стресс), позволяющий отбирать клетки с заданной устойчивостью/признаком.

**Селективный маркер** – ген/признак, позволяющий отбирать трансформированные клетки (например, устойчивость к определенному фактору).

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

**Соматоклональная изменчивость** – совокупность генетических и эпигенетических изменений, возникающих в культуре тканей и проявляющихся на уровне регенерантов.

**Соматоклональные вариации и варианты** – фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных геномов растительных клеток.

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

**Соматический гибрид** – растение, полученное путем гибридизации соматических клеток.

**Соматический эмбриогенез** – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток путем, напоминающим нормальный зиготический эмбриогенез.

**Субкультивирование** – перенос инокулюма (транспланта) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

**Субпротопласт** – изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

**Тотипотентность** – свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т.е. реализовывать тотипотентность ядра с образованием целого организма.

**Трансген** – введенный (чужеродный) ген или генетическая конструкция, присутствующая в геноме/клетке реципиента.

**Трансгеноз** – перенос любым способом чужеродных генов в клетки-реципиенты.

**Трансформация** – введение генетического материала в клетку (естественными или искусственными методами) с последующей интеграцией или временным существованием в клетке.

**Удельная скорость роста ( $\mu$ )** – скорость увеличения биомассы/числа клеток, отнесенная к текущей биомассе/числу клеток.

**Цибрид (цитоплазматический гибрид)** – гибрид, у которого ядро происходит от одного родителя, а органеллы (митохондрии/пластиды) – от другого.

**Цитопласт** – ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

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

**Эксплант** – фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

**Эмбрионид** – зародышеподобная структура, возникшая путем соматического эмбриогенеза.

**Эпигенетическая регуляция** – изменения экспрессии генов без изменения последовательности ДНК (метилование ДНК, модификации гистонов и др.).

**Эпигенетические вариации** – фенотипическое выражение дифференциальной активности генов, от мутаций и соматических вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка-растение-клетка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова Л.В. Прикладная биотехнология: учеб. пособие. СПб: ГИОРД, 2003. 288 с.
2. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций. Мн.: БГУ, 2004. 78 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. Пособие. М.: фбк-пресс, 1999. 160 с.
4. Воронин Е.С. Биотехнология: учебник. М.: ГИОРД, 2005. 792 с.
6. Глик Б. Молекулярная биотехнология. М.: Мир, 2002. 589 с.
7. Дышко В.Н. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве: курс лекций для аспирантов. Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. 69 с.
8. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.: Академия, 2005. 288 с.
5. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: курс лекций. Минск: БГУ, 2002. 105 с.
6. Квеситадзе Г.И., Безбородов А.М. Введение в биотехнологию. М.: Наука, 2002. 284 с.
7. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. М.: Академия, 2007. 256 с.
8. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник. М.: Высш. шк., 2003. 469 с.
9. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: учеб. Пособие. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. 496 с.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА</b> .....	<b>3</b>
<b>ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ <i>in vitro</i>. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ</b> .....	<b>8</b>
<b>ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ</b> .....	<b>18</b>
<b>КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ</b> .....	<b>31</b>
<b>СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ</b> .....	<b>53</b>
<b>ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ</b> .....	<b>64</b>
<b>ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ</b> ...	<b>81</b>
<b>БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ</b> .....	<b>95</b>
<b>КРАТКАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ</b> .....	<b>101</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>107</b>

---

*Учебное издание*

### ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

*Краткий курс лекций*

Составители:

**Звездина** Татьяна Николаевна

**Филипенко** Сергей Иванович

**Игнатьев** Иван Иванович

Компьютерная верстка *А. Н. Федоренко*

ИЛ № 06150. Сер. АЮ от 21.02.02.

Подписано в печать 02.04.26. Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 6,75. Электронное издание. Заказ № 793.

*Изд-во Приднестр. ун-та. 3300, г. Тирасполь, ул. Мира, 18.*