ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Литература основная

1. Биотехнология/ Под. Ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. – М.: Высшая школа, 1987-1988. Т. 1-8.
2. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности «Зоотехния» / Ю.А. Горбунов, Г.Ф. Медведев, Н. Г. Минина [и др.]; под ред. Ю.А. Горбунова. — Минск: ИВЦ Минфи-на, 2010 – 288 с.
3. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учебник / Ю. А. Горбунов, Г.Ф. Медведев [и др.] под ред. Ю. А. Горбунова. – Минск: ИВЦ Минфина, 2016. – 344 с.
4. Биотехнология. Принципы и применение/Под ред. И.Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
5. Basic Biotechnology. Third Edition. Edited Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen. Cambridge university press. 2006. P. 666.

1. **Определение «биотехнологии» и «биотехнологического производства», «генетической инженерии»**
2. **Исторические предпосылки для возникновения биотехнологии**
3. **Направления и задачи биотехнологии**

1. Определение «биотехнологии» и «биотехнологического производства», «генетической инженерии»,

Термин «Биотехнология» появился в середине 70-х годов XX столетия благодаря достижениям биологии:

- **зарождению *генетической инженерии* (технологии рекомбинантных ДНК) после синтеза в 1972 г. первой рекомбинантной молекулы ДНК;**
- **культивированию клеток и тканей (*клеточной инженерии*);**
- **биохимии и технологии ферментов;**
- **микробиологии и иммунологии;**
- **использованию биологических процессов в промышленности (технологии ферментации – производству целевых продуктов и переработке отходов).**

Биотехнология (первое определение,1978):

- ***Извлечение выгоды в технологических процессах из свойств микроорганизмов и клеточных культур***

Современное, более полное:

- ***Биотехнология – наука о методах и технологиях создания и использования генетически измененных биологических объектов (растений, животных, микроорганизмов) для интенсификации производства или создания новых продуктов различного назначения (В. С. Шевелуха и др.).***

Биотехнологическое производство:

– ***полный биосинтез с помощью микроорганизмов биологически активных веществ и продуктов:***

антибиотиков,

ферментов,

витаминов,

аминокислот и др. или

– ***комплексное использование отдельных***

микробиологических и

химических стадий

при синтезе лекарственных препаратов и других ценных продуктов.

2. Исторические предпосылки для возникновения биотехнологии

Человек использует биотехнологические процессы многие тысячи лет. Области применения:

- **пивоварение и виноделие с использованием дрожжей;**
- **выпечка хлеба;**
- **приготовление молочных продуктов с помощью молочнокислых бактерий, пищевого уксуса при участии уксуснокислых бактерий;**
- **хранение и переработка продуктов путем ферментации (производство сыра, переработка соевых бобов с помощью мицелиальных грибов, дрожжей и молочнокислых бактерий в соевый соус).**
- **изготовление мыла из жиров,**

  простейших лекарств,

  получение льняного волокна.

В их основе метод микробиологической ферментации.

Как *самостоятельная наука* биотехнология выделилась благодаря разработке методов генетической инженерии.

В становлении биотехнологии велико значение других наук.

Поэтому *биотехнологию* можно рассматривать как междисциплинарную область научно-технического прогресса, возникшую на стыке

- **биологических,**
- **химических и**
- **технических наук.**

3. Направления биотехнологии

1. *Технология рекомбинантных ДНК*, генетическая (генная) инженерия

Сущность: в геном бактерии, клетки, животного или растения встраивается какой-либо чужеродный ген, отвечающий за нужный (полезный) признак; результат – изменение свойства объекта.

Справочно: геном – совокупность всех хромосом клетки или организма

В 1973 г. американские исследователи Стэнли Коэн и Энни Чанг встроили в бактериальную *плазмиду* участок ДНК лягушки.

Затем эту *плазмиду* вернули в клетку бактерии, которая стала синтезировать белки лягушки, а также передавать лягушечью ДНК своим потомкам.

Был найден метод, позволяющий встраивать чужеродные *гены* в *геном микро- или макро*организма.

Что это дало?

<u>В растениеводстве</u>:

разрабатываются и используются способы улучшения сельскохозяйственных культур

- **по урожайности,**
- **качеству (например, генно-инженерная соя),**
- **устойчивости к заболеваниям, а также**
- **способы борьбы с вредителями растений.**

США, Латинская Америка, Китай, Индия, Франция, Германия подняли сельское хозяйство на генетически модифицированных культурах.

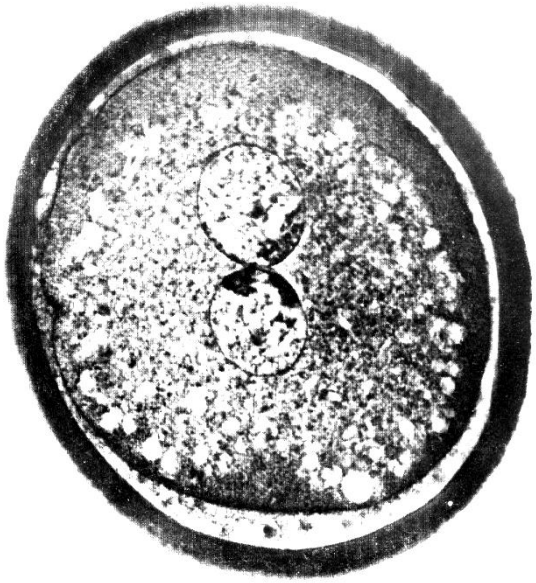
В животноводстве: получение трансгенных животных

Включение в геном чужеродного гена может решать две цели:

- **генетическое улучшение животных и**
- **получение животных для производства ценных продуктов.**

Схема получения

- **Получение и клонирование гена**
- **Получение зигот и выявление пронуклеусов**
- **Микроинъекция копий генов в видимый пронуклеус**



- **Трансплантация зиготы в половые органы подготовленной самки**
- **Оценка родившихся животных по генотипу и фенотипу:**

выявление интеграции и экспрессии чужеродной ДНК,

обнаружение продукта гена (например, соматотропина человека) и

выяснение влияния на признак (интенсивность роста)

- **Установление наследования гена**

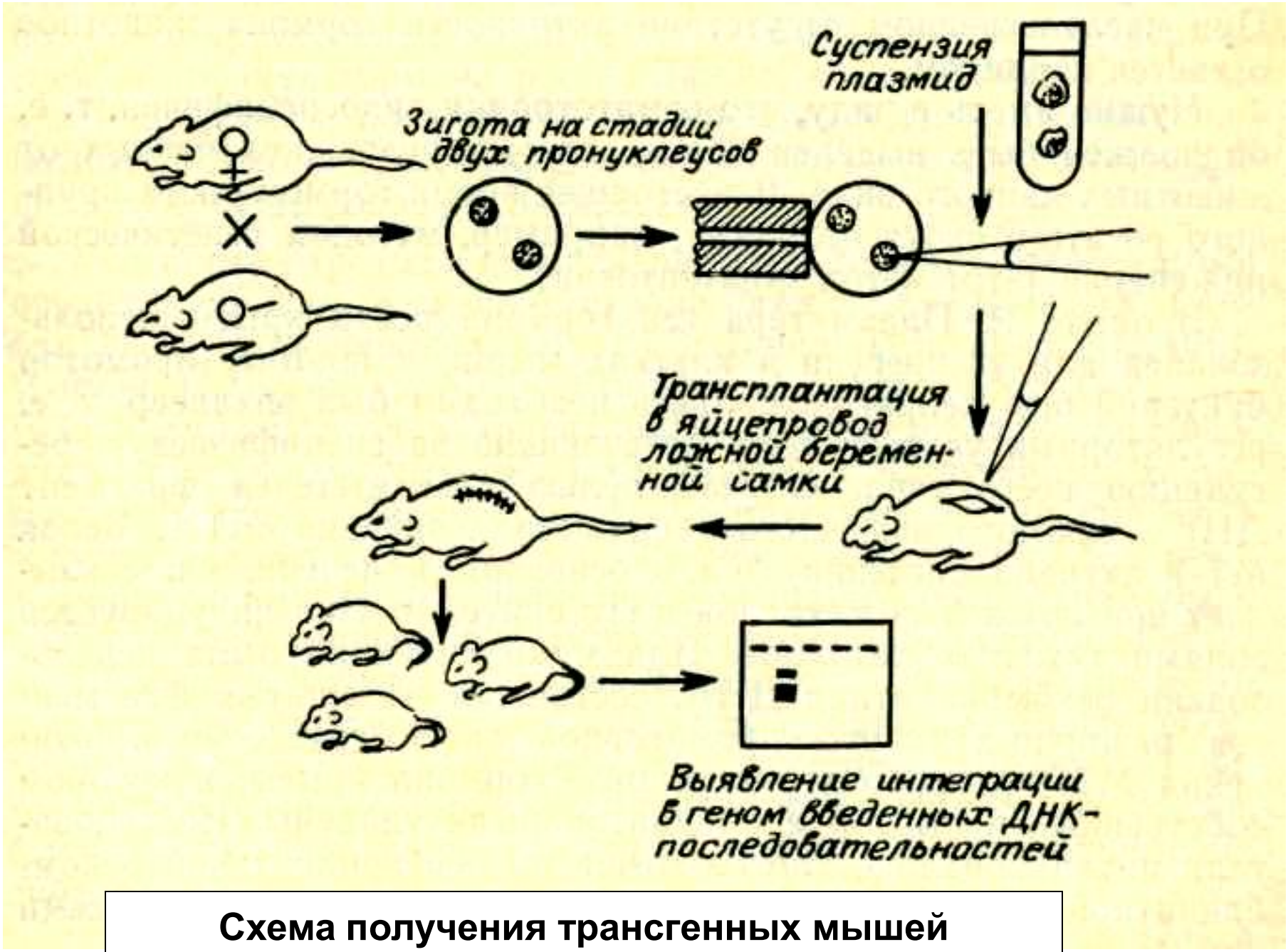


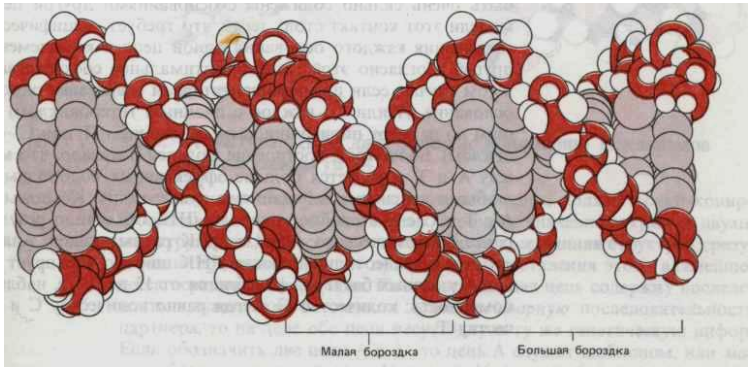
Схема получения трансгенных мышей

- **Получение трансгенных животных**





Два козлика, в геном которых включен ген лактофферина человека.



Схематическое изображение фрагмента ДНК

Созданы трансгенные коровы и козы, в молоке которых содержится человеческий альбумин, снижающий кровяное давление.

Получен из молока трансгенных животных препарат антитромбин, который применяется для лечения и профилактики инфаркта миокарда.

В медицине получение различных веществ:

- **интерферона, который применяется как противовирусное и противоопухолевое средство;**
- **инсулина,**
- **гормона роста человека и животных и др.**

Для получения этих и других веществ гены человека были клонированы в микроорганизмах.

К. Г. Скрябин считает, что тот, кто владеет генетической информацией, будет абсолютно владеть миром.

Уже сегодня можно получить полную расшифровку своего генома с прогнозом развития организма и предрасположенности к заболеваниям.

Неизбежный этап – изменение человека на генетическом уровне, протезирование органов из собственных тканей, а также клонирование.

2. Клеточная инженерия

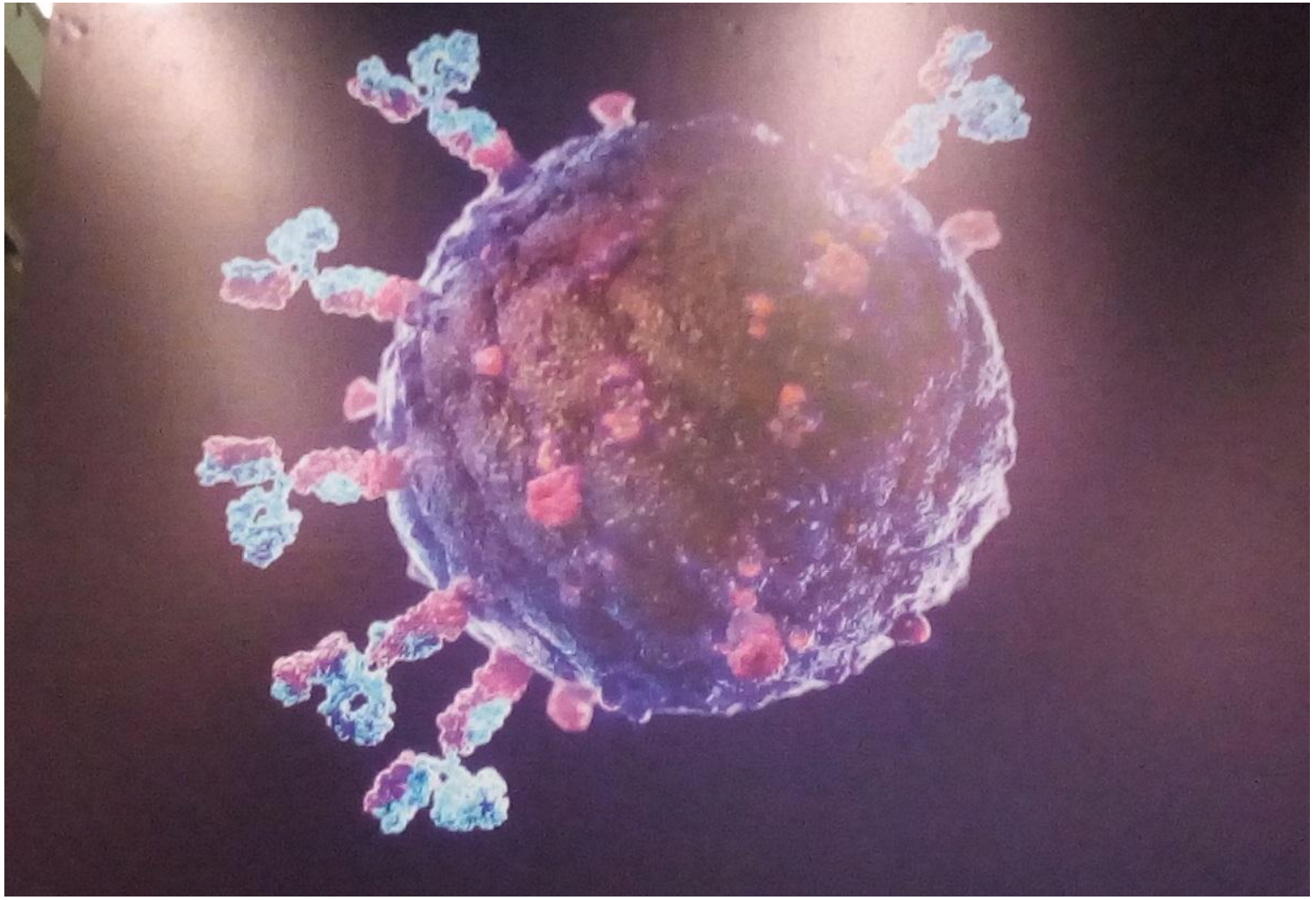
Основная форма существования жизни – клетка. В ней протекают все физиологические процессы, как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов.

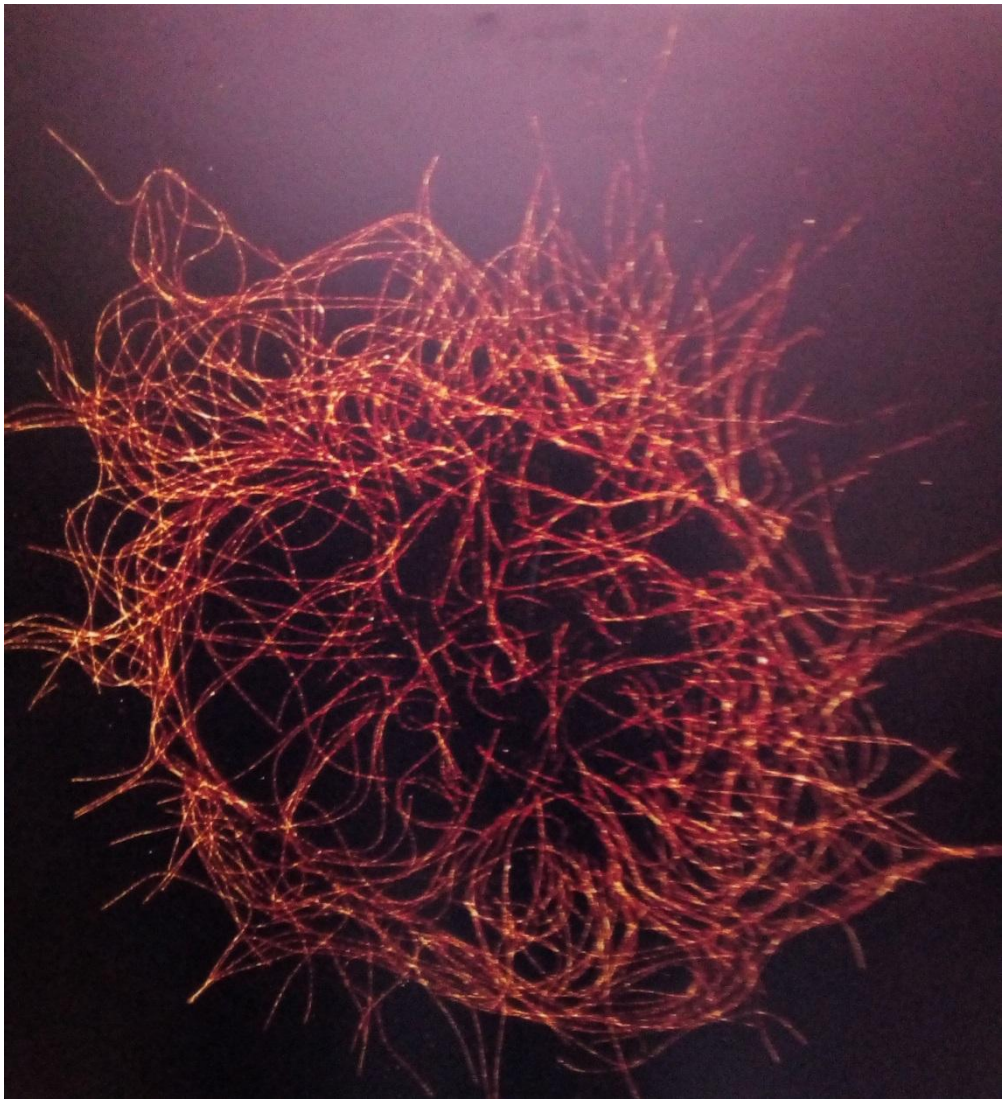
Рост и размножение организмов связаны с образованием новых клеток.

Каждая клетка на определённой стадии делится и даёт начало дочерним клеткам. Образуются разнообразные по форме, величине, степени дифференциации и функциям клетки.

3D – модель клетки.

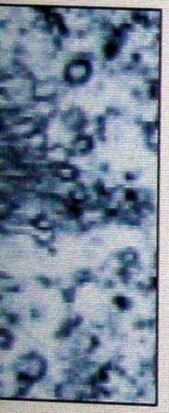
3D – моделирование. Newt Studios Medical Animation (USA)



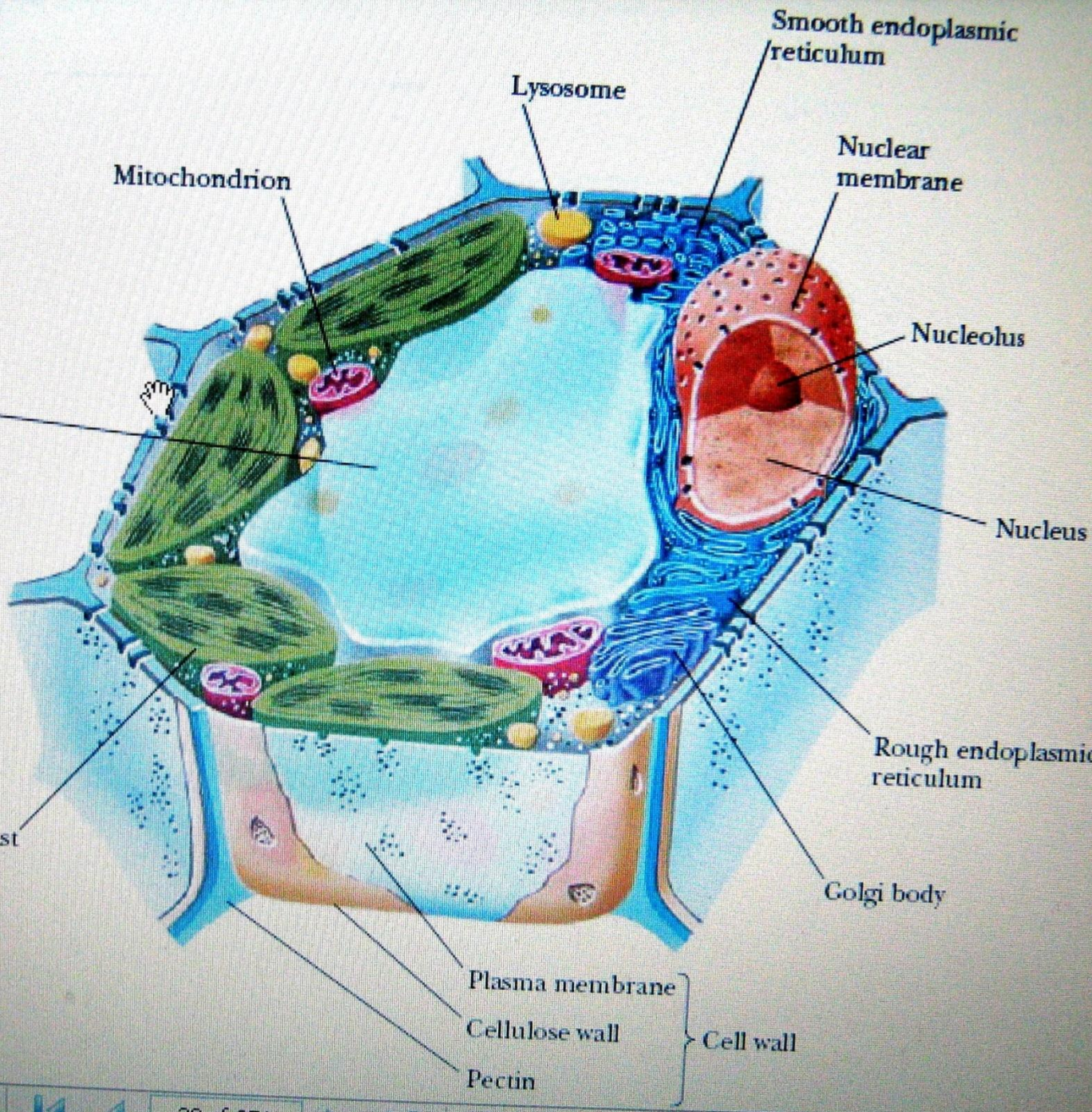


Цитоскелет. **Freely Universitat Berlin and the Dutch University of Utrecht**



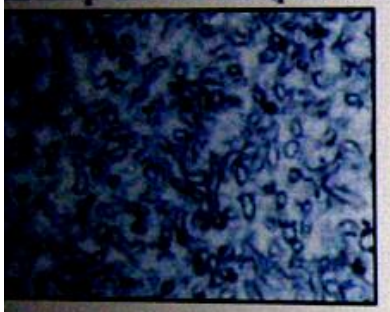




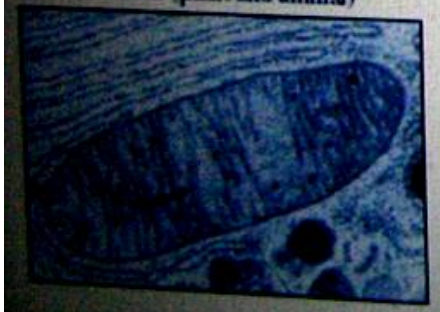

Smooth endoplasmic reticulum
Lysosome
Nuclear membrane
Mitochondrion
Nucleolus
Vacuole
Nucleus
Rough endoplasmic reticulum
Chloroplast
Golgi body
Plasma membrane
Cellulose wall
Cell wall
Pectin



h endoplasmic reticulum (plant and animal)



Mitochondrion (plant and animal)



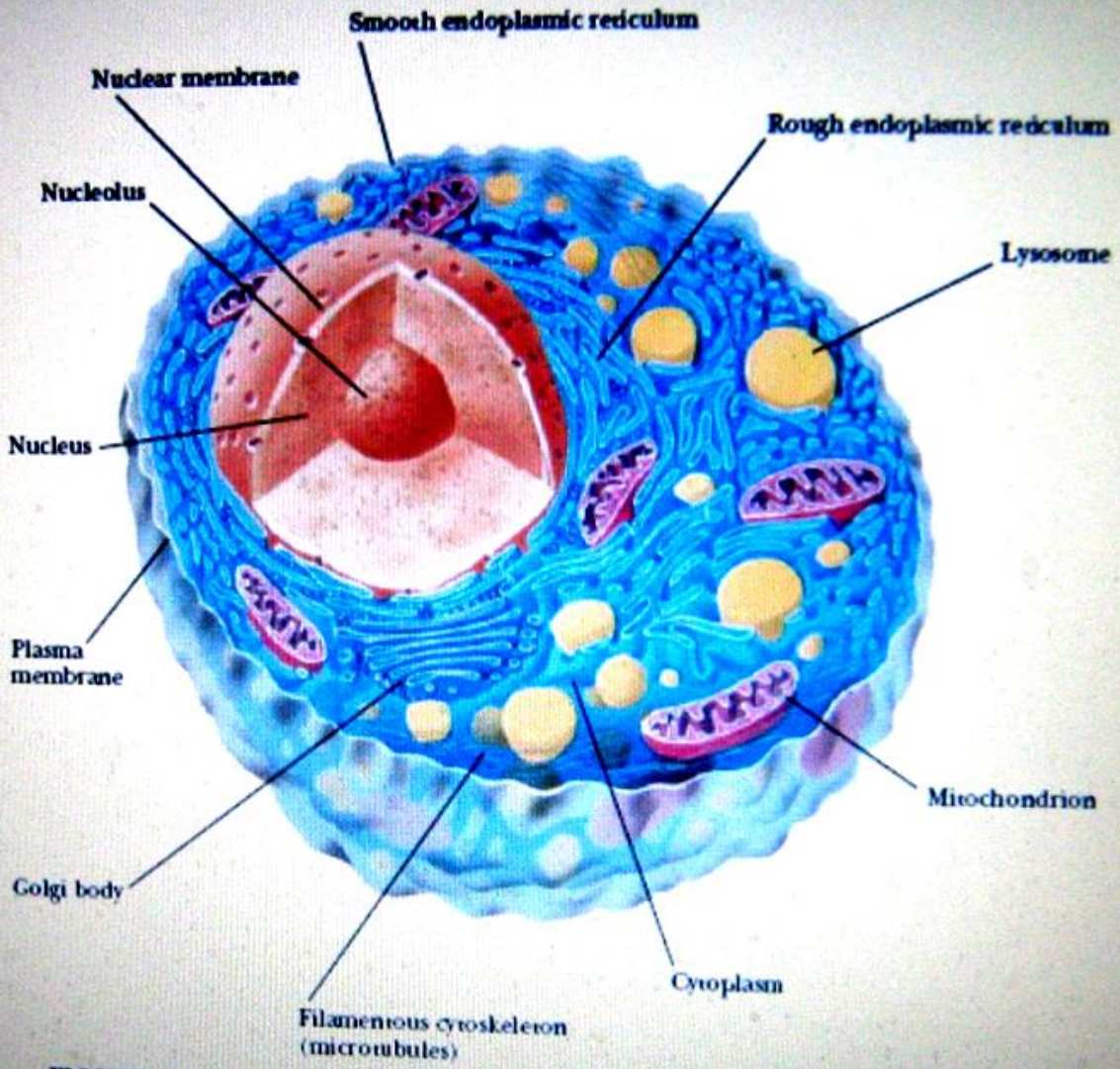
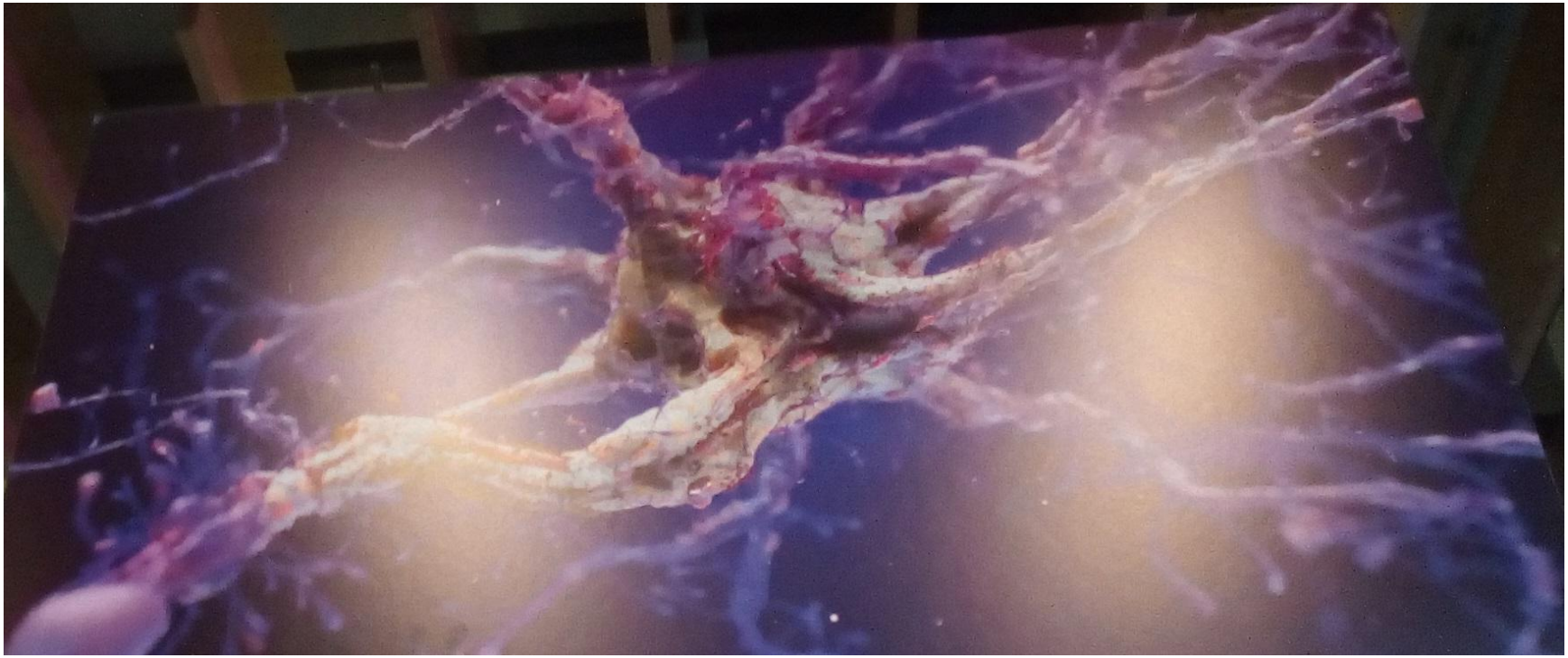


FIGURE 1.22 • This figure diagrams a rat liver cell, a typical higher animal cell in which the characteristic features of animal cells are evident, such as a nucleus, nucleolus, mitochondria, Golgi bodies, lysosomes, and endoplasmic reticulum (ER). Microtubules and the network of filaments constituting the cytoskeleton are also depicted. (*Photo. by. Dwight R.*

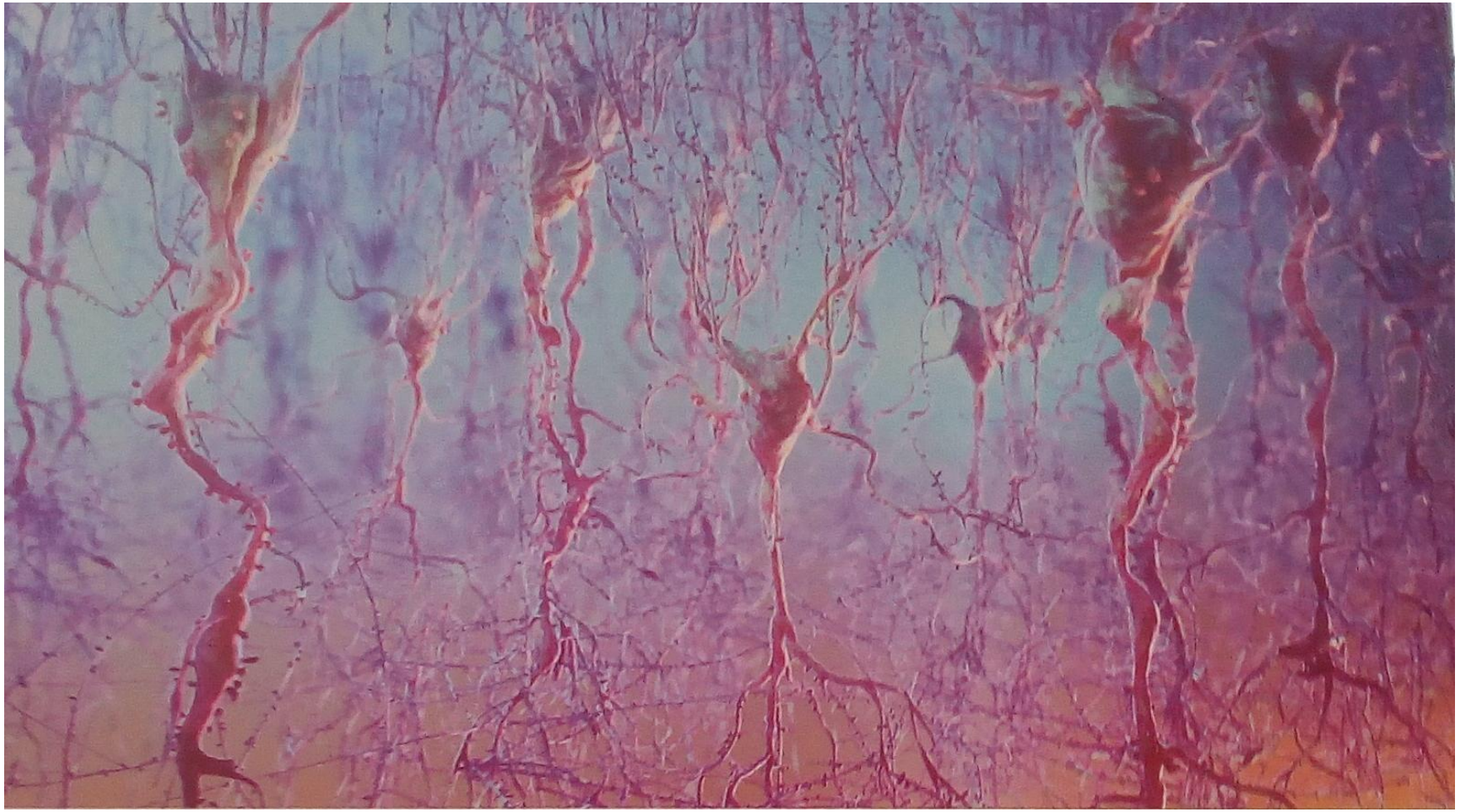


Клетка кожи (кератиноцит). Torsten Wittmann



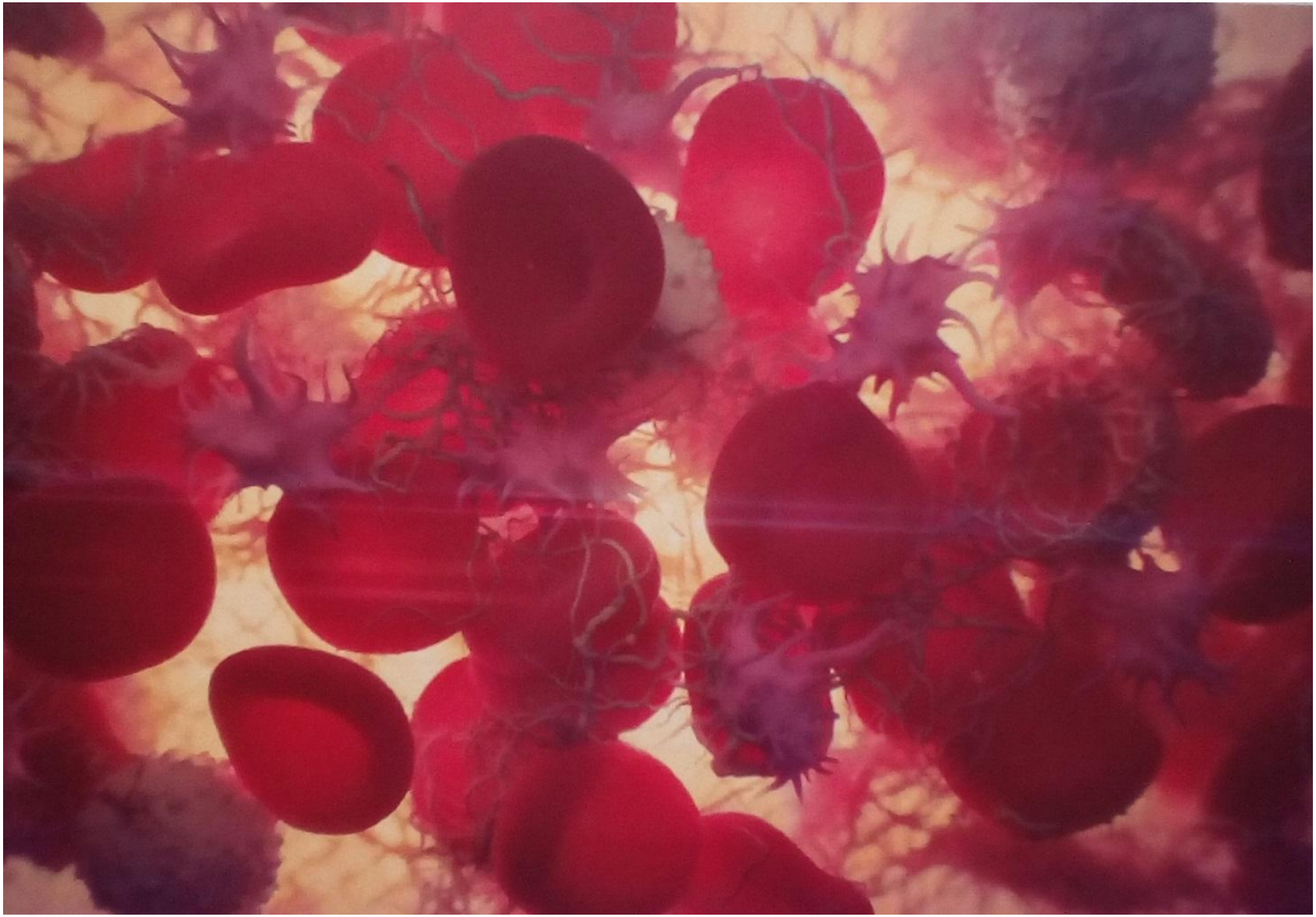
Нейроны головного мозга. 3D – моделирование

Newt Studios Medical Animation (USA)



Нейроны головного мозга. 3D – моделирование

Newt Studios Medical Animation (USA)



Свертывание крови. 3D – моделирование Newt Studios Medical Animation (USA)



Бактерия Leptospira. 3D – моделирование

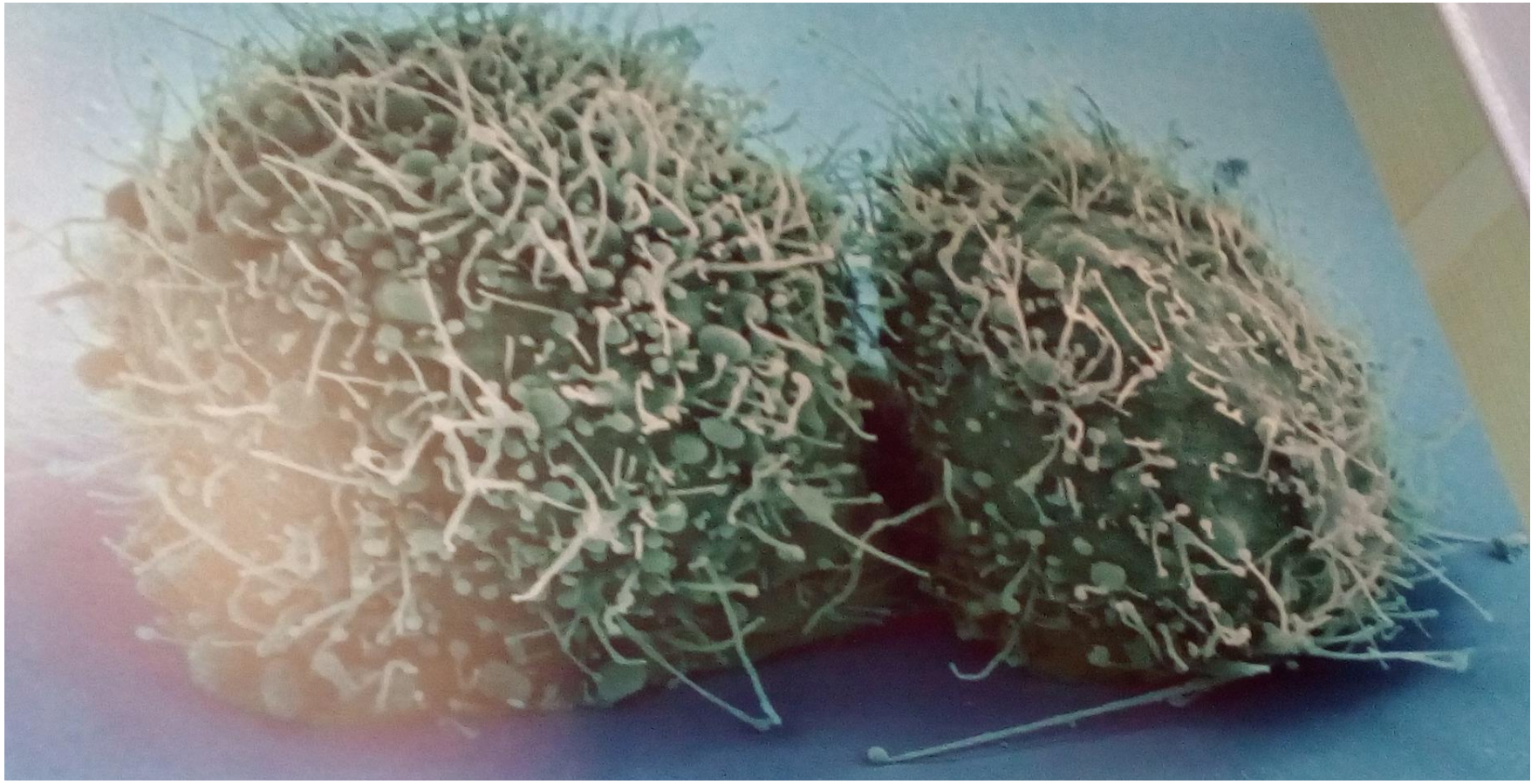
Newt Studios Medical Animation (USA)



Hela, бессмертные клетки.

Сканирующая электронная микроскопия

National Center for Microscopy and Imaging Research



Hela, бессмертные клетки.
Завершенная стадия деления.

Сканирующая электронная микроскопия
National Center for Microscopy and Imaging Research

Все соматические клетки специализированы, т.е. выполняют какую-либо функцию.

Эмбриональная стволовая клетка не имеет никаких функций, кроме переноса мРНК в следующее клеточное поколение.

Способность к неограниченному делению сохраняется у нее до тех пор, пока она не получит генетического сигнала.

После деления дочерняя клетка может остаться стволовой, какой была и родительская клетка, или начать необратимый путь дифференциации и превратиться в один из 150 возможных типов зародышевых клеток.

Стволовые клетки могут использоваться как источник первичного клеточного «сырья», из которого можно вырастить теоретически любую специализированную клетку.

Вся работа генома контролируется набором генов, которые сначала формируют остов клетки, потом ее внутреннюю структуру (органеллы) и затем целиком клетку с полным набором генов.

В последний момент в клетку встраивается генетическая программа, определяющая ее специализацию.

Имея одинаковый набор генов, в организме есть по меньшей мере 350 типов клеток, работающих по различным генетическим программам.

А в одной-единственной клетке имеются 5000 так называемых генов эмбриогенеза, регулирующих на начальной стадии развития зародыша превращение в организм, состоящий из миллиардов клеток.

Стволовые клетки в виде островков имеются во многих тканях и сохраняются бесконечно.

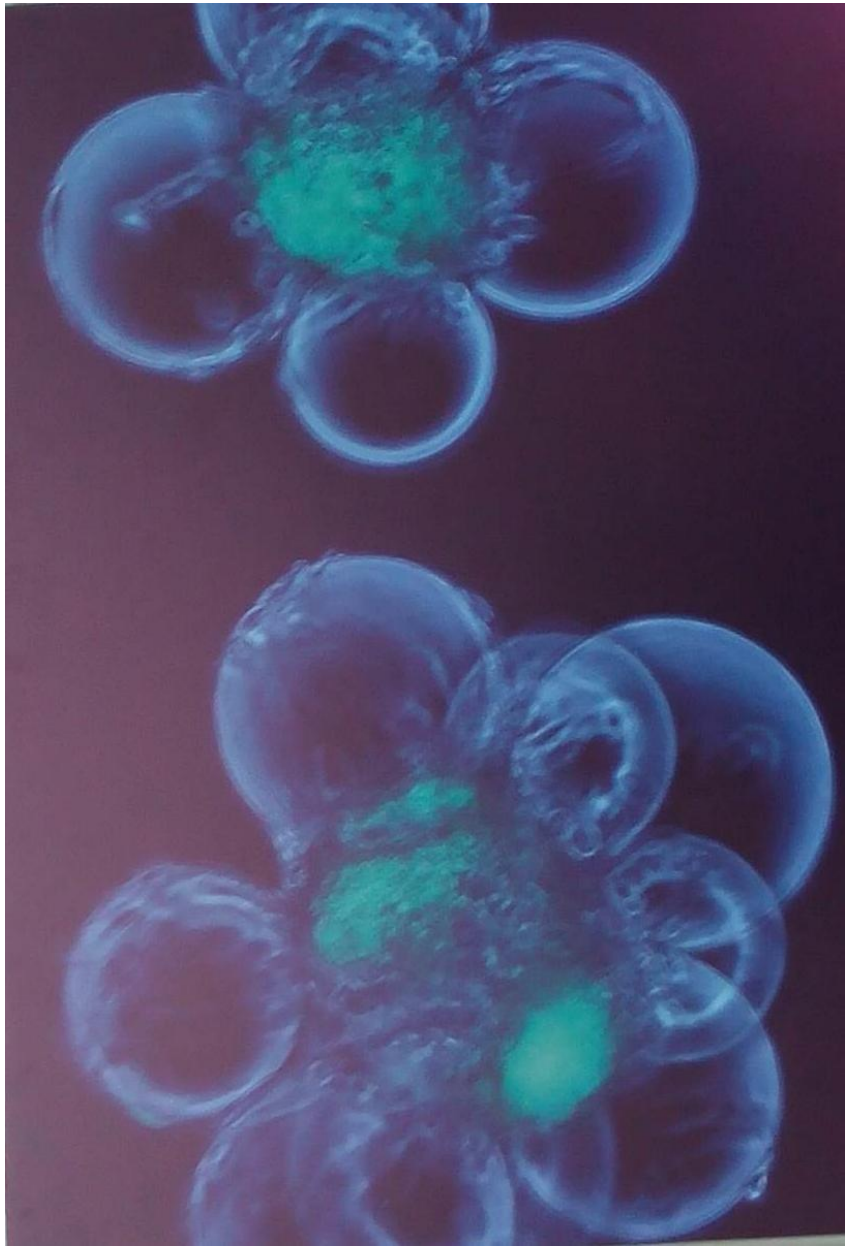
Внешне они отличаются от клеток дифференцированных, но имеют клеточную память, которая направляет их развитие после деления в ранее предопределенном направлении. То есть такие клетки *детерминированы*.

Но детерминация не строго необратимое изменение. Японским ученым удалось превратить такую клетку в «универсальную», способную развиваться в клетки различных тканей и органов.

Получены и сперматозоиды из клеток соматических

Сначала в результате деления зиготы образуются клетки (бластомеры), которые не становятся зачатками будущих органов или тканей. Они просто переносчики генетической информации в виде молекул РНК.

Когда накопится достаточное количество информации, в работу включаются гены, ответственные за специализацию, после чего начинают формироваться семейства различных стволовых клеток и происходит сегментация зародыша (структурно выделяются участки будущих органов). Количество клеток в том или ином сегменте (будущем органе) генетически запрограммировано.



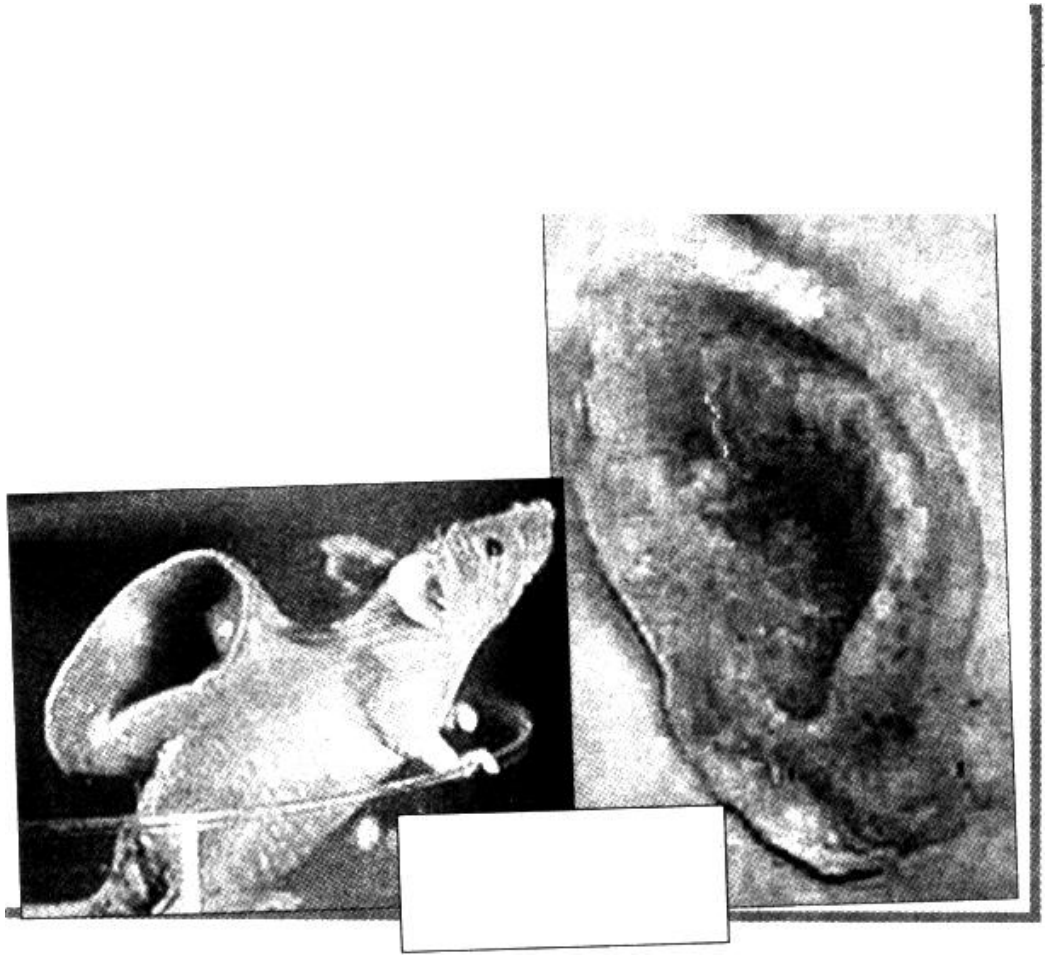
Чтобы различить в биореакторе два типа клеток – питающие и стволовые – использовали стволовые клетки мыши, продуцирующие особый маркер, зеленый флуоресцирующий белок. Питающие миобласты не дают флуоресцирующего сигнала, поэтому их можно отличить от стволовых клеток. Флуоресцирующая микроскопия, Д.Б. Кауэн. Гарвардская медицинская школа, детская больница г. Бостона, США) Д. Канкел

Уникальное свойство клеток – т*отипотентность*, т. е. способность к регенерации целого организма, а также продуцирование важнейших соединений вторичного синтеза.

Биотехнологические процессы основываются на функционировании либо клеток, либо изолированных из них биологических структур, чаще всего ферментов.

Культивирование клеток для замены:

- **отдельных поврежденных тканей (хрящевая, костная, печеночная, мозговая) или**
- **выращивание отдельных органов с целью трансплантации людям и животным**
- **вакцин нового поколения**
- **клонирование животных: овца, лошадь, корова, собака, волчицы, кошка.**

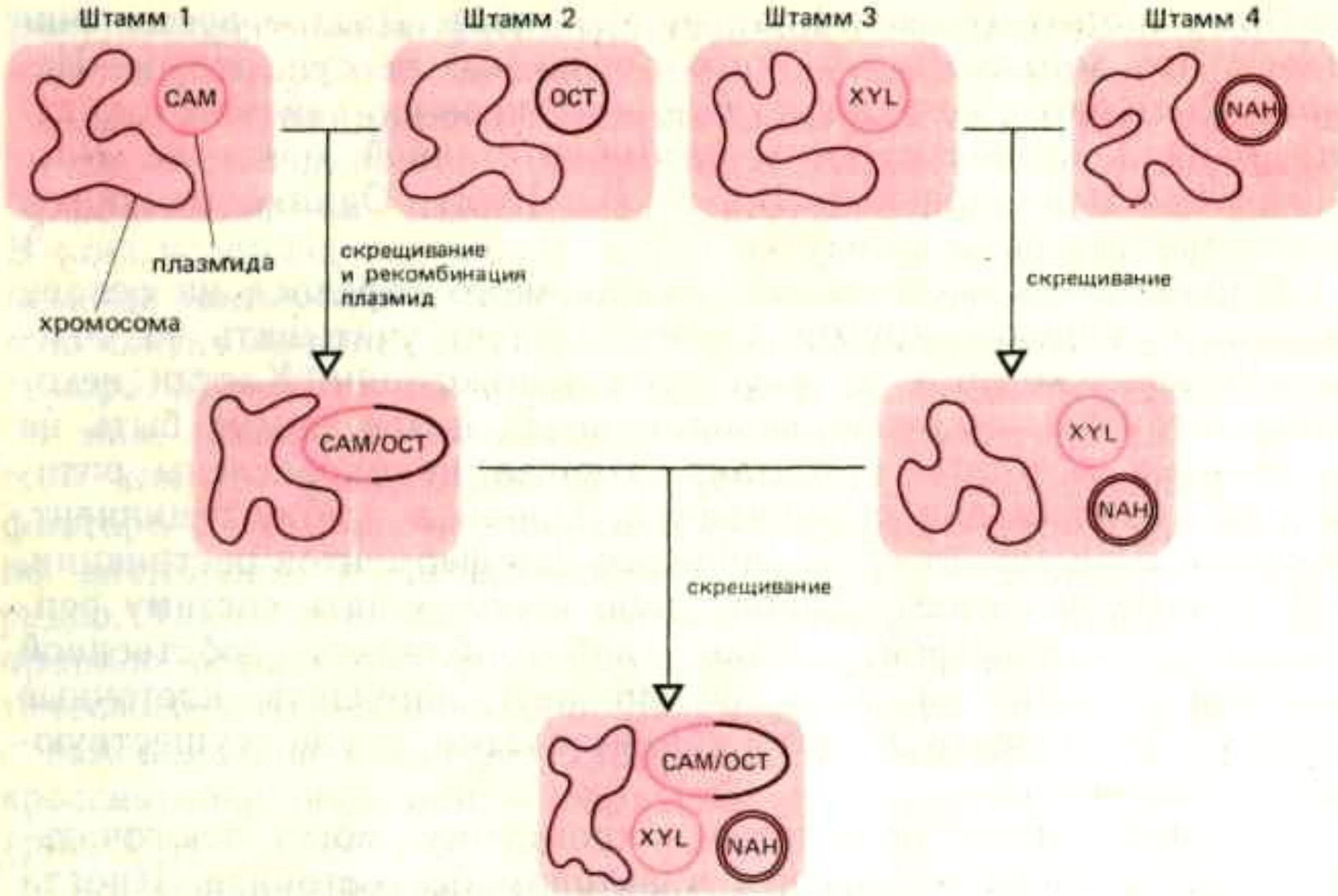


Слияние клеток

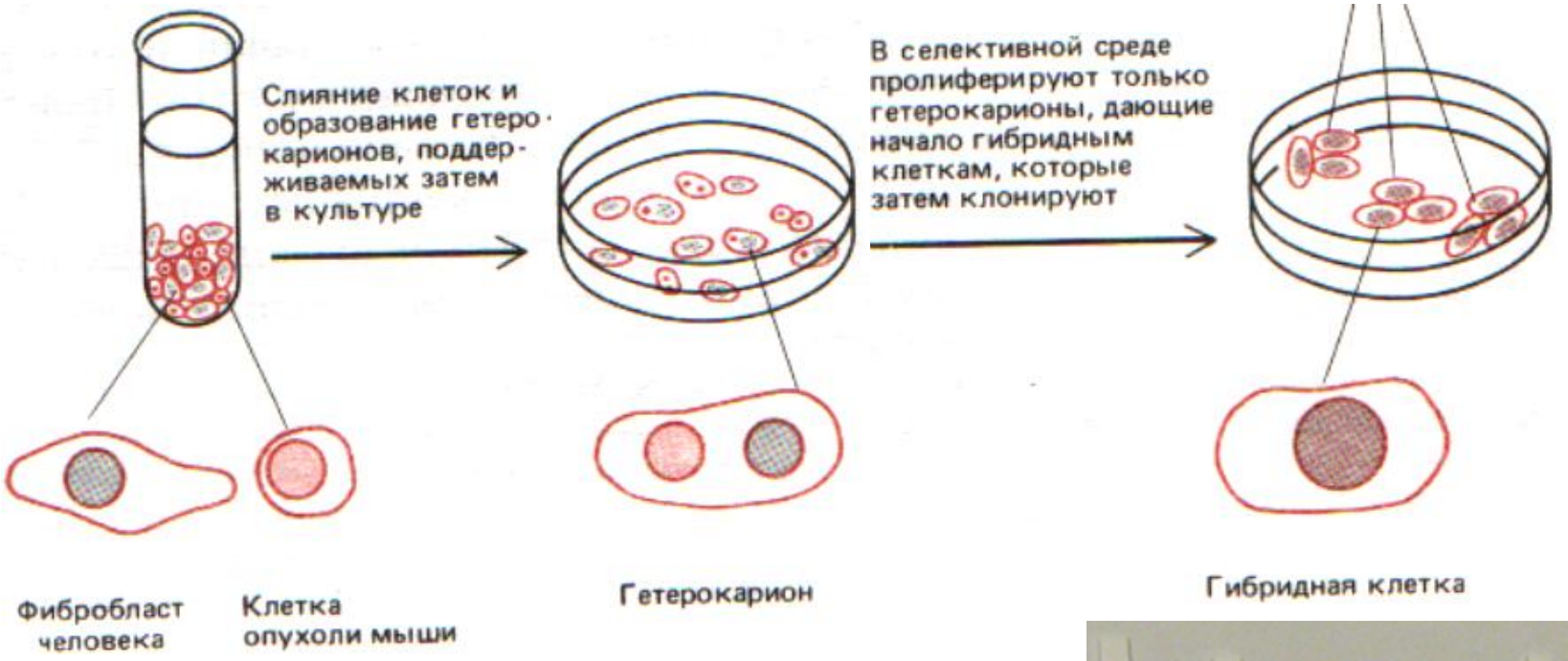
Прежде всего, это скрещивание филогенетически отдаленных форм живого. Получены плодовитые и фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом. Получены также межродовые стерильные гибриды картофеля и томата и межвидовые (Saccharomyces uvarum a. S. diastaticus) и межродовые (Kluyveromyces lactis a. Saccharomyces cerevisiae) гибриды дрожжей.

Значительный интерес представляет получение ассиметричных гибридов, у которых полный набор хромосом одной родительской формы и частичный набор другой. Такие гибриды устойчивее, более плодовиты и жизнеспособны, чем симметричные.

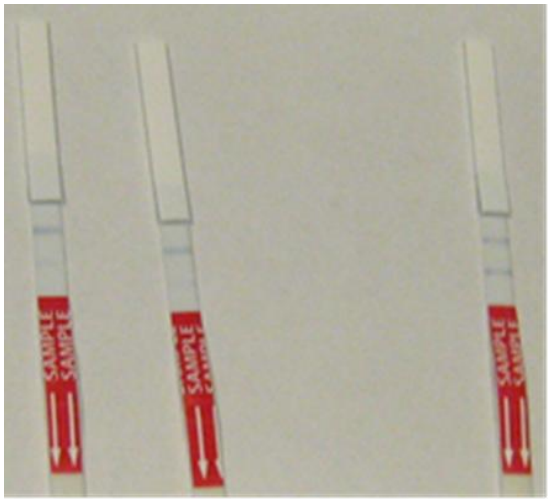
- **Возможно также получение гибридов путем слияния трех или более родительских клеток. Такие гибридные клетки могут быть использованы для выращивания растений (грибов) – регенератов.**
- **Большое значение имеет гибридизация клеток, у которых различные программы развития. Это относится и к соматическим клеткам.**
- **Для получения межвидовых (межродовых) гибридов используется метод слияния протопластов (protos – первый и plastos – вылепленный, образованный) – ограниченных цитоплазматической мембраной образований (клеток без оболочек).**


Штамм 1
Штамм 2
Штамм 3
Штамм 4
CAM
OCT
XYL
NAH
плазмида
хромосома
скрещивание
и рекомбинация
плазмид
скрещивание
CAM/OCT
XYL
NAH
скрещивание
CAM/OCT
XYL
NAH

- **получение моноклональных антител**



В двух первых пробах содержание прогестерона высокое (нижние полоски едва заметные), а в третьей пробе – низкое (нижняя полоска так же проявляется, как и верхняя контрольная)



3. Производство антибиотиков -— ключевое направление в медицине и фармацевтической промышленности.

Получают антибиотики путем культивирования микроорганизмов.

Известно более 6 тысяч антибиотиков, продуцентами которых являются:

- **6 родов нитчатых грибов,**
- **3 рода актиномицетов и**
- **2 рода истинных бактерий.**

4. Бродильные процессы *в химической промышленности* при производстве:

- **органических кислот (kt a -1):**

  лимонной 900

  глюконикковой 60

  молочной 50

  L-аскорбиновой 60

- **органических растворителей**

- **Молочную кислоту получают с помощью молочнокислых бактерий,**
- **лимонную – с помощью гриба Aspergillius niger.**

5. Высокоочищенные рекомбинантные протеины:

- **аналитические энзимы и антитела –**
  в медицинской диагностике,
  в анализах пищевых продуктов,
  биохимических и молекулярных биологических анализах;

- **энзимы, используемые в генетической инженерии (эндонуклеазы, ДНК и РНК полимеразы и др.);**

- **терапевтические протеины – ростовой фактор;**

- **антитела и энзимы в качестве активных лекарственных ингредиентов**

- **insulin-like growth factor 1, IGF1) — белок из семейства инсулиноподобных факторов роста, по структуре и функциям похожий на инсулин.**
- **Он участвует в эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма.**
- **является косвенным показателем количества гормона роста (ГР), вырабатываемого организмом.**

6. Использование продукции сельского хозяйства или отходов сельскохозяйственного производства для получения источников энергии:

- **из низко качественного вина – этиловый спирт**
- **из навоза – биогаз, подстилочный материал**
- **из рапса – дизтоплив и др.**

В Италии технический этиловый спирт вырабатывали этим путем.

Этот продукт производится из низких сортов вина и в других странах Европы, Америки.

В Беларуси этиловый спирт высшей степени очистки для ликероводочных изделий получали из молочной сыворотки (Пружанский молочный комбинат, Шумилинский сырзавод). В сутки цеха перерабатывали до 90 т сыворотки, получая из одной тонны 20–22 л спирта.

- **Метан генерирующие бактерии (метаногены) наиболее древние бактерии. В качестве субстрата большинство метаногенов используют углекислый газ и водород.**

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O + \text{Энергия}$$

Ряд таких бактерий может использовать для образования метана окись углерода.

$$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + \text{Энергия}$$

$$CO + 3H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O + \text{Энергия}$$

Технология анаэробной переработки ила сточных вод и других отходов наиболее распространенная. Она с успехом используется с 1901 г.



На задней левой конечности красная повязка – мастит. Молоко от маститных коров уничтожается. Подстилка – переработанный навоз.






Jenbacher
gas engines

7. Применение биотехнологических процессов *при защите окружающей среды*, получении экологически чистых источников энергии.

Использование микроорганизмов при переработке отходов не требует создания стерильных условий. Чем больше разных микроорганизмов принимают участие в этом, тем лучше.

Процесс минерализации органических отбросов, основанный на использовании активного ила, был разработан в 1914 году. С тех пор он существенно модернизирован.

Переработка стоков в анаэробных условиях смешанной микрофлорой применяется все более широко. При этом попутно образуется биогаз, который состоит в основном из метана и CO^2.

С газом генерируется более 80% свободной энергии, следовательно, такая переработка энергетически высокоэффективна. Она может использоваться для получения части необходимой энергии.

В Китае, в основном в сельскохозяйственных общинах, эксплуатируется более 18 млн. генераторов биогаза.

8. Биотехнологические процессы *в пищевой промышленности*:

- **производство фруктозных сиропов**
- **грибного белка и белка одноклеточных организмов,**
- **вкусовых добавок.**

9. Микробиологические превращение стероидов

- **Получение стероидных гормонов для медицины и ветеринарии**





10. Производство аминокислот

- **Микробиологическое производство аминокислот наибольшее распространение получило в последние 50–60 лет, когда было выяснено, что Corynebacterium glutamicum из сахара и соли аммония синтезирует глутаминовую кислоту.**

После этого были получены мутанты и разработаны методы производства:

- **многих аминокислот,**
- **нуклеотидов и**
- **реактивов для биохимических исследований.**

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

1. *Строение и свойства клеток*
2. *Принципы культивирования клеток in vitro и получение клоновых культур*
3. *Стволовые клетки*
4. *Клонирование и клеточная терапия с помощью стволовых клеток*

- Основы генетической инженерии и биотехнологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности «Зоотехния» / Ю.А. Горбунов, Г.Ф. Медведев, Н. Г. Минина [и др.]; под ред. Ю.А. Горбунова. — Минск: ИВЦ Минфи-на, 2010 – 288 с.
- Биотехнология. Учебное пособие для вузов. В 8 кн./Под. Ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 3: Клеточная инженерия/Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин, Т.Г. Корженевская, Е.Н. Маркарова. М.: «Высшая школа», 1987 – 127 с.: ил.
- Максимов Г.В., Василенко В.Н., Максимов В.Г., Максимов А.Г. Теоретические и практические аспекты использования биотехнологии и генной инженерии / Научн. Ред. М.В. Супотницкий. – М.: Вузовская книга, 2004. – 208 с.: ил.

1. Строение и свойства клеток

- **Свойства и функции клеток многоклеточных организмов: соматических, половых и стволовых.**
- **Гибридизация соматических клеток.**
- **Принципы разделения сперматозоидов, несущих X и Y половые хромосомы.**

Строение и свойства клеток. **Основная форма существования жизни – клетка. В ней протекают все физиологические процессы, как у одноклеточных, так и многоклеточных организмов.**

Рост многоклеточных организмов связан с образованием из одной клетки новых клеток. Каждая клетка на определённой стадии делится и даёт начало дочерним клеткам. Образуются разнообразные по форме, величине, степени дифференциации и функциям соматические, стволовые и половые клетки.

Одноклеточных бактерий и цианобактерий (сине-зеленые водоросли), не имеющих ядра и других органелл, называют *прокариотами*.

Клетки животных, растений, водорослей, грибов и простейших, у которых имеется истинное ядро и другие органеллы (митохондрии, хлоропласты у растений), называют *эукариотами*.

Автотрофные **– *м*икроорганизмы, способные сами синтезировать органические вещества,**

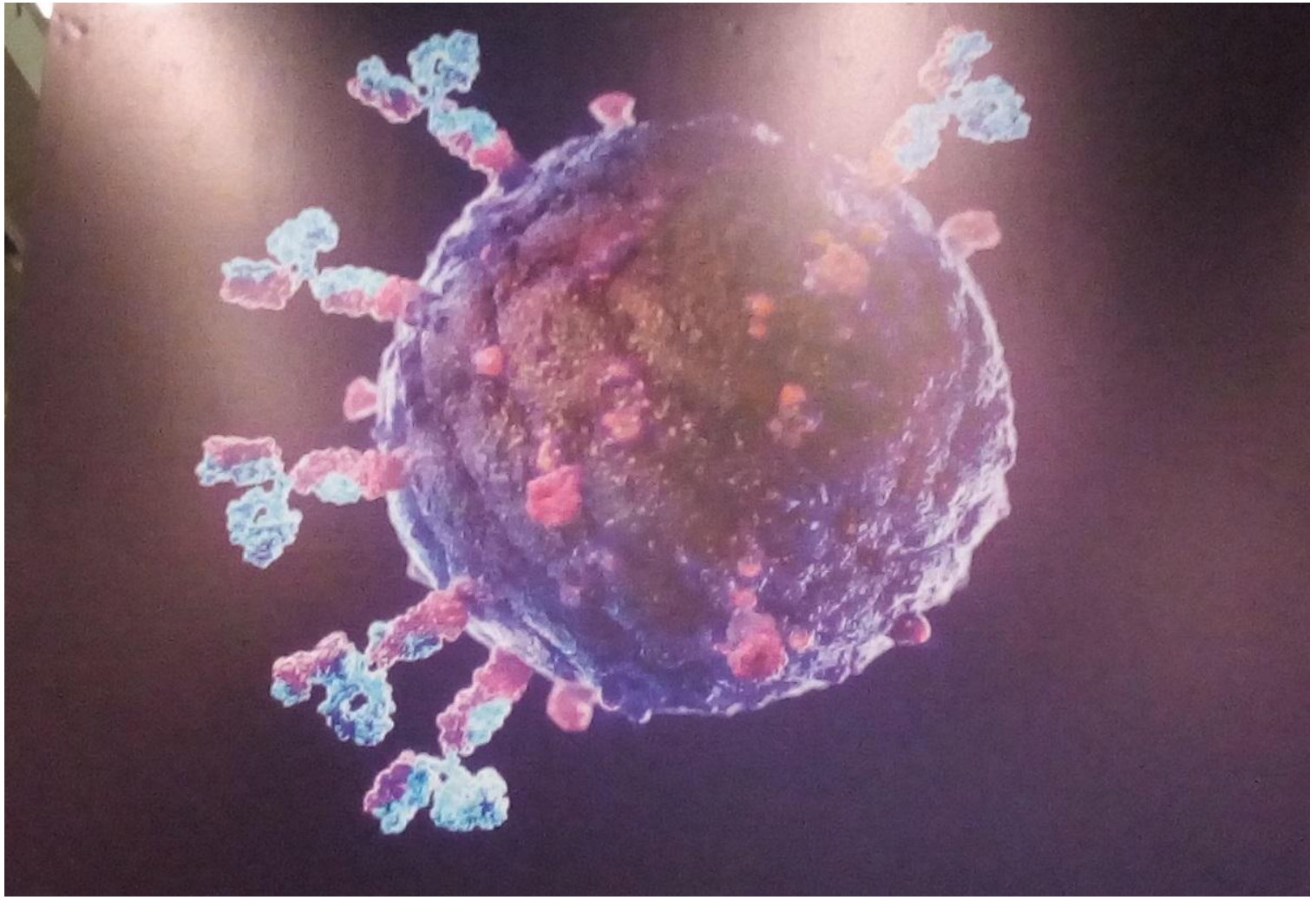
гетеротрофные **– для них необходимы готовые органические вещества.**

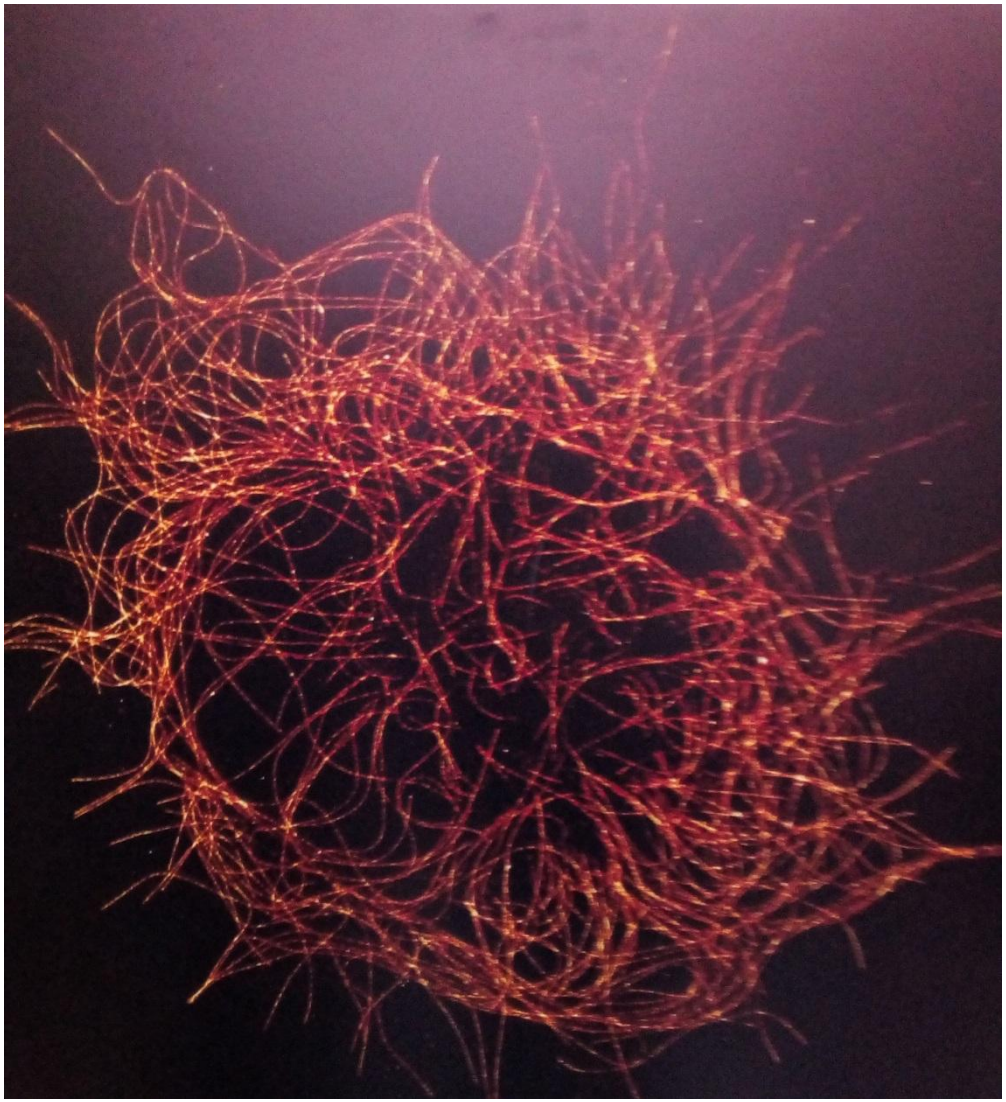
Уникальное свойство клеток – *тотипотентность*, т. е. способность к регенерации целого организма, а также продуцирование важнейших соединений вторичного синтеза.

Биотехнологические процессы основываются на функционировании либо клеток, либо изолированных из них биологических структур, чаще всего ферментов.

3D – модель клетки.

3D – моделирование. Newt Studios Medical Animation (USA)

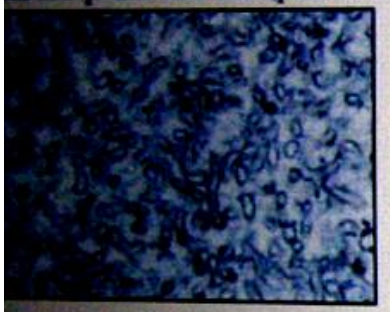




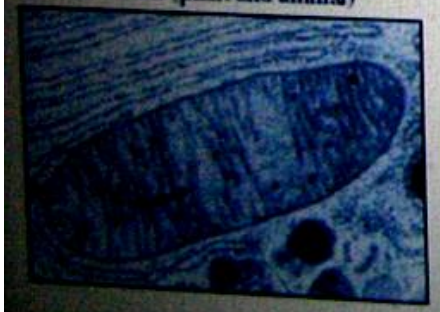
Цитоскелет. **Freely Universitat Berlin and the Dutch University of Utrecht**



h endoplasmic reticulum (plant and animal)



Mitochondrion (plant and animal)



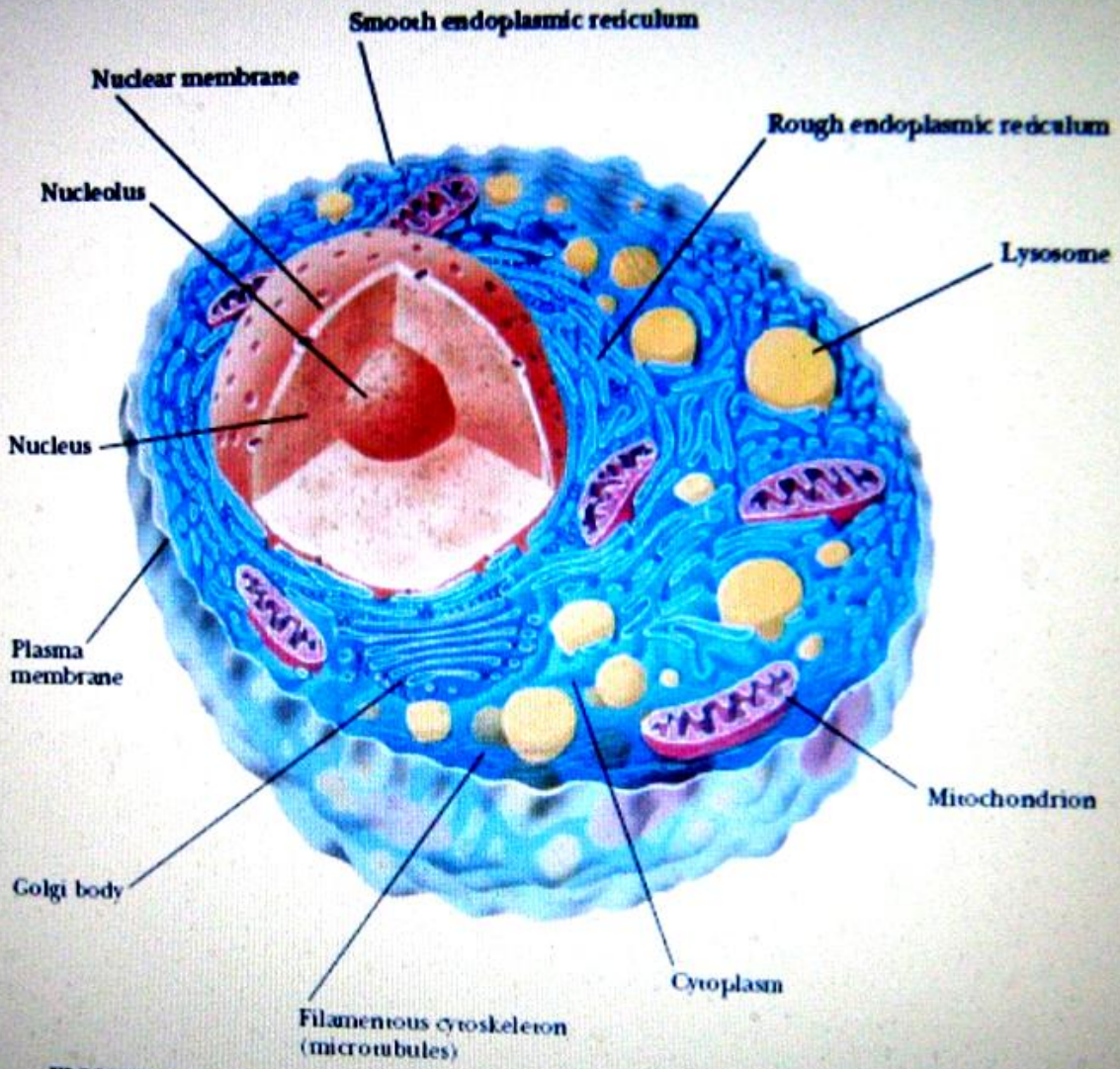
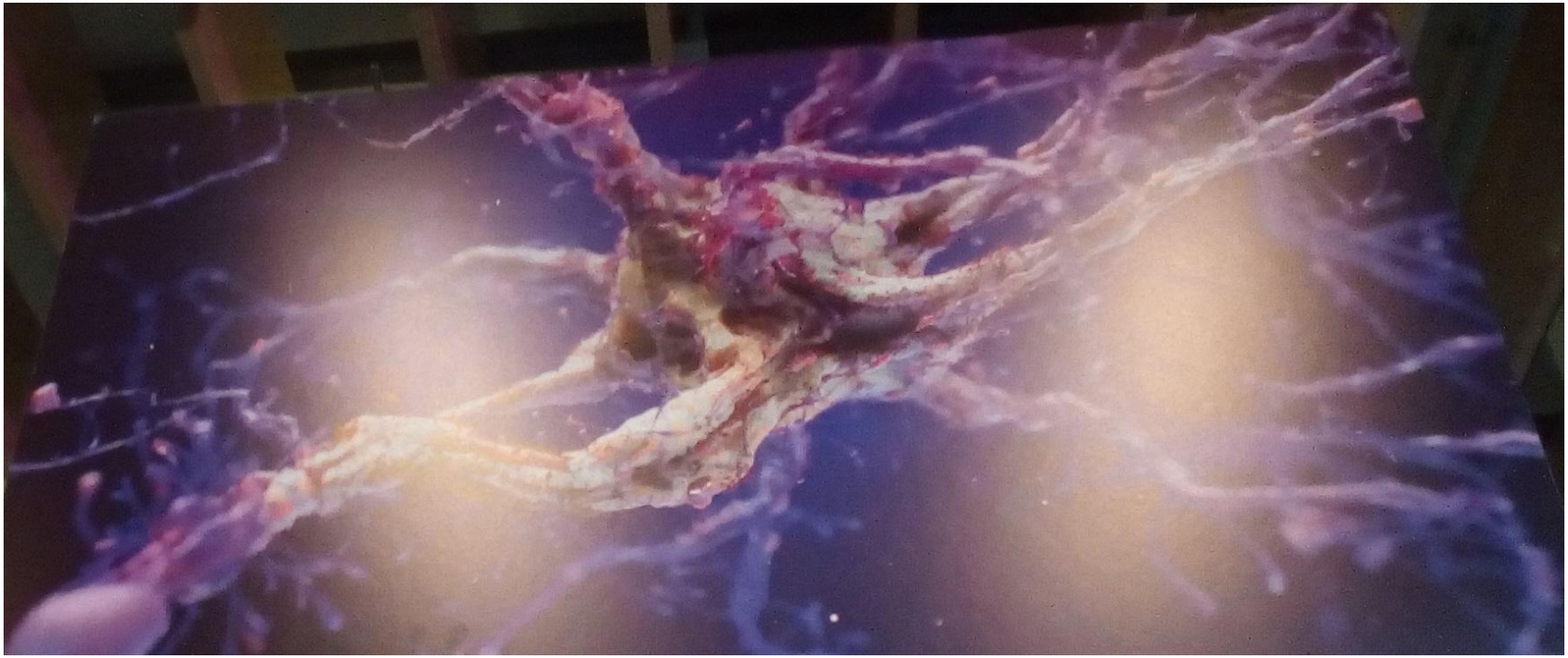


FIGURE 1.22 • This figure diagrams a rat liver cell, a typical higher animal cell in which the characteristic features of animal cells are evident, such as a nucleus, nucleolus, mitochondria, Golgi bodies, lysosomes, and endoplasmic reticulum (ER). Microtubules and the network of filaments constituting the cytoskeleton are also depicted. (*Photo. by. Dwight R.*

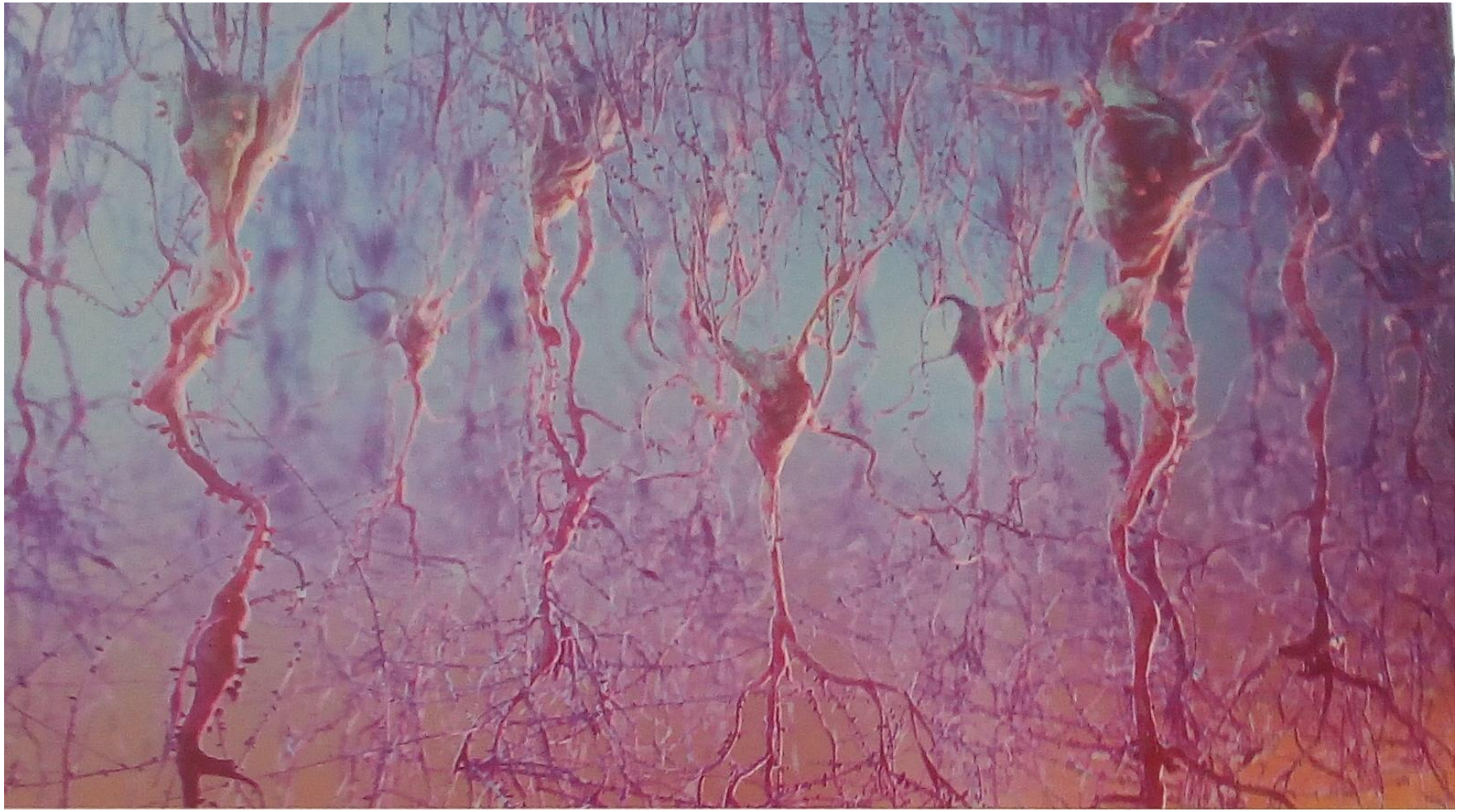


Клетка кожи (кератиноцит). Torsten Wittmann



Нейроны головного мозга. 3D – моделирование

Newt Studios Medical Animation (USA)



Нейроны головного мозга. 3D – моделирование

Newt Studios Medical Animation (USA)



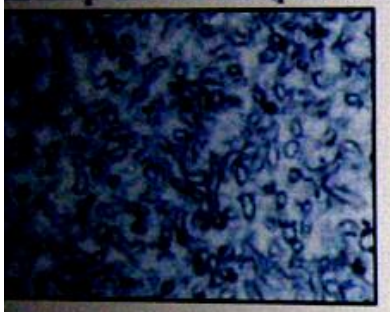
Бактерия Leptospira. 3D – моделирование

Newt Studios Medical Animation (USA)

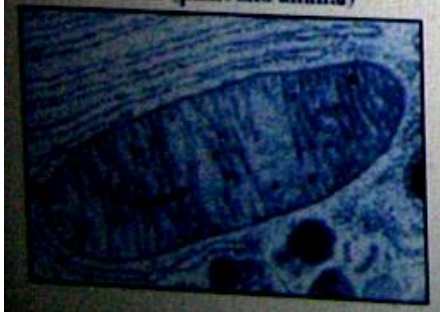
- **Ядро – хранение генетической информации, репликация ДНК, образование информационных РНК (транскрипция)**
- **Цитоплазма и мембрана – транспорт веществ; рецепторы для передачи сигналов**
- **Митохондрии – энергетический центр клетки, образование АТФ, дыхание, окисление питательных веществ**
- **Вакуоли – накопление резервных и балластных веществ**
- **Рибосомы – синтез белка (трансляция)**
- **Лизосомы – разрушение биополимеров**
- **Комплекс Гольджи – экскреция, распределение белков по клетке**
- **Клеточная стенка – механический барьер; транспорт веществ**
- **Эндоплазматическая сеть – синтез липидов, белков, углеводов, гликолиз белков**



h endoplasmic reticulum (plant and animal)



Mitochondrion (plant and animal)



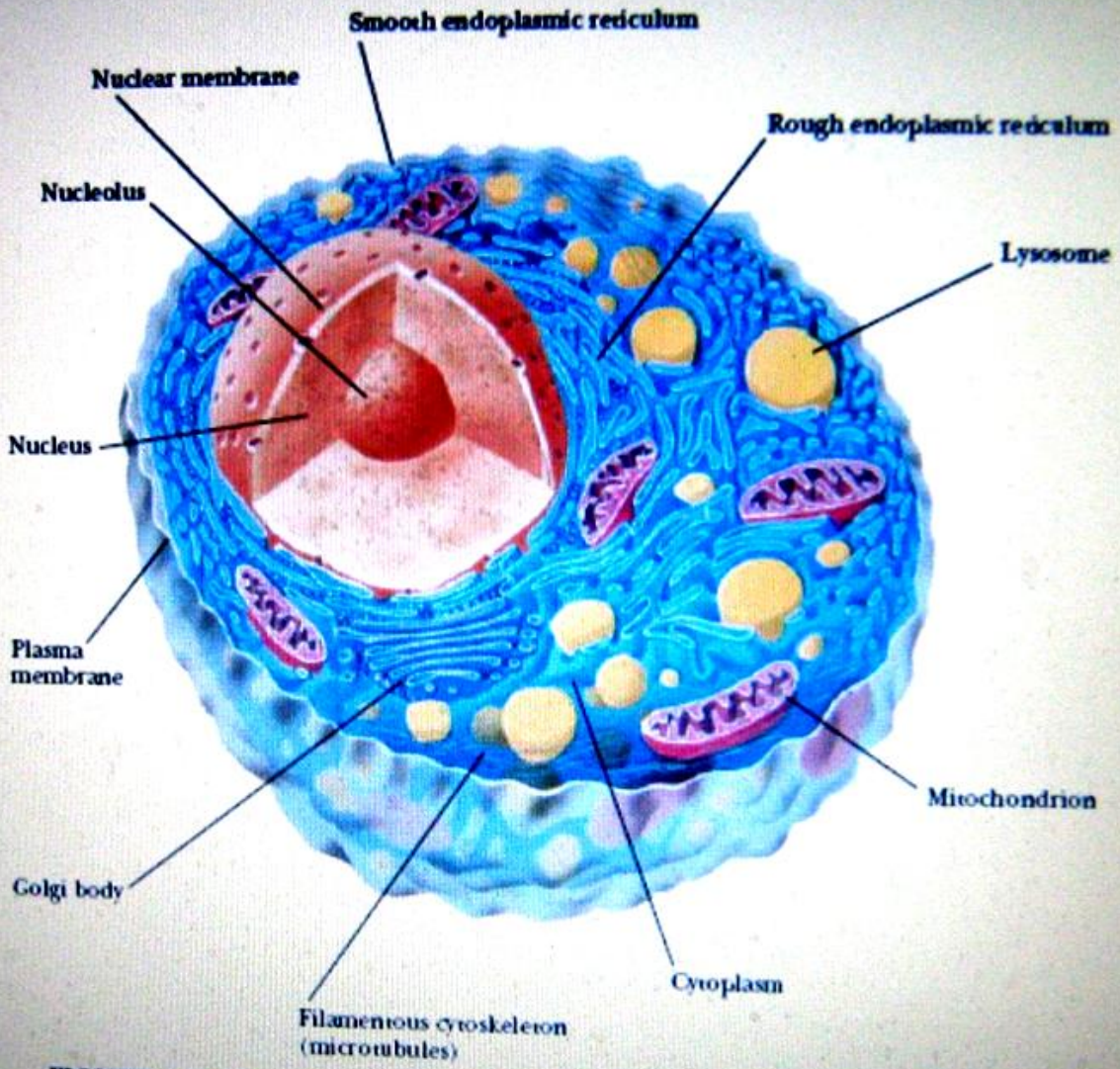


FIGURE 1.22 • This figure diagrams a rat liver cell, a typical higher animal cell in which the characteristic features of animal cells are evident, such as a nucleus, nucleolus, mitochondria, Golgi bodies, lysosomes, and endoplasmic reticulum (ER). Microtubules and the network of filaments constituting the cytoskeleton are also depicted. (*Photo. by. Dwight R.*

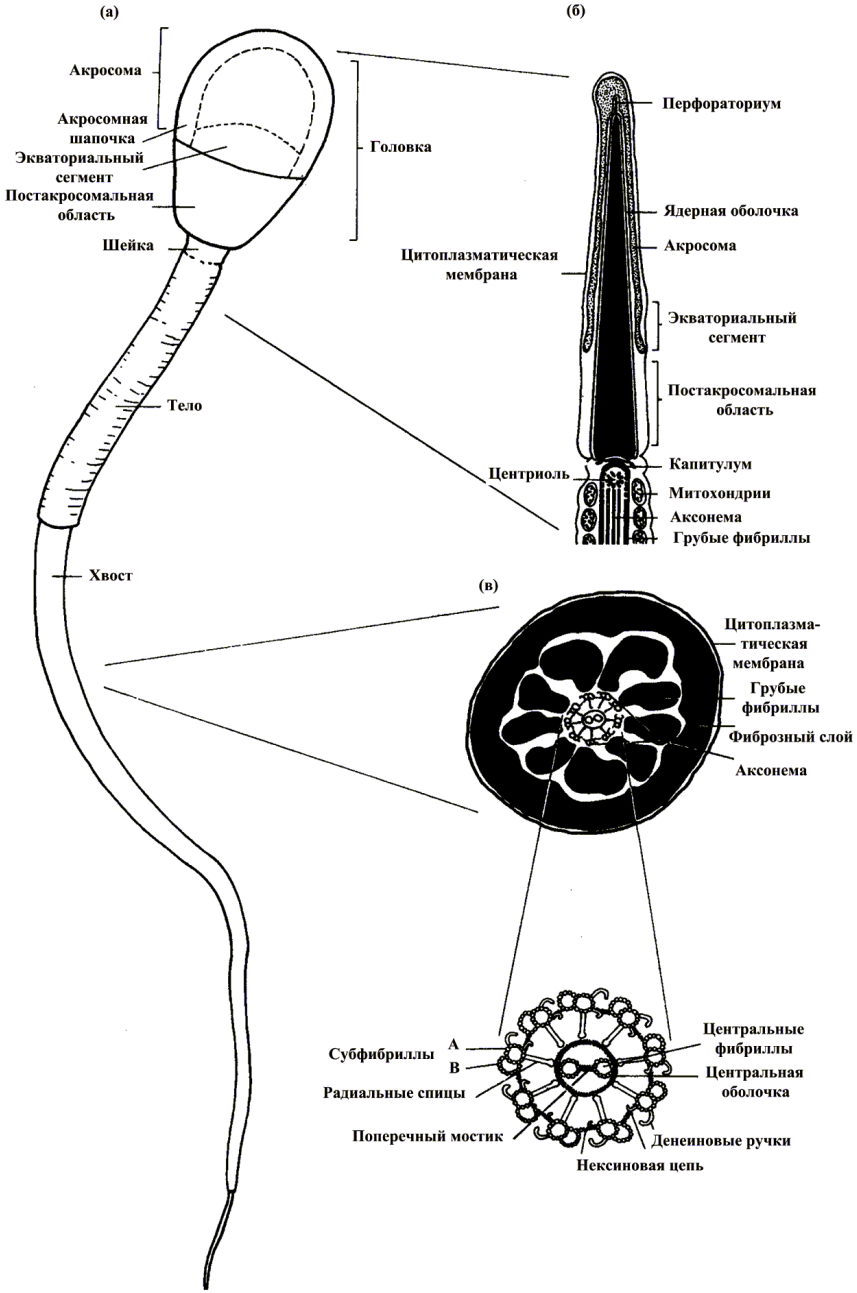
Митохондрия



- **Митохондрии выполняют основную функцию по обеспечению клеток энергией.**

Для реализации этого процесса необходимы

- **транспорт субстратов,**
- **их окисление,**
- **цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса),**
- **функционирование дыхательных цепей и**
- **сопряжение окисления и фосфорилирования**

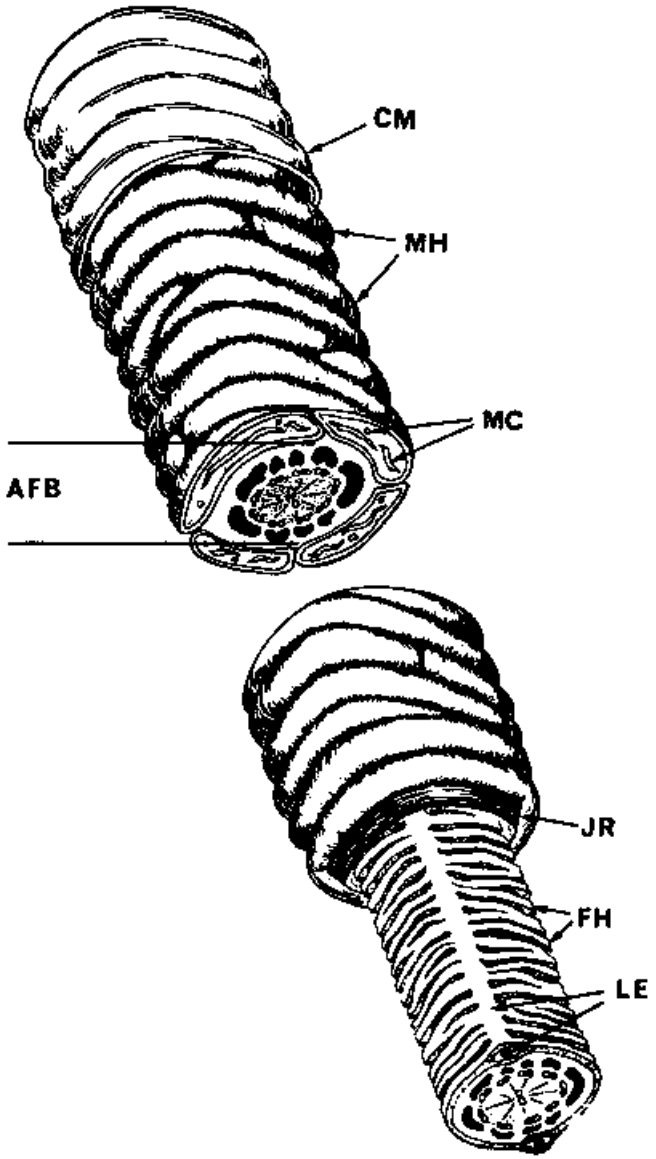

(а)
Акросома
Акросомная шапочка
Экваториальный сегмент
Постакросомальная область
Шейка
Головка
Тело
Хвост
(б)
Перфораториум
Ядерная оболочка
Акросома
Цитоплазматическая мембрана
Экваториальный сегмент
Постакросомальная область
Капитулум
Центриоль
Митохондрии
Аксонема
Грубые фибриллы
(в)
Цитоплазма-тическая мембрана
Грубые фибриллы
Фиброзный слой
Аксонема
Субфибриллы
A
B
Радиальные спицы
Поперечный мостик
Центральные фибриллы
Центральная оболочка
Денеиновые ручки
Нексиновая цепь

Образование спиральной нити

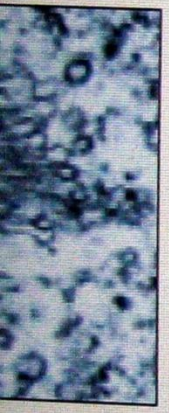
Постепенно сперматида вытягивается, осевая нить удлиняется и формирует тело и хвост спермия.

Митохондрии удлиняются, соединяются концами друг с другом и образуют одну или несколько длинных нитей, которые спирально обвивают осевую нить в области тела сперматозоида.

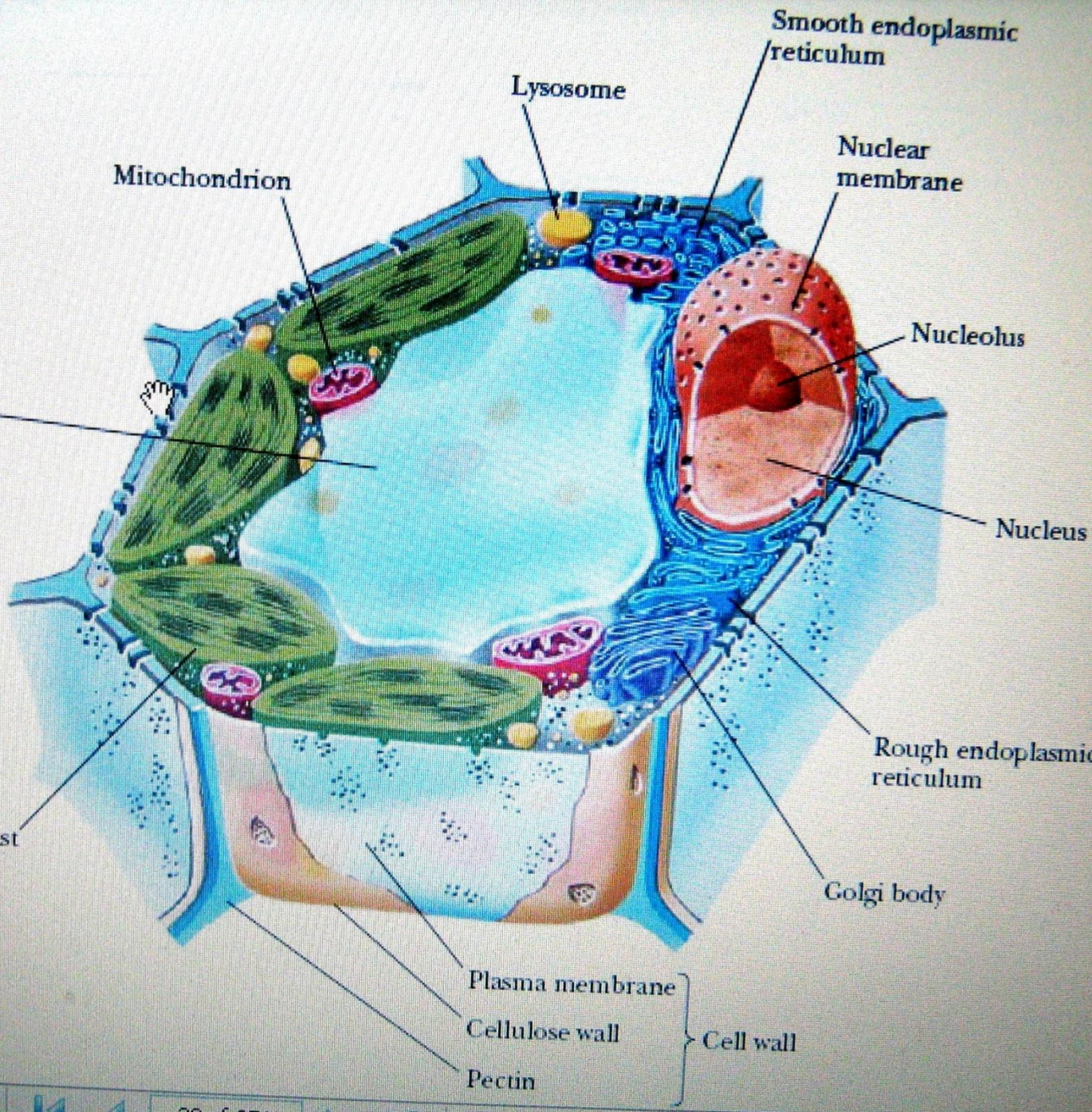
Остальная часть осевой нити покрыта слоем из плотных фибрилл в виде полукружных ребрышек. Кончик сперматозоида не покрыт этими фибриллами.







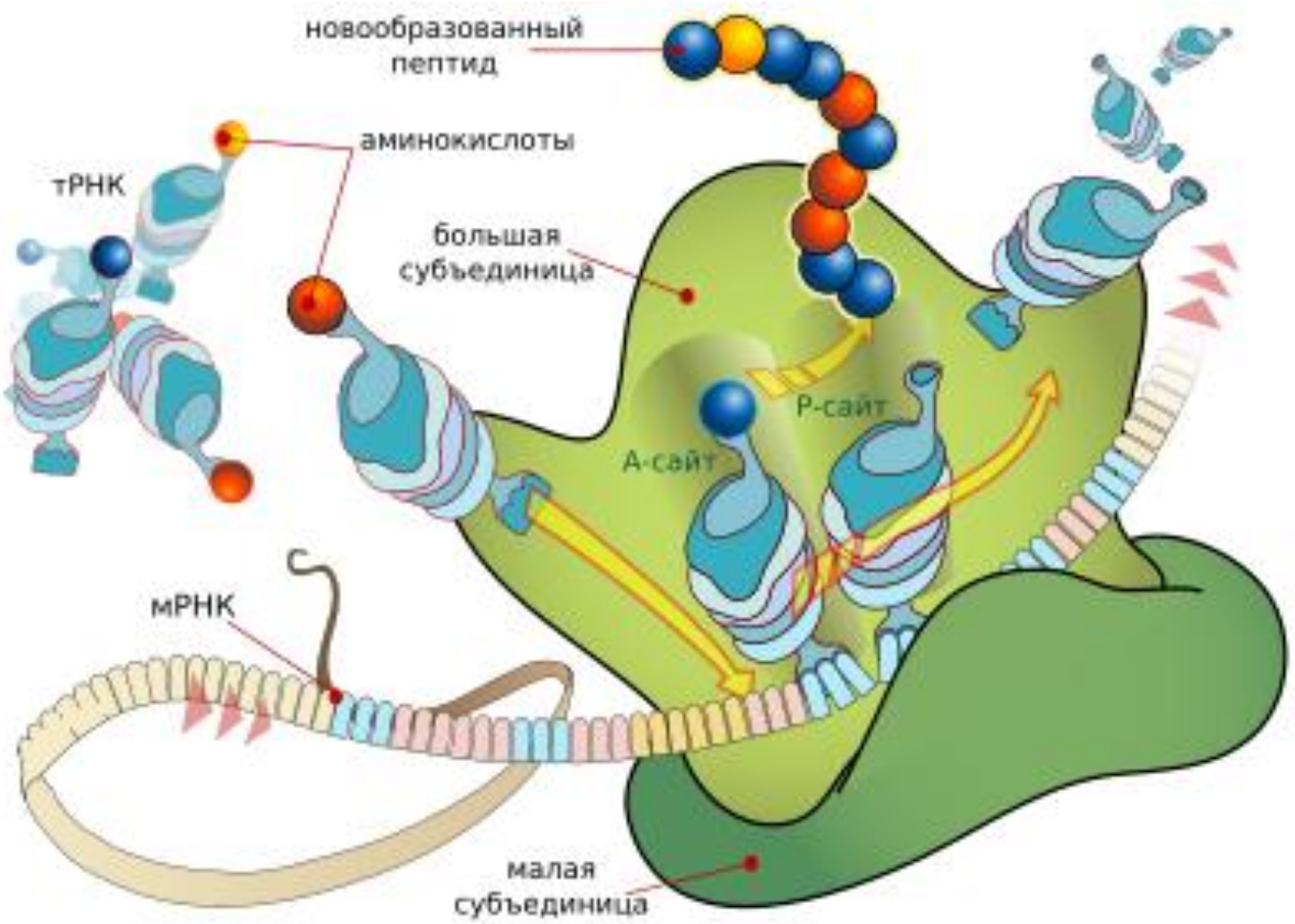



Smooth endoplasmic reticulum
Lysosome
Nuclear membrane
Mitochondrion
Nucleolus
Vacuole
Nucleus
Rough endoplasmic reticulum
Chloroplast
Golgi body
Plasma membrane
Cellulose wall
Cell wall
Pectin


Строение растительной клетки

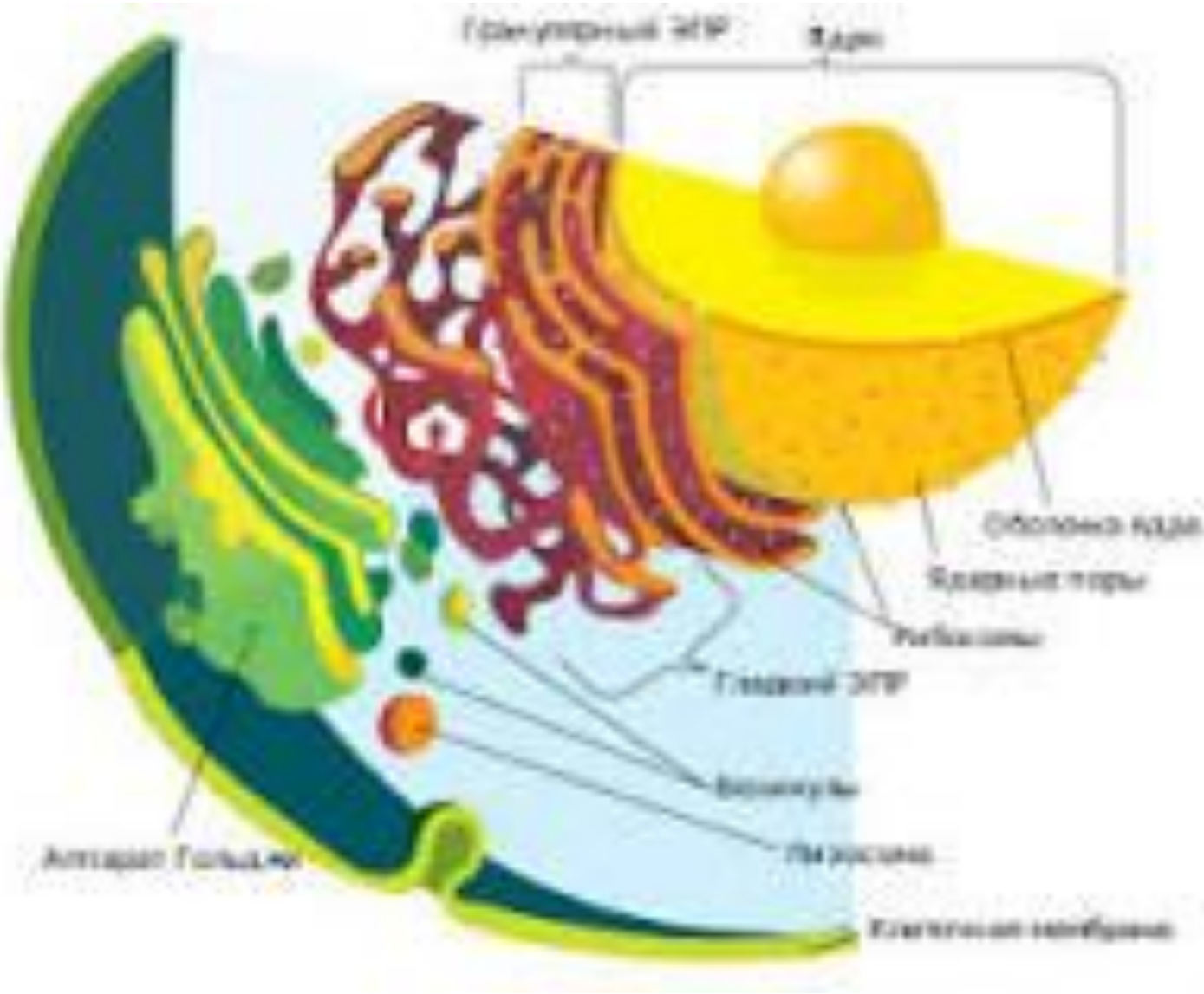

ядрышко
ядерная оболочка
ядро
митохондрии
клеточная оболочка
рибосомы
клеточная мембрана
хлоропласты
вакуоль
цитоплазма

Рибосома


новообразованный пептид
аминокислоты
тРНК
большая субъединица
Р-сайт
А-сайт
мРНК
малая субъединица

- **Рибосома представляет собой сложный комплекс из молекул РНК и белка, который осуществляет в клетке одну из ключевых функций — синтезирует белковые молекулы из аминокислот**

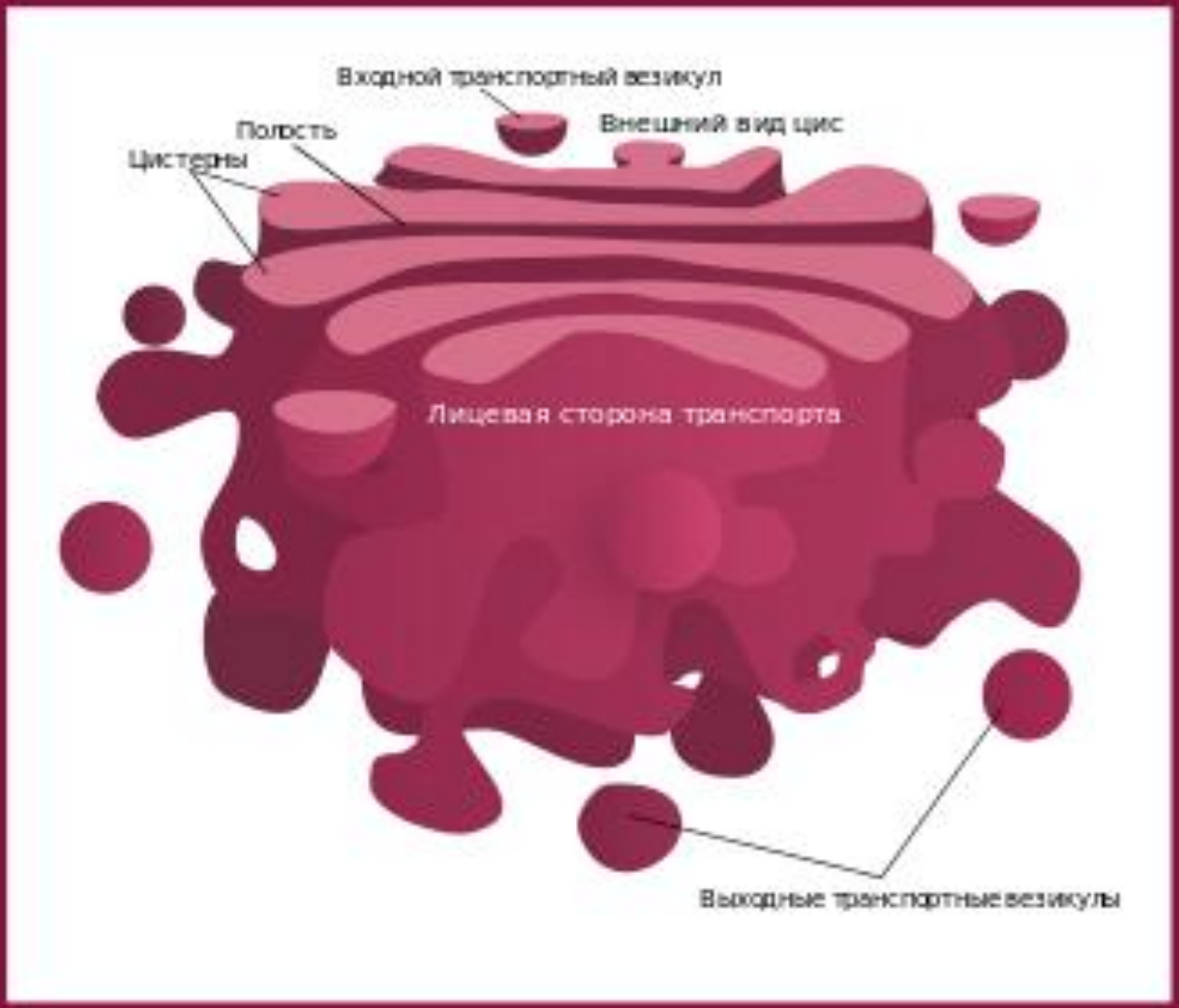
Лизосомы



Функциями лизосом являются:

- **переваривание захваченных клеткой при эндоцитозе веществ или частиц (бактерий, других клеток),**
- **аутофагия — уничтожение ненужных клетке структур, к примеру, во время замены старых органелл новыми, или**
- **переваривание белков и других веществ, произведенных внутри самой клетки.**

Аппарат Гольджи



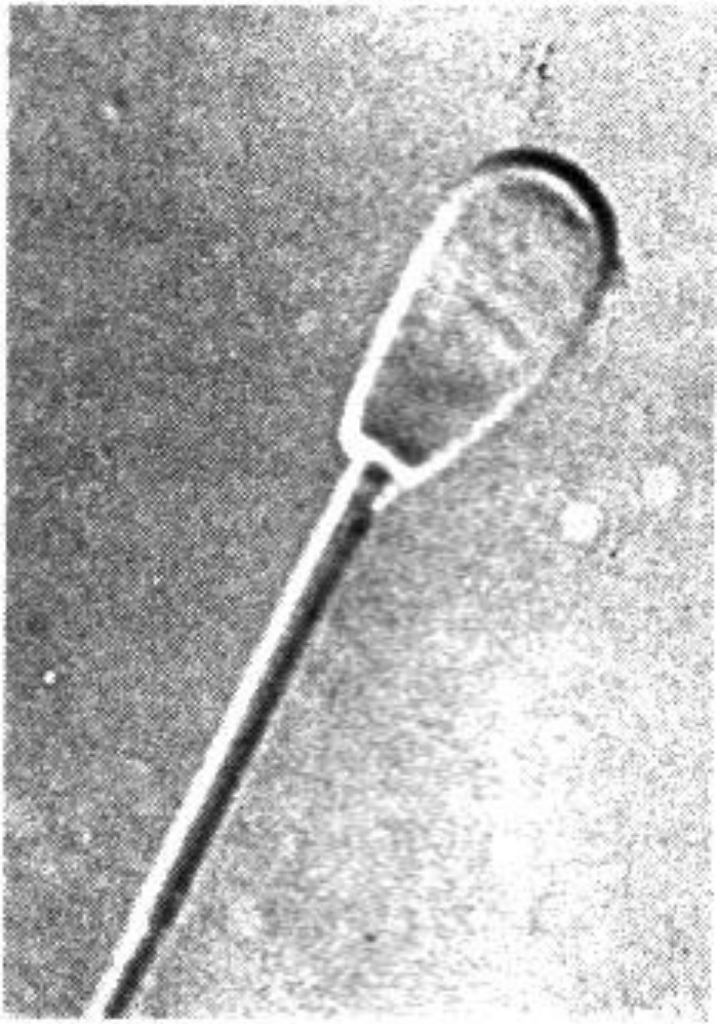
- **Аппарат Гольджи - мембранная структура эукариотической клетки, органелла, в основном предназначенная для выведения веществ, синтезированных в эндоплазматическом ретикулуме**

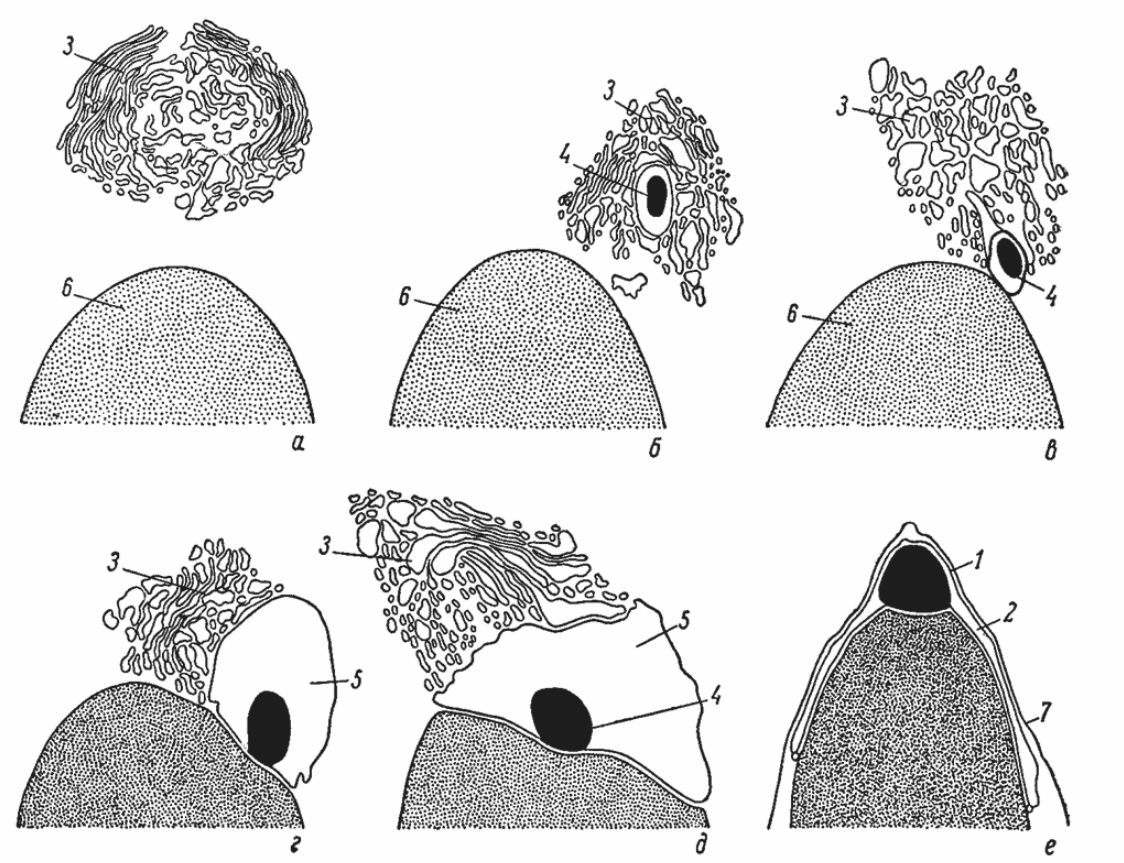
Сперматиды округлой формы; ядро находится в передней части клетки. Аппарат Гольджи располагается здесь между ядром и цитоплазматической мембраной.

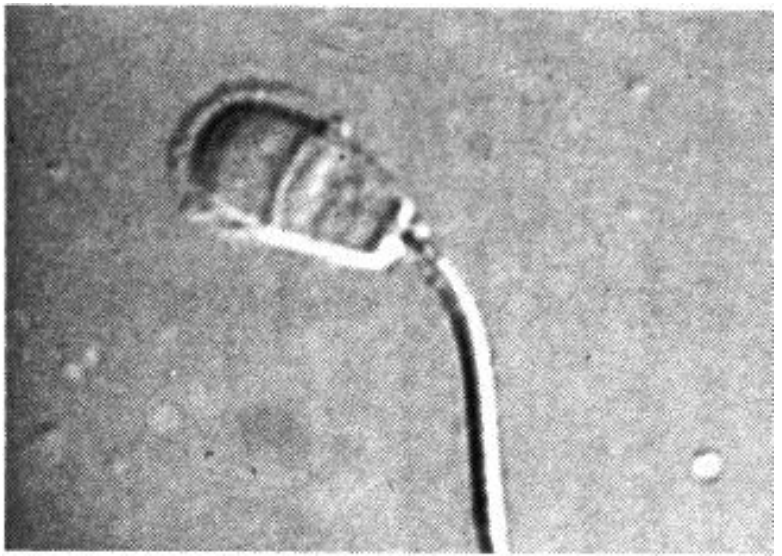
Среди телец Гольджи появляется вакуоль с темным зернышком. Из нее образуется *акросома* в виде двухслойной шапочки, которая прикрывает переднюю часть ядра.

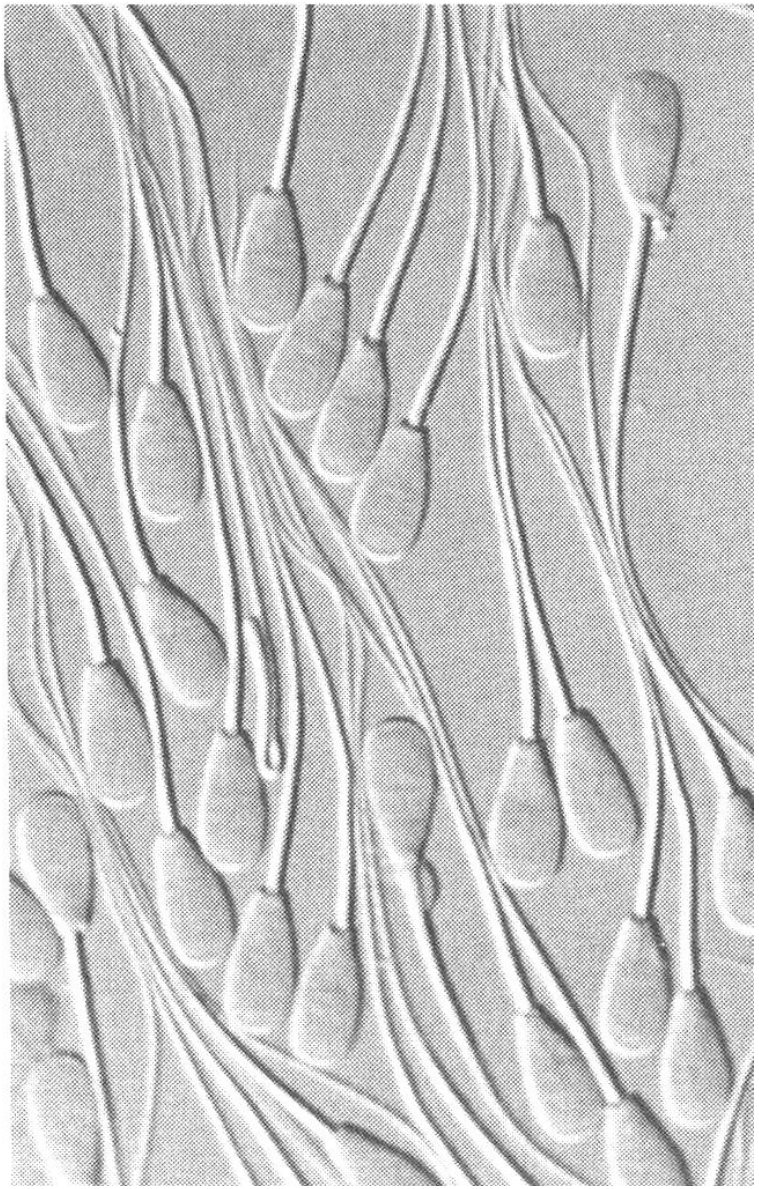
В последующем ядро удлиняется и формирует головку сперматозоида.

После отхода цитоплазмы назад цитоплазматическая мембрана соприкасается со стенками акросомы.



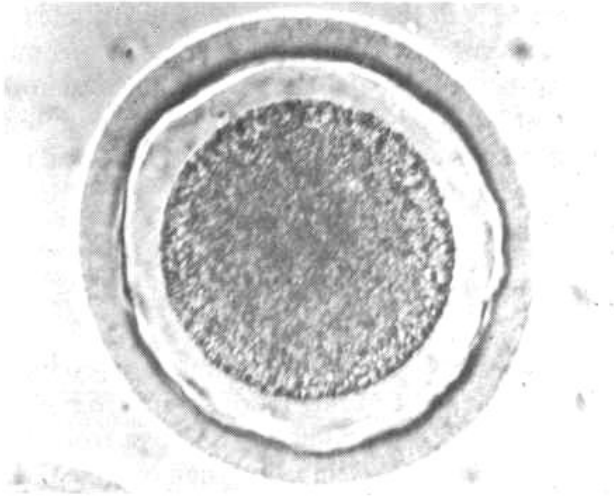

3
6
а
3
4
6
б
3
4
6
в
3
5
г
3
5
4
д
1
2
7
е



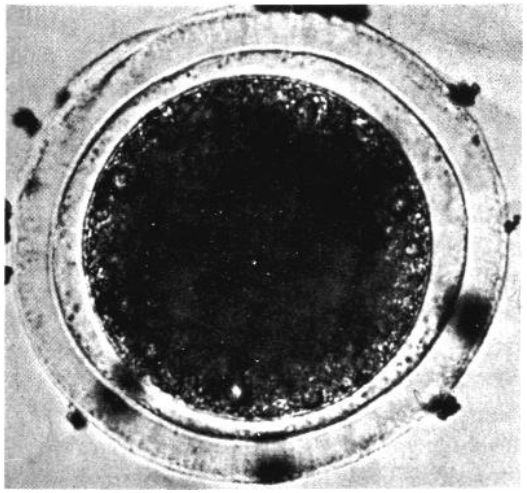


Спермии быка

Неоплодотворенные яйцеклетки: овцы



коровы



Принципы культивирования клеток in vitro и получение клоновых культур. **Многие клетки растений и животных в благоприятных условиях *in vitro* ("в стекле") способны выжить, размножаться и дифференцироваться.**

В 1907 г. Гаррисон помещал небольшие кусочки спинного мозга амфибий во влажную теплую камеру. Через сутки у отдельных нервных клеток появлялись длинные тонкие отростки. Это доказывало, что нервное волокно вырастает из одной клетки, а не путем слияния многих клеток.

Предложенный им метод культивирования клеток в сгустке лимфы с добавлением *эмбриональных экстрактов* используется и в настоящее время.



Культивирование соматических клеток животных в лимфе

В тканях животных и растений несколько типов клеток. Для изучения свойств клеток, их необходимо разделить. Сначала разрушают внеклеточное вещество и нарушают связи, за счет которых удерживаются клетки вместе. Затем из полученной суспензии выделяют различные типы клеток и исследуют их по отдельности.

Наиболее подходящим материалом для получения клеток являются ткани эмбриона или новорожденных.

Межклеточные связи разрушают с помощью протеолитических ферментов (трипсин, коллагеназа) и соединений, связывающих ионы кальция (ЭДТА). После такого «мягкого» механического разрушения ткани, выделяют различные типы клеток.

Разделяют клетки различными методами.

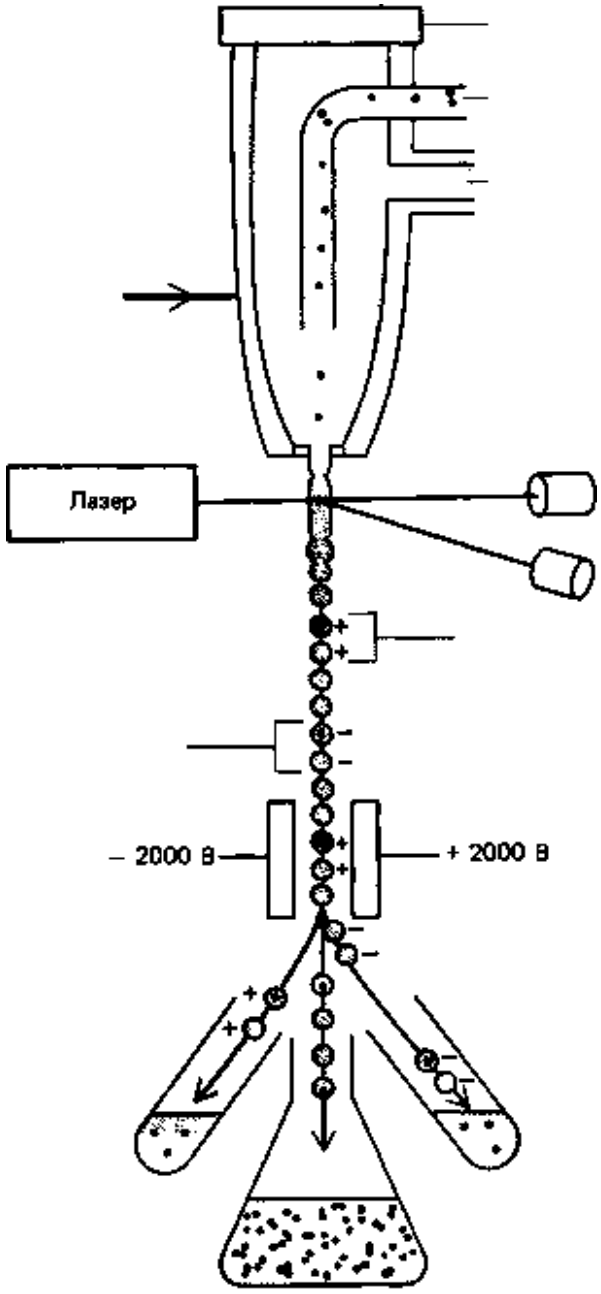
Осаждением *(седиментацией)* или центрифугированием большие клетки отделяют от маленьких, а тяжелые клетки от легких.

Некоторые клетки прикрепляются к стеклу или пластмассе. Их легко отделяют от не прочно прикрепленных клеток.

Более надежно клетки метить антителами, связанными с флюоресцентными красителями. Меченые клетки отделяют от не меченых с помощью анализатора клеток *(сортера)*.

Сопло ультразвукового вибратора прибора формирует крошечные капельки. В них размещается по одной клетке или вообще клетка в капельке отсутствует. Капельки заряжаются отрицательно или положительно в зависимости от наличия или отсутствия флюоресценции клетки.

Клетки движутся в узком потоке. Лазерный луч анализирует наличие у них флюоресценции и передает данные в компьютер.

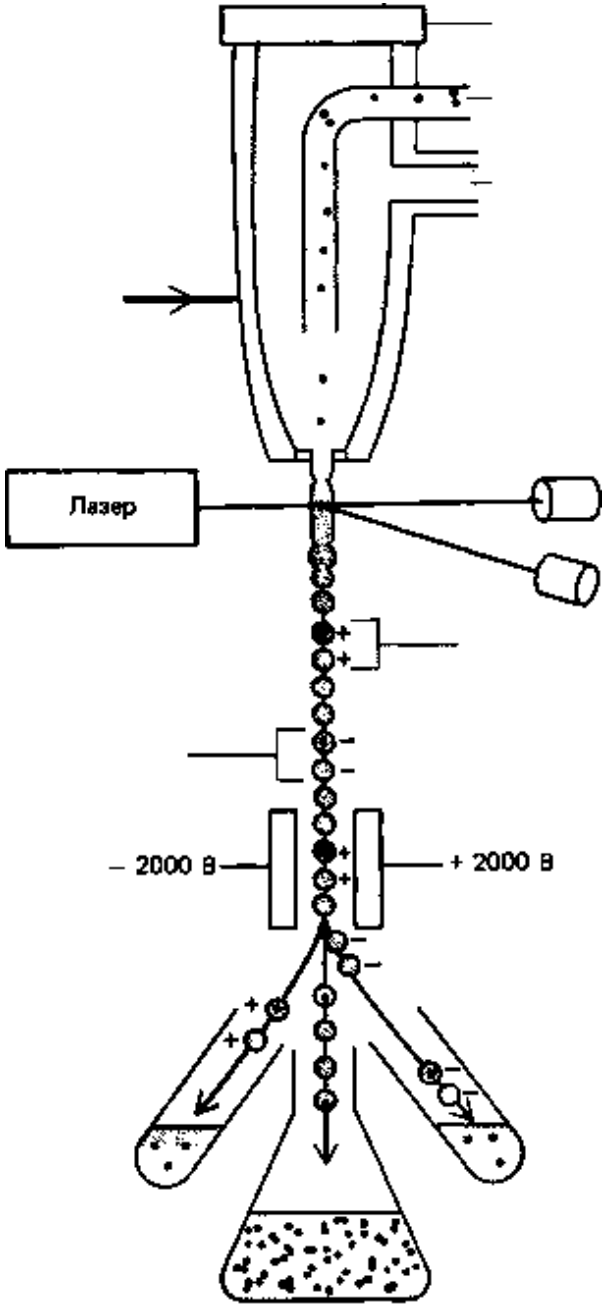


Сильное электрическое поле направляет капельки в контейнеры.

Капельки с флюоресцирующими клетками «–» попадают в контейнер на стороне поля с «+» зарядом.

Капельки с нефлюоресцирующими клетками «+» попадают в контейнер на стороне электрического поля с «–» зарядом.

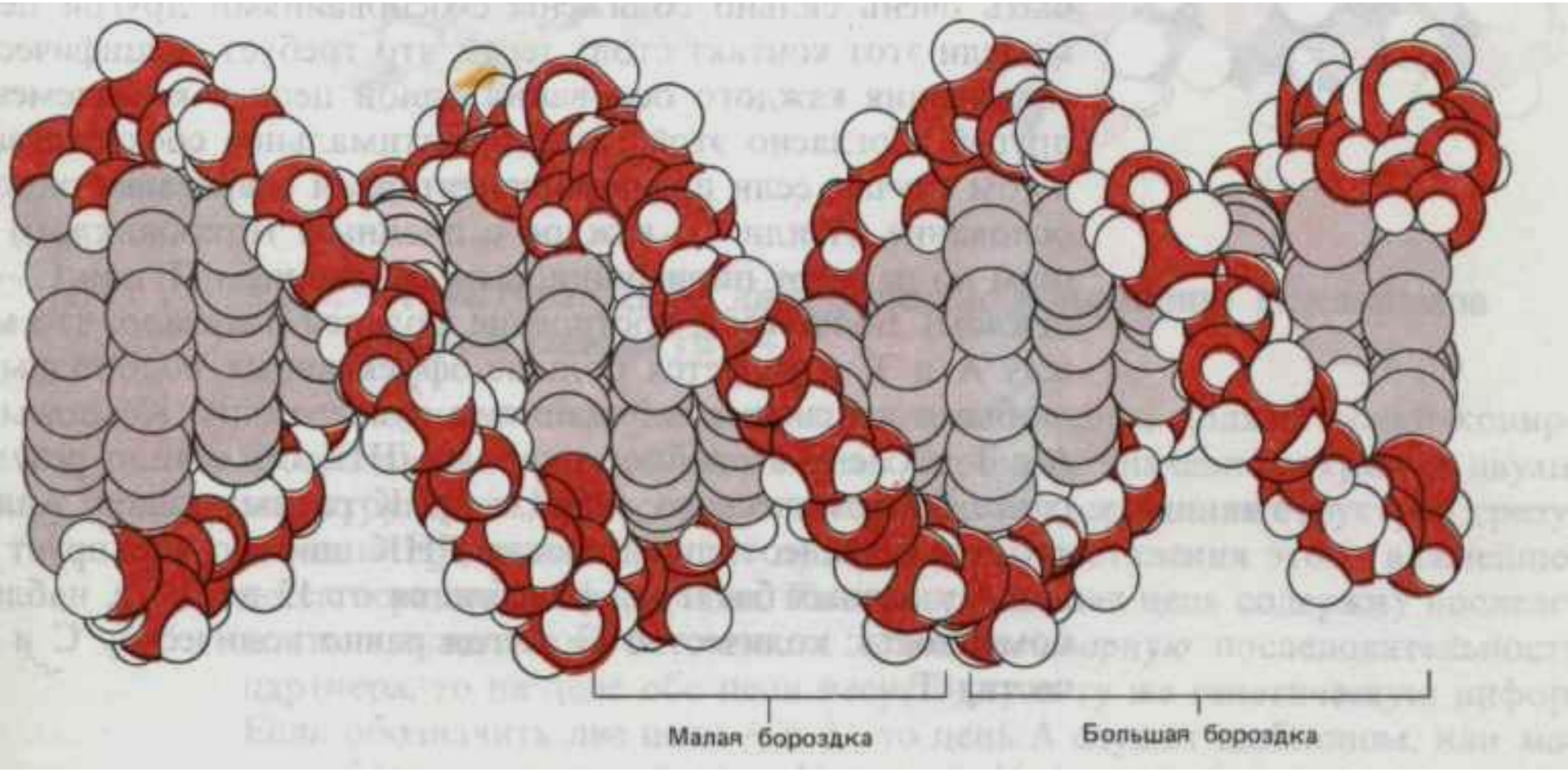
Случайные комочки клеток остаются незаряженными и направляются в контейнер для отходов.



Этот принцип разделения клеток применен к сперме. Сперматозоиды разделяются на 2 группы: с Y и X хромосомами.

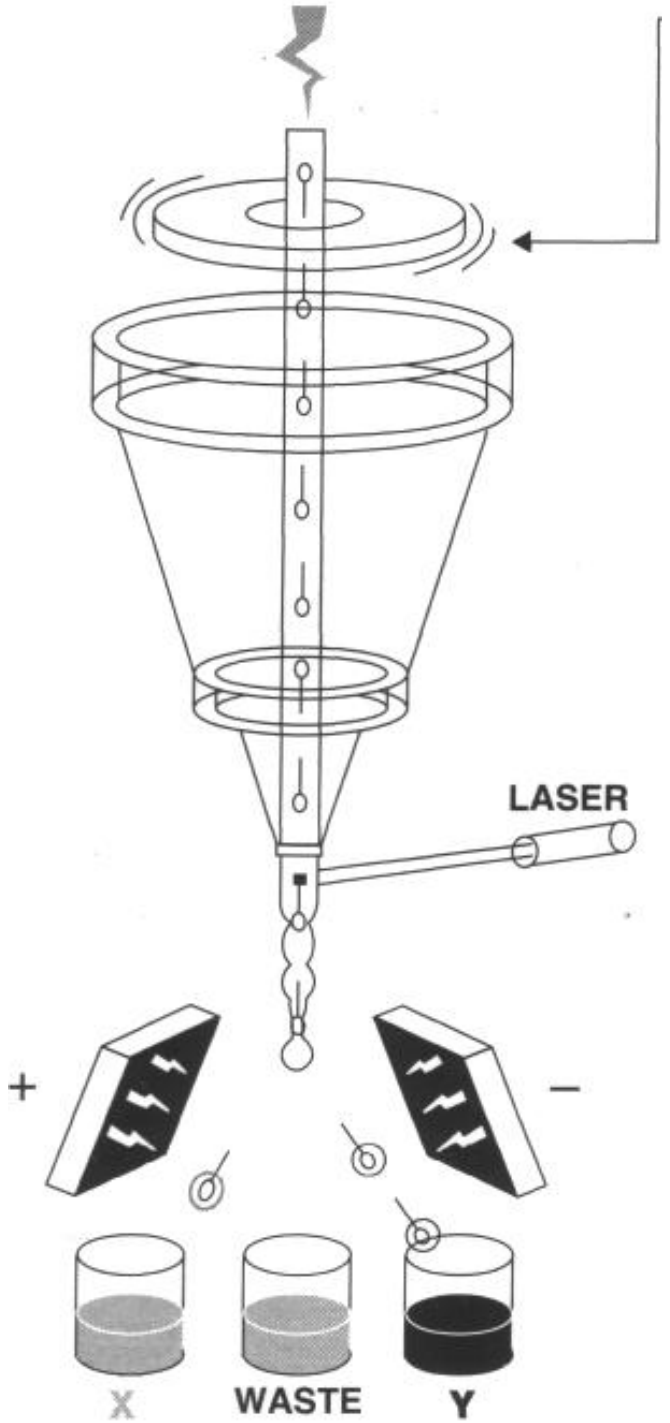
В основе метода использовано различие в содержании ДНК в Y- и X-несущих сперматозоидах (в X-несущих сперматозоидах на 3–4% больше ДНК).

После получения сперма сохраняется неразбавленной в течение 9 ч и затем окрашивается краской Хехст (Hoechst) 33342. Через мембрану сперматозоидов проникает флуоресцирующее вещество краски bis-benzimidazol и специфически связывается с А–Т парами вдоль малой бороздки ДНК. Краситель не повреждает ДНК, а различие в степени флуоресценции выявляется при прохождении сперматозоидов через лазерный детектор, который передает данные в компьютер.


Малая бороздка
Большая бороздка

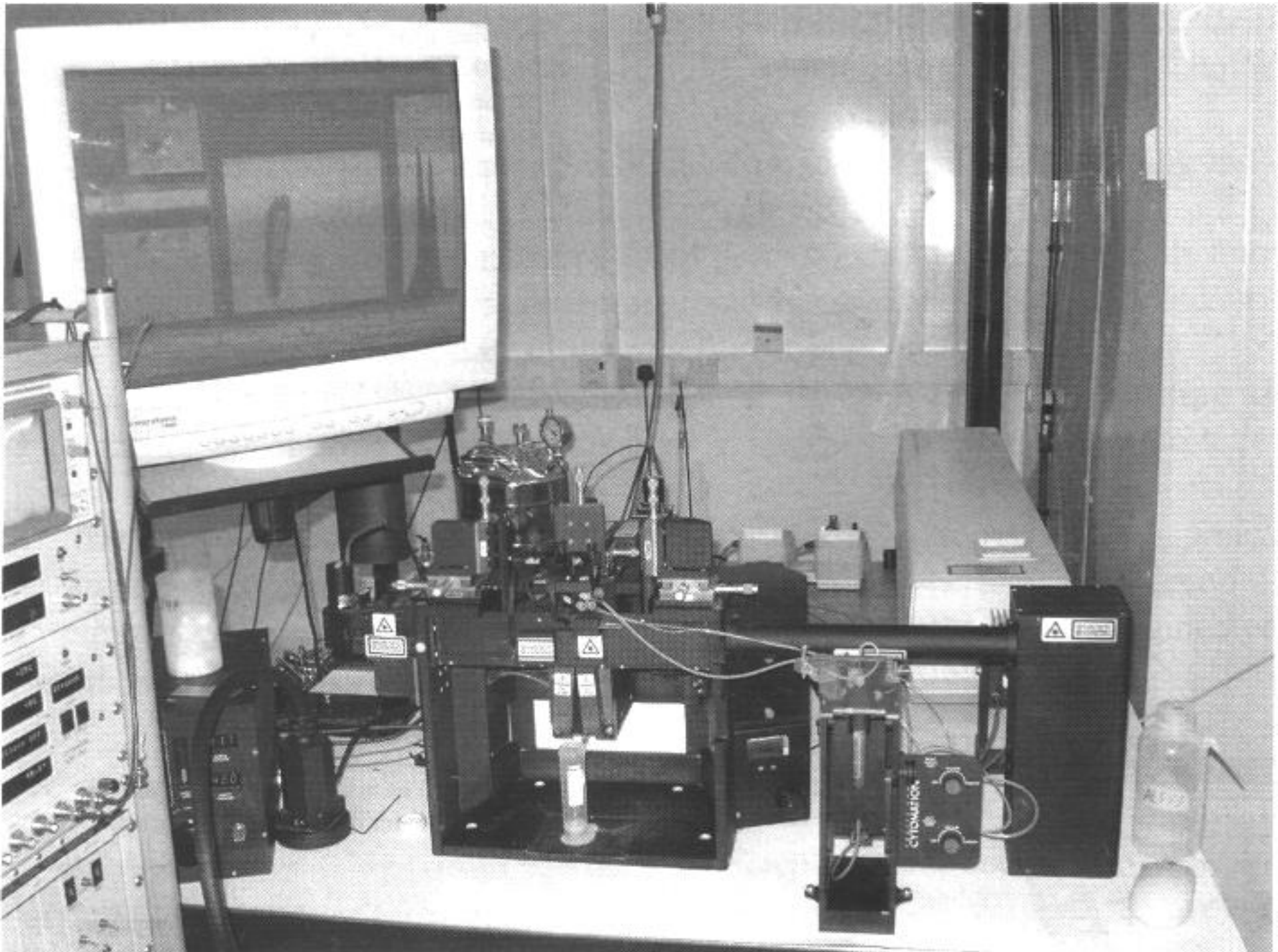
После окрашивания сперма разбавляется специальной средой.

Погибшие спермии отделяются от живых путем окрашивания пищевым красителем FD&C#40, который проникает в головки мертвых сперматозоидов, окрашивает их и нейтрализует флуоресценцию Хехст 33342 только в них, но не в живых клетках.



- **В фловцитометре (Flow cytometric sorting) формируются маленькие капельки. В каждой из них содержится один сперматозоид, в отдельных два, а некоторые не содержат сперматозоидов. Лазерный луч измеряет интенсивность флуоресценции и компьютер определяет, какую хромосому содержит сперматозоид. Капельки с Y- несущими сперматозоидами приобретают отрицательный заряд, а X-несущие – положительный.**

  В соответствующих контейнерах накапливается 20% сперматозоидов с Y-хромосомой и 20% - с X-хромосомой. Способ имеет коммерческое значение. Применяется в нескольких странах.



Родильное отделение, Паршино. 140 нетелей.

- **Первое осеменение телок было проведено в возрасте 512,9 ± 3,4 дней. Оплодотворяемость 81,4%, число осеменений на стельность 1,28.**
- **59 животных были осеменены приобретенной в Канаде разделенной спермой двух быков – Сапфира и Тангента. После осеменения спермой Сапфира родилось 18 телочек и 2 бычка, Тангента – 36 телочек и 3 бычка. Всего родилось 54 телочки (91,5%) и 5 бычков (8,5%). Мертворожденных ?**
- **От 81 телки, осемененных не разделенной спермой 4-х быков, получено 50 телочек и 31 бычок (в т.ч. один мертворожденный). Соотношение телочек и бычков заметно различалось в зависимости от быка: Брейвари – 23 телочки и 19 бычков (в т.ч. 1 бычок мертворожденный), Роджер – 22 телочки и 7 бычков, Лекзакт – 3 телочки и Аллегро – 2 телочки и 4 бычка.**

Схема культивирования клеток **:**

- **Выделение клеток**
- **Получение первичной культуры**
- **Пересев**
- **Морфологическая характеристика, фенотипирование и т.п.**
- **Замораживание/хранение/размораживание**

Для культивирования клеток in vitro используются пластмассовые чашки и растворы.

Клетки многоклеточных организмов **растут хорошо на твердой поверхности. А для роста отдельных клеток необходимо, чтобы поверхность чашки была покрыта внеклеточным веществом (например, коллагеном).**

Существовать способны клетки животных и в растворах, но с добавлением какого-либо биологического материала: сыворотки плодов крупного рогатого скота (СПК), лошадиной сыворотки, и др.

Выращенные *первичные культуры* клеток можно переносить из чашки в другие и получать большое количество *вторичных культур*. Эти культуры также можно перевивать последовательно в течение нескольких недель или месяцев.

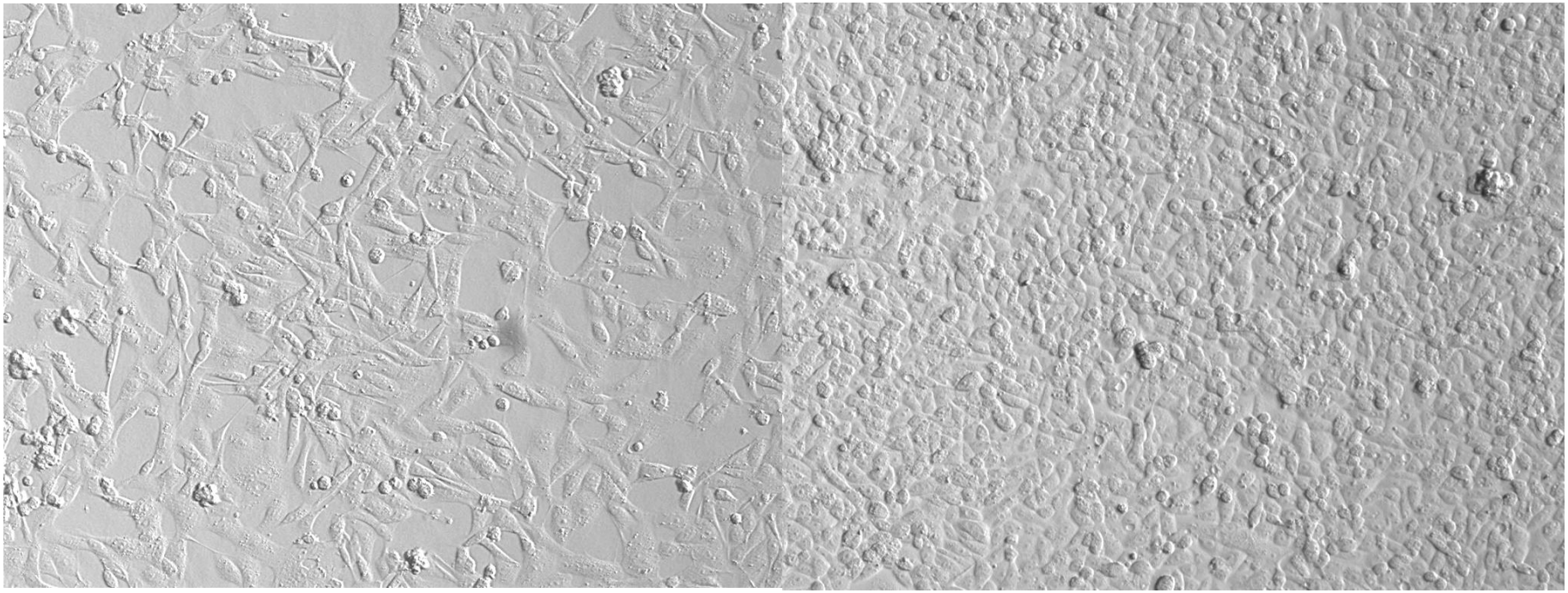
Нередко все генерации культивируемых клеток сохраняют признаки дифференциации тех тканей, из которых они были получены.

Так, *фибробласты* секретируют коллаген.

***Эмбриональные скелетные мышечные клетки* сливаются и образуют гигантские мышечные волокна, которые спонтанно сокращаются в чашке для культивирования.**

***Клетки эпителия* размещаются несколькими слоями.**

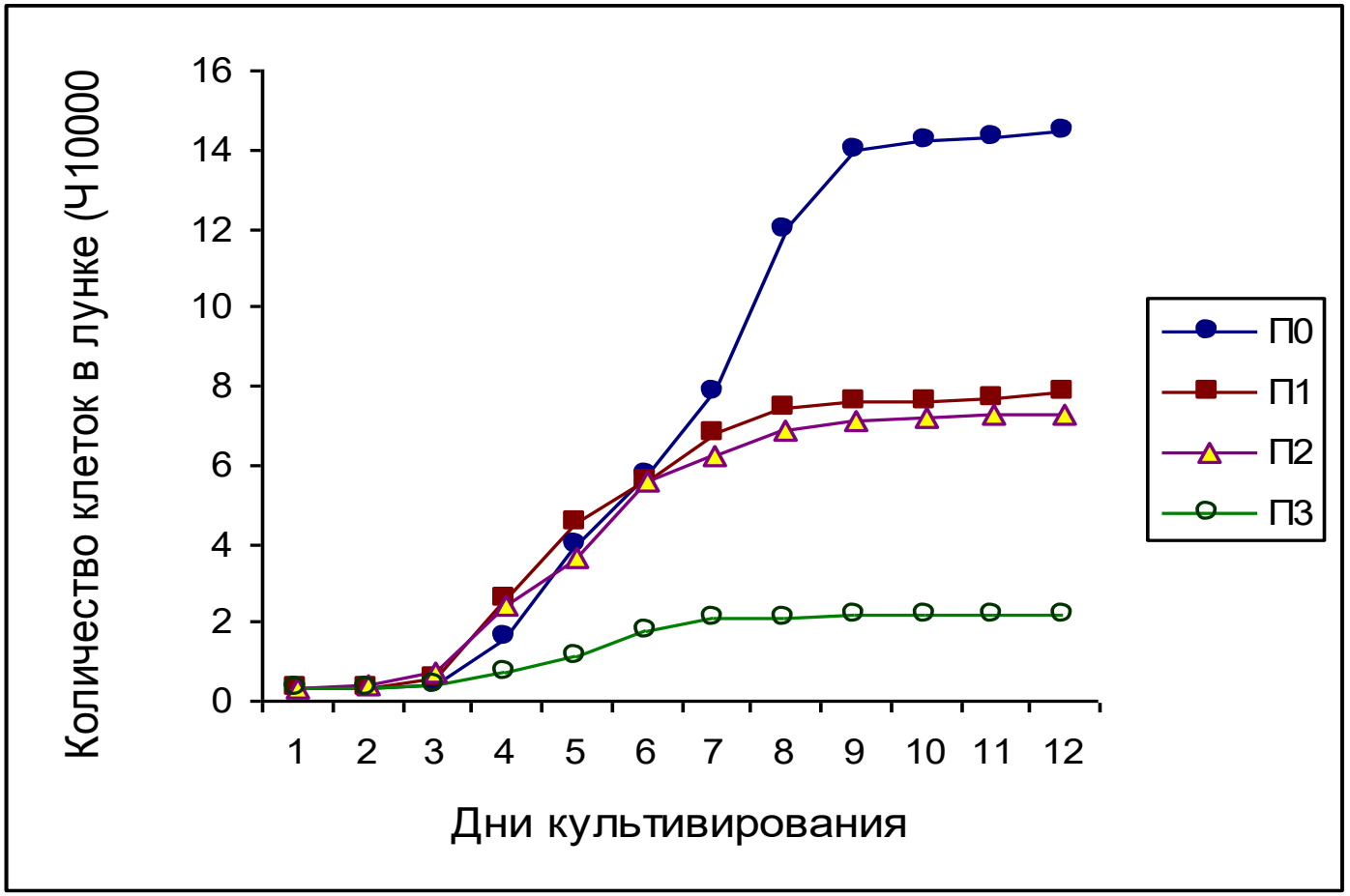
Рост клеток BGM



День 1

День 3

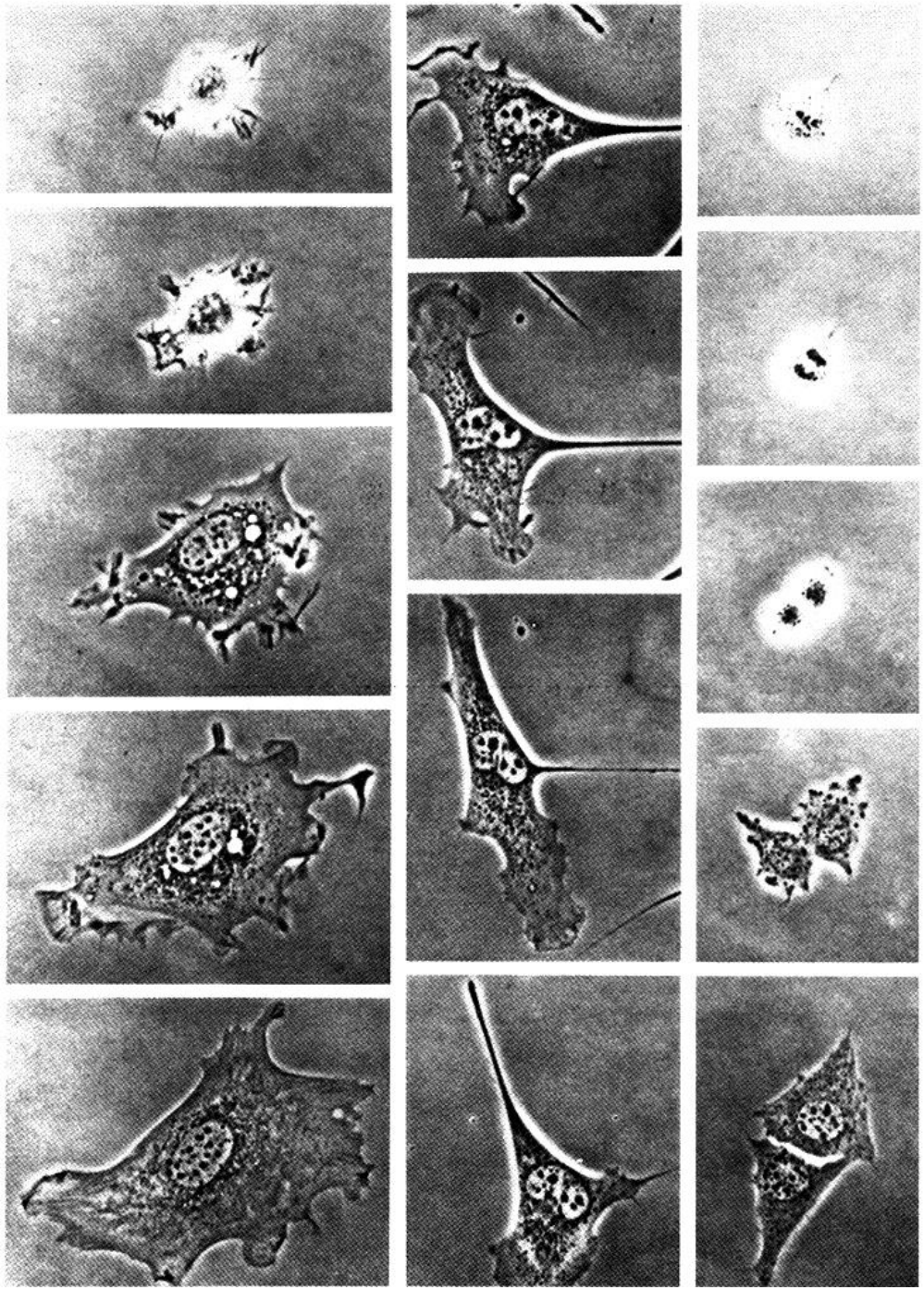
Кривые роста МСК в первичной культуре (П0)
и 3 последующих пассажах (П1, П2, П3)



Подвижность мышиных фибробластов в фазово-контрастном микроскопе

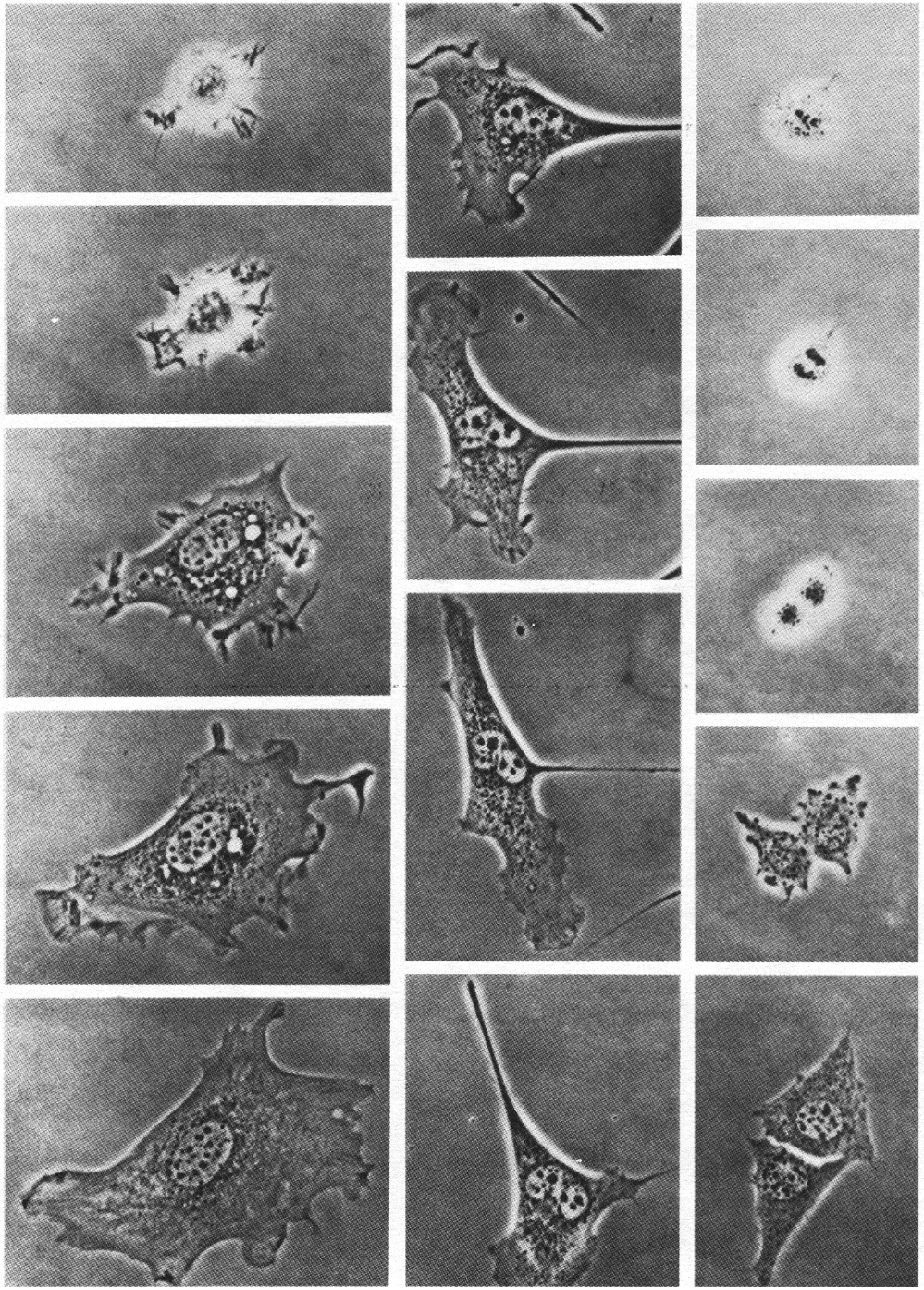
Левый ряд:

по мере распластывания клетки на поверхности из нее в поисках подходящих участков прикрепления выпячиваются иглообразные микрошипы и листообразные ламеллоподии. Периодически ламеллоподии заворачиваются обратно («бахрома»), а затем снова выпячиваются вперед.



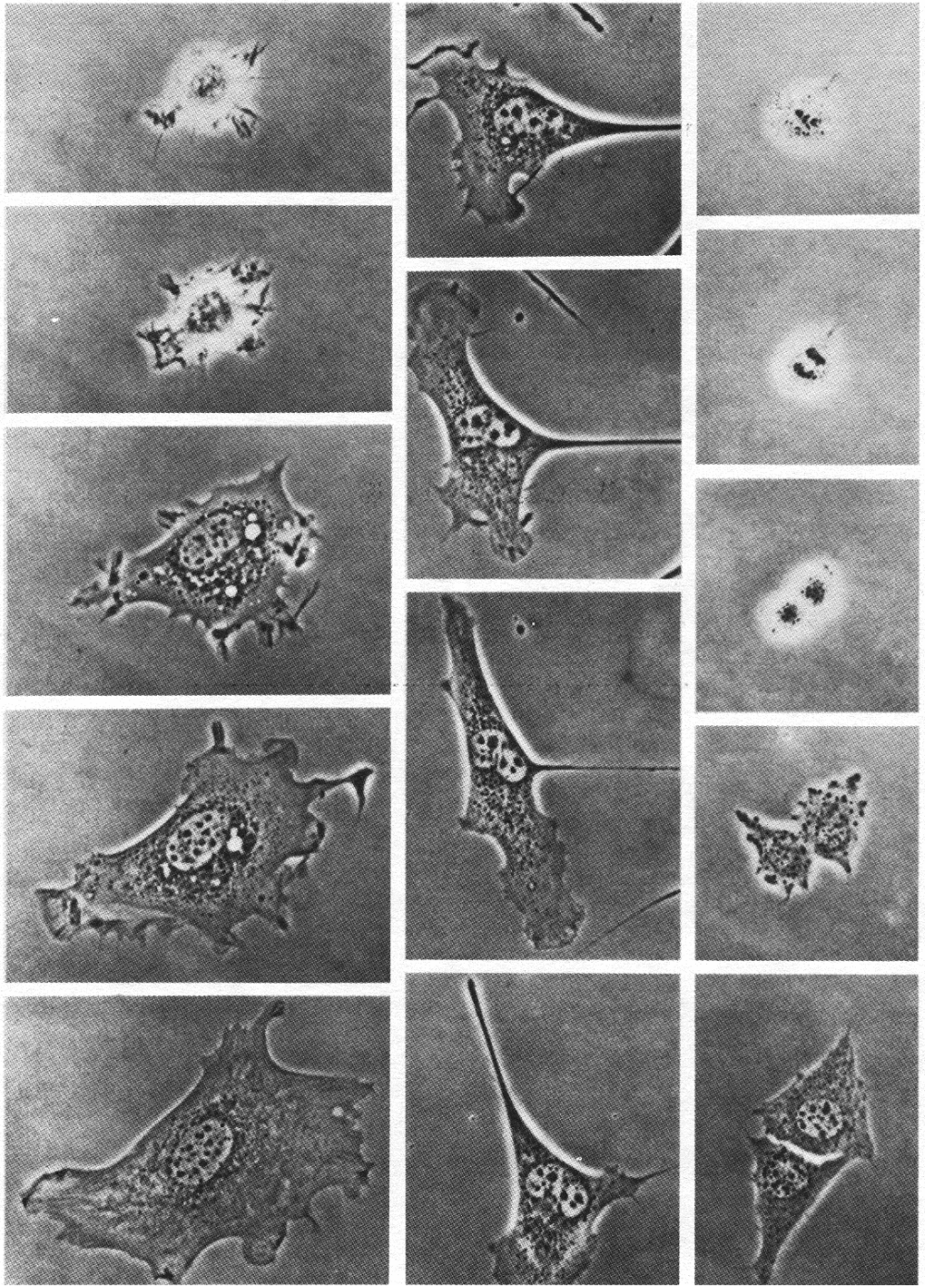
Средний ряд:

после распластывания фибробласты становятся асимметричными и начинают ползать по поверхности культуральной чашки ламеллоподией вперед, резко изменяя направления движения.

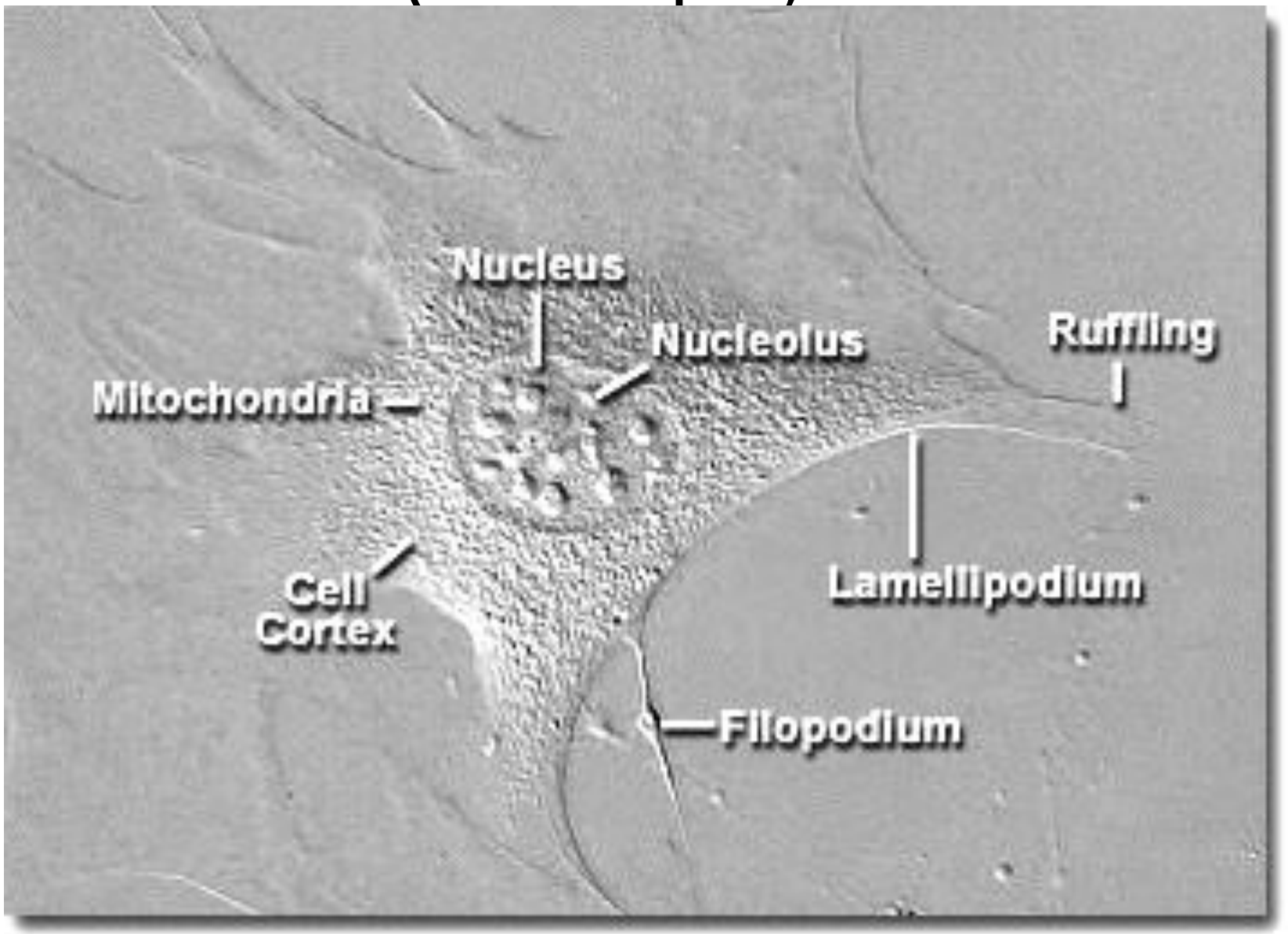


Правый ряд:

в ходе митоза распластанная клетка округляется, затем образуется митотическое веретено. Две дочерние клетки после деления вновь распластываются на поверхности.

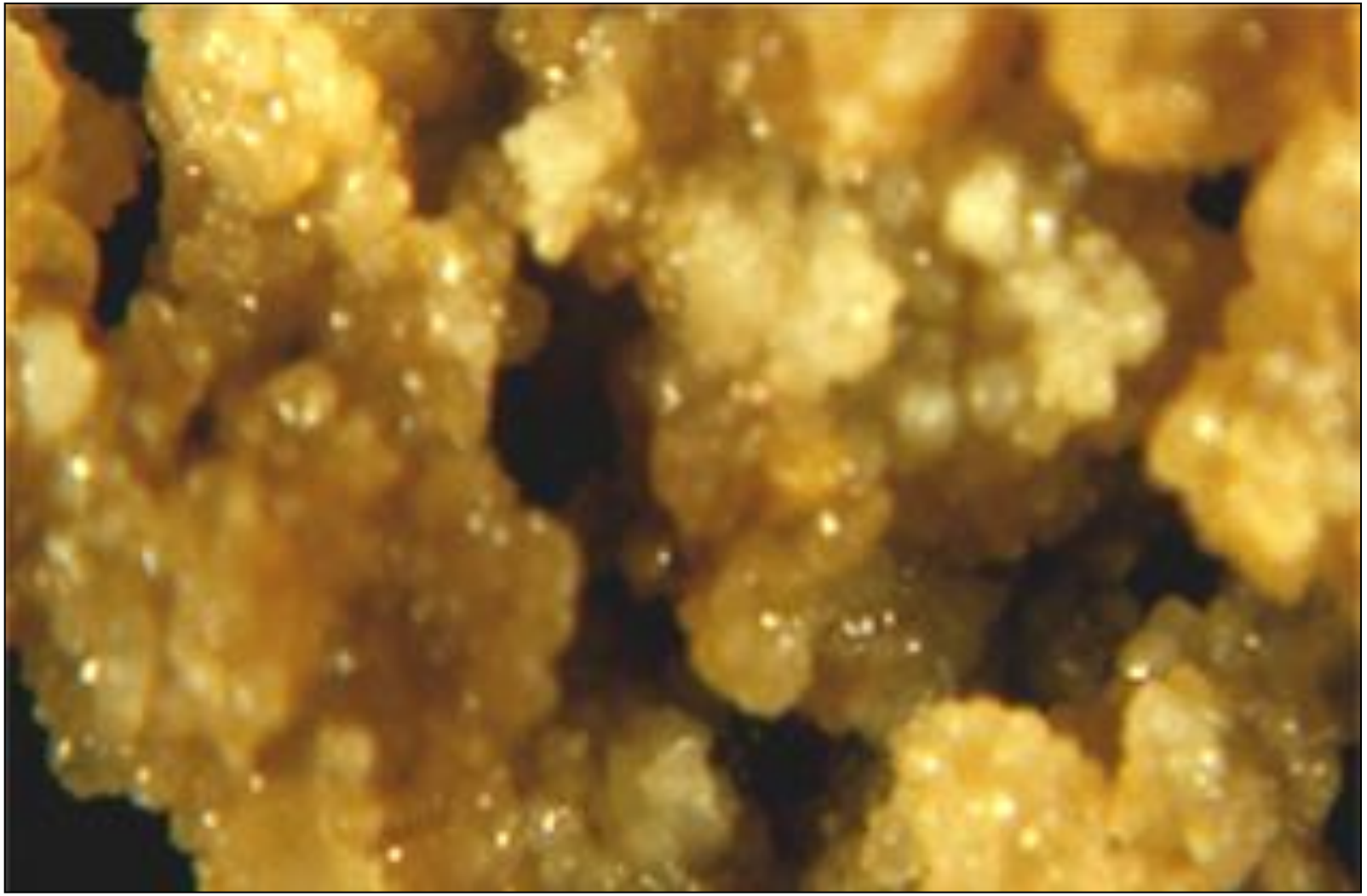


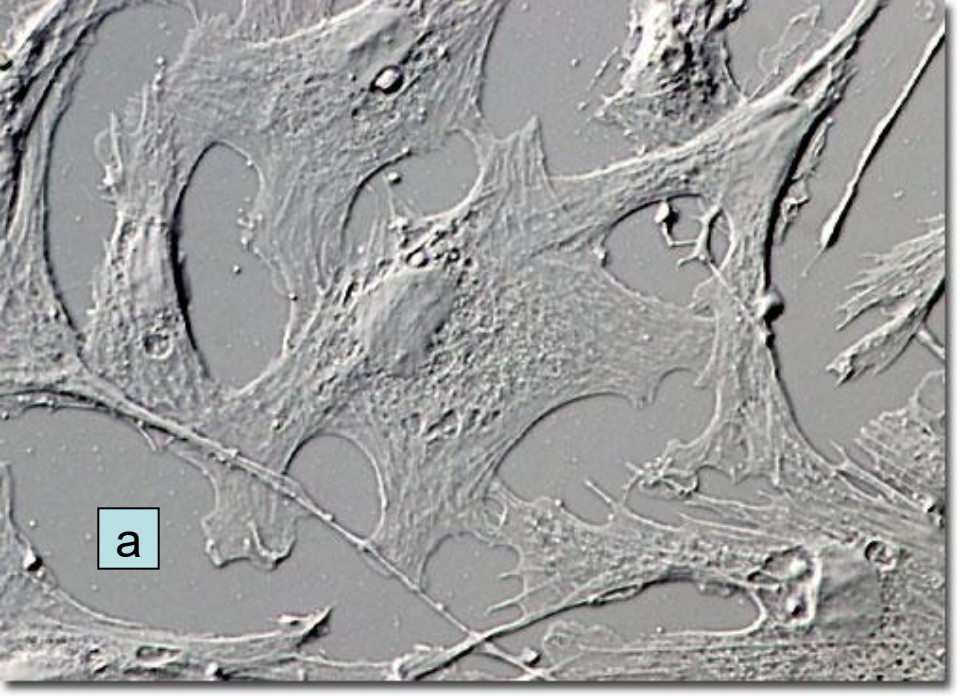
Морфология фибробласта (Varel-контраст)

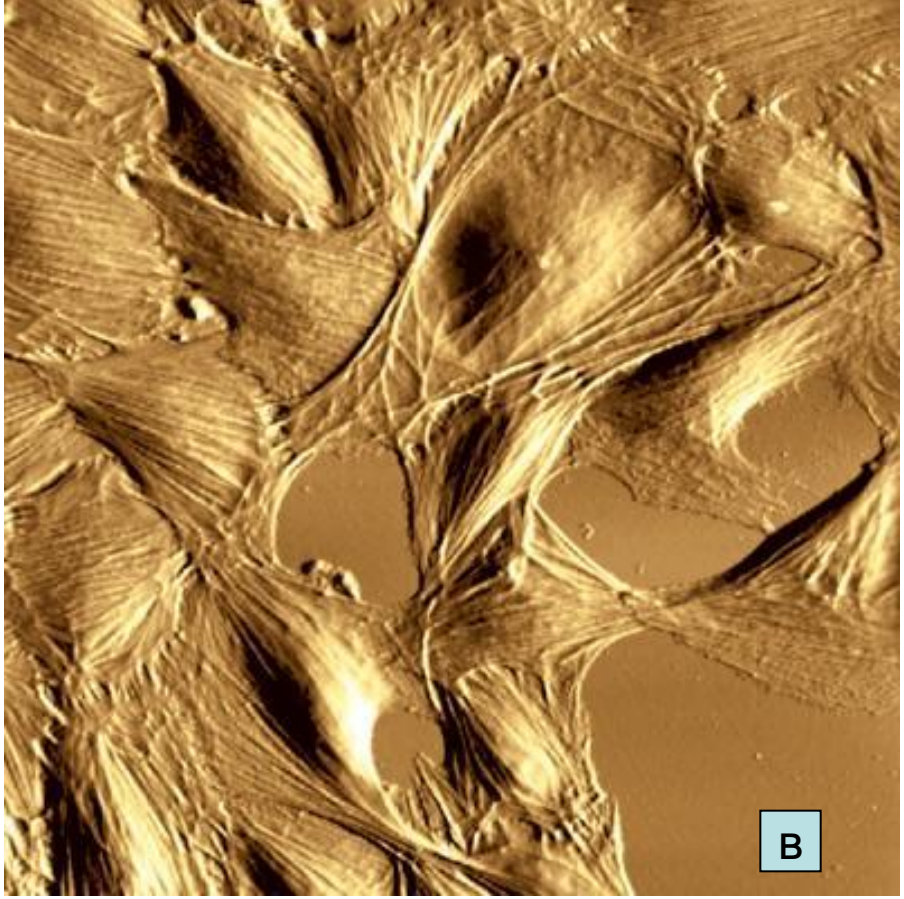


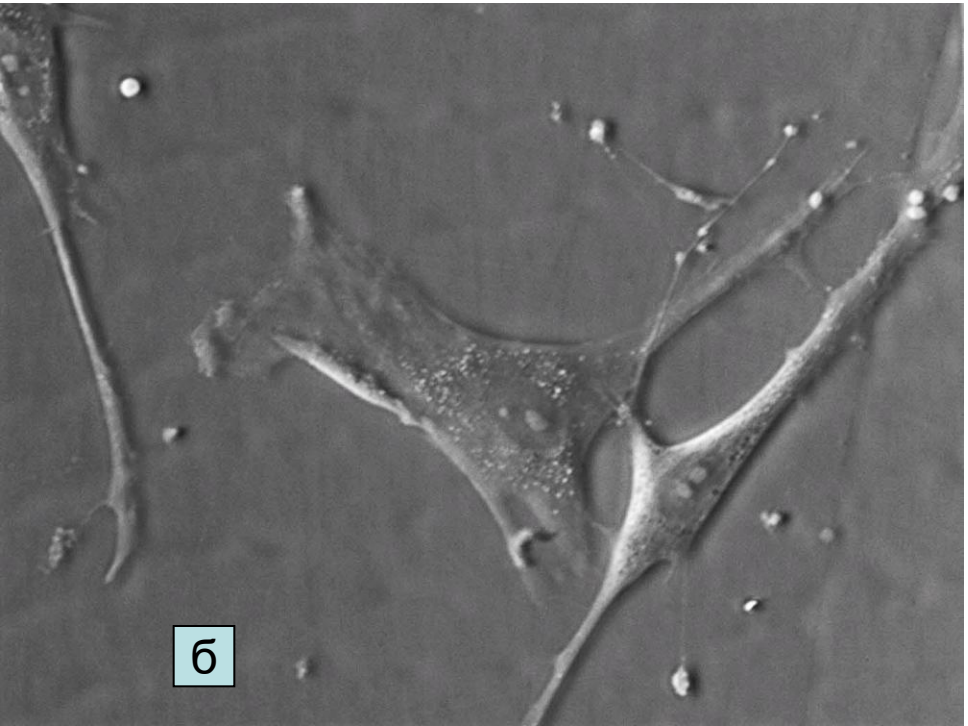
- **Филоподии представляют собой тонкие цитоплазматические выросты, выходящие за пределы переднего края ламеллиподий в мигрирующих клетках. Внутри ламеллиподии актиновые ребра известны как микрошипы, а когда они выходят за пределы ламеллиподии, они известны как филоподии.**

Каллусная ткань, выращенная из одной клетки на питательной среде





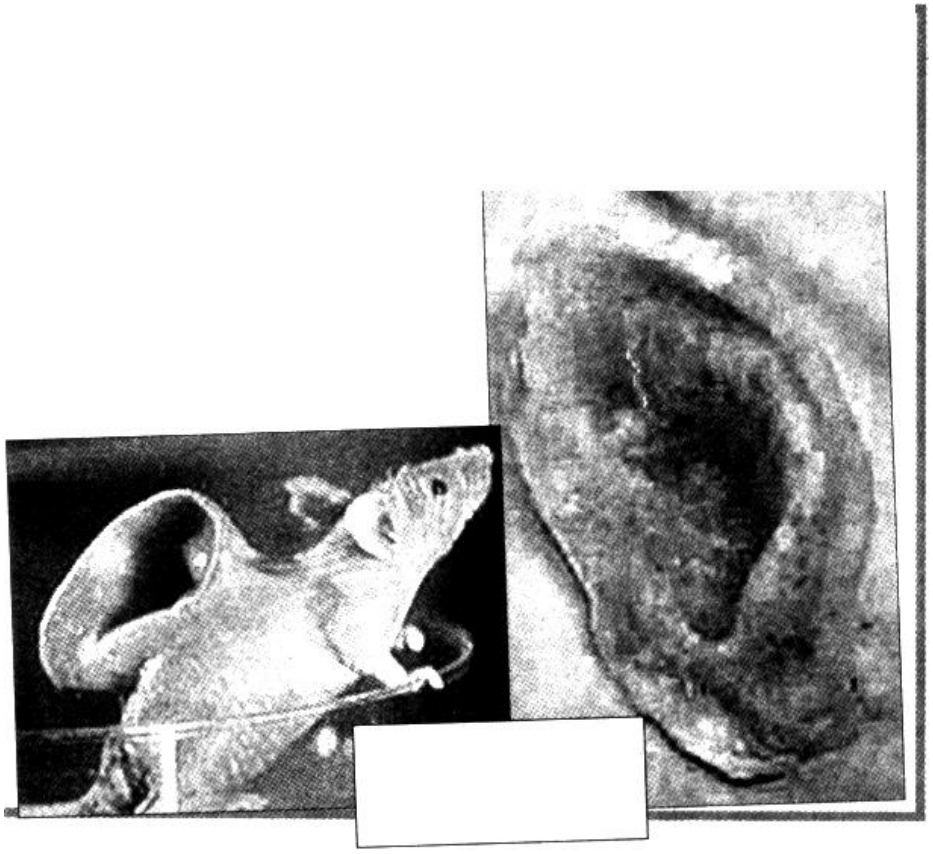




а – фибробласты
б – больной
в – ткань

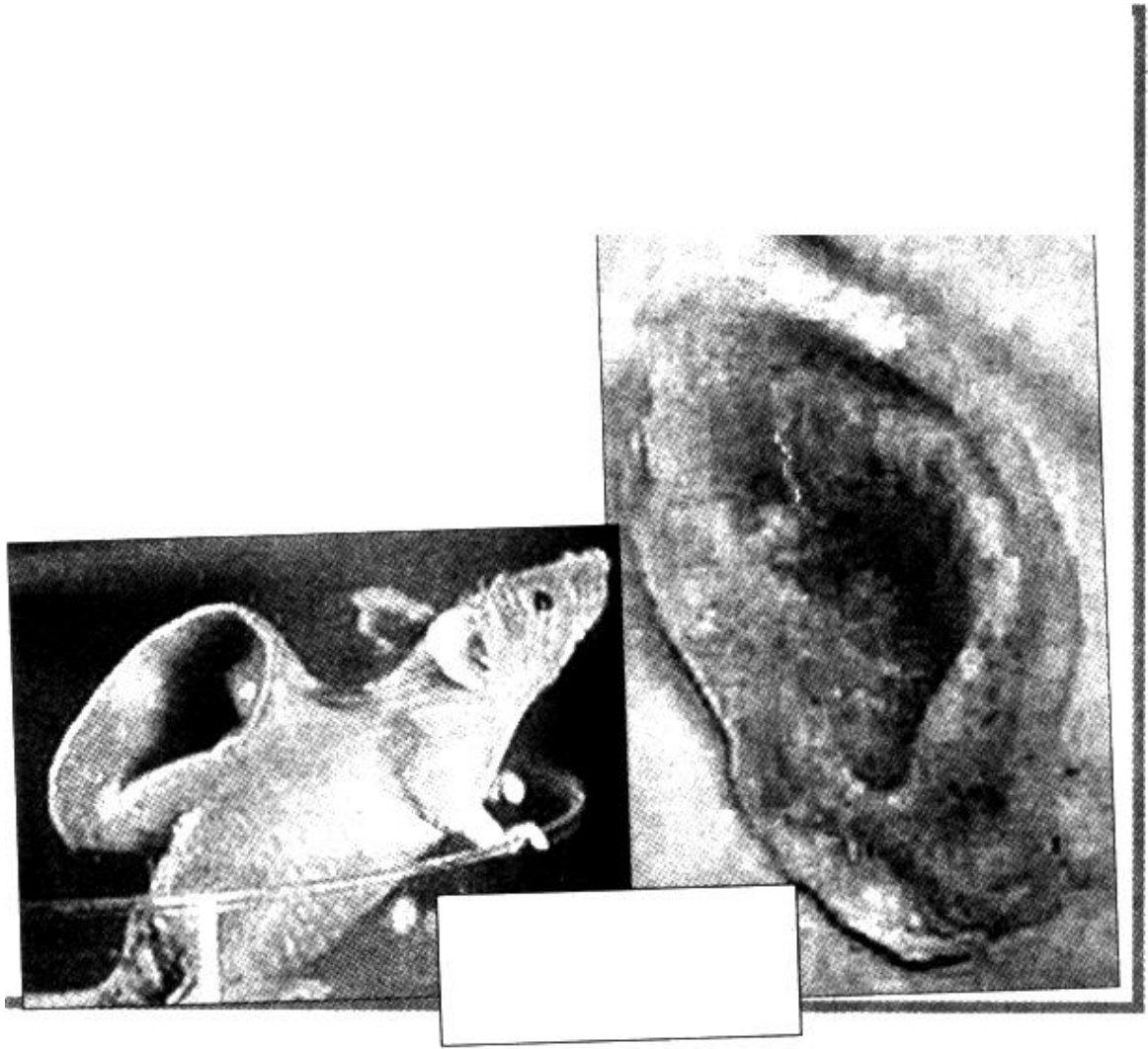
Чарльз Ваканти из Массачусетского университета вырастил человеческое ухо на спине у мыши.

Орон Каттц и Ионат Цурр (университет Западной Австралии) создали биореактор, в котором из живых клеток кожи мышки вырастили «пальто». Клетки помещали на манекен – полимерный каркас. Клетки на нем размножились, наросли сплошным покровом в виде пальто. Каркас растворился, а пальто осталось.



Таким способом можно размножать клетки кожи других видов и из нескольких клеток вырастить, например, ухо человека.

Като и Такеуши в 1964 году из растущей в культуре ткани одиночной клетки моркови получили целое растение моркови.



Большинство клеток животных в культуре после определенного числа деления погибает. Клетки кожи человека делятся 50–100 раз. Возможно, что срок жизни их в культуре отражает потенциальную продолжительность жизни организма, из которого они получены.

Так, при культивировании клеток от больных, которые страдают заболеваниями, укорачивающими жизнь, срок жизни и клеток в культуре оказывается укороченным.

Но иногда спонтанно возникают такие клетки – мутанты, которые способны бесконечно долго поддерживаться в виде клеточных линий. Клеточные линии можно использовать для получения клонов, которые происходят из одиночной клетки – предшественника.

Стволовые клетки

Продолжительность жизни клеток различна. Время от образования клетки в результате деления родительской клетки до следующего деления или смерти составляет *клеточный цикл*.

Некоторые специализированные клетки (мышечные, нервные) не делятся и живут столько, сколько живёт организм.

Клетки эпителия кишечника, эритроциты и др. живут недолго. Они должны постоянно обновляться.

Восполнение клеток при их естественной гибели, а также при регенерации тканей в случае ран, травм происходит за счёт недифференцированных, сохраняющих способность к делению стволовых клеток у животных и клеток меристем у растений.

Деление и дифференцировка клеток строго регулируется. При нарушении механизма регуляции начинается неконтролируемое деление клеток, характерное для роста злокачественных опухолей.

Стволовые клетки **обладают свойством быстро размножаться в культуре. В 1981 г. М. Эвансу впервые удалось выделить животную стволовую эмбриональную клетку из зародыша мыши.**

В 1998 г. Д. Томпсон и Д. Беккер (США) выделили эмбриональные стволовые клетки из человеческого зародыша. Таких клеток в зародыше очень мало – сотые доли процента.

Во взрослом организме на 1 миллион клеток в среднем имеется одна стволовая клетка. У человека стволовые клетки сохраняются до глубокой старости. Если их ввести в нефункционирующую часть организма, они сами могут находить слабые места и восполнять утраченную функцию.

Все соматические клетки специализированы, т.е. выполняют какую-либо функцию. Эмбриональная стволовая клетка не имеет функций, кроме переноса мРНК в следующее клеточное поколение.

Способность к неограниченному делению сохраняется у нее до тех пор, пока она не получит генетического сигнала. После деления дочерняя клетка может остаться стволовой, какой была и родительская клетка, или начать необратимый путь дифференциации и превратиться в один из 150 возможных типов зародышевых клеток.

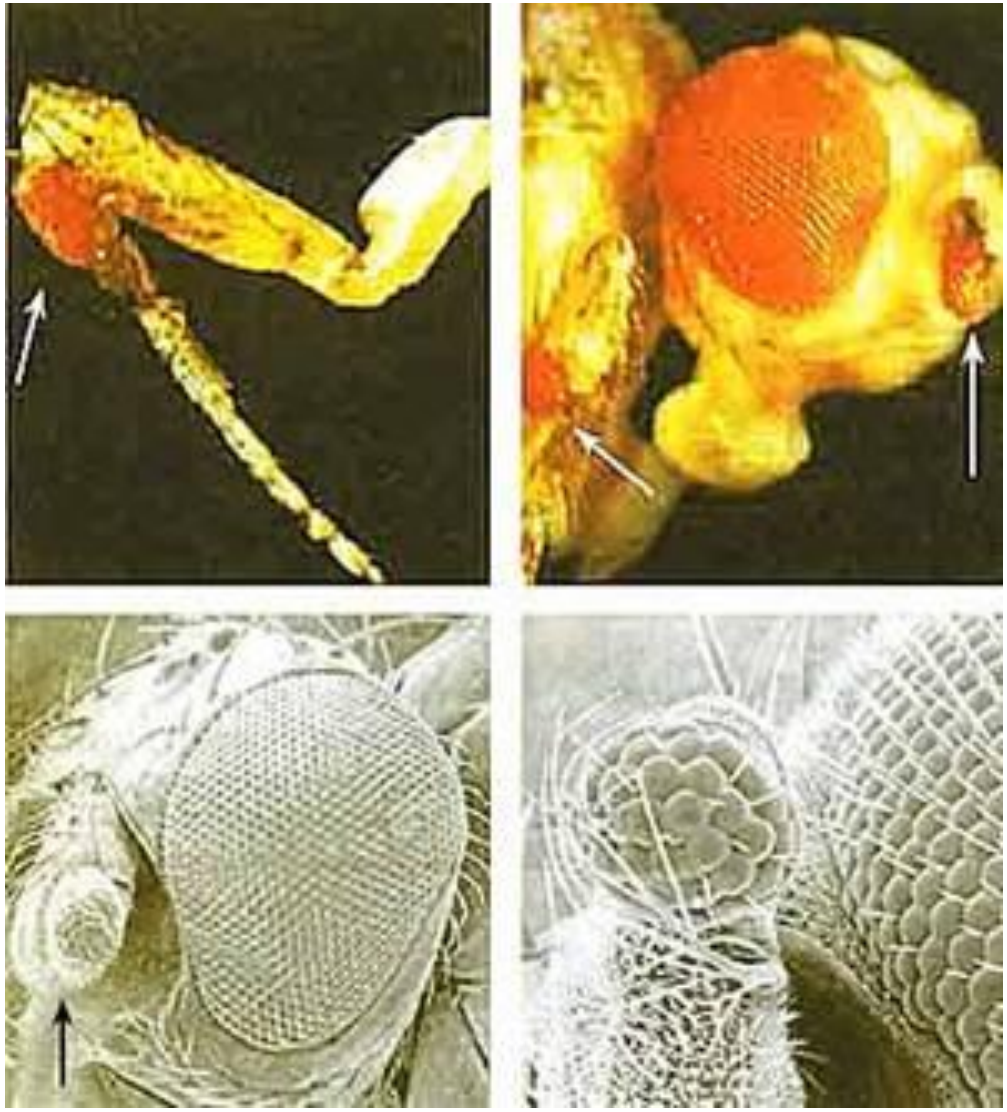
Из стволовой клетки можно вырастить теоретически любую специализированную клетку.

- **В стволовых клетках определенная организация генных сетей. Есть ключевые гены, от которых зависит специфика развития данной ткани или органа, и структурные гены, запускаемые ключевыми генами, которые обеспечивают синтез тканеспецифических белков и формирование того или иного органа или ткани.**
- **Эта закономерность присуща всем животным. Так, у дрозофилы есть ген eyeless, который обусловливает развитие глаза. Если его заставить работать в необычном месте, то глаза могут появиться на брюхе, на лапках, на крыле и в любом другом месте.**
- **Сходный ген есть и у млекопитающих. Введенный в геном дрозофилы, он дает тот же эффект, что и собственный ген хозяина.**

Развитие глаза в необычных местах на теле дрозофилы:

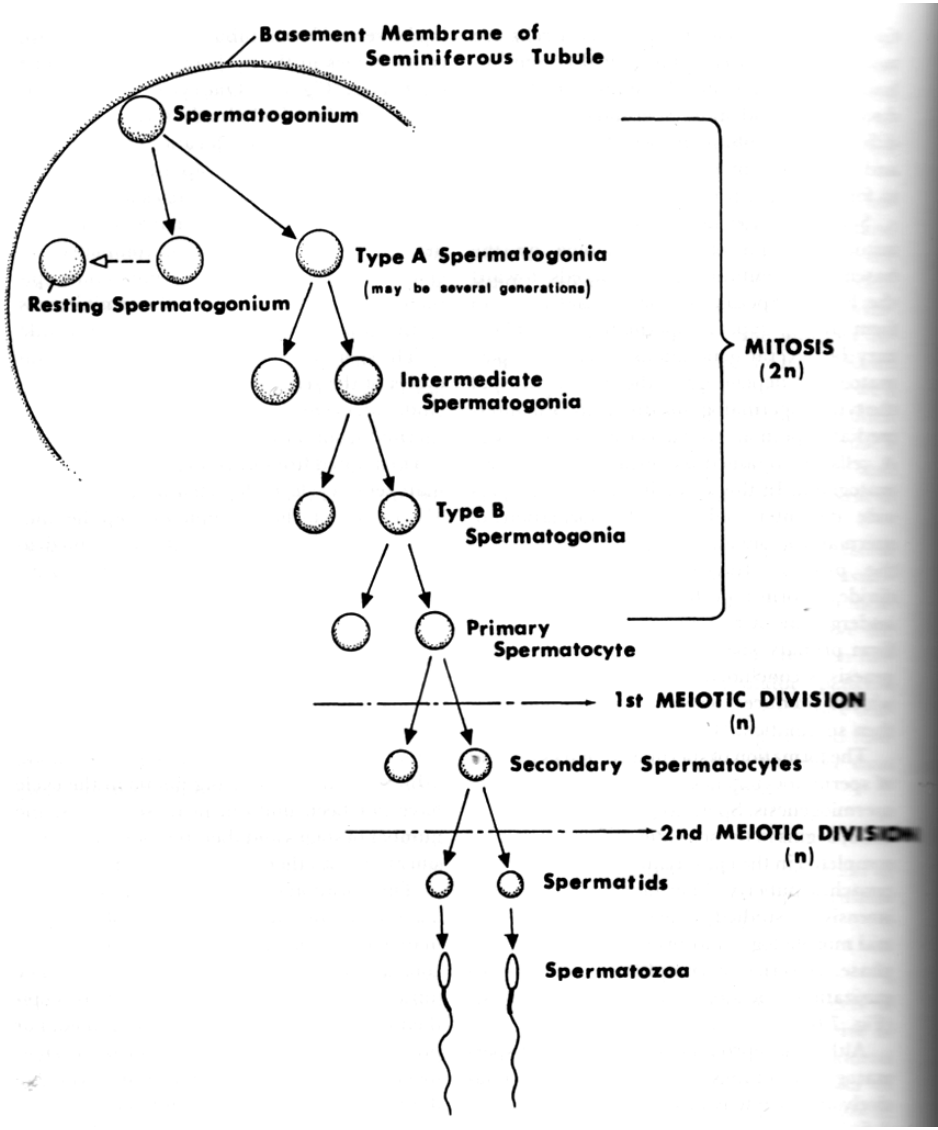
а, б — на лапке,

в, г — на антенне.



- **Стволовые клетки имеются во многих тканях. Внешне они отличаются от клеток дифференцированных, но заложенная в них программа направляет развитие после деления в предопределенном направлении.**

То есть такие клетки *детерминированы*.



1 - компоненты просвета канальца;

2 - базальный компонент;

3 - интерстициальный компонент;

4 - сперматиды;

5 - первичные сперматоциты;

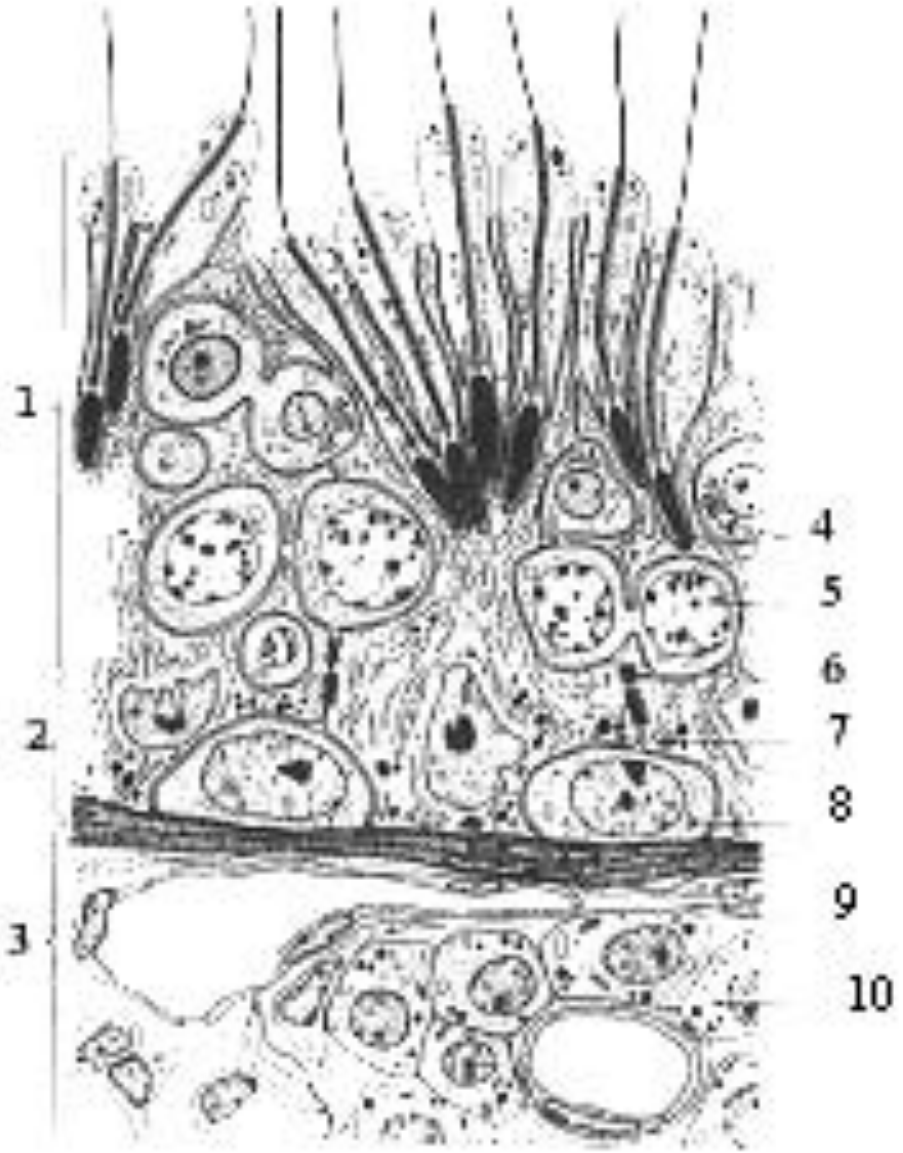
6 - соединительный комплекс;

7 - клетка Сертоли;

8 – сперматогония;

9 - соединительная ткань;

10 - клетка Лейдига



Однако детерминация не строго необратимое изменение. Японским ученым удалось превратить такую клетку в «универсальную», способную развиваться в клетки различных тканей и органов.

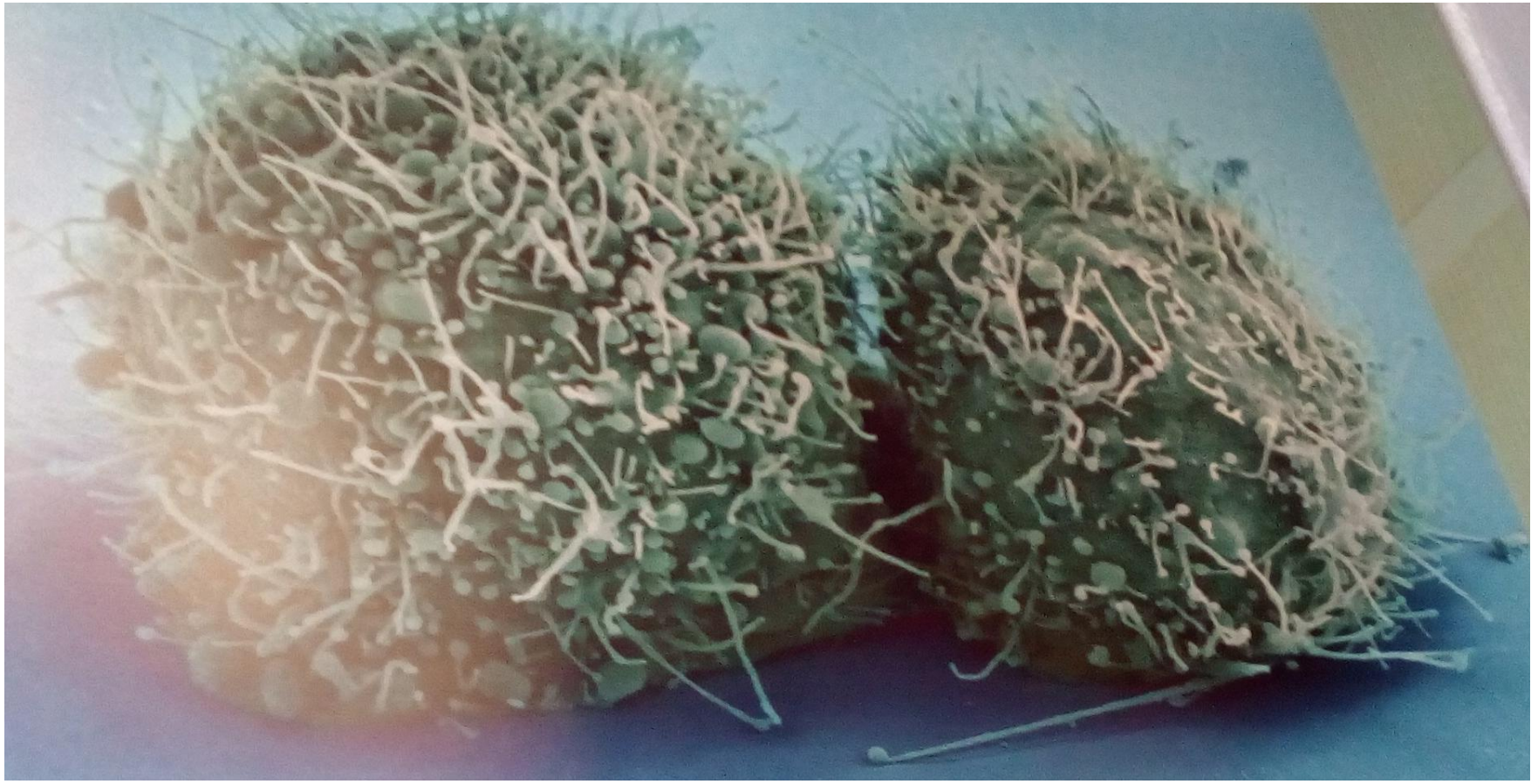
Из эмбриональных стволовых клеток формируются островки в различных органах и тканях, которые состоят из взрослых специализированных клеток. Эти клетки рождаются, растут и умирают. И лишь их праматерь бессмертна.



Hela, бессмертные клетки.

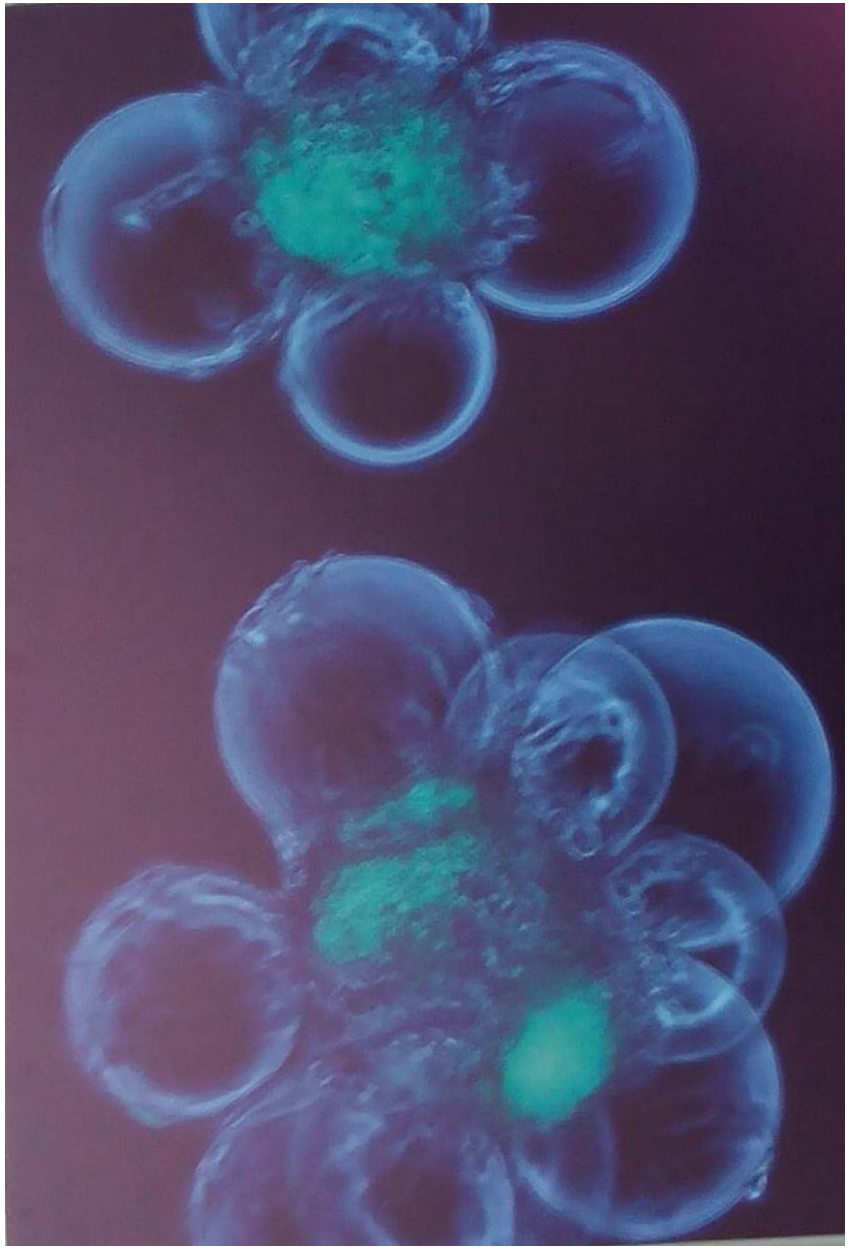
Сканирующая электронная микроскопия

National Center for Microscopy and Imaging Research



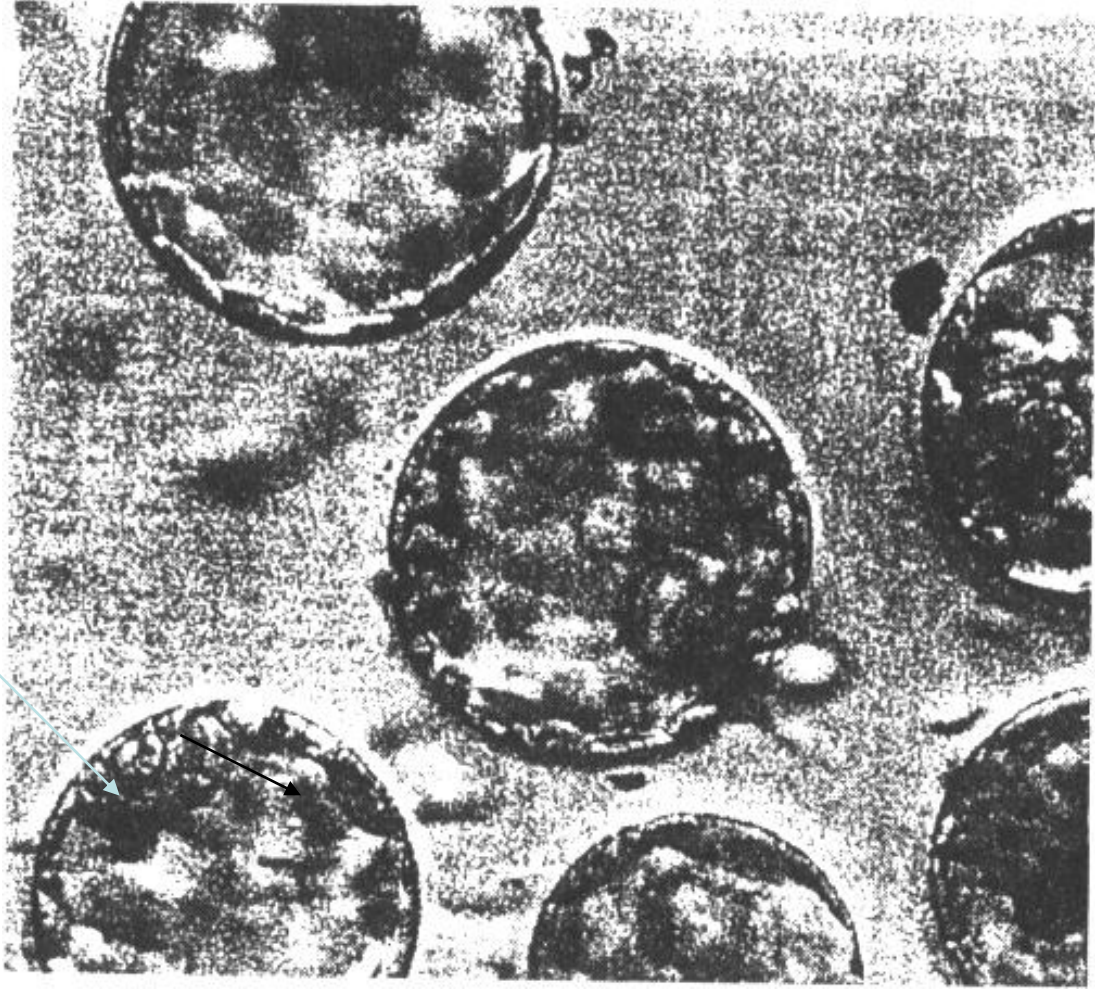
Hela, бессмертные клетки.
Завершенная стадия деления.

Сканирующая электронная микроскопия
National Center for Microscopy and Imaging Research



Чтобы различить в биореакторе два типа клеток – питающие и стволовые – использовали стволовые клетки мыши, продуцирующие особый маркер, зеленый флуоресцирующий белок. Питающие миобласты не дают флуоресцирующего сигнала, поэтому их можно отличить от стволовых клеток. Флуоресцирующая микроскопия, Д.Б. Кауэн. Гарвардская медицинская школа, детская больница г. Бостона, США) Д. Канкел

Бластоцисты человека, полученные путем оплодотворения в пробирке. Скопление стволовых клеток хорошо видно у стенки бластоцисты в левом нижнем углу фотографии (появляются на 5–7-й день после оплодотворения)



Все соматические клетки специализированы, т.е. выполняют какую-либо функцию. Эмбриональная стволовая клетка не имеет никаких функций, кроме переноса мРНК в следующее клеточное поколение.

Способность к неограниченному делению сохраняется у нее до тех пор, пока она не получит генетического сигнала. После деления дочерняя клетка может остаться стволовой, какой была и родительская клетка, или начать необратимый путь дифференциации и превратиться в один из 150 возможных типов зародышевых клеток.

Стволовые клетки могут использоваться как источник первичного клеточного «сырья», из которого можно вырастить теоретически любую специализированную клетку.

Стволовые клетки имеются во многих тканях. Внешне они отличаются от клеток дифференцированных, но имеют клеточную память, которая направляет их развитие после деления в ранее предопределенном направлении. То есть такие клетки *детерминированы*. В них уже произошло стойкое внутреннее изменение, которое делает клетку и ее потомков отличными от других клеток эмбриона и предполагает развитие по специализированному пути.

Но детерминация не строго необратимое изменение. Японским ученым удалось превратить такую клетку в «универсальную», способную развиваться в клетки различных тканей и органов.

Из эмбриональных стволовых клеток формируются островки в различных органах и тканях, которые состоят из взрослых специализированных клеток, которые возникают, растут и погибают. И лишь их праматерь бессмертна.

Вся работа генома контролируется набором генов, которые сначала формируют остов клетки, потом ее внутреннюю структуру (органеллы) и затем целиком клетку с полным набором генов. В последний момент в клетку встраивается генетическая программа, определяющая ее специализацию. Имея одинаковый набор генов, в организме есть по меньшей мере 350 типов клеток, работающих по различным генетическим программам.

А в одной-единственной клетке имеются 5000 так называемых генов эмбриогенеза, регулирующих на начальной стадии развития зародыша превращение в организм, состоящий из миллиардов клеток.

Сначала в результате деления зиготы образуются клетки (бластомеры), которые не становятся зачатками будущих органов или тканей. Они просто переносчики генетической информации в виде молекул РНК.

Когда накопится достаточное количество информации, в работу включаются гены, ответственные за специализацию, после чего начинают формироваться семейства различных стволовых клеток и происходит сегментация зародыша (структурно выделяются участки будущих органов). Количество клеток в том или ином сегменте (будущем органе) генетически запрограммировано.

Поэтому ученым при выращивании эмбриональных стволовых клеток чрезвычайно важно брать клетку-праматерь на ранней стадии.

Сейчас научились выделять из головного мозга зародышей не просто отдельные эмбриональные стволовые клетки, а зародышевую ткань, из которой природа создает все живое. При хранении зародыша в холодильнике при температуре +4°С через 4–5 часов все клетки погибают, остаются лишь эмбриональные стволовые клетки.

В 2006 г. японские врачи сообщили, что им удалось вырастить почку человека в теле животного. Стволовые клетки из костного мозга человека пересадили в еще не сформировавшуюся почку зародыша мыши. У родившегося грызуна часть почки была человеческой. Ее пересадили взрослому грызуну, у которого она благополучно прижилась и стала развиваться.

Биореактор (ферментер) для выращивания микроорганизмов, клеток или тканей







Криоконсервация стволовых клеток
с использованием программного замораживателя

А – эмбриональные стволовые клетки человека, подготовленные для криоконсервации;

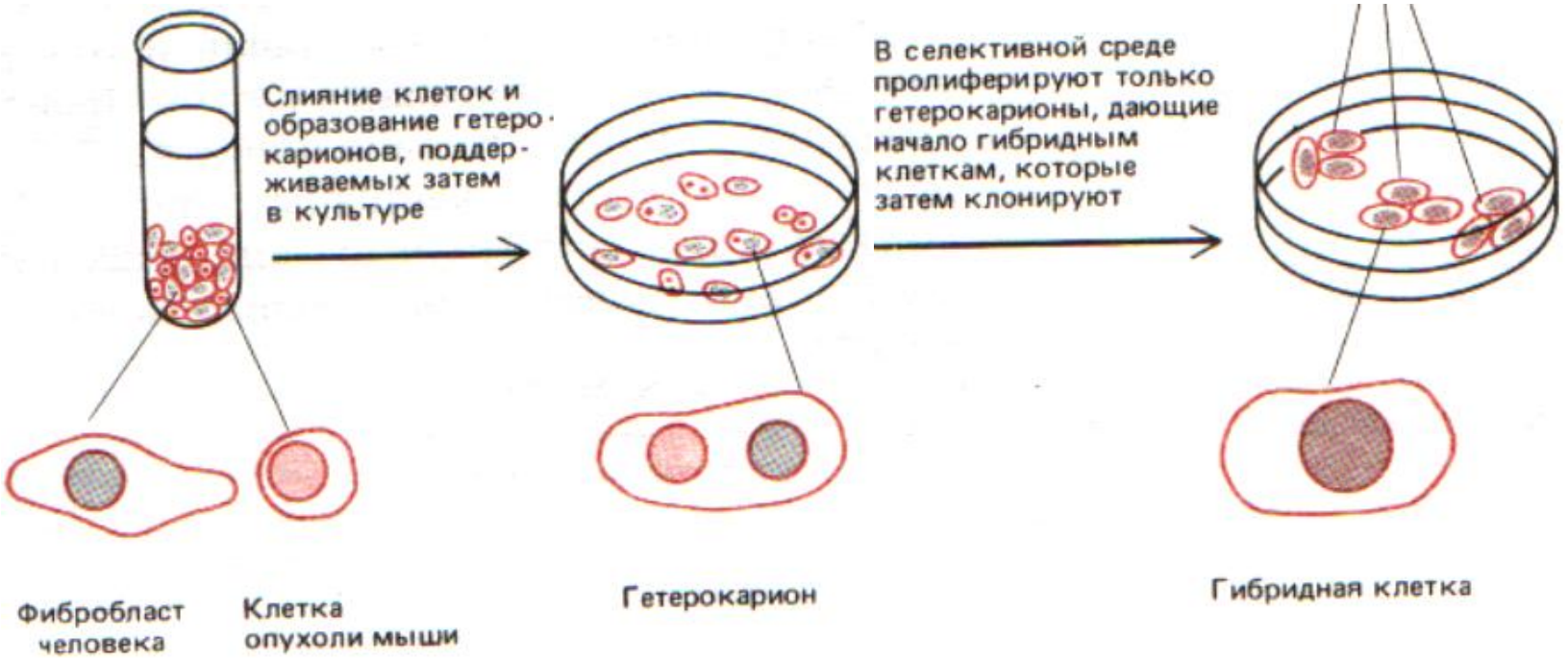
Б – штатив с пробирками, находящимися на хранении в криобанке стволовых клеток

Гибридизация путем скрещивания – это наиболее простой путь создания организмов с желаемыми признаками. Две клетки, сливаясь, образуют одну клетку с двумя ядрами (*гетерокарион*).

При этом смешиваются цитоплазматические мембраны, цитоплазма и ядра обоих клеток.

В последующем *гетерокарион* делится митотически, образуя *гибридную клетку*. Ядерные оболочки у этой клетки разрушаются, все хромосомы объединяются в одно большое ядро.

Такие гибридные клетки можно клонировать и получить гибридную клеточную линию.


Слияние клеток и образование гетерокарионов, поддерживаемых затем в культуре
В селективной среде пролиферируют только гетерокарионы, дающие начало гибридным клеткам, которые затем клонируют
Фибробласт человека
Клетка опухоли мыши
Гетерокарион
Гибридная клетка

Harris и Watkins (1965) получили гетерокарионы клеток млекопитающих, индуцировав вирусом слияние клеток мыши и человека.

Иногда из гетерокарионов образовывались гибридные клетки с одним слившимся ядром. При этом происходила быстрая потеря хромосом человека (сохранялась только одна или несколько хромосом).

Такие гибридные клетки используются для изучения генов в хромосомах человека.

В других гибридных клетках сохраняется большинство исходных хромосом.

Широко используется метод гибридизации соматических клеток для получения моноклональных антител.

Клонирование и клеточная терапия с помощью стволовых клеток

Способность эмбриональной стволовой клетки стать любой клеткой организма связана с наличием в ней избытка РНК всех генов, отвечающих за рост зародыша на ранней стадии развития эмбриона.

Факторы, делающие эмбриональную клетку уникальной, находятся в ее клеточной жидкости – цитоплазме. Именно поэтому возможно клонирование живых существ. Можно вынуть ядро с генетическим материалом из клетки любого организма, вставить его в оболочку яйцеклетки, и система начнет работать – копировать содержащуюся в ДНК информацию, а затем формировать новое живое существо, идентичное донору.

Изучение путей превращения эмбриональной стволовой клетки особенно важно для медицины. Зная эти пути, можно вырастить из клеток-предшественников огромный массив ткани и, в принципе, любой человеческий орган.

Но для того, чтобы клонировать орган, одних эмбриональных стволовых клеток недостаточно. Нужны еще специальные стволовые клетки, из которых выращивается межклеточное вещество, формируется кровеносная система. Работы по выращиванию органов уже ведутся.

При пересадке эмбриональных стволовых клеток в какой-либо орган из них всегда образуются только клетки этого органа, что позволяет использовать эмбриональные стволовые клетки для восстановления поврежденных органов и тканей, лечения множества тяжелых заболеваний.

Гены эмбриогенеза людей, которые отвечают за раннее развитие зародыша из эмбриональной стволовой клетки, отличаются от генов обезьян и других млекопитающих. Причем это относится не ко всем клеткам, а только к тем, которые управляют развитием мозга.

В отличие от других живых существ, передняя доля мозга человека уже на ранних стадиях перестает контролироваться генами, которые определяют, сколько клеток будет в том или ином органе. Поэтому мозг человека может расти. Формирующиеся в процессе развития мозга новые нейроны мигрируют, создавая новые и новые клеточные образования.

Благодаря новым генам мозг зародыша человека и других млекопитающих приобрел и новый орган — нервный гребень. Его клетки способны пройти расстояние в несколько метров. Из мигрирующих клеток гребня образуются вся костно-мышечная система лица, тимус, все элементы внутреннего уха, проводящая система сердца, периферическая нервная система, надпочечники.

Изучение превращений стволовых клеток позволило выявить неожиданные взаимосвязи в системах органов и тканей человека. Так, американский ученый Ро Маккей, выращивая нервные клетки из их предшественников — нейрональных стволовых клеток, неожиданно обнаружил в межклеточной среде инсулин.

После серии экспериментов он сообщил о том, что при определенных условиях нейрональные стволовые клетки способны превращаться в β-клетки поджелудочной железы, то есть в клетки, вырабатывающие инсулин. Более того, оказалось что β-клетки состоят в близком родстве с клетками стриатума — важной части головного мозга, управляющей многими процессами.

- **Японские ученые извлекли из зародышей мышей 50 тыс. стволовых клеток, из которых формируются зубы. В течение нескольких недель выращивали их в желеобразном коллагене. В результате вырос зародыш зуба величиной около 0,5 мм. Его пересадили взрослой мыши на место вырванного резца. Через 37 дней зуб пробился сквозь десну, а спустя 50 дней мышь жевала всеми своими зубами.**
- **В США в 2008 г. провели первую в мире трансплантацию трахеи, выращенной из стволовых клеток самого пациента.**
- **Получена поджелудочная железа**
- **Мочевой пузырь**
- **Новое сердце на каркасе старого (не выполняло функции сердца)**
- **Клапаны человеческого сердца**
- **Роговицу глаза**
- **Капиллярные кровеносные сосуды**

ГЕНЕТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Создание промышленных штаммов микроорганизмов

- **Свойства микроорганизмов**
- **Генетическое конструирование *in vivo* и увеличение продуктивности штаммов**
  - **Подбор продуцентов по их свойствам**
  - **Накопление продуцента**
  - **Мутагенез и отбор**
  - **Клон, клоновая культура**
  - **Гибридизация путем скрещивания**

ЛИТЕРАТУРА

- Биотехнология/ Под. Ред. Н.С. Егорова,

  В.Д. Самуилова. Книга 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов/ В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высш. Шк., 1988. – 208 с.: ил.

2. Биотехнология: Учебник / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др.; Под. ред. академика РАСХН Е.С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение/Под ред. И.Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
4. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: Учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.

Свойства микроорганизмов

«Извлечение выгоды в технологических процессах из свойств микроорганизмов и клеточных культур»

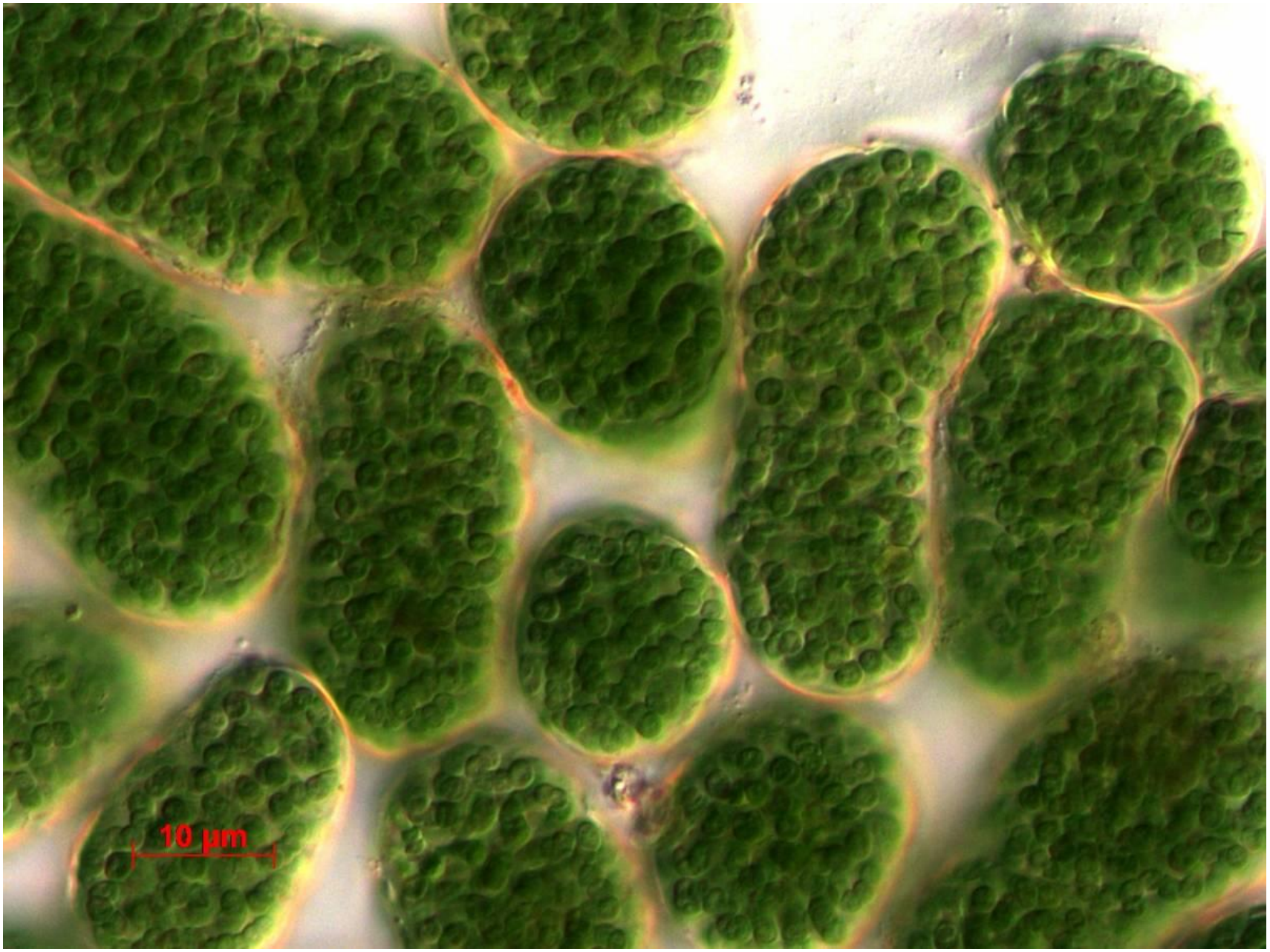
- **Бактерий и цианобактерий (сине-зеленые водоросли), не имеющих ядра и других органелл, называют *прокариотами*.**

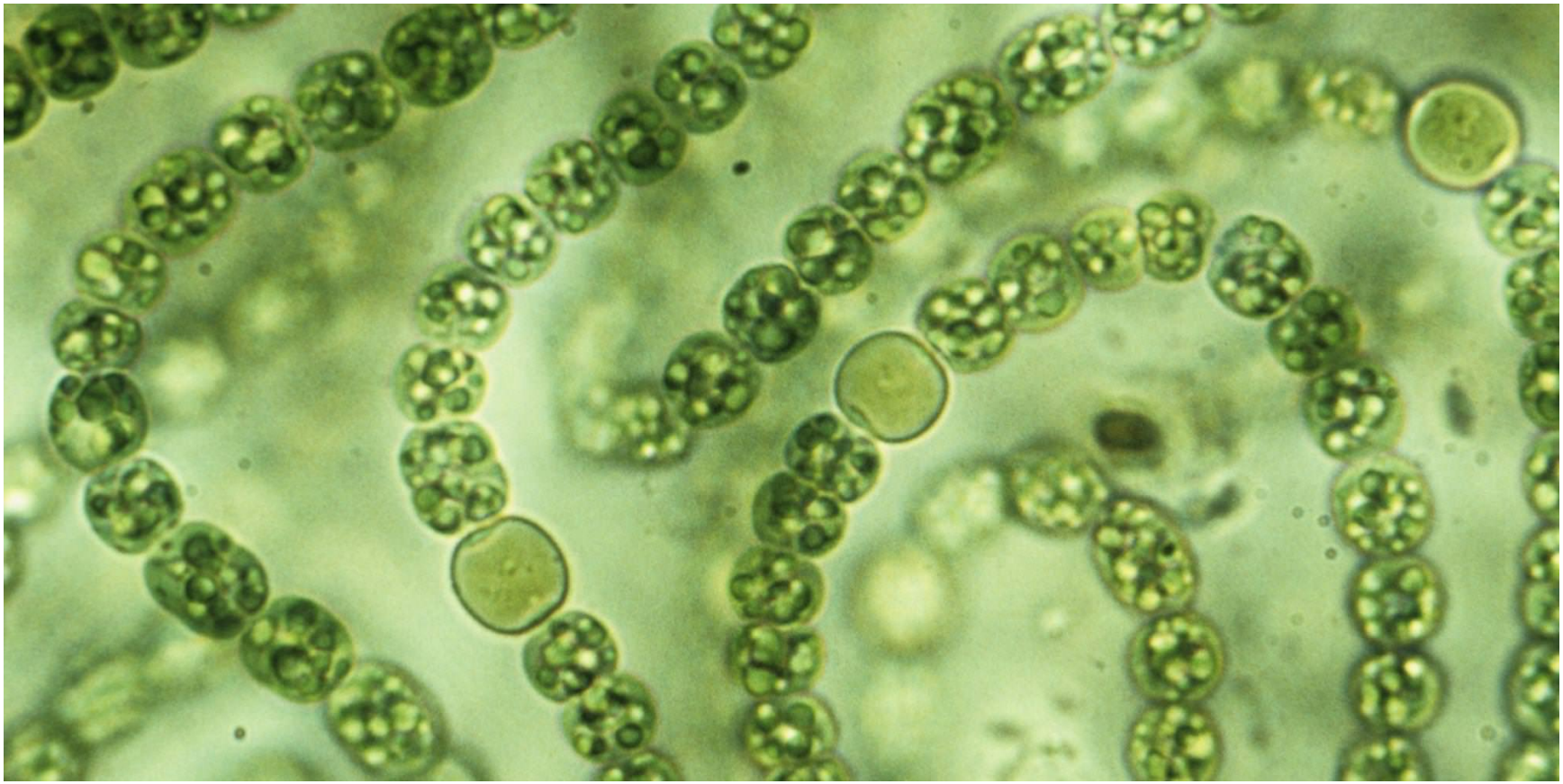
- **Клетки животных, растений, водорослей, грибов и простейших, у которых имеется истинное ядро и другие органеллы (митохондрии, хлоропласты у растений), называют *эукариотами*.**

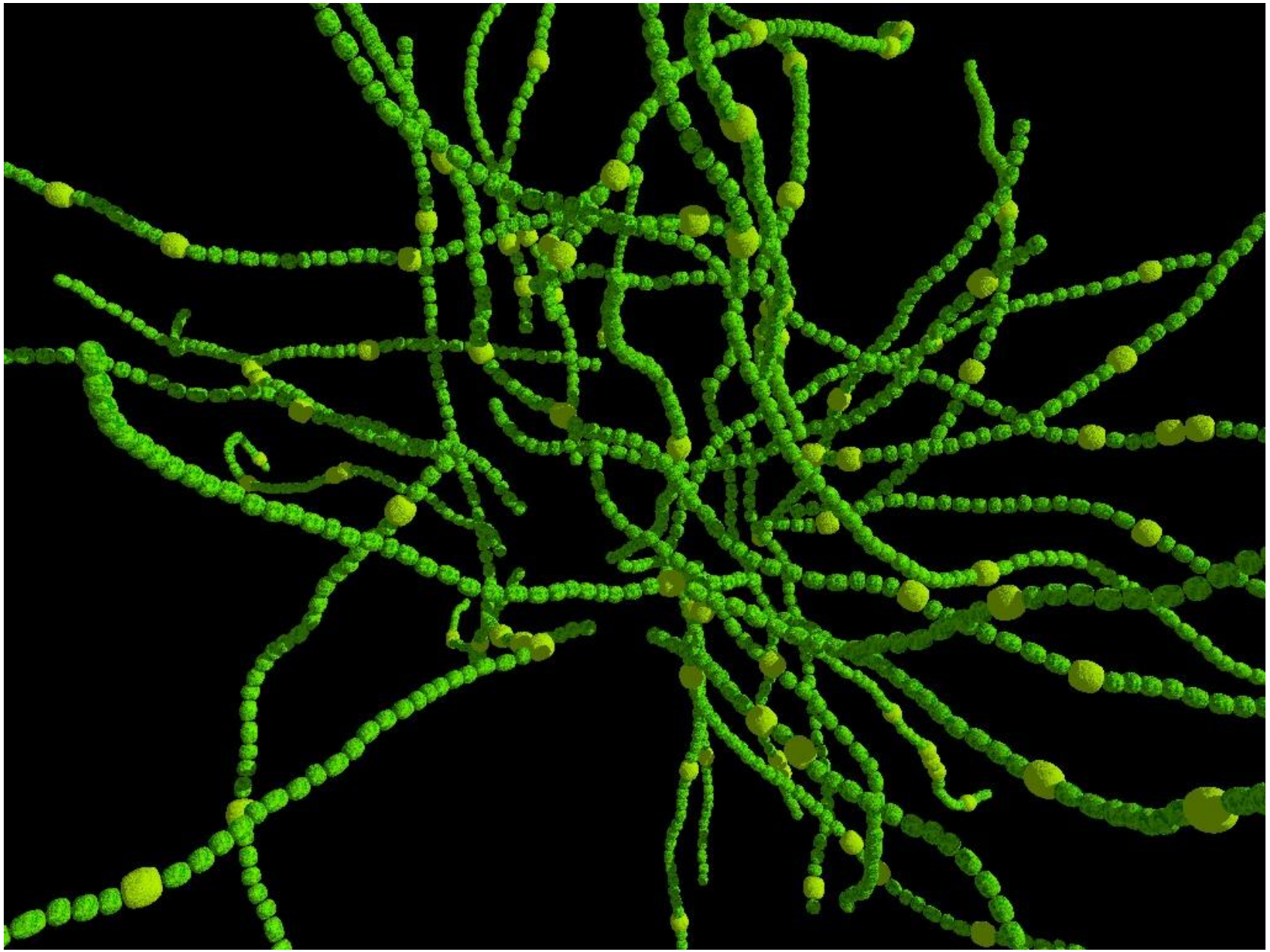
- ***Автотрофные* – *м*икроорганизмы, способные сами синтезировать органические вещества, *гетеротрофные* – для них необходимы готовые органические вещества.**

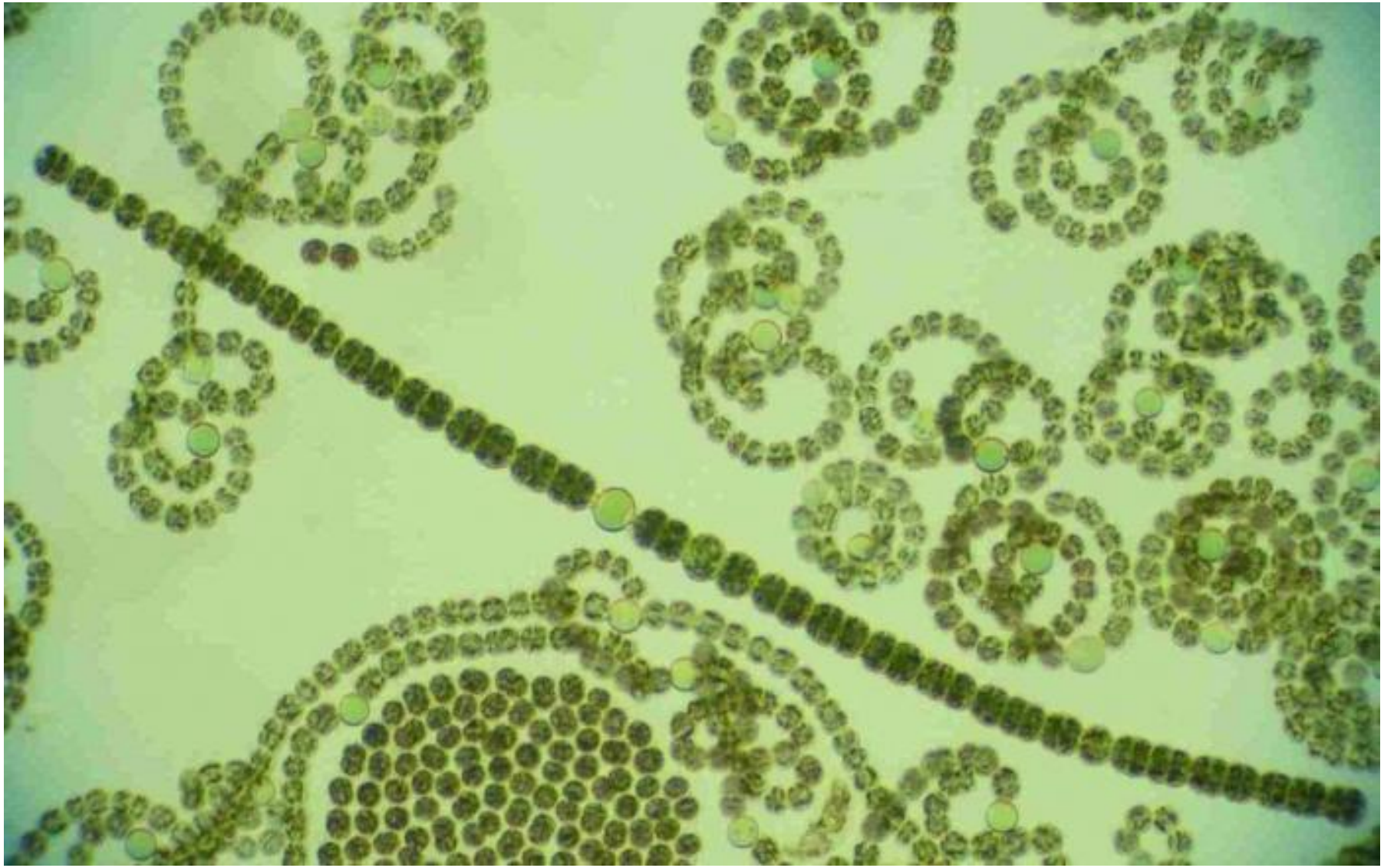
- **Циано-бактерии, или сине-зеленые водоросли (лат. Cyanobacteria) – обширная группа грамотрицательных бактерий крупных размеров, способных к фотосинтезу.**
- **Цианобактерии – это наиболее сложно устроенные и дифференцированные прокариоты.**

- **История существования сине-зеленых водорослей уходит далеко в прошлое, на несколько (3,5) миллиардов лет назад.**
- **Такие выводы сделали ученые-палеонтологи, проанализировавшие горные породы (их участки) тех далеких времен.**
- **На поверхности образцов были обнаружены циано-бактерии, строение которых ничем не отличалось от такового у современных форм.**


10 µm



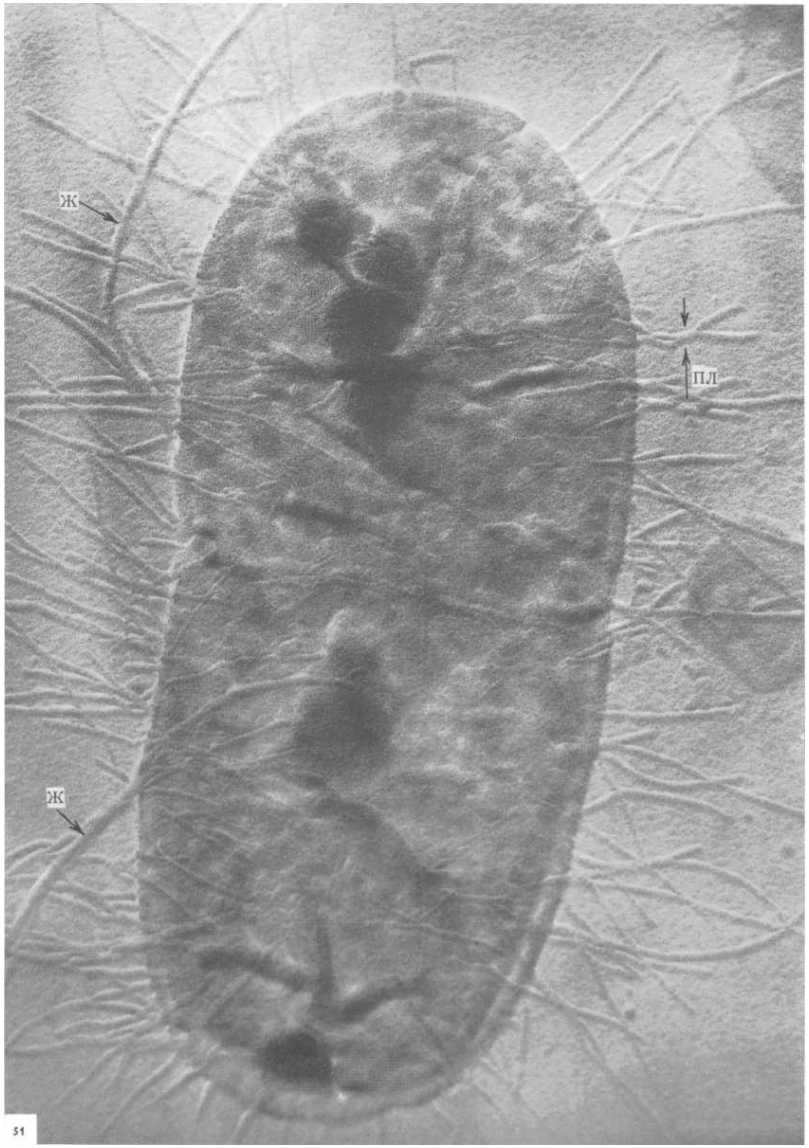




Бактерии



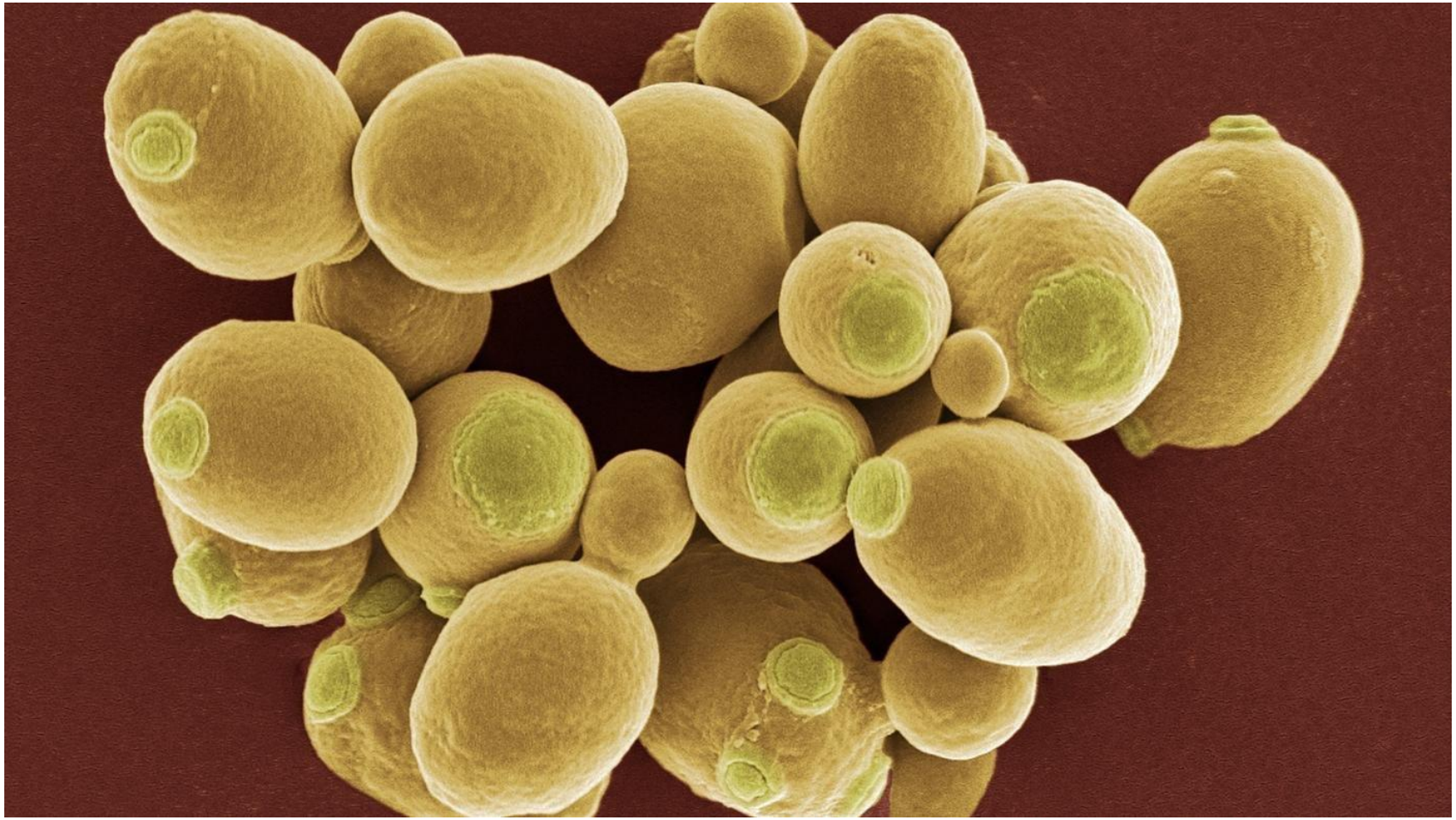
Кишечная палочка





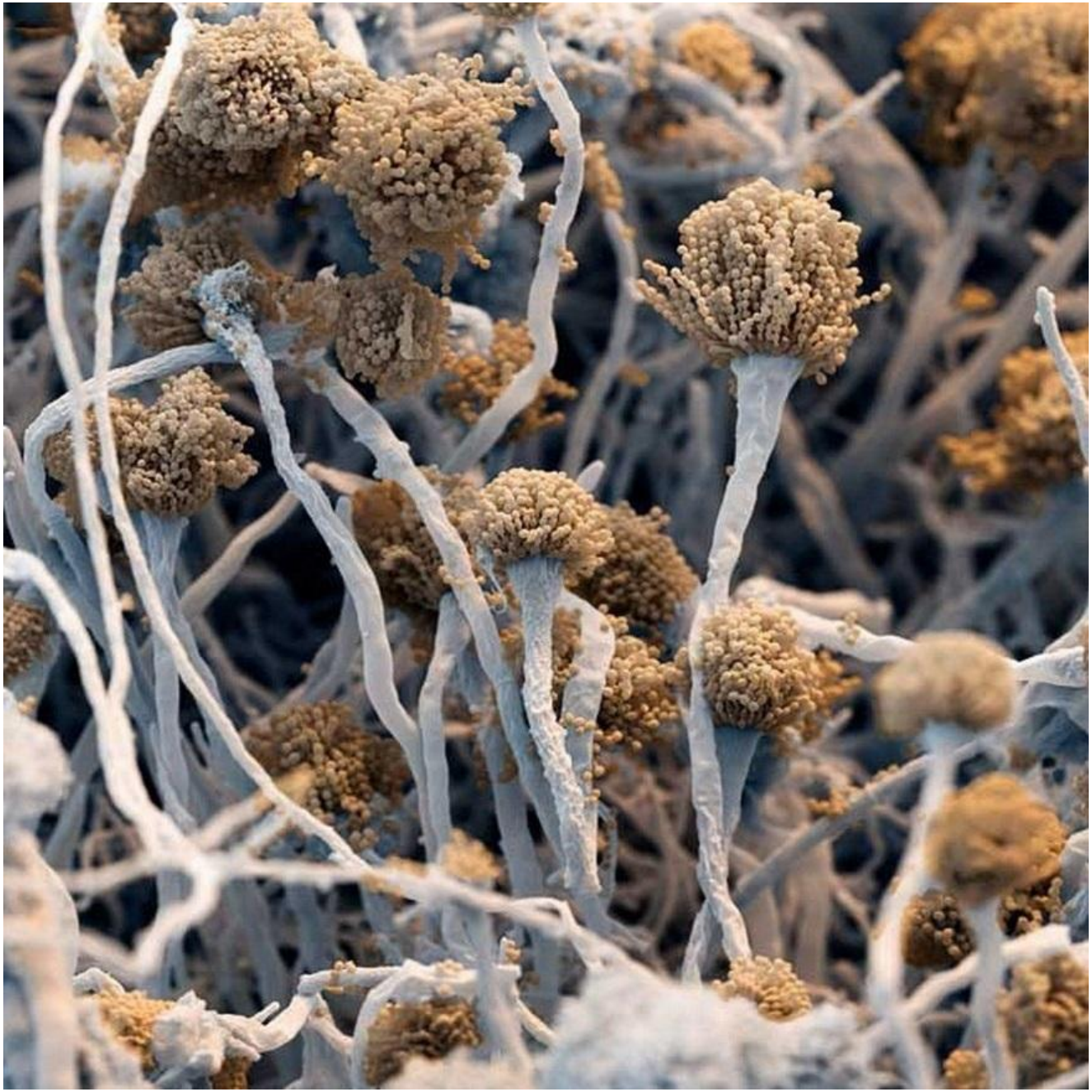


Дрожжи



Мицелиальные грибы





Микроорганизмы – бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы способны жить и размножаться в среде, в которой имеются в качестве источника питания одно органическое вещество и минеральные соли.

Отдельные бактерии выдерживают температуры, близкие к 0 °С или +80 °С.

- **Метаболические процессы в микробной клетке строго регулируются и протекают с большей скоростью, чем у животных, и это позволяет ей расти и быстро размножаться.**

Так, деление кишечной палочки в полноценной среде происходит каждые 30 мин.

В течение суток дрожжи массой 5 г. могут синтезировать около 0,5 кг белка, т.е. столько же, сколько и корова массой 500 кг.

Жизнедеятельность микроорганизмов запрограммирована на непрерывное размножение при строгой экономии питательных веществ.

Первичные метаболиты образуется только в количествах, необходимых для роста.

Превращение углерода субстрата в углерод клеточной биомассы равен 70% (коэффициент полезного действия).

Микроорганизмы содержат многие ферментные системы.

Способны превращать органические соединения в полезные продукты и физиологически активные вещества.

Могут осуществлять в одну стадию важнейшие превращения, требующие при синтезе 20 или более химических стадий.

Способны проводить реакции, трудно или совсем не осуществимые методами химического синтеза.

Микроорганизмы могут превращать растительную массу с низким содержанием белка в пищевые продукты с более высоким содержанием его

Эти свойства микробной клетки широко используются в хозяйственной деятельности человека (дрожжи – для хлебопечения, виноделия, пивоварения, а бактерии – для получения кисломолочных продуктов).

Изучением свойств микроорганизмов занимается микробиология.

В связи с большими потребностями промышленности в микробах-продуцентах интенсивно развивается прикладная генетика микроорганизмов (*селекция микроорганизмов)*.

Генетическое конструирование *in vivo* и *у*величение продуктивности штаммов

Для совершенствования промышленного процесса с участием многоклеточных или одноклеточных организмов необходимо улучшение их свойств.

Современным методом изменения генетической программы микроорганизмов или клеток и улучшения их свойств является генетическое конструирование.

Генетическое конструирование *in vivo* включает получение и отбор мутантов и применение различных способов перемещения наследственной информации в живых микробных клетках.

Генетическое конструирование *in vitro* осуществляется путем манипуляций на выделенной из микроорганизмов ДНК.

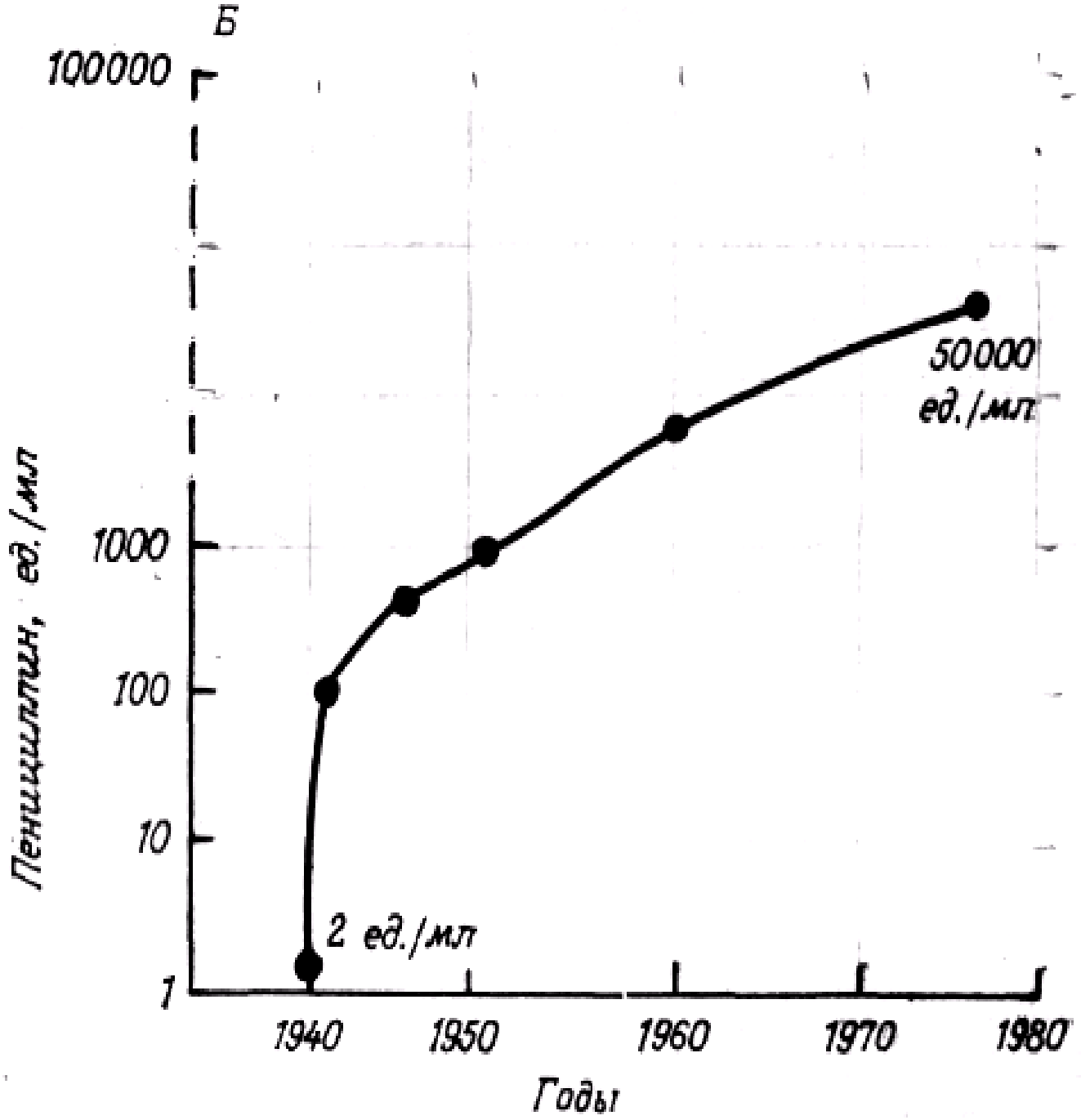
В настоящее время оба эти метода взаимосвязаны и выгодно дополняют друг друга.

Многие годы основным (чаще единственным) способом улучшения микроорганизмов являлся индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор лучших штаммов.

Метод трудоемок, так как отбор, как правило, проводится наугад. Селекционные работы могли занимать многие годы.

Однако практические результаты часто бывают очень значительными. Так, многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина позволила поднять их активность от 100 до 50 000 ед./мл.

В последнее время для объединения в одном организме нужных свойств разных штаммов используют *гибридизацию*.


Б
100000
1000
100
10
1
Пенициллин, ед./мл
2 ед./мл
50000
ед./мл
1940
1950
1960
1970
1980
Годы

Подбор продуцентов по их свойствам. **Важный этап в селекции – поиск природных форм микроорганизмов. Главное свойство продуцента – его способность синтезировать целевой продукт. Для промышленного использования важно также, чтобы он обладал высокой скоростью роста, использовал малоценные не пищевые субстраты и был устойчивым к другим микроорганизмам.**

Сначала отыскивают микроорганизмы с желательными свойствами. Отбирают пробы из таких мест, где наиболее вероятно существование искомых форм.

Например, углеводородокисляющие микроорганизмы могут находиться вблизи бензоколонок, а разлагающие целлюлозу и метанобразующие микроорганизмы обитают в рубце жвачных, винные дрожжи – на винограде.

Микроорганизмы, составляющие препараты «Экобел» и «Родобел» выделены из белорусских почв.

Эти препараты разработаны в институте микробиологии под руководством доктора биологических наук А. Самсоновой.

Микроорганизмы этих препаратов иммобилизованы на торфе. При внесении в почву они используют в качестве источника питания нефтепродукты, разлагая их до более простых метаболитов и в конечном итоге до углекислого газа и воды.

Торф в составе препарата оказывает благотворное влияние на почву.

Накопление продуцента. Отобранные образцы проб вносятся в элективные среды. Путем изменения их свойств (содержание энергии, углерода, азота, pH, осмотического давления, температуры) создаются условия, обеспечивающие развитие выделенного микроорганизма.

Например, для накопления продуцента холестеринoксидазы в среды в качестве источника углерода вносят холестерин.

Для углеводородокисляющих бактерий в среды включают парафин, а для продуцентов протеолитических или липолитических ферментов – белки или липиды. В этих средах накапливаются необходимые продуценты.

Мутагенез и отбор. После получения накопительных культур микроорганизмов, образцы их засевают на плотные питательные среды. В процессе роста отдельные клетки образуют изолированные колонии. При пересеве их получают чистые культуры, с которыми продолжают селекционную работу.

Селекция – направленный отбор *мутантов*, т.е. организмов с измененными наследственными признаками. Появляются мутанты в результате мутаций.

Мутации – это внезапно возникающие (скачкообразные) наследуемые изменения в генетическом материале клетки, проявляющиеся структурными модификациями в нуклеотидной последовательности ДНК.

Спонтанные **(неконтролируемые) мутации возникают с низкой частотой. Ген должен удвоиться в среднем 10^6 –10^8 раз, чтобы возникла мутация. Однако при проведении исследований используются большие объемы среды, которые имеют концентрацию микроорганизмов, достигающую 10^9 клеток или более в 1 мл. И так как культивирование происходит непрерывно, это позволяет получать большие количества мутантов.**

Методы, основанные на отборе спонтанных мутаций, позволили усовершенствовать многие технологии с использованием микроорганизмов. Таким путем были отобраны штаммы пивных, винных и пекарских дрожжей, уксуснокислых и пропионовокислых бактерий.

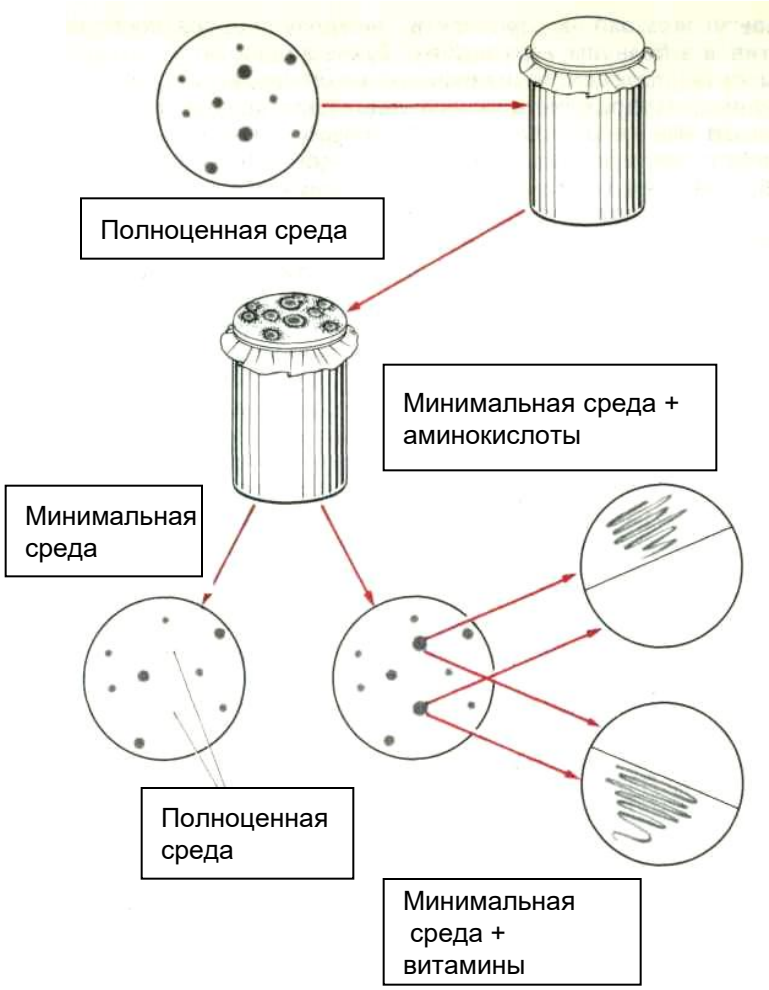
Индуцированный мутагенез. **Содержание мутантов в микробной популяции можно существенно увеличить, если подвергнуть ее воздействию различными факторами. Мутагенным действием обладают ультрафиолетовое, рентгеновское и γ– излучение, а также химические соединения: азотистая кислота, этилметансульфонат, нитрозо-гуанидин и другие нитрозамины, акридиновые красители, бромурацил и др.**

Обработанную мутагеном культуру рассеивают на плотные питательные среды так, чтобы получить отдельные колонии, а затем исследуют каждый клон на продуктивность. Выделив более продуктивный вариант, процедуру мутагенеза и отбора повторяют (скрининг и ступенчатый отбор).

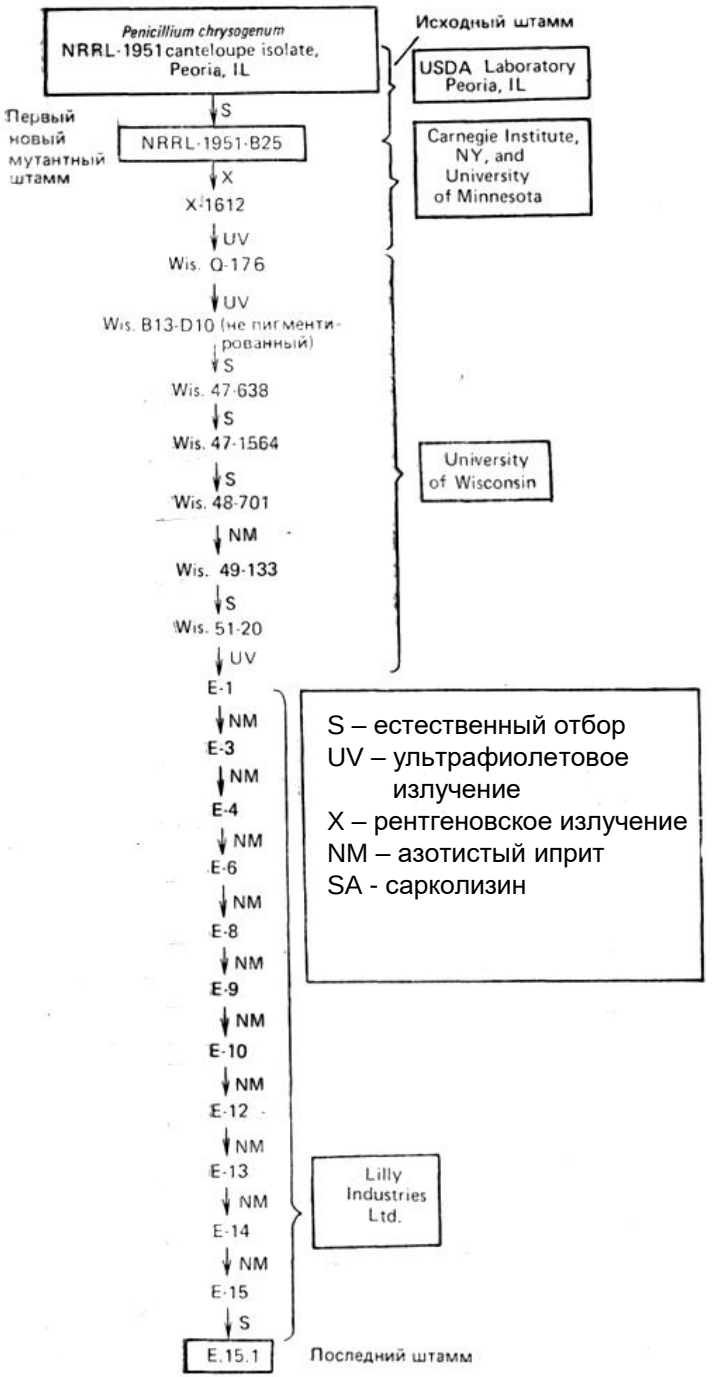
Основной недостаток индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора – трудоемкость. Для уменьшения затрат труда широко использовался метод отпечатков, введенный в 1952 г. Д. Ледербергом и Э. Ледербергом.

Чашки Петри засеваются так, чтобы выросло на каждой из них 50–200 колоний. К стерильному бархату или фильтровальной бумаге, натянутым на деревянном или металлическом цилиндре, прикладывают чашки с выросшими колониями.

К материалу с отпечатками колоний прикладывают чашки с различными средами и воздействуют на них различными факторами (температура, антибиотики, фаги и др.). Таким образом, выявляются искомые штаммы микроорганизмов.



- **Характерным примером индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора является выделение высокопродуктивного штамма – продуцента пенициллина.**



Индуцированный мутагенез и отбор продуктивных мутантов и сейчас остается важным методом повышения активности промышленных штаммов микроорганизмов, в частности продуцентов антибиотиков.

- ***Отбор клеток по принципу устойчивости их к различным факторам.*** **При культивировании в непрерывном режиме были отобраны по признаку устойчивости к этиловому спирту – продукту жизнедеятельности – дрожжи Saccharomyces uvarum. Микроорганизмы–мутанты при длительном культивировании (650 ч) проявляли устойчивость к действию спирта даже в концентрации 10%.**

Благодаря достижениям молекулярной генетики стало возможным проводить отбор продуцентов по их устойчивости и к структурным аналогам целевого продукта. Использован принцип обратной связи активности или синтеза фермента и продукта биосинтеза (В.Г. Дебабов, 1984). Повышение концентрации продукта угнетает активность фермента, который участвует в синтезе его, или подавляет синтез самого фермента.

При наличии глюкозы и аммиака (NH_4^+) многие микроорганизмы синтезируют необходимые для жизнедеятельности азотсодержащие соединения. Если же в среду добавить какую-либо аминокислоту, то синтез ее прекращается. Такой же эффект оказывает добавление структурного аналога аминокислоты, который однако не может войти в состав белка. И рост клеток подавляется в связи с прекращением синтеза аминокислоты. Выживают отдельные клетки – мутанты с нарушенной регуляцией активности и синтеза фермента. Отбирают те из них, у которых фермент сохранил функциональную активность, но стал нечувствительным к ингибирующему действию конечного продукта или его аналогу. Подходящими являются и те, у которых синтез фермента происходит при избытке продукта или его аналога.

- **Клон, клоновая культура.** **Генетическое изучение микроорганизмов стало возможным после разработки способов выделения клоновых культур (клонов). *Клон – это популяция генетически однородных клеток, происходящих из одной и той же клетки-предшественника,* например колония, выросшая из одной клетки при высеве культуры на плотной питательной среде.**

Клонирование клеток используется для выделения мутантных клеточных линий, у которых мутация затронула специфические гены. *Клоновая по происхождению культура, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам, называется штаммом.*

Важной задачей селекционной работы является получение и поддержание высокопродуктивных штаммов.

8. Метод гибридизации соматических клеток.

Гибридизация соматических клеток - это слияние совместно культивируемых клеток разных видов, образующих гибридные клетки со свойствами обоих родительских видов.

Гибридные клетки, содержащие два полных генома, при делении могут утрачивать хромосомы одного из видов.

Можно получать клетки с желаемым набором хромосом, изучать сцепление генов и их локализацию в определенных хромосомах.

Методы генетики соматических клеток позволяют изучать механизмы первичного действия и взаимодействия генов, регуляцию генной активности.

Гибридизация путем скрещивания – это наиболее простой путь создания организмов с желаемыми признаками. Две клетки, сливаясь, образуют одну клетку с двумя ядрами (*гетерокарион*).

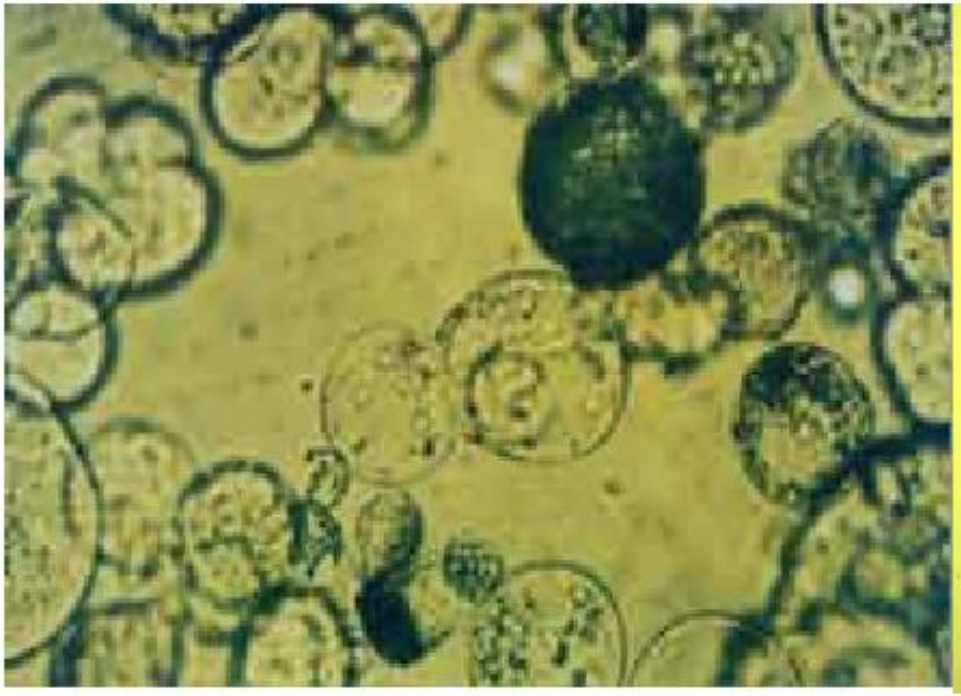
При этом смешиваются цитоплазматические мембраны, цитоплазма и ядра обоих клеток.

В последующем *гетерокарион* делится митотически, образуя *гибридную клетку*. Ядерные оболочки у этой клетки разрушаются, все хромосомы объединяются в одно большое ядро.

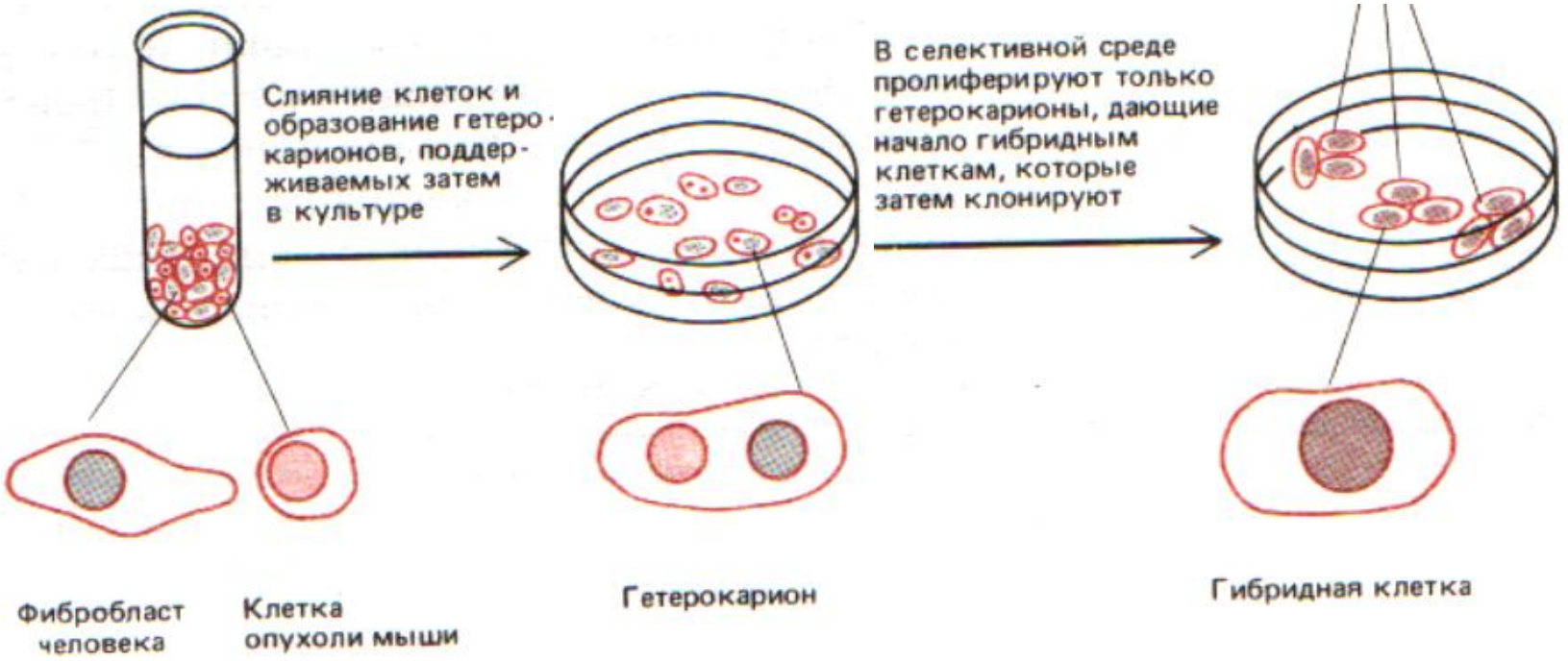
Такие гибридные клетки можно клонировать и получить гибридную клеточную линию.

Соматическая гибридизация

- это слияние двух различных клеток в культуре тканей





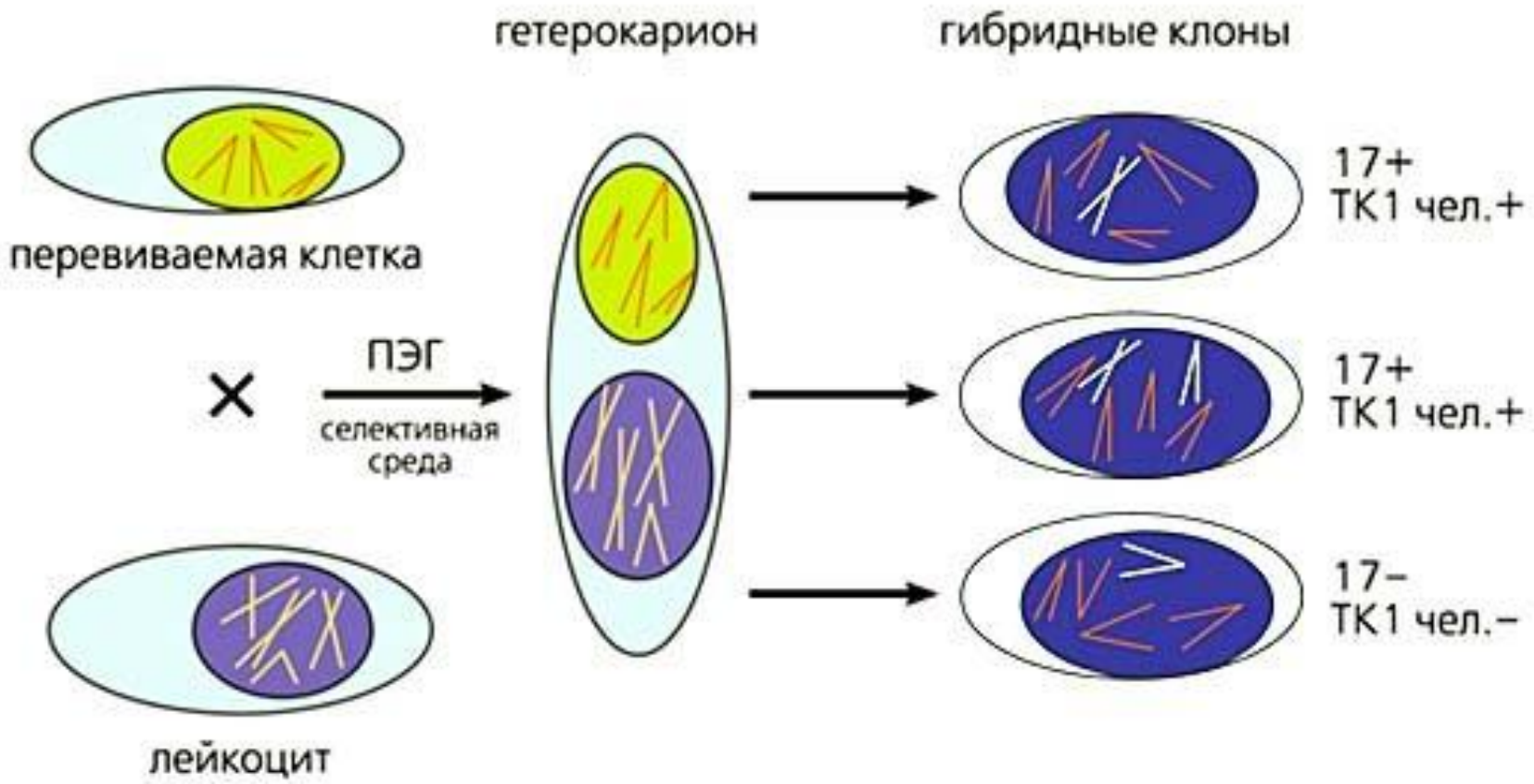

Слияние клеток и образование гетерокарионов, поддерживаемых затем в культуре
В селективной среде пролиферируют только гетерокарионы, дающие начало гибридным клеткам, которые затем клонируют
Фибробласт человека
Клетка опухоли мыши
Гетерокарион
Гибридная клетка

Harris и Watkins (1965) получили гетерокарионы клеток млекопитающих, индуцировав вирусом слияние клеток мыши и человека.

Иногда из гетерокарионов образовывались гибридные клетки с одним слившимся ядром. При этом происходила быстрая потеря хромосом человека (сохранялась только одна или несколько хромосом).

Такие гибридные клетки используются для изучения генов в хромосомах человека.

В других гибридных клетках сохраняется большинство исходных хромосом.


гетерокарион
гибридные клоны
перевиваемая клетка
ПЭГ
селективная среда
лейкоцит
17+
ТК1 чел.+
17+
ТК1 чел.+
17−
ТК1 чел.−

При непосредственном контакте между собой клеток прокариотических ("доядерных") или эукариотических ("с настоящим ядром") происходит перенос ДНК от клетки-донора к клетке-реципиенту.

Этот процесс скрещивания называют к*онъюгацией.* Он используется для получения *рекомбинантов*.

В 1946 г. Ледерберг и Татум провели опыт с двумя ауксотрофными по двум различным аминокислотам мутантами *Escherihia coli* К12. Один двойной мутант нуждался в аминокислотах А и В, но был способен синтезировать С и Д ($А^-$ $В^-$ С+Д+); другой был ему комплементарен (А+В+$С^-$ $Д^-$). Мутанты не росли на минимальной питательной среде и не образовывали колоний.

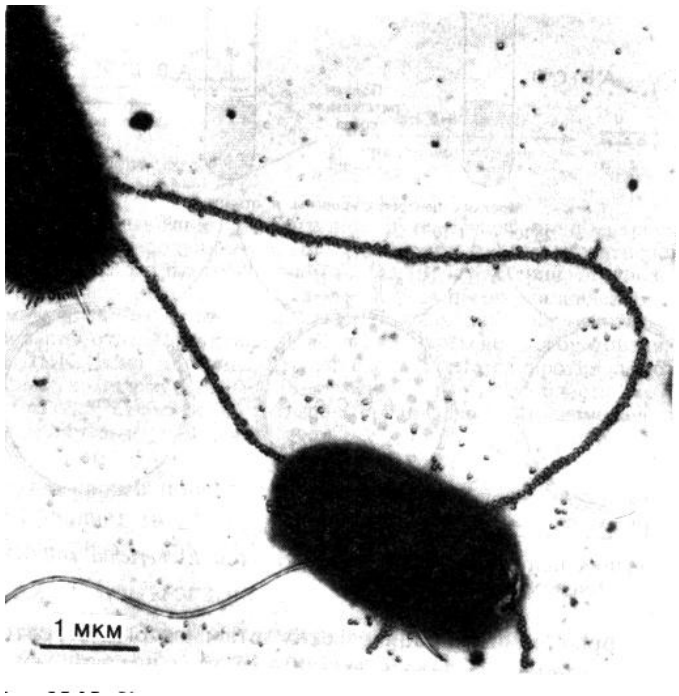
Однако если на ту же среду высевали смесь обоих мутантов, то колонии появлялись. Клетки колоний обладали наследственной способностью синтезировать все аминокислоты, т.е. принадлежали к типу А+ В+С+ Д+ (были прототрофными). Генетические рекомбинанты объединяли в себе генетическую информацию двух реципрокно дефектных (взаимодополняющих) родительских клеток. Возникали с частотой 1 :10^6.

При скрещивании перенос генетического материала происходит от донора («мужского» штамма) к реципиенту («женскому» штамму), а весь процесс рекомбинации и расщепления протекает в клетках штамма-реципиента.

Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только фрагменты генома.

Клетки *Escherihia coli*, связанные между собой F-пилями.

У бактерий контакт клеток осуществляется за счет образования коньюгационного мостика, по которому переносится ДНК из одной клетки в другую. Способность к формированию мостика закодирована во многих плазмидах. По коньюгационному мостику плазмиды переносят свои гены, а в ряде случаев – и гены клетки-хозяина. Следовательно, они обладают способностью к мобилизации хромосом.

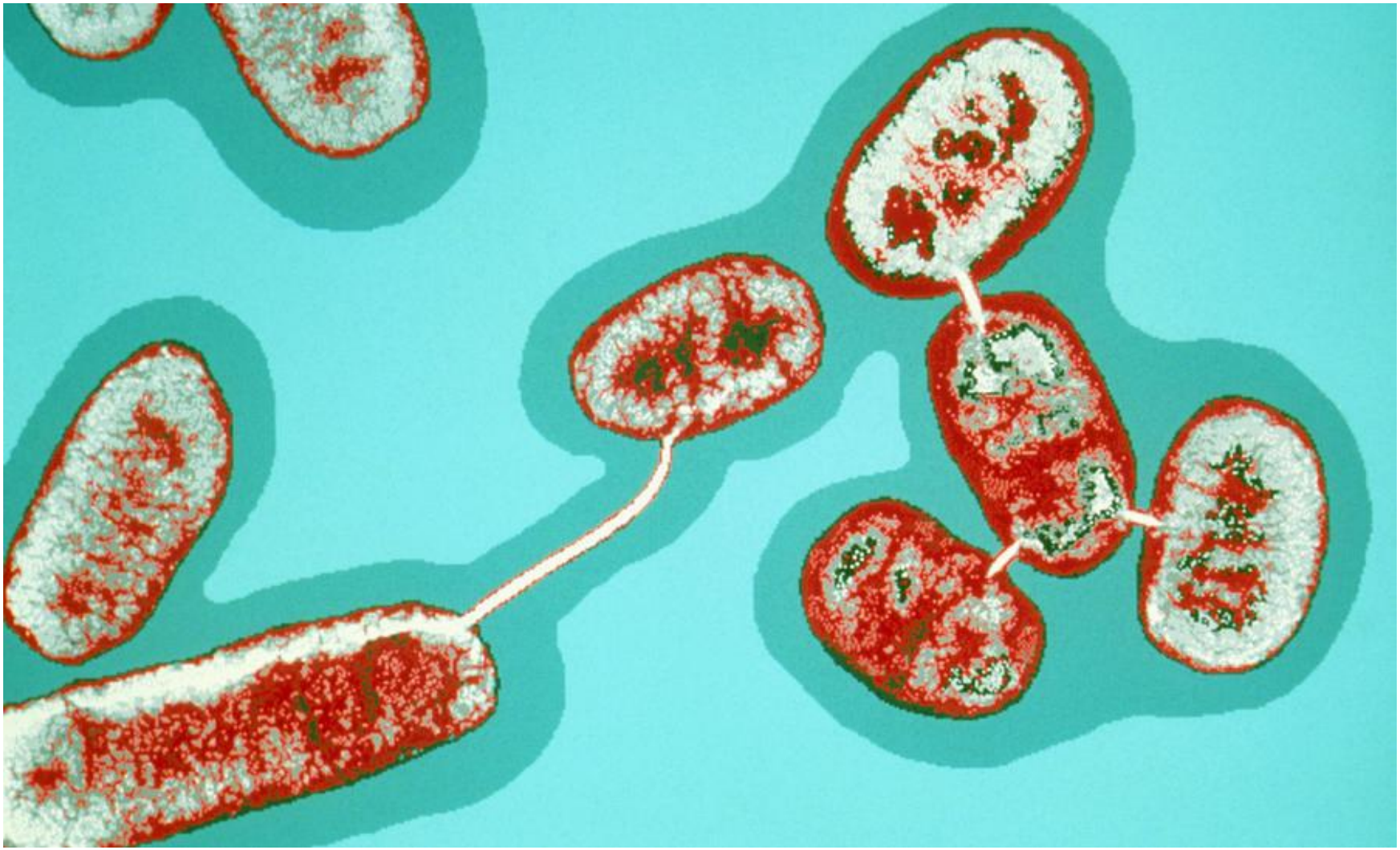


Обе F-пили клетки Hfr помечены донор-специфическими РНК-фагами MS-2. Многочисленные пили типа I клетки-реципиента (в верхнем левом углу) короткие и не адсорбируют бактериофага.

Система конъюгационного переноса плазмиды F-фактор обеспечивает осуществление двух основных этапов процесса конъюгации: образование скрещивающихся пар и перенос и репликацию ДНК.

Для образования скрещивающихся пар необходимы половые ворсинки – пили. Они образуются на поверхности клетки-донора и вероятно служат для взаимного узнавания при контакте между клеткой-донором и клеткой-реципиентом и делают возможным образование конъюгационного мостика, по которому ДНК переходит внутрь клетки-реципиента

Репликация плазмиды реализуется при участии хромосомного аппарата бактериальной клетки.



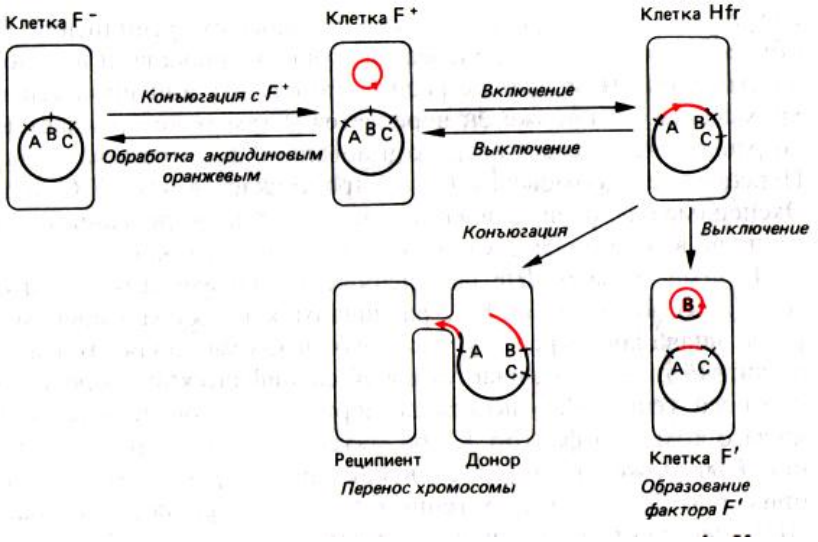
- **При исследовании процесса скрещивания бактерий выяснилось, что способность клетки быть донором связана с наличием особого фактора, который при конъюгации передается из одной клетки в другую – полового фактора *F* (от fertility – плодовитость). Клетки, не содержащие фактора F (клетки F^-) могут функционировать только как реципиенты.**
- **При конъюгации, т.е. при прямом контакте между клетками, частота передачи фактора *F* близка к 100%. Таким образом, клетки-реципиенты в результате конъюгации превращаются в потенциальных доноров; при этом хромосомные признаки еще не передаются.**
- **Фактор *F* представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК с массой $45 \cdot 10^6$ Да. В качестве внехромосомного автономно реплицируемого элемента ДНК ее относят к плазмидам.**

- **В популяции *F*+ лишь немногие клетки способны быть донорами хромосомной ДНК. Оказалось, что это те клетки, в которых фактор *F* интегрировался в бактериальную хромосому. Если клоны таких клеток-доноров использовать в экспериментах со скрещиванием, то рекомбинанты образуются примерно в тысячу раз чаще, чем при использовании обычных клеток *F*+.**

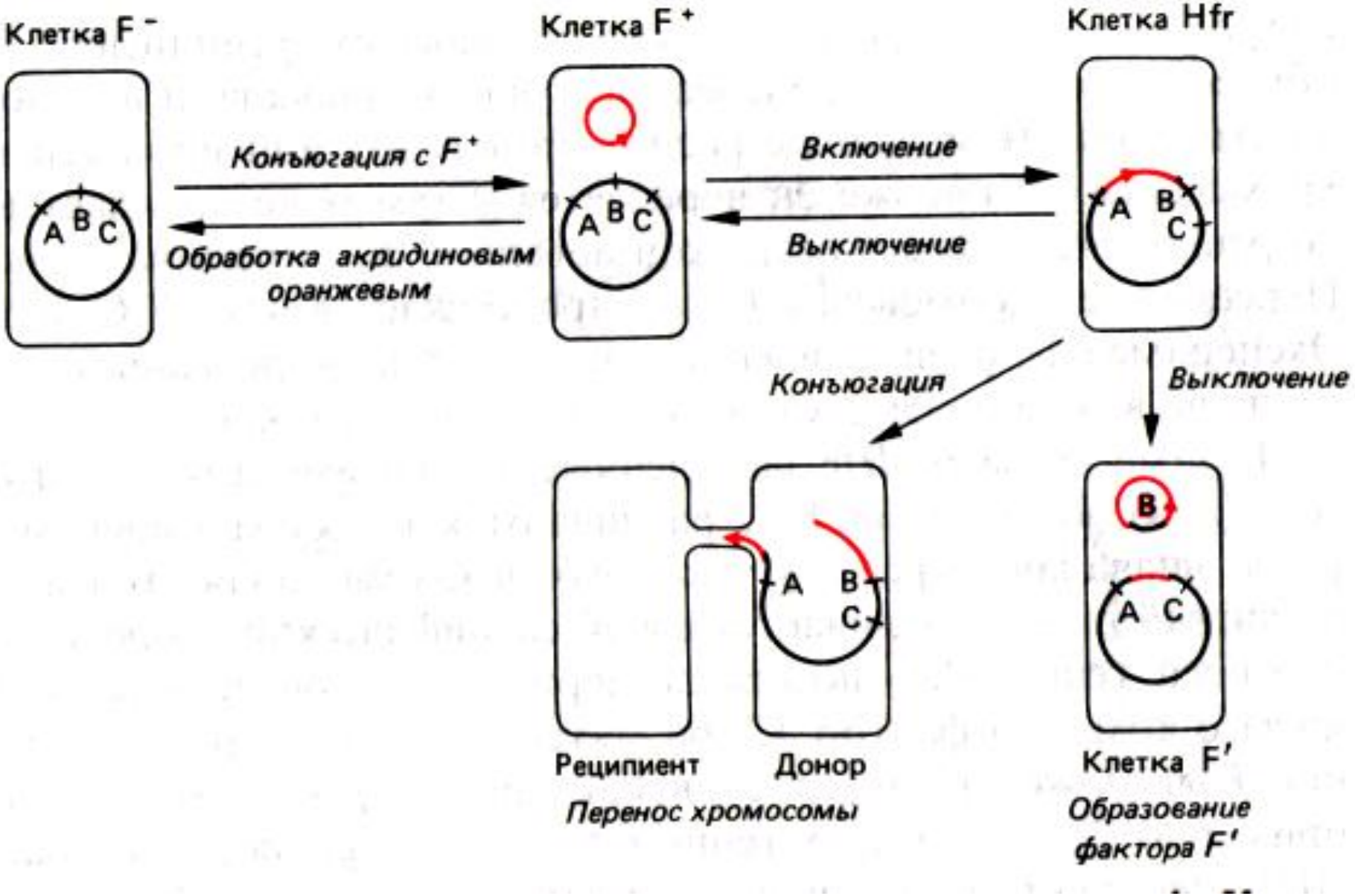
  Клетка F^- может служить только реципиентом. При конъюгации с клеткой штамма F^+ или Hfr она может получить фактор F и в результате стать клеткой F+.

Взаимоотношения между половыми типами *Escherihia coli*

В клетке F+ фактор F представляет собой кольцевую молекулу ДНК. При включении фактора F в бактериальную хромосому клетка переходит в состояние Hfr (высокая частота рекомбинантов).



В случае неправильного выключения фактора F из хромосомы он может превратиться в фактор F′, содержащий кусочек хромосомной ДНК.


Клетка F⁻
Клетка F⁺
Клетка Hfr
A B C
Конъюгация с F⁺
Обработка акридиновым оранжевым
Включение
Выключение
Конъюгация
Выключение
A B C
A C
B
Реципиент
Донор
Клетка F′
Перенос хромосомы
Образование фактора F′

- **У грибов, дрожжей и водорослей гибриды образуются при слиянии клеток (копуляции). В результате слияния гаплоидных ядер исходных клеток образуется диплоидная клетка – зигота. В последующем в ходе мейоза каждая из хромосом диплоидного ядра продольно расщепляется, образуя две сестринские хроматиды. Гомологичные хромосомы образуют пары и в результате кроссинговера обмениваются частями своих хроматид. В сформировавшихся гаплоидных половых спорах может содержаться новый набор генов, которыми различались родительские клетки. Это происходит в результате рекомбинации генов одной и той же хромосомы, или разных хромосом при перераспределении хромосомных пар.**

У некоторых микроорганизмов (Neurospora crassa) ядро сразу же подвергается мейозу, а аспергилл, дрожжей-шизосахаромицетов, водорослей хломидомонады образуются диплоидные вегетативные клетки.

Системы скрещивания у грибов

- **У грибов типы скрещивания разнообразны. Половой процесс контролируется системой несовместимости, которая у некоторых видов биполярна, а у других - тетраполярна. При биполярной системе несовместимости процесс скрещивания контролируется одним локусом с двумя противоположными аллельными формами. Это дает два типа спаривания. При тетраполярной системе несовместимости процесс скрещивания контролируется двумя генами, которые имеют множество аллельных форм. Скрещивание возможно, если обе клетки обладают разными аллелями каждого из двух локусов. В других случаях клетки погибают в процессе скрещивания.**

- **Система скрещивания была обнаружена у бактерий рода Bacillus, который широко используется в промышленности. Эти бактерии могут легко воспринимать голую ДНК, поэтому рекомбинантные формы несложно получить путем трансформации. Таким путем был создан штамм Bacillus, у которого синтезируемый белок на 50 % представлен ферментом α-амилазой.**

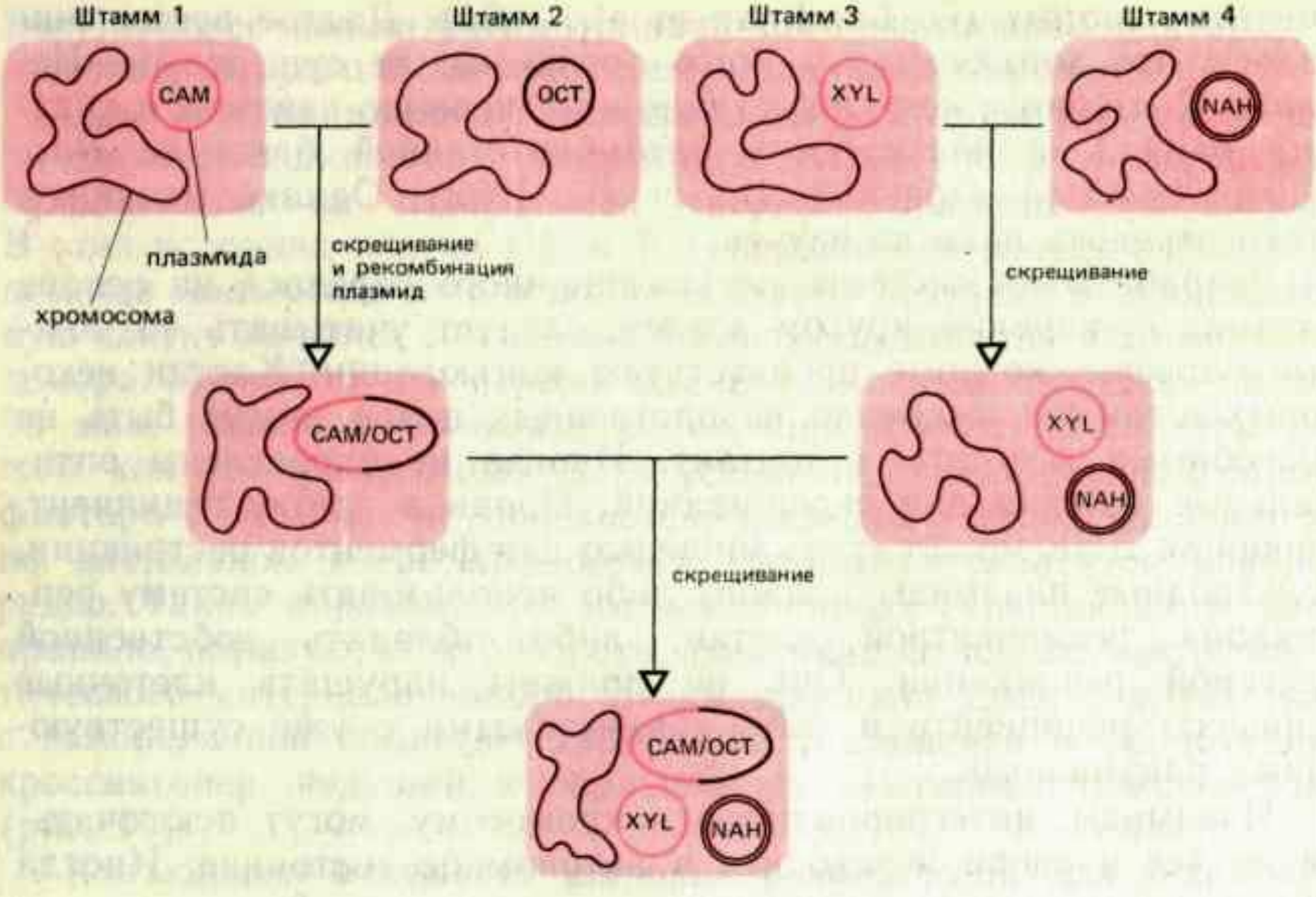
- **Хорошо развиты системы скрещивания у различных видов Streptomyces, с помощью которых получают более 60 % применяющихся в настоящее время антибиотиков. Плазмида SCP2, выделенная из Streptomyces coelicolor, также несущая фактор пола, продуцирует рекомбинантные формы с очень высокой частотой. Другая плазмида SCP1, по своим свойствам близка к плазмиде Escherichia coli. Она может встраиваться в хромосому Streptomyces, а также включать фрагменты хромосомной ДНК.**

Возможности метода слияния клеток

Прежде всего, это скрещивание филогенетически отдаленных форм живого. Получены плодовитые и фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом. Получены также межродовые стерильные гибриды картофеля и томата и межвидовые (Saccharomyces uvarum a. S. diastaticus) и межродовые (Kluyveromyces lactis a. Saccharomyces cerevisiae) гибриды дрожжей.

Значительный интерес представляет получение ассиметричных гибридов, у которых полный набор хромосом одной родительской формы и частичный набор другой. Такие гибриды устойчивее, более плодовиты и жизнеспособны, чем симметричные.

- **Возможно также получение гибридов путем слияния трех или более родительских клеток. Такие гибридные клетки могут быть использованы для выращивания растений (грибов) – регенератов.**
- **Большое значение имеет гибридизация клеток, у которых различные программы развития. Это относится и к соматическим клеткам.**
- **Для получения межвидовых (межродовых) гибридов используется метод слияния протопластов (protos – первый и plastos –вылепленный, образованный) – ограниченных цитоплазматической мембраной образований (клеток без оболочек).**


Штамм 1
Штамм 2
Штамм 3
Штамм 4
CAM
OCT
XYL
NAH
плазмида
хромосома
скрещивание
и рекомбинация
плазмид
скрещивание
CAM/OCT
XYL
NAH
скрещивание
CAM/OCT
XYL
NAH

Мутации бывают

цитоплазматические **и** ***ядерные*** **(хромосомные).**

Различают три типа ***хромосомных*** **мутаций:**

- **изменение числа хромосом,**
- **изменение числа и порядка расположения генов (хромосомные перестройки) и**
- **изменения отдельных генов (внутригенные изменения).**

Мутации

- По протяженности повреждений мутации бывают:
  - **точечными**, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, (последствия: замена аминокислоты, сдвиг рамки считывания, возникновение бессмысленного кодона),
  - **протяженными** *(аберрации)*.
- Мутации разделяют на:
  - **хромосомные –** изменение двух и более участков хромосомы,
  - **генные** – изменение гена или цистрона: **модификации** оснований, **делеции** (выпадение нескольких пар нуклеотидов), **транспозиции** (перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы), **инсерция** (разрыв путем вставки посторонней ДНК), **дупликация** (добавление нуклеотидных пар) и деформации спирали ДНК.


fineart
america

Хромосомные перестройки включают:

- ***делеции*** **(выпадения участков хромосомы),**
- ***дупликации и амплификации*** **(удвоения или умножения числа отдельных генов или группы генов),**
- ***транспозиции*** **(вставки участков хромосом в новые места),**
- ***транслокации*** **(обмен участками между хромосомами),**
- ***инверсии*** **(изменения порядка расположения генов в хромосоме). Они могут вызывать как утрату, так и приобретение новых признаков.**

Хромосомные перестройки (кроме амплификаций) стабильны.

- ***Внутригенные мутации*** **изменяют последовательность азотистых оснований в пределах одного гена. Такие изменения обычно приводят к нарушениям или модификациям синтеза и строения белка.**
- **Мутанты способны к *реверсии*, т.е. к восстановлению исходного фенотипа. Мутанты, которые появляются в результате реверсии, называются *ревертантами*.**
- **Мутации являются основным источником всех биологических изменений. По своему происхождению бывают *спонтанными и индуцированными*.**

ГЕНЕТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Создание промышленных штаммов микроорганизмов

- **Свойства микроорганизмов**
- **Генетическое конструирование *in vivo* и увеличение продуктивности штаммов**
  - **Подбор продуцентов по их свойствам**
  - **Накопление продуцента**
  - **Мутагенез и отбор**
  - **Клон, клоновая культура**
  - **Гибридизация путем скрещивания**

ЛИТЕРАТУРА

- Биотехнология/ Под. Ред. Н.С. Егорова,

  В.Д. Самуилова. Книга 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов/ В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высш. Шк., 1988. – 208 с.: ил.

2. Биотехнология: Учебник / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др.; Под. ред. академика РАСХН Е.С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение/Под ред. И.Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
4. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: Учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.

Свойства микроорганизмов

«Извлечение выгоды в технологических процессах из свойств микроорганизмов и клеточных культур»

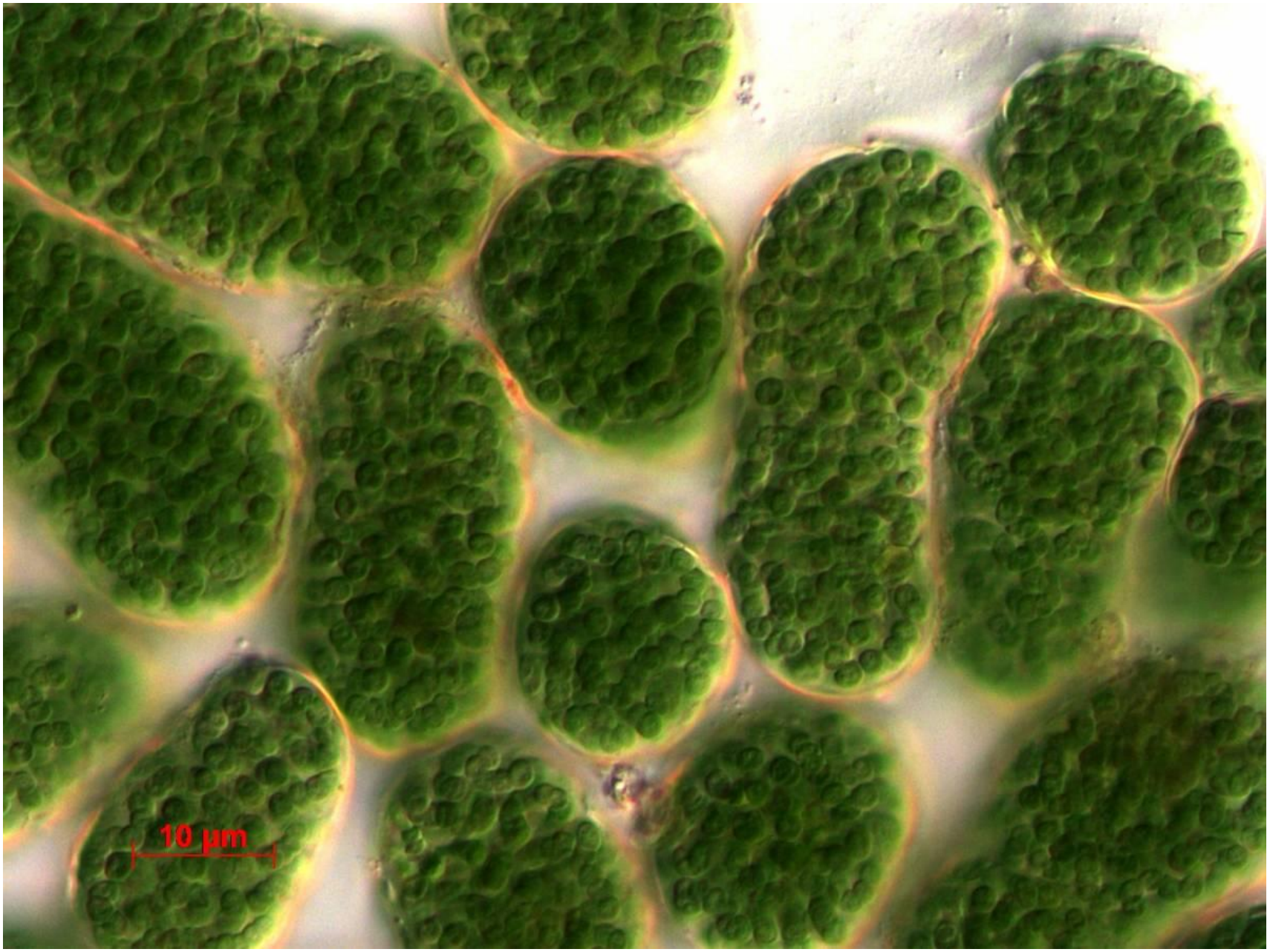
- **Бактерий и цианобактерий (сине-зеленые водоросли), не имеющих ядра и других органелл, называют *прокариотами*.**

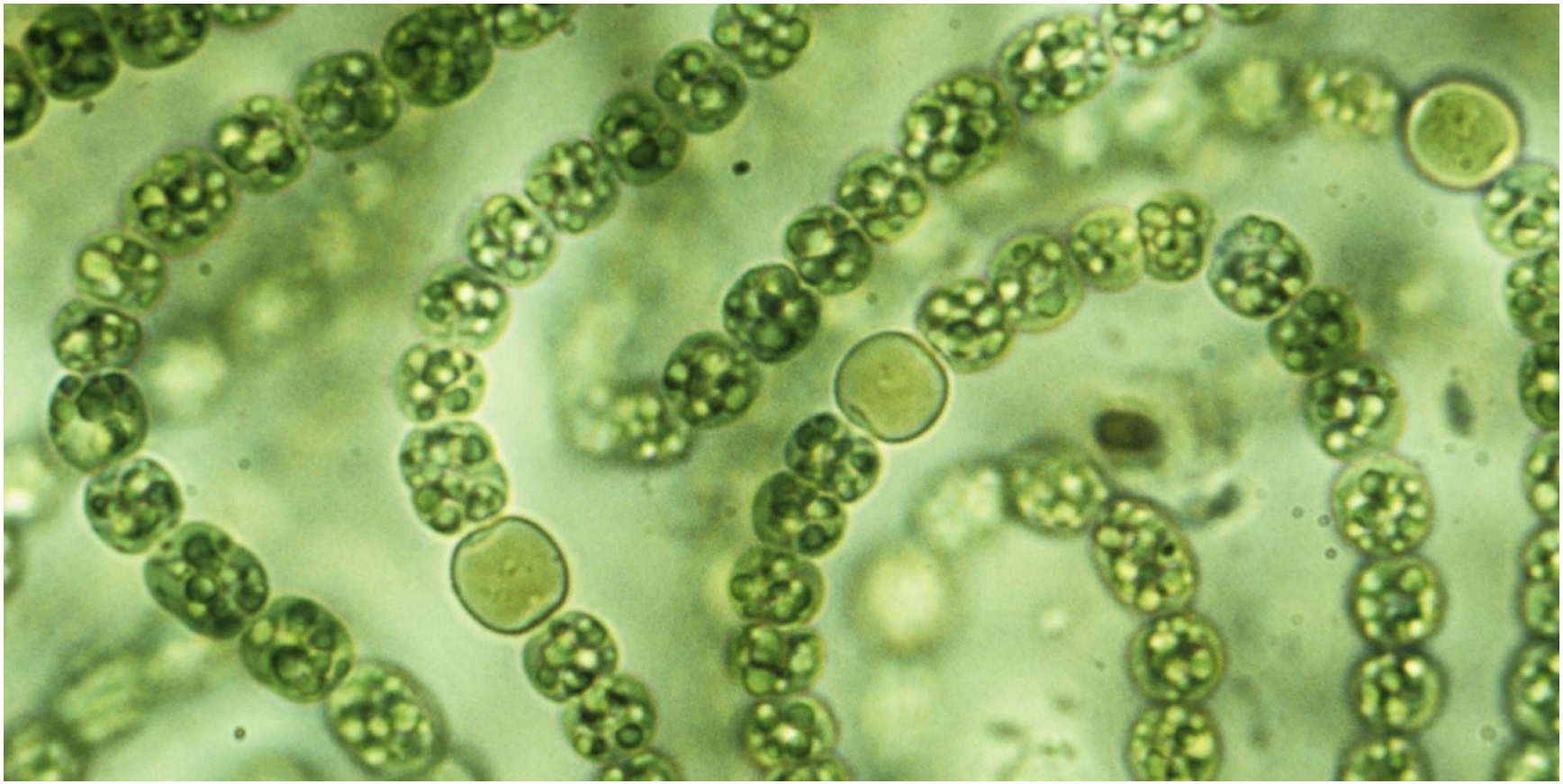
- **Клетки животных, растений, водорослей, грибов и простейших, у которых имеется истинное ядро и другие органеллы (митохондрии, хлоропласты у растений), называют *эукариотами*.**

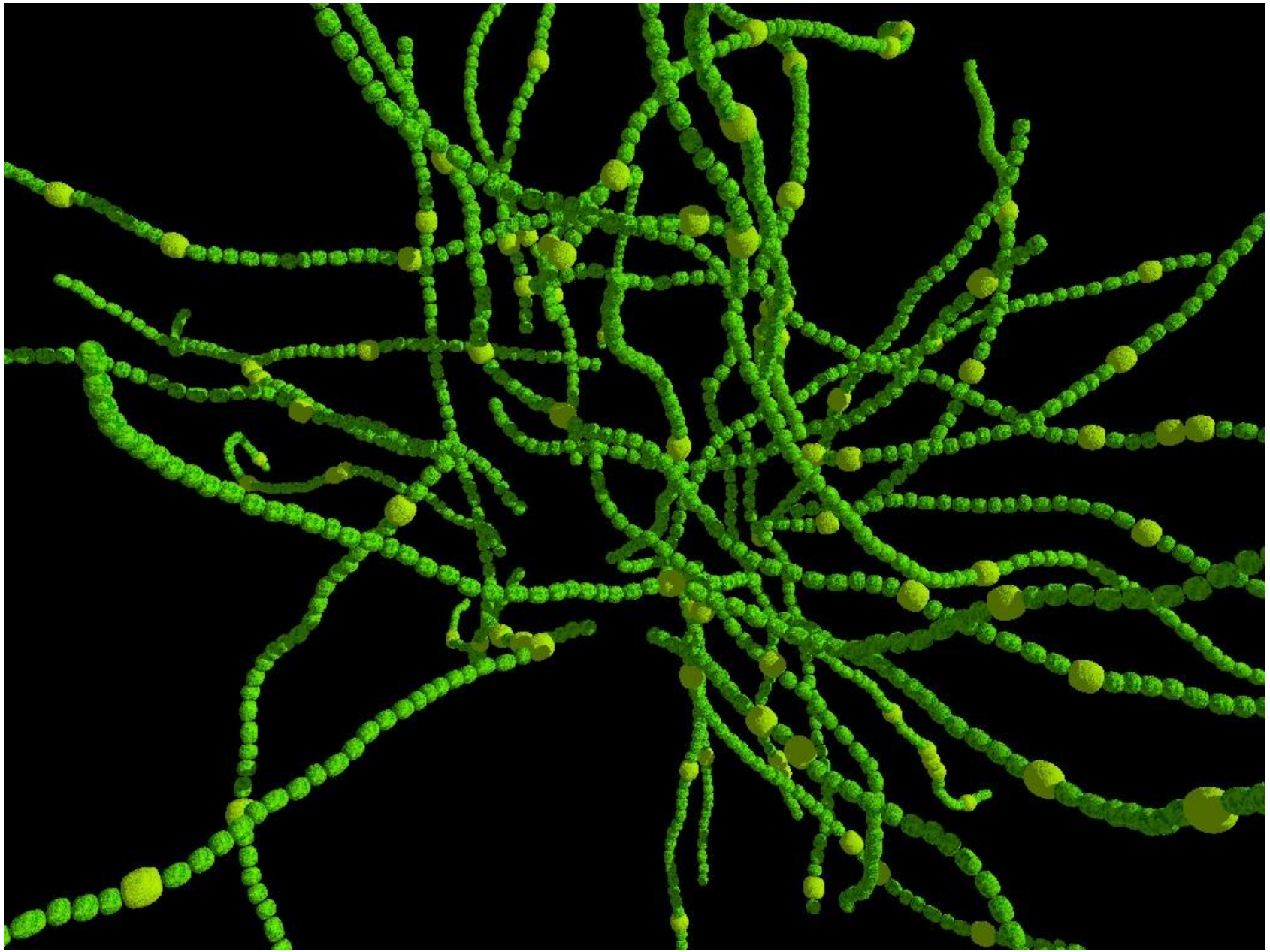
- ***Автотрофные* – *м*икроорганизмы, способные сами синтезировать органические вещества, *гетеротрофные* – для них необходимы готовые органические вещества.**

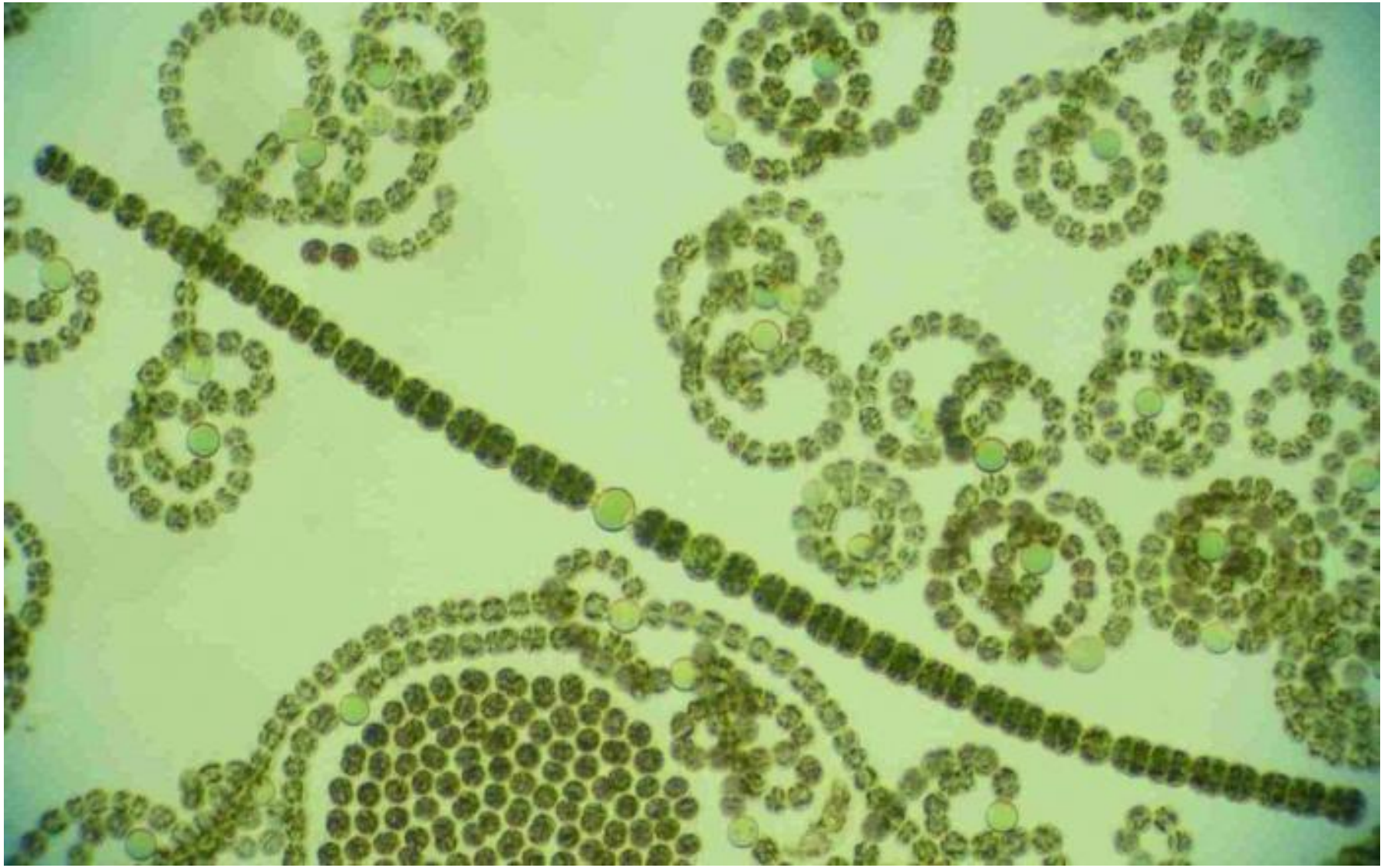
- **Циано-бактерии, или сине-зеленые водоросли (лат. Cyanobacteria) – обширная группа грамотрицательных бактерий крупных размеров, способных к фотосинтезу.**
- **Цианобактерии – это наиболее сложно устроенные и дифференцированные прокариоты.**

- **История существования сине-зеленых водорослей уходит далеко в прошлое, на несколько (3,5) миллиардов лет назад.**
- **Такие выводы сделали ученые-палеонтологи, проанализировавшие горные породы (их участки) тех далеких времен.**
- **На поверхности образцов были обнаружены циано-бактерии, строение которых ничем не отличалось от такового у современных форм.**


10 µm



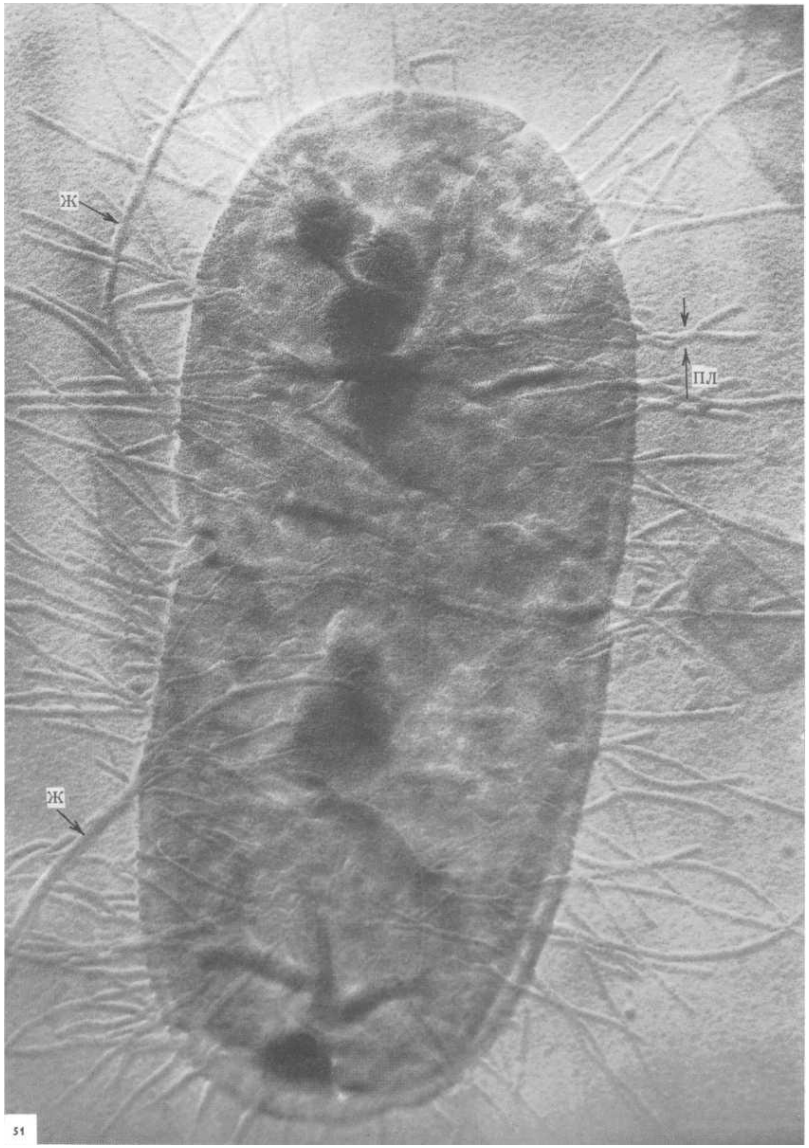




Бактерии



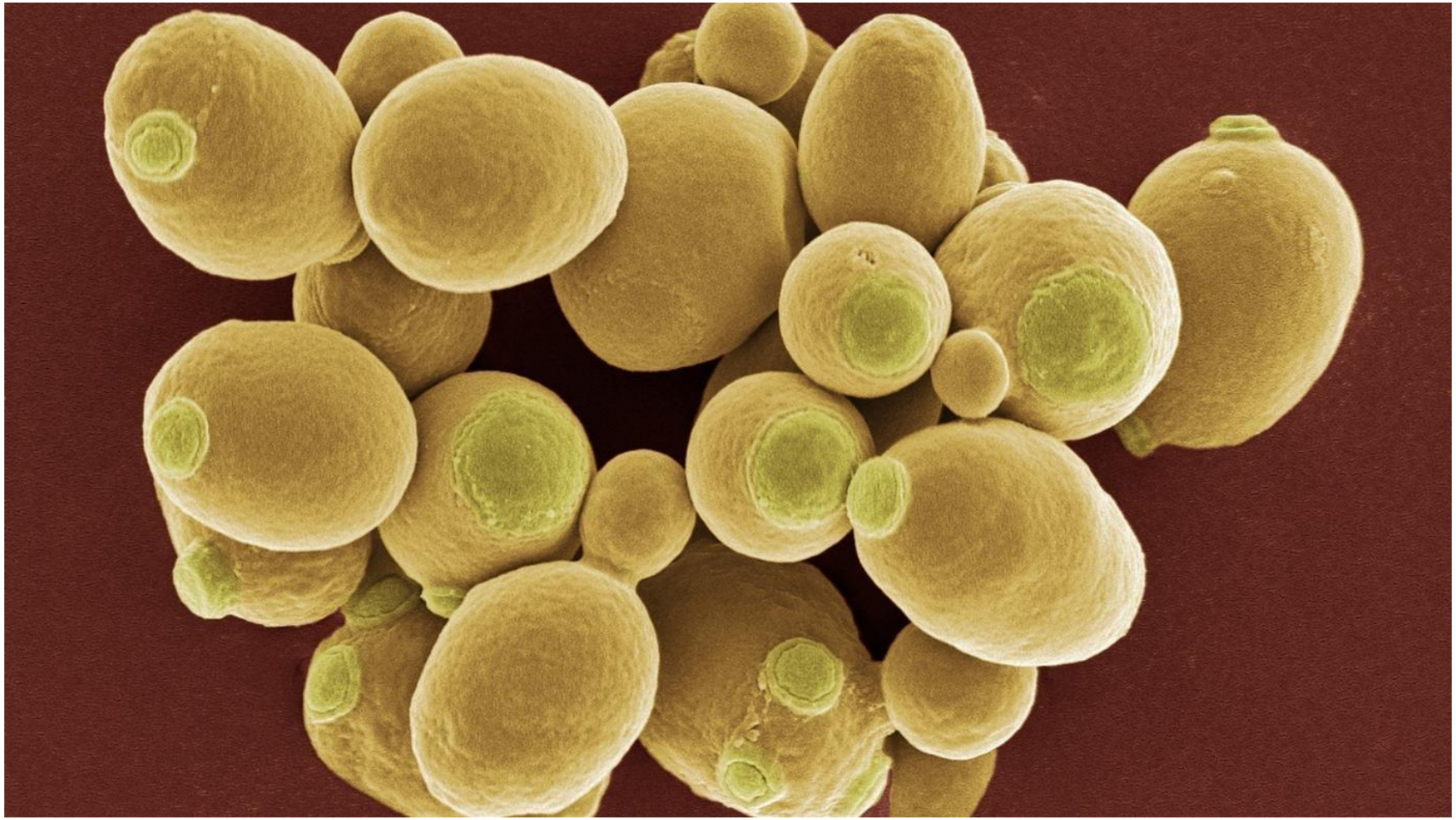
Кишечная палочка





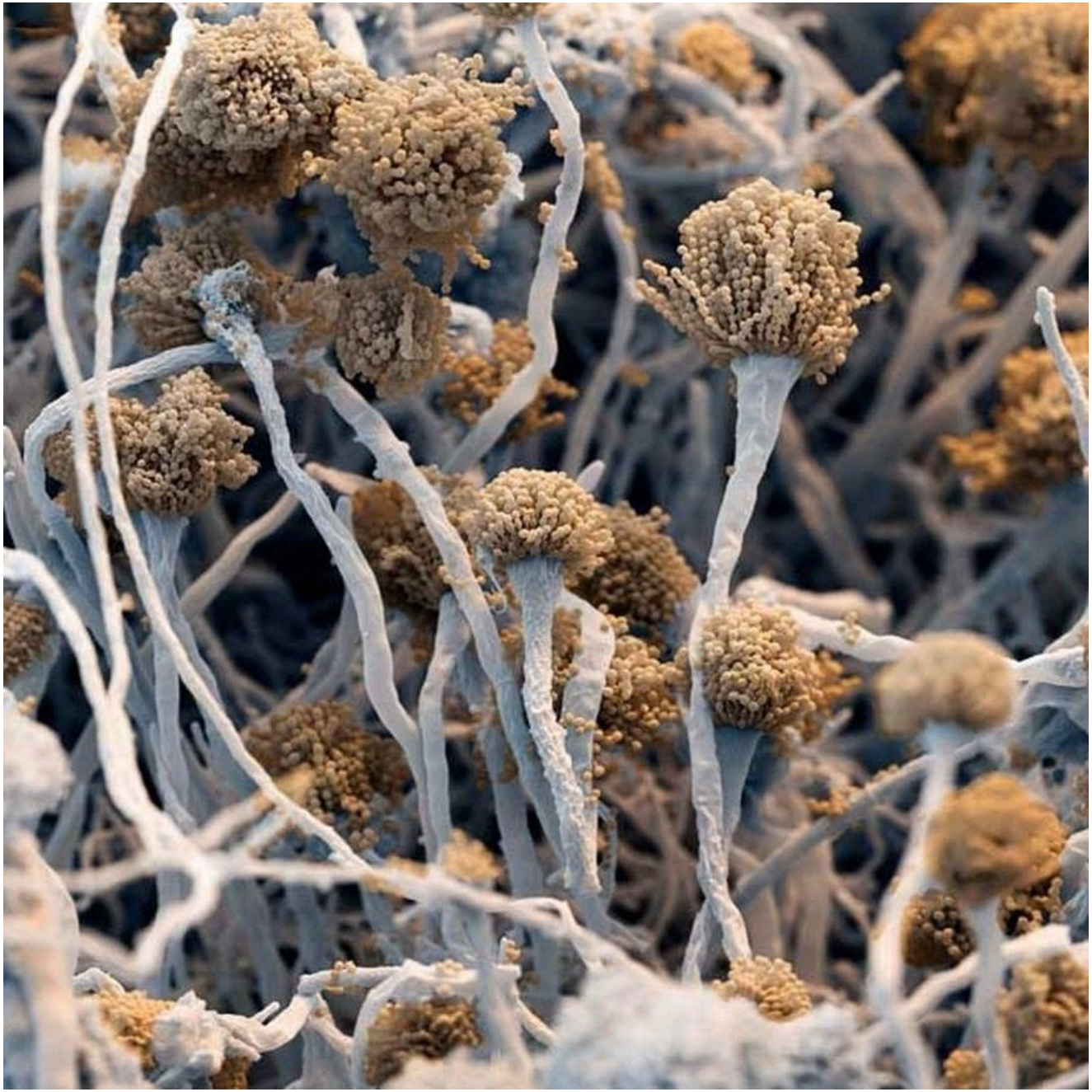


Дрожжи



Мицелиальные грибы





Микроорганизмы – бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы способны жить и размножаться в среде, в которой имеются в качестве источника питания одно органическое вещество и минеральные соли.

Отдельные бактерии выдерживают температуры, близкие к 0 °С или +80 °С.

- **Метаболические процессы в микробной клетке строго регулируются и протекают с большей скоростью, чем у животных, и это позволяет ей расти и быстро размножаться.**

Так, деление кишечной палочки в полноценной среде происходит каждые 30 мин.

В течение суток дрожжи массой 5 г. могут синтезировать около 0,5 кг белка, т.е. столько же, сколько и корова массой 500 кг.

Жизнедеятельность микроорганизмов запрограммирована на непрерывное размножение при строгой экономии питательных веществ.

Первичные метаболиты образуется только в количествах, необходимых для роста.

Превращение углерода субстрата в углерод клеточной биомассы равен 70% (коэффициент полезного действия).

Микроорганизмы содержат многие ферментные системы.

Способны превращать органические соединения в полезные продукты и физиологически активные вещества.

Могут осуществлять в одну стадию важнейшие превращения, требующие при синтезе 20 или более химических стадий.

Способны проводить реакции, трудно или совсем не осуществимые методами химического синтеза.

Микроорганизмы могут превращать растительную массу с низким содержанием белка в пищевые продукты с более высоким содержанием его

Эти свойства микробной клетки широко используются в хозяйственной деятельности человека (дрожжи – для хлебопечения, виноделия, пивоварения, а бактерии – для получения кисломолочных продуктов).

Изучением свойств микроорганизмов занимается микробиология.

В связи с большими потребностями промышленности в микробах-продуцентах интенсивно развивается прикладная генетика микроорганизмов (*селекция микроорганизмов)*.

Генетическое конструирование *in vivo* и *у*величение продуктивности штаммов

Для совершенствования промышленного процесса с участием многоклеточных или одноклеточных организмов необходимо улучшение их свойств.

Современным методом изменения генетической программы микроорганизмов или клеток и улучшения их свойств является генетическое конструирование.

Генетическое конструирование *in vivo* включает получение и отбор мутантов и применение различных способов перемещения наследственной информации в живых микробных клетках.

Генетическое конструирование *in vitro* осуществляется путем манипуляций на выделенной из микроорганизмов ДНК.

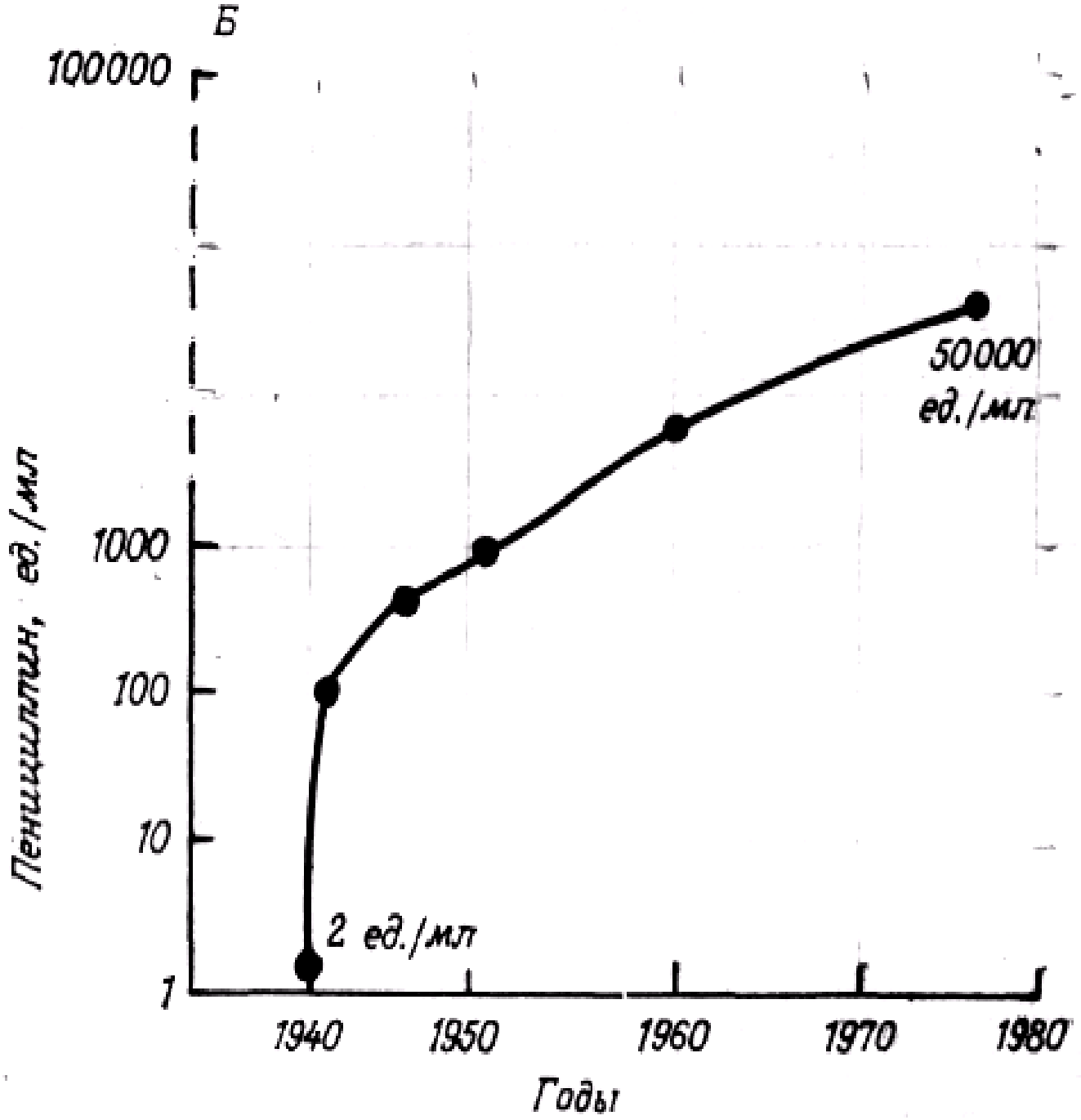
В настоящее время оба эти метода взаимосвязаны и выгодно дополняют друг друга.

Многие годы основным (чаще единственным) способом улучшения микроорганизмов являлся индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор лучших штаммов.

Метод трудоемок, так как отбор, как правило, проводится наугад. Селекционные работы могли занимать многие годы.

Однако практические результаты часто бывают очень значительными. Так, многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина позволила поднять их активность от 100 до 50 000 ед./мл.

В последнее время для объединения в одном организме нужных свойств разных штаммов используют *гибридизацию*.


Б
100000
1000
100
10
1
Пенициллин, ед./мл
2 ед./мл
50000
ед./мл
1940
1950
1960
1970
1980
Годы

Подбор продуцентов по их свойствам. **Важный этап в селекции – поиск природных форм микроорганизмов. Главное свойство продуцента – его способность синтезировать целевой продукт. Для промышленного использования важно также, чтобы он обладал высокой скоростью роста, использовал малоценные не пищевые субстраты и был устойчивым к другим микроорганизмам.**

Сначала отыскивают микроорганизмы с желательными свойствами. Отбирают пробы из таких мест, где наиболее вероятно существование искомых форм.

Например, углеводородокисляющие микроорганизмы могут находиться вблизи бензоколонок, а разлагающие целлюлозу и метанобразующие микроорганизмы обитают в рубце жвачных, винные дрожжи – на винограде.

Микроорганизмы, составляющие препараты «Экобел» и «Родобел» выделены из белорусских почв.

Эти препараты разработаны в институте микробиологии под руководством доктора биологических наук А. Самсоновой.

Микроорганизмы этих препаратов иммобилизованы на торфе. При внесении в почву они используют в качестве источника питания нефтепродукты, разлагая их до более простых метаболитов и в конечном итоге до углекислого газа и воды.

Торф в составе препарата оказывает благотворное влияние на почву.

Накопление продуцента. Отобранные образцы проб вносятся в элективные среды. Путем изменения их свойств (содержание энергии, углерода, азота, pH, осмотического давления, температуры) создаются условия, обеспечивающие развитие выделенного микроорганизма.

Например, для накопления продуцента холестеринoксидазы в среды в качестве источника углерода вносят холестерин.

Для углеводородокисляющих бактерий в среды включают парафин, а для продуцентов протеолитических или липолитических ферментов – белки или липиды. В этих средах накапливаются необходимые продуценты.

Мутагенез и отбор. После получения накопительных культур микроорганизмов, образцы их засевают на плотные питательные среды. В процессе роста отдельные клетки образуют изолированные колонии. При пересеве их получают чистые культуры, с которыми продолжают селекционную работу.

Селекция – направленный отбор *мутантов*, т.е. организмов с измененными наследственными признаками. Появляются мутанты в результате мутаций.

Мутации – это внезапно возникающие (скачкообразные) наследуемые изменения в генетическом материале клетки, проявляющиеся структурными модификациями в нуклеотидной последовательности ДНК.

Спонтанные **(неконтролируемые) мутации возникают с низкой частотой. Ген должен удвоиться в среднем 10^6 –10^8 раз, чтобы возникла мутация. Однако при проведении исследований используются большие объемы среды, которые имеют концентрацию микроорганизмов, достигающую 10^9 клеток или более в 1 мл. И так как культивирование происходит непрерывно, это позволяет получать большие количества мутантов.**

Методы, основанные на отборе спонтанных мутаций, позволили усовершенствовать многие технологии с использованием микроорганизмов. Таким путем были отобраны штаммы пивных, винных и пекарских дрожжей, уксуснокислых и пропионовокислых бактерий.

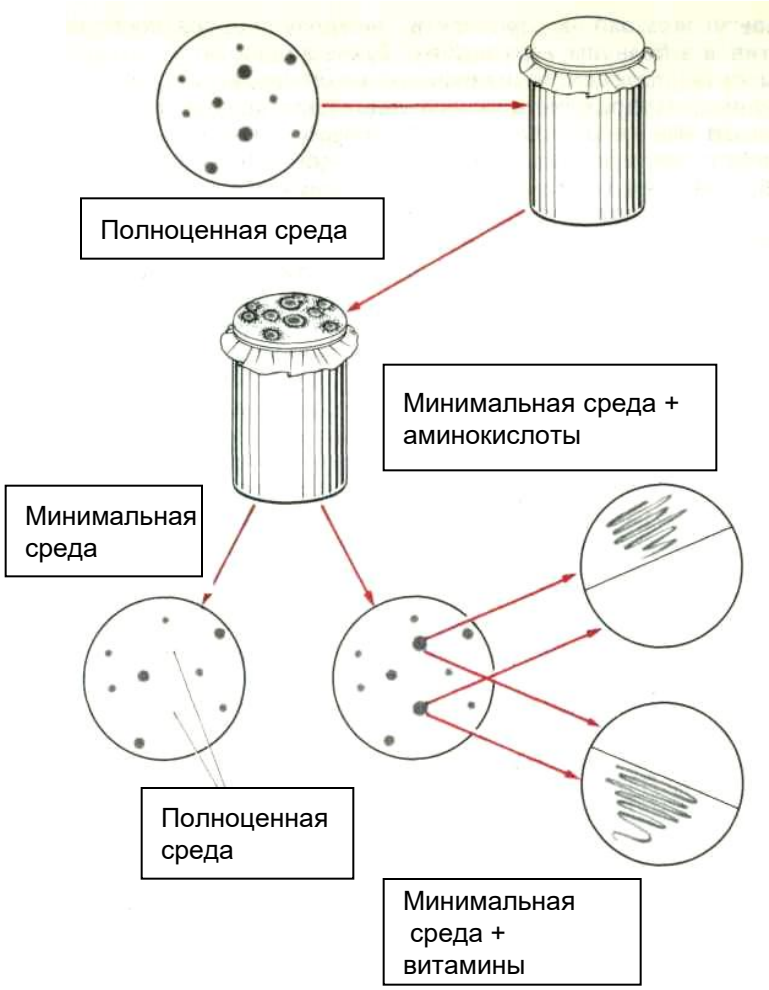
Индуцированный мутагенез. **Содержание мутантов в микробной популяции можно существенно увеличить, если подвергнуть ее воздействию различными факторами. Мутагенным действием обладают ультрафиолетовое, рентгеновское и γ–излучение, а также химические соединения: азотистая кислота, этилметансульфонат, нитрозо-гуанидин и другие нитрозамины, акридиновые красители, бромурацил и др.**

Обработанную мутагеном культуру рассеивают на плотные питательные среды так, чтобы получить отдельные колонии, а затем исследуют каждый клон на продуктивность. Выделив более продуктивный вариант, процедуру мутагенеза и отбора повторяют (скрининг и ступенчатый отбор).

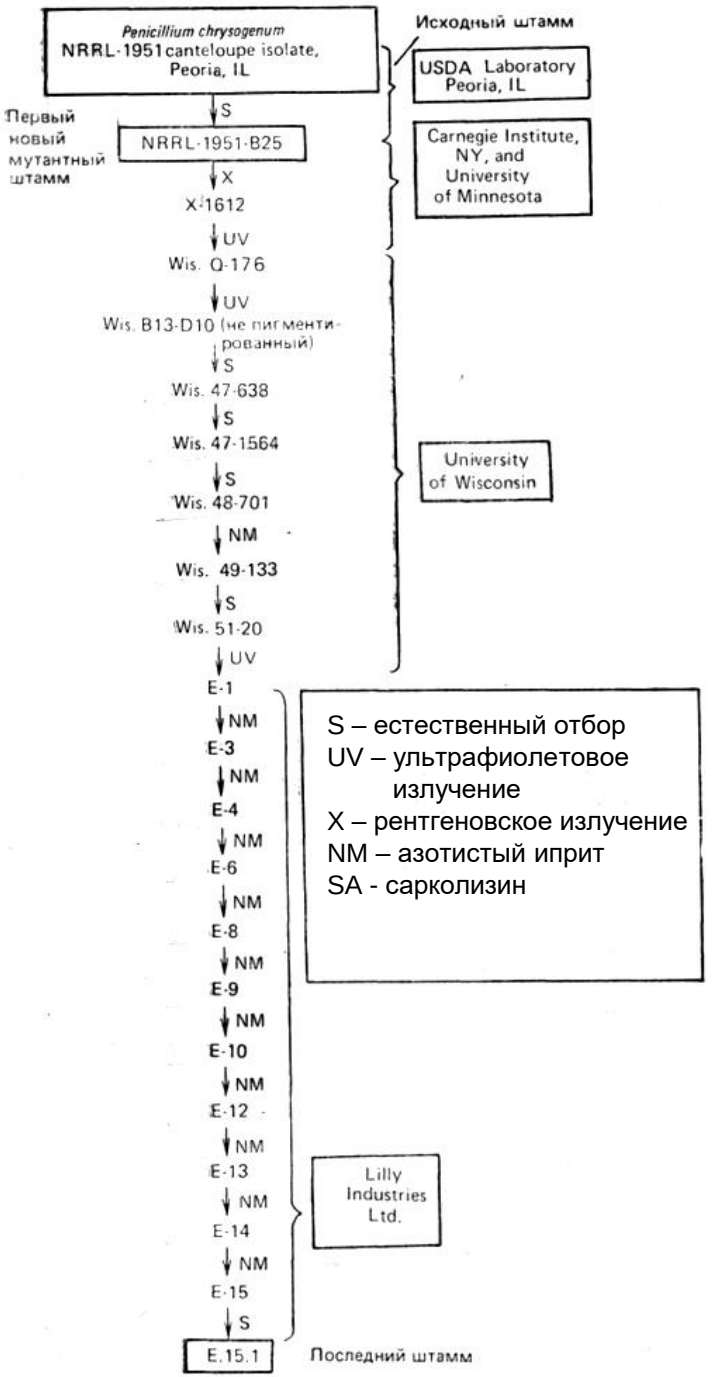
Основной недостаток индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора – трудоемкость. Для уменьшения затрат труда широко использовался метод отпечатков, введенный в 1952 г. Д. Ледербергом и Э. Ледербергом.

Чашки Петри засеваются так, чтобы выросло на каждой из них 50–200 колоний. К стерильному бархату или фильтровальной бумаге, натянутым на деревянном или металлическом цилиндре, прикладывают чашки с выросшими колониями.

К материалу с отпечатками колоний прикладывают чашки с различными средами и воздействуют на них различными факторами (температура, антибиотики, фаги и др.). Таким образом, выявляются искомые штаммы микроорганизмов.



- **Характерным примером индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора является выделение высокопродуктивного штамма – продуцента пенициллина.**



Индуцированный мутагенез и отбор продуктивных мутантов и сейчас остается важным методом повышения активности промышленных штаммов микроорганизмов, в частности продуцентов антибиотиков.

- ***Отбор клеток по принципу устойчивости их к различным факторам.*** **При культивировании в непрерывном режиме были отобраны по признаку устойчивости к этиловому спирту – продукту жизнедеятельности – дрожжи Saccharomyces uvarum. Микроорганизмы–мутанты при длительном культивировании (650 ч) проявляли устойчивость к действию спирта даже в концентрации 10%.**

Благодаря достижениям молекулярной генетики стало возможным проводить отбор продуцентов по их устойчивости и к структурным аналогам целевого продукта. Использован принцип обратной связи активности или синтеза фермента и продукта биосинтеза (В.Г. Дебабов, 1984). Повышение концентрации продукта угнетает активность фермента, который участвует в синтезе его, или подавляет синтез самого фермента.

При наличии глюкозы и аммиака (NH_4^+) многие микроорганизмы синтезируют необходимые для жизнедеятельности азотсодержащие соединения. Если же в среду добавить какую-либо аминокислоту, то синтез ее прекращается. Такой же эффект оказывает добавление структурного аналога аминокислоты, который однако не может войти в состав белка. И рост клеток подавляется в связи с прекращением синтеза аминокислоты. Выживают отдельные клетки – мутанты с нарушенной регуляцией активности и синтеза фермента. Отбирают те из них, у которых фермент сохранил функциональную активность, но стал нечувствительным к ингибирующему действию конечного продукта или его аналогу. Подходящими являются и те, у которых синтез фермента происходит при избытке продукта или его аналога.

- **Клон, клоновая культура.** **Генетическое изучение микроорганизмов стало возможным после разработки способов выделения клоновых культур (клонов). *Клон – это популяция генетически однородных клеток, происходящих из одной и той же клетки-предшественника,* например колония, выросшая из одной клетки при высеве культуры на плотной питательной среде.**

Клонирование клеток используется для выделения мутантных клеточных линий, у которых мутация затронула специфические гены. *Клоновая по происхождению культура, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам, называется штаммом.*

Важной задачей селекционной работы является получение и поддержание высокопродуктивных штаммов.

8. Метод гибридизации соматических клеток.

Гибридизация соматических клеток - это слияние совместно культивируемых клеток разных видов, образующих гибридные клетки со свойствами обоих родительских видов.

Гибридные клетки, содержащие два полных генома, при делении могут утрачивать хромосомы одного из видов.

Можно получать клетки с желаемым набором хромосом, изучать сцепление генов и их локализацию в определенных хромосомах.

Методы генетики соматических клеток позволяют изучать механизмы первичного действия и взаимодействия генов, регуляцию генной активности.

Гибридизация путем скрещивания – это наиболее простой путь создания организмов с желаемыми признаками. Две клетки, сливаясь, образуют одну клетку с двумя ядрами (*гетерокарион*).

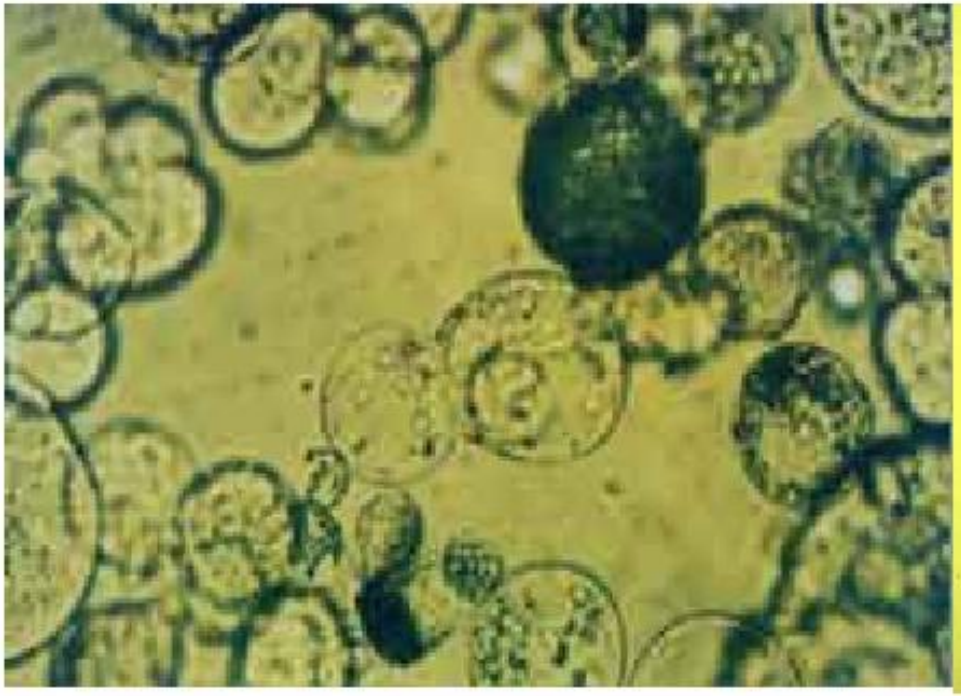
При этом смешиваются цитоплазматические мембраны, цитоплазма и ядра обоих клеток.

В последующем *гетерокарион* делится митотически, образуя *гибридную клетку*. Ядерные оболочки у этой клетки разрушаются, все хромосомы объединяются в одно большое ядро.

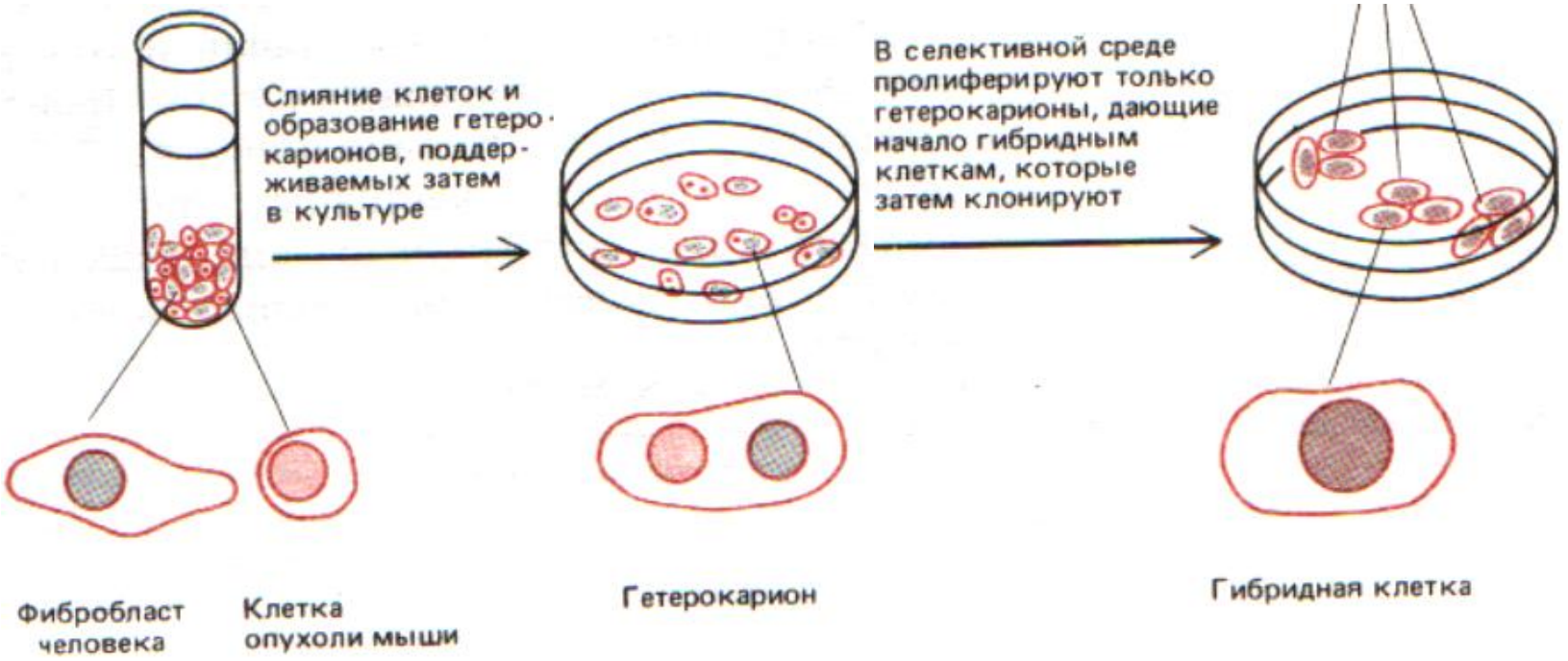
Такие гибридные клетки можно клонировать и получить гибридную клеточную линию.

Соматическая гибридизация

- это слияние двух различных клеток в культуре тканей





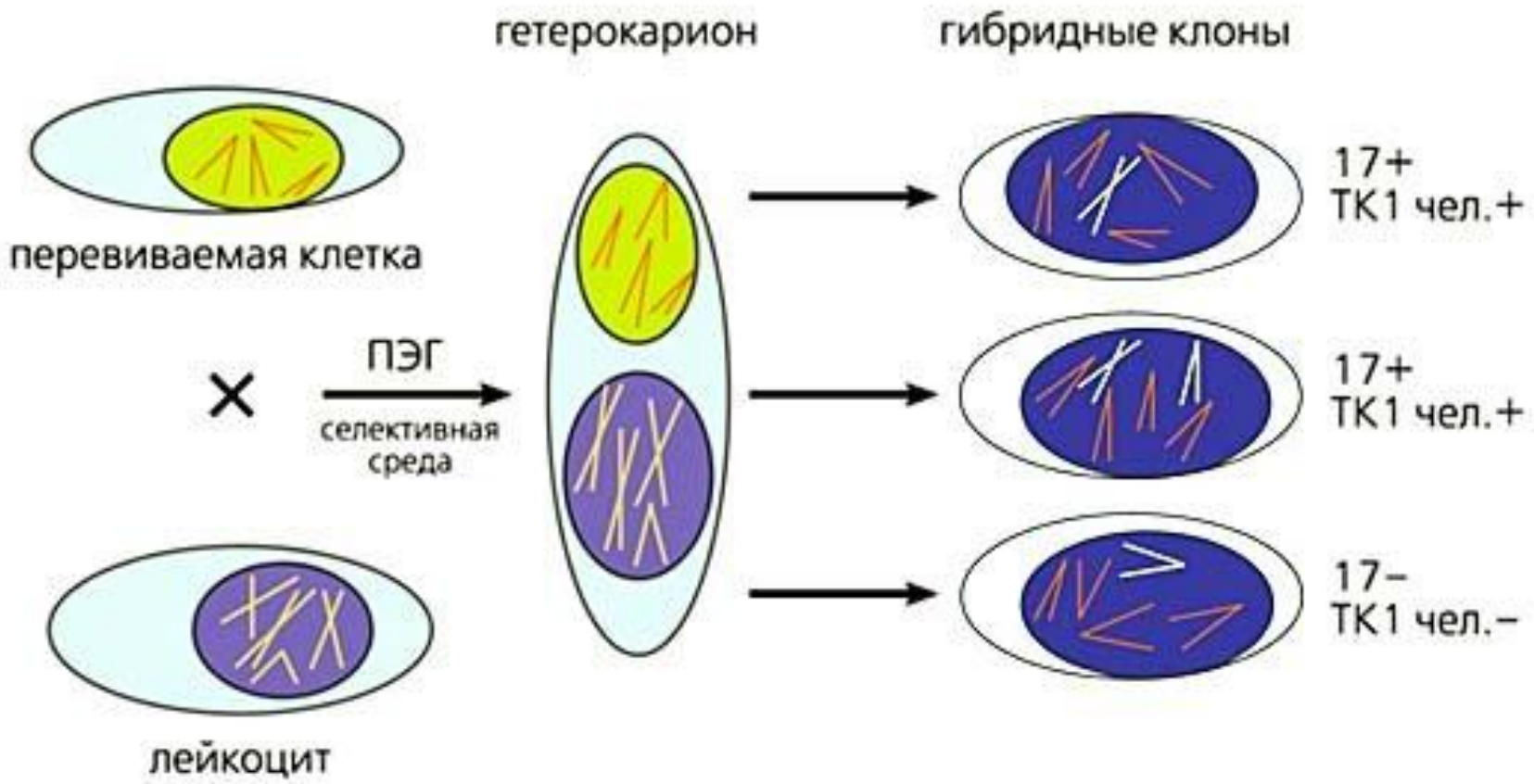

Слияние клеток и образование гетерокарионов, поддерживаемых затем в культуре
В селективной среде пролиферируют только гетерокарионы, дающие начало гибридным клеткам, которые затем клонируют
Фибробласт человека
Клетка опухоли мыши
Гетерокарион
Гибридная клетка

Harris и Watkins (1965) получили гетерокарионы клеток млекопитающих, индуцировав вирусом слияние клеток мыши и человека.

Иногда из гетерокарионов образовывались гибридные клетки с одним слившимся ядром. При этом происходила быстрая потеря хромосом человека (сохранялась только одна или несколько хромосом).

Такие гибридные клетки используются для изучения генов в хромосомах человека.

В других гибридных клетках сохраняется большинство исходных хромосом.


гетерокарион
гибридные клоны
перевиваемая клетка
ПЭГ
селективная среда
лейкоцит
17+
ТК1 чел.+
17+
ТК1 чел.+
17−
ТК1 чел.−

При непосредственном контакте между собой клеток прокариотических ("доядерных") или эукариотических ("с настоящим ядром") происходит перенос ДНК от клетки-донора к клетке-реципиенту.

Этот процесс скрещивания называют к*онъюгацией.* Он используется для получения *рекомбинантов*.

В 1946 г. Ледерберг и Татум провели опыт с двумя ауксотрофными по двум различным аминокислотам мутантами *Escherihia coli* К12. Один двойной мутант нуждался в аминокислотах А и В, но был способен синтезировать С и Д ($А^-$ $В^-$ С+Д+); другой был ему комплементарен (А+В+$С^-$ $Д^-$). Мутанты не росли на минимальной питательной среде и не образовывали колоний.

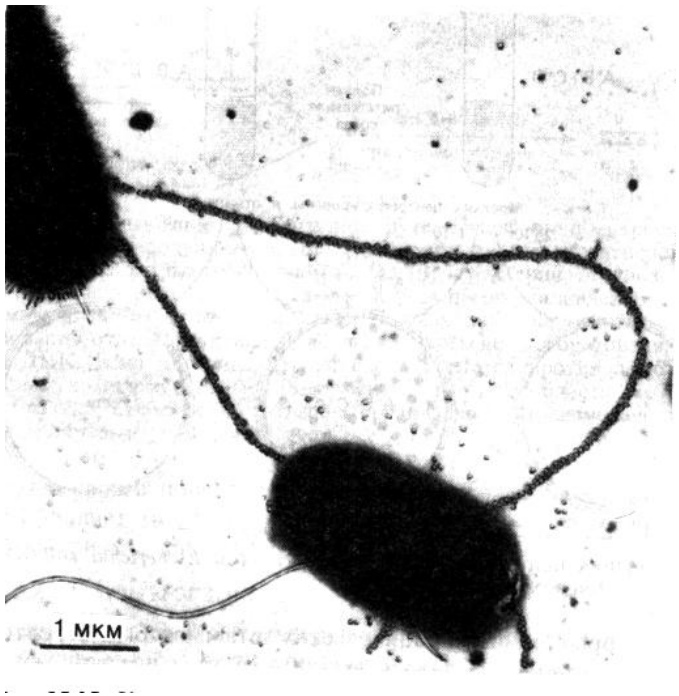
Однако если на ту же среду высевали смесь обоих мутантов, то колонии появлялись. Клетки колоний обладали наследственной способностью синтезировать все аминокислоты, т.е. принадлежали к типу А+ В+С+ Д+ (были прототрофными). Генетические рекомбинанты объединяли в себе генетическую информацию двух реципрокно дефектных (взаимодополняющих) родительских клеток. Возникали с частотой 1 :10^6.

При скрещивании перенос генетического материала происходит от донора («мужского» штамма) к реципиенту («женскому» штамму), а весь процесс рекомбинации и расщепления протекает в клетках штамма-реципиента.

Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только фрагменты генома.

Клетки *Escherihia coli*, связанные между собой F-пилями.

У бактерий контакт клеток осуществляется за счет образования коньюгационного мостика, по которому переносится ДНК из одной клетки в другую. Способность к формированию мостика закодирована во многих плазмидах. По коньюгационному мостику плазмиды переносят свои гены, а в ряде случаев – и гены клетки-хозяина. Следовательно, они обладают способностью к мобилизации хромосом.

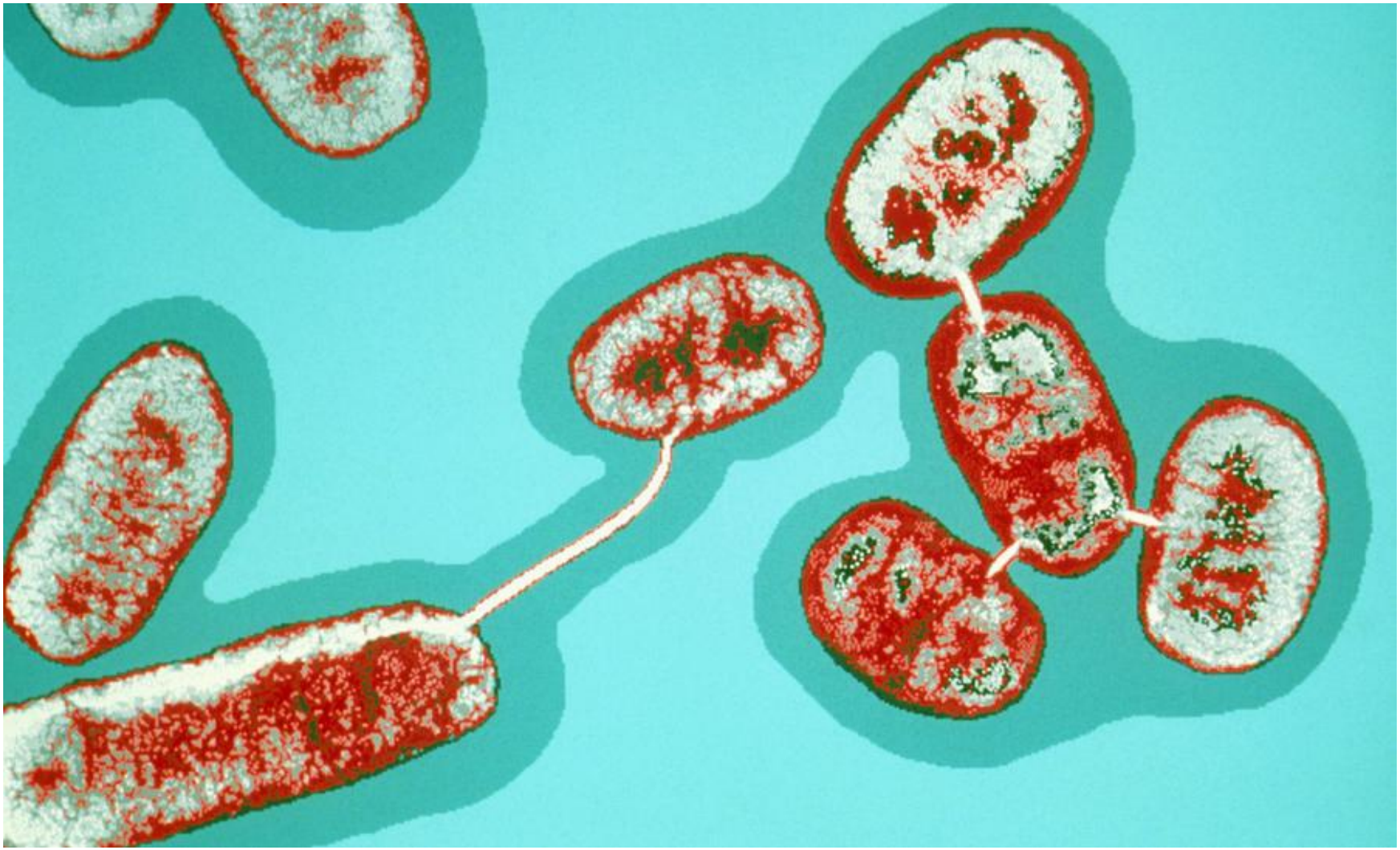


Обе F-пили клетки Hfr помечены донор-специфическими РНК-фагами MS-2. Многочисленные пили типа I клетки-реципиента (в верхнем левом углу) короткие и не адсорбируют бактериофага.

Система конъюгационного переноса плазмиды F-фактор обеспечивает осуществление двух основных этапов процесса конъюгации: образование скрещивающихся пар и перенос и репликацию ДНК.

Для образования скрещивающихся пар необходимы половые ворсинки – пили. Они образуются на поверхности клетки-донора и вероятно служат для взаимного узнавания при контакте между клеткой-донором и клеткой-реципиентом и делают возможным образование конъюгационного мостика, по которому ДНК переходит внутрь клетки-реципиента

Репликация плазмиды реализуется при участии хромосомного аппарата бактериальной клетки.



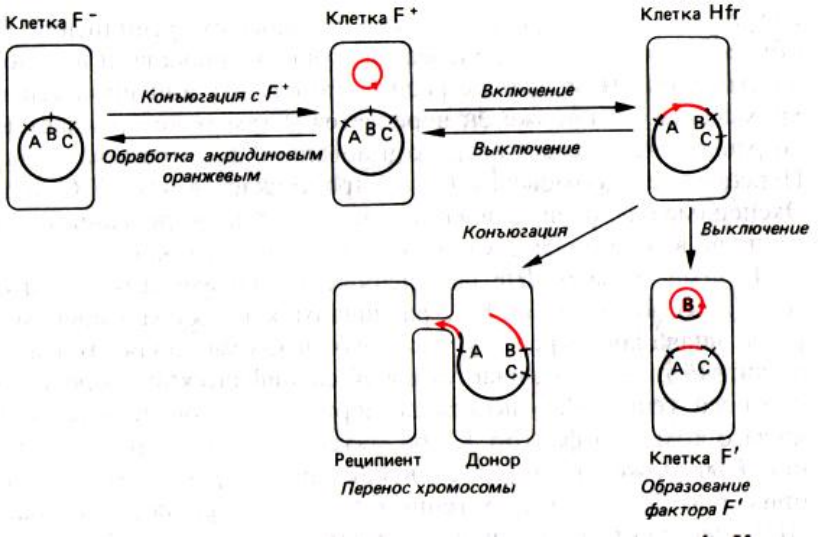
- **При исследовании процесса скрещивания бактерий выяснилось, что способность клетки быть донором связана с наличием особого фактора, который при конъюгации передается из одной клетки в другую – полового фактора *F* (от fertility – плодовитость). Клетки, не содержащие фактора F (клетки F^-) могут функционировать только как реципиенты.**
- **При конъюгации, т.е. при прямом контакте между клетками, частота передачи фактора *F* близка к 100%. Таким образом, клетки-реципиенты в результате конъюгации превращаются в потенциальных доноров; при этом хромосомные признаки еще не передаются.**
- **Фактор *F* представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК с массой $45 \cdot 10^6$ Да. В качестве внехромосомного автономно реплицируемого элемента ДНК ее относят к плазмидам.**

- **В популяции *F*+ лишь немногие клетки способны быть донорами хромосомной ДНК. Оказалось, что это те клетки, в которых фактор *F* интегрировался в бактериальную хромосому. Если клоны таких клеток-доноров использовать в экспериментах со скрещиванием, то рекомбинанты образуются примерно в тысячу раз чаще, чем при использовании обычных клеток *F*+.**

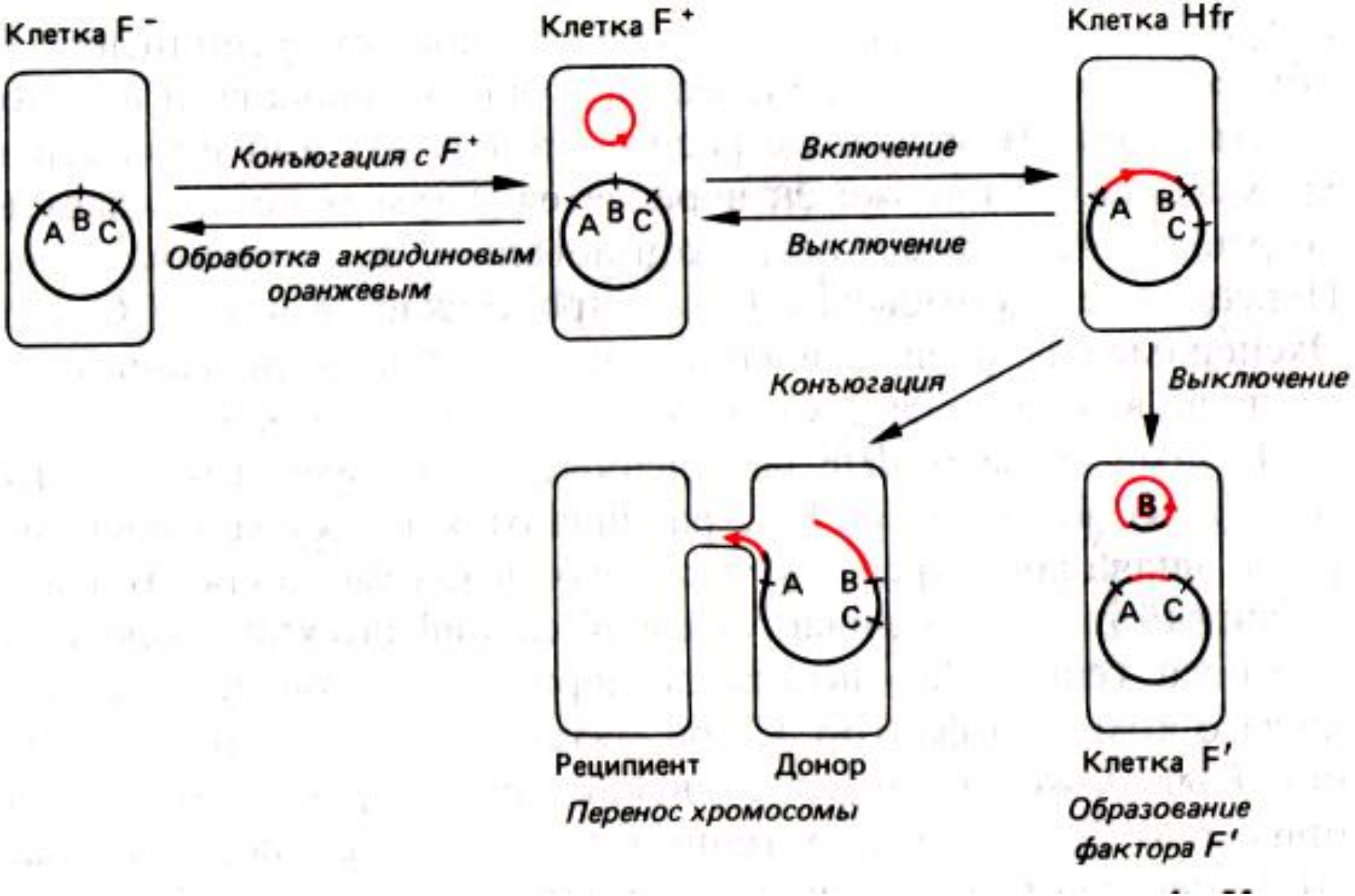
  Клетка F^- может служить только реципиентом. При конъюгации с клеткой штамма F^+ или Hfr она может получить фактор F и в результате стать клеткой F+.

Взаимоотношения между половыми типами *Escherihia coli*

В клетке F+ фактор F представляет собой кольцевую молекулу ДНК. При включении фактора F в бактериальную хромосому клетка переходит в состояние Hfr (высокая частота рекомбинантов).



В случае неправильного выключения фактора F из хромосомы он может превратиться в фактор F′, содержащий кусочек хромосомной ДНК.


Клетка F⁻
Клетка F⁺
Клетка Hfr
A B C
Конъюгация с F⁺
Обработка акридиновым оранжевым
Включение
Выключение
Конъюгация
Выключение
A B C
A C
B
Реципиент
Донор
Клетка F′
Перенос хромосомы
Образование фактора F′

- **У грибов, дрожжей и водорослей гибриды образуются при слиянии клеток (копуляции). В результате слияния гаплоидных ядер исходных клеток образуется диплоидная клетка – зигота. В последующем в ходе мейоза каждая из хромосом диплоидного ядра продольно расщепляется, образуя две сестринские хроматиды. Гомологичные хромосомы образуют пары и в результате кроссинговера обмениваются частями своих хроматид. В сформировавшихся гаплоидных половых спорах может содержаться новый набор генов, которыми различались родительские клетки. Это происходит в результате рекомбинации генов одной и той же хромосомы, или разных хромосом при перераспределении хромосомных пар.**

У некоторых микроорганизмов (Neurospora crassa) ядро сразу же подвергается мейозу, а аспергилл, дрожжей-шизосахаромицетов, водорослей хломидомонады образуются диплоидные вегетативные клетки.

Системы скрещивания у грибов

- **У грибов типы скрещивания разнообразны. Половой процесс контролируется системой несовместимости, которая у некоторых видов биполярна, а у других - тетраполярна. При биполярной системе несовместимости процесс скрещивания контролируется одним локусом с двумя противоположными аллельными формами. Это дает два типа спаривания. При тетраполярной системе несовместимости процесс скрещивания контролируется двумя генами, которые имеют множество аллельных форм. Скрещивание возможно, если обе клетки обладают разными аллелями каждого из двух локусов. В других случаях клетки погибают в процессе скрещивания.**

- **Система скрещивания была обнаружена у бактерий рода Bacillus, который широко используется в промышленности. Эти бактерии могут легко воспринимать голую ДНК, поэтому рекомбинантные формы несложно получить путем трансформации. Таким путем был создан штамм Bacillus, у которого синтезируемый белок на 50 % представлен ферментом α-амилазой.**

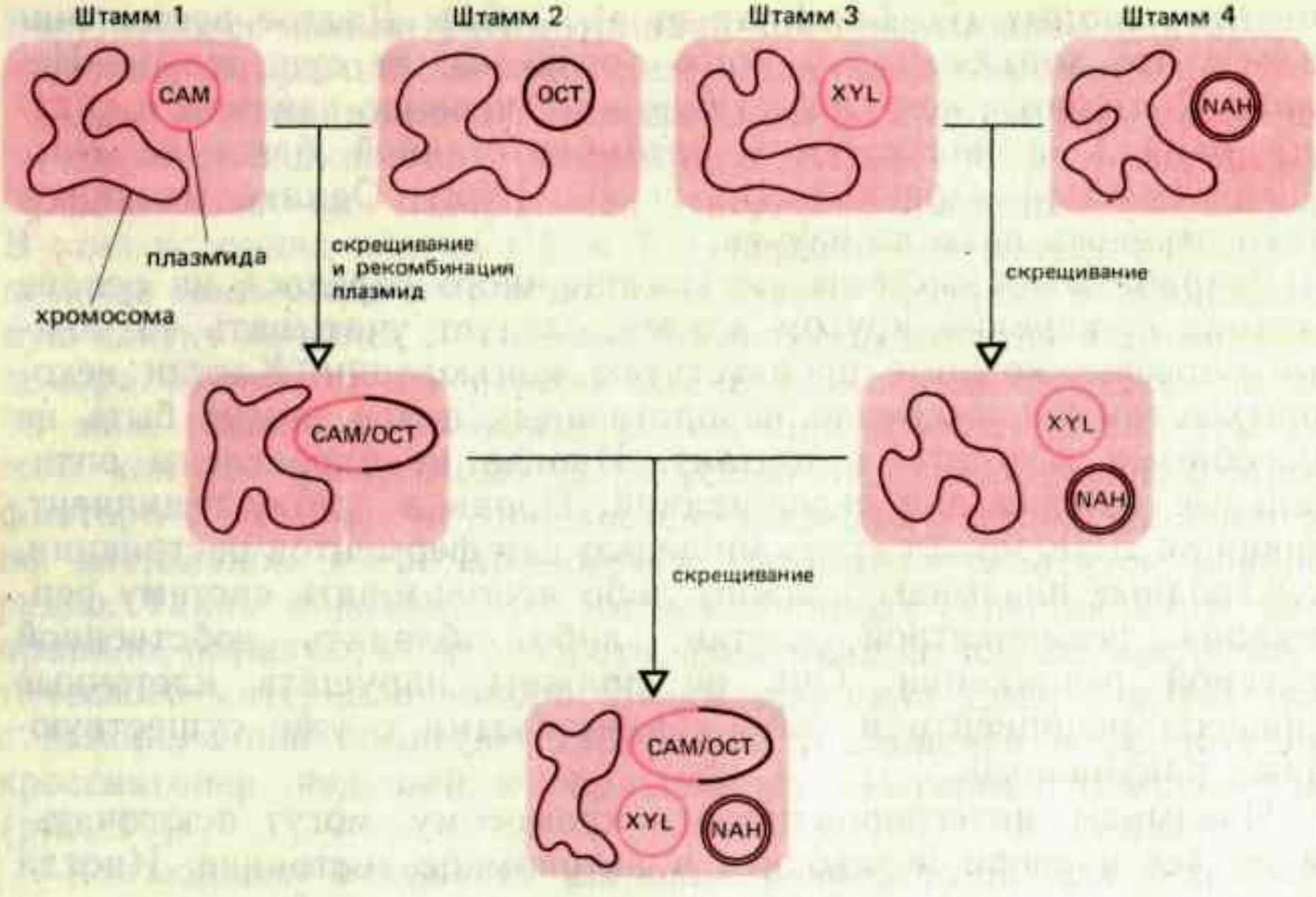
- **Хорошо развиты системы скрещивания у различных видов Streptomyces, с помощью которых получают более 60 % применяющихся в настоящее время антибиотиков. Плазмида SCP2, выделенная из Streptomyces coelicolor, также несущая фактор пола, продуцирует рекомбинантные формы с очень высокой частотой. Другая плазмида SCP1, по своим свойствам близка к плазмиде Escherichia coli. Она может встраиваться в хромосому Streptomyces, а также включать фрагменты хромосомной ДНК.**

Возможности метода слияния клеток

Прежде всего, это скрещивание филогенетически отдаленных форм живого. Получены плодовитые и фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом. Получены также межродовые стерильные гибриды картофеля и томата и межвидовые (Saccharomyces uvarum a. S. diastaticus) и межродовые (Kluyveromyces lactis a. Saccharomyces cerevisiae) гибриды дрожжей.

Значительный интерес представляет получение ассиметричных гибридов, у которых полный набор хромосом одной родительской формы и частичный набор другой. Такие гибриды устойчивее, более плодовиты и жизнеспособны, чем симметричные.

- **Возможно также получение гибридов путем слияния трех или более родительских клеток. Такие гибридные клетки могут быть использованы для выращивания растений (грибов) – регенератов.**
- **Большое значение имеет гибридизация клеток, у которых различные программы развития. Это относится и к соматическим клеткам.**
- **Для получения межвидовых (межродовых) гибридов используется метод слияния протопластов (protos – первый и plastos –вылепленный, образованный) – ограниченных цитоплазматической мембраной образований (клеток без оболочек).**


Штамм 1
Штамм 2
Штамм 3
Штамм 4
CAM
OCT
XYL
NAH
плазмида
хромосома
скрещивание
и рекомбинация
плазмид
скрещивание
CAM/OCT
XYL
NAH
скрещивание
CAM/OCT
XYL
NAH

Мутации бывают

цитоплазматические **и** ***ядерные*** **(хромосомные).**

Различают три типа ***хромосомных*** **мутаций:**

- **изменение числа хромосом,**
- **изменение числа и порядка расположения генов (хромосомные перестройки) и**
- **изменения отдельных генов (внутригенные изменения).**

Мутации

- По протяженности повреждений мутации бывают:
  - **точечными**, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, (последствия: замена аминокислоты, сдвиг рамки считывания, возникновение бессмысленного кодона),
  - **протяженными** *(аберрации)*.
- Мутации разделяют на:
  - **хромосомные –** изменение двух и более участков хромосомы,
  - **генные** – изменение гена или цистрона: **модификации** оснований, **делеции** (выпадение нескольких пар нуклеотидов), **транспозиции** (перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы), **инсерция** (разрыв путем вставки посторонней ДНК), **дупликация** (добавление нуклеотидных пар) и деформации спирали ДНК.


fineart
america

Хромосомные перестройки включают:

- ***делеции*** **(выпадения участков хромосомы),**
- ***дупликации и амплификации*** **(удвоения или умножения числа отдельных генов или группы генов),**
- ***транспозиции*** **(вставки участков хромосом в новые места),**
- ***транслокации*** **(обмен участками между хромосомами),**
- ***инверсии*** **(изменения порядка расположения генов в хромосоме). Они могут вызывать как утрату, так и приобретение новых признаков.**

Хромосомные перестройки (кроме амплификаций) стабильны.

- ***Внутригенные мутации*** **изменяют последовательность азотистых оснований в пределах одного гена. Такие изменения обычно приводят к нарушениям или модификациям синтеза и строения белка.**
- **Мутанты способны к *реверсии*, т.е. к восстановлению исходного фенотипа. Мутанты, которые появляются в результате реверсии, называются *ревертантами*.**
- **Мутации являются основным источником всех биологических изменений. По своему происхождению бывают *спонтанными и индуцированными*.**

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ СТЕРОИДОВ

1. Биотрансформации стероидных гормонов
2. Гормональные препараты и их применение

1. Биотрансформации стероидных гормонов

Использование в биотехнологическом процессе микроорганизмов позволяет:

- **осуществлять из компонентов питательной среды биосинтез биологически активных веществ и продуктов (антибиотиков, ферментов, витаминов, полисахаридов, липидов, аминокислот, пигментов);**
- **использовать совместно химические и микробиологические стадии при синтезе лекарственных препаратов и других продуктов, т.е. осуществлять *микробиологические трансформации*.**

Микробиологические трансформации очень эффективны в области химии стероидов. Сложность их молекул затрудняет даже незначительные модификации химическим путем.

Микроорганизмы же благодаря наличию ферментов способны в одну стадию осуществлять уникальные реакции.

В зависимости от типа возникновения и отщепления функциональных групп микробиологические трансформации вызывают *окисление, восстановление, гидролиз эфиров, гидроксилирование, метилирование, этерификацию, дегидрирование, ацетилирование, рацемизацию, изомеризацию* и др.

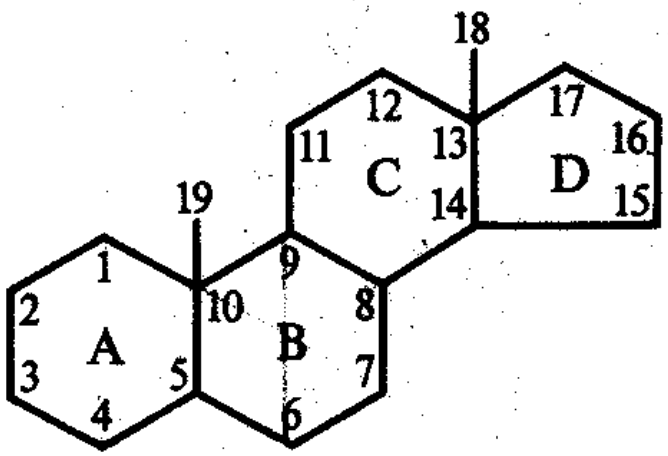
При этом не происходит синтез новой молекулы, а изменяется лишь молекулярная структура вещества.

Микроорганизмы имеют все типы ферментов

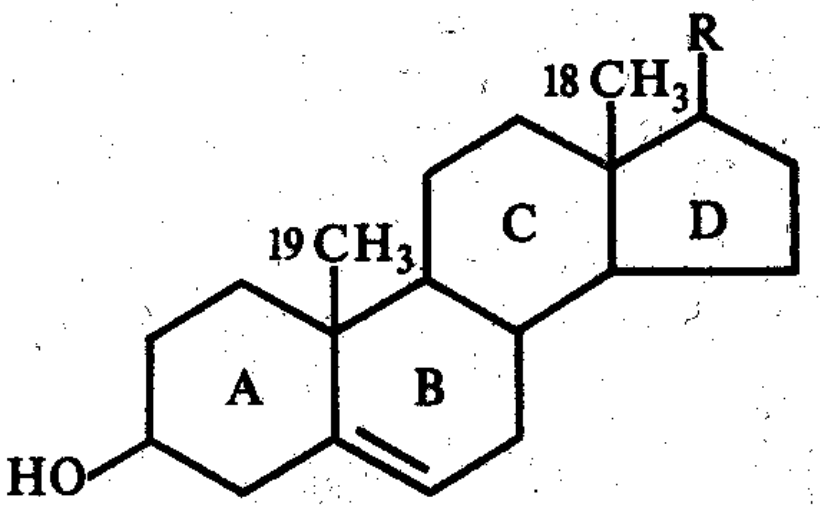
- **Оксиредуктазы – катализируют реакции окисления и восстановления.**
- **Гидролазы – катализируют разрыв химической связи с присоединением элементов молекулы воды.**
- **Лиазы – катализируют разрыв связей C-C, C-N, C-O, C-S с образованием двойных связей (декарбоксилирование).**
- **Трансферазы – (переносят химические группы).**
- **Изомеразы – катализируют различные процессы изомеризации.**
- **Лигазы – катализируют процессы конденсации двух сочетающихся молекул за счет энергии распада АТФ.**

У веществ стероидной природы циклическим скелетом молекулы является <u>циклопентанпергидрофенантрен</u>, который включает три шестичленных и одно пятичленное кольцо.

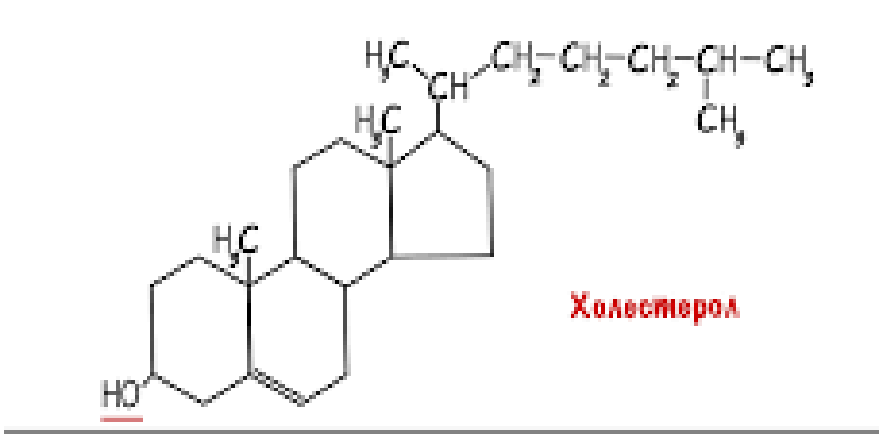
К стеринам (стеролам) относят стероиды, которые имеют в положении С-3 гидроксильную группу (НО).

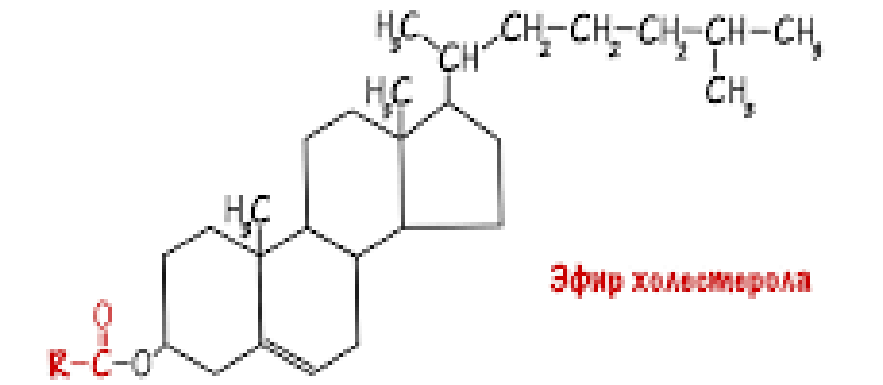


циклопентанпергидрофенантрен



стерины

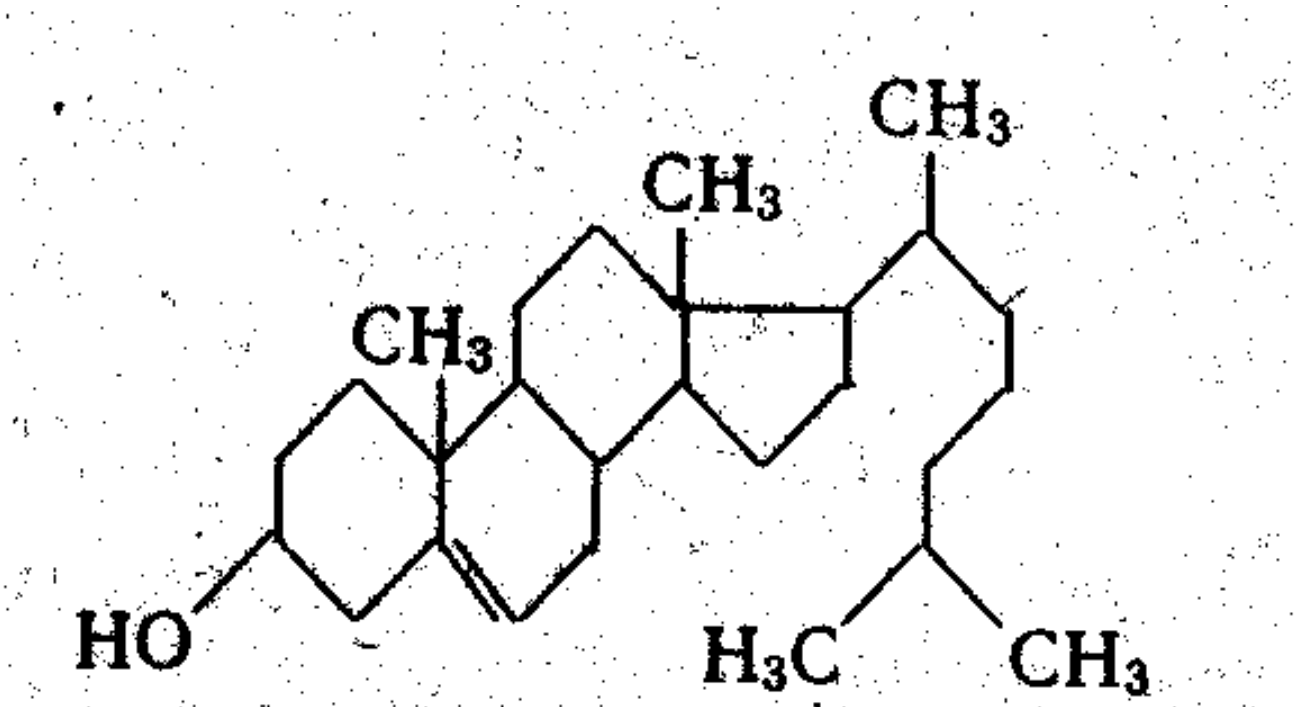




- **Наиболее известным из стеринов является холестерин ($C_{27}H_{46}O$). Обнаруживается во многих органах и тканях человека и животных. Принимает участие в физиологических процессах, происходящих в живой клетке.**

Желчные камни человека на 99% состоят из холестерина.

Получают холестерин из спинного и головного мозга крупного рогатого скота.



холестерин

- **Окисление – процесс отдачи электронов, сопровождающийся повышением степени окисления элемента.**
- **Восстановление – процесс присоединения электронов, сопровождающийся понижением степени окисления элемента.**
- **В окислительно-восстановительных реакциях одновременно идут два процесса: окисление и восстановление.**

Стерины необходимы для осуществления физиологических и биохимических функций живого организма. Они участвуют в образовании мембранных систем, клеточных оболочек и других структурных образований клетки.

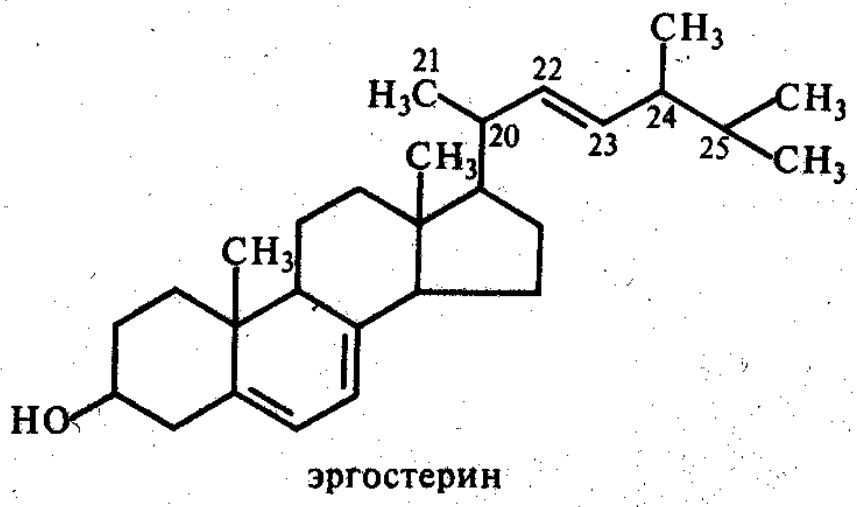
Стерины растений (фитостерины) – источники получения стероидных препаратов:

- **эргостерин**
- **стигмастерин**
- **β-ситостерин**

- ***Эргостерин*** **– провитамин Д. Содержится в растениях, грибах, микроорганизмах (особенно много в дрожжах).**

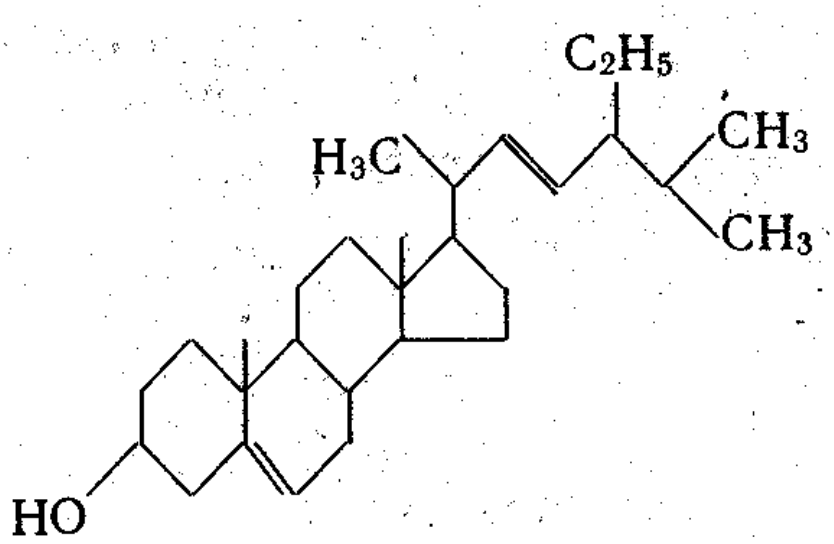
Для промышленного получения эргостерина обычно используются пекарские дрожжи.

В отличие от холестерина имеет дополнительную метильную группу в боковой цепи при C_{24}, а также две двойные связи (при C_7 и в боковой цепи между 22 и 23-м углеродными атомами).



эргостерин

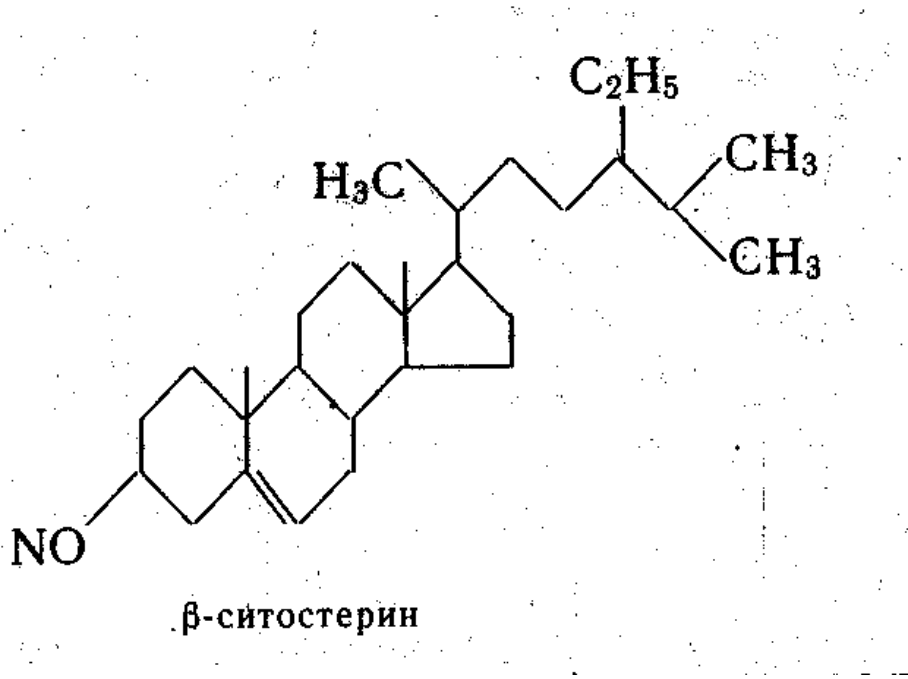
- ***Стигмастерин*** **в отличие от холестерина также имеет двойную связь между 22- и 23-углеродными атомами и этильную группу в положении 24. Содержится в соевом масле и сахарном тростнике.**
- **Диосгенин вырабатывается в культуре клеток диоскореи дельтовидной корневого изготовления.**



стигмастерин

- ***Ситостерин-β*** **содержится в хлопковом и талловом маслах, в зародышах пшеницы, в натуральном каучуке, в сахарном тростнике и других растениях. Отличается от стигмостерина отсутствием двойной связи в боковой цепи.**

  Комерческим источником ситостеринов являются тростник и хлопковое масло.

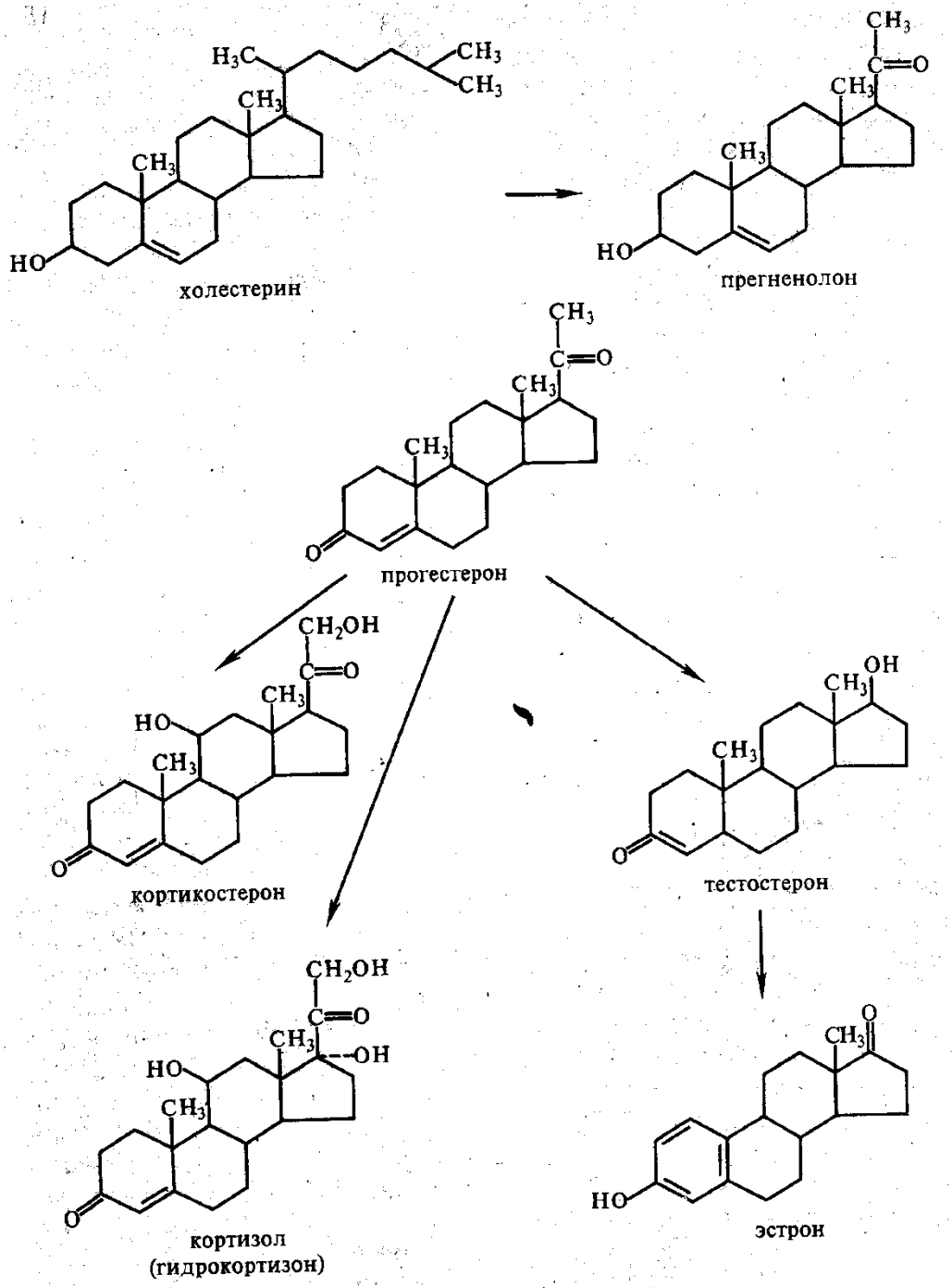


β-ситостерин

В организме при биосинтезе стероидных гормонов вначале из холестерина образуется *прегненолон* - промежуточный продукт биосинтеза прогестинов, андрогенов и эстрогенов и кортикостероидов.

Окисление 3ОН-группы прегненолона в С=О сопровождается перемещением двойной связи; в результате этой кетостероидизомеразной реакции образуется *прогестерон.*

В коре надпочечников прогестерон превращается в *кортикостерон и кортизол (гидрокортизон).*


холестерин
прегненолон
прогестерон
кортикостерон
тестостерон
кортизол
(гидрокортизон)
эстрон

Промышленный синтез гидрокортизона, преднизолона, дексаметазона начали осуществлять после разработки микробиологических способов их получения.

осуществляется биотехнологическим путем из растительного сырья:
диосгенина из растения диоскореи,
стигмастерина из соевых бобов,
ситостеринов (тростник и хлопковое масло).

Эти препараты обладают противовоспалительным, десенсибилизирующим и противошоковым действием.

Эффективны при лечении ревматических и хронических кожных заболеваний, воспалительных процессов, бронхиальной астмы, для инициации родов.

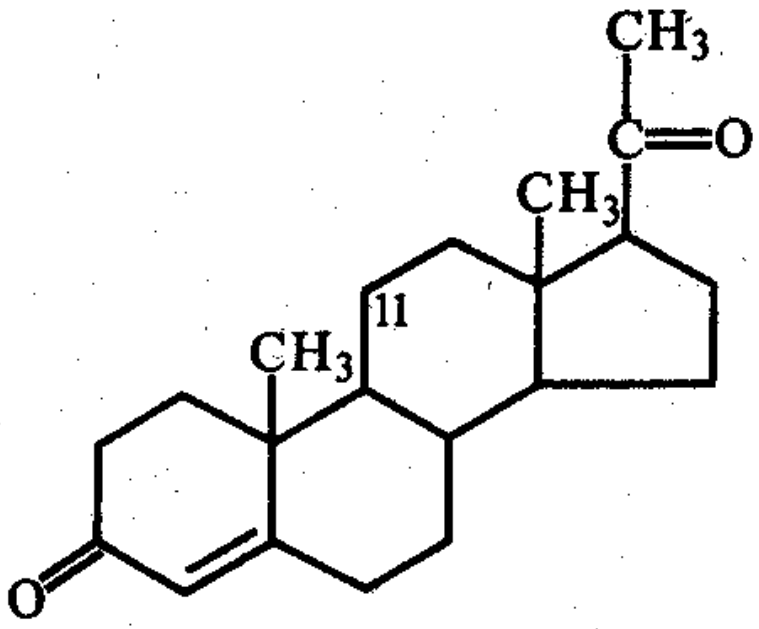
Еще до установления строения стероидов было известно, что в кишечнике бактериальная флора превращает холестерин в копростерин, а холевую кислоту – в дезоксихолевую.

После установления структуры стероидных гормонов начали использовать свойства микроорганизмов для получения различных соединений.

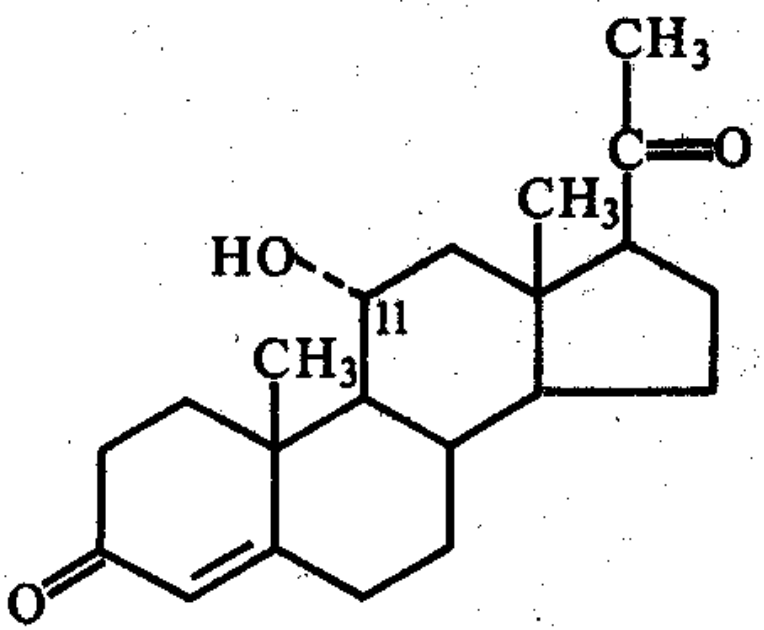
Внедрение микробиологического синтеза в технологию получения стероидных гормонов вызвало переворот в фармацевтической промышленности, существенно повысило ее экономические показатели.

Метод микробной трансформации стероидов был осуществлен и запатентован в 1937 году.

При ферментации прогестерона с культурой Rhizopus nigricans был получен 11α-гидроксипрогестерон. В промышленность метод внедрен в 1952 году.



прогестерон

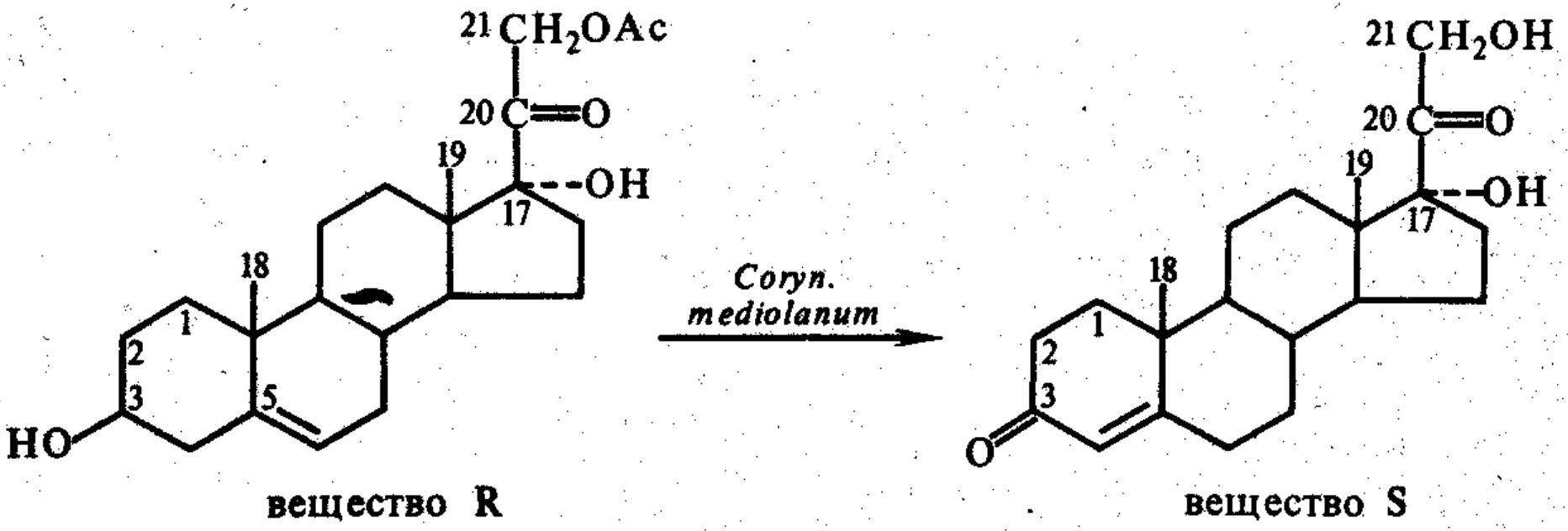


11α-гидроксипрогестерон

При синтезе кортизона, гидрокортизона и преднизолона используется кортикостерон – вещество S Рейхштейна и его производные. Это вещество подвергается гидроксилированию при участии грибов Cunninghamella blakesleeana и др.

Само вещество S Рейхштейна является модифицированным продуктом биотрансформации моно ацетата "вещества R" с помощью культуры Corynebacterium mediolanum.

Многие коммерческие препараты стероидов, которые обладают противовоспалительным действием, являются производными преднизолона.



вещество R

вещество S

Процесс ферментативного превращения вещества R в вещество S Рейхштейна включает гидролиз 21-ацетогруппы и окисление 3β-гидроксигруппы в 3-кетогруппу с одновременным перемещением двойной связи из ▲5 в ▲4.

- ***Введение гидроксильной группы.*** **Микробиологическое гидроксилирование – наиболее важный и часто применяемый метод.**
- **Наличие гидроксильных групп в 3, 11, 16, 17 положениях молекулы обусловливает физиологическую активность многих стероидных препаратов.**

Осуществляется гидроксилирование многими микроорганизмами (Rh. nigricans, Thieghemella orchidis и др.). При этом образуется смесь 11α- и 11β-эпимеров.

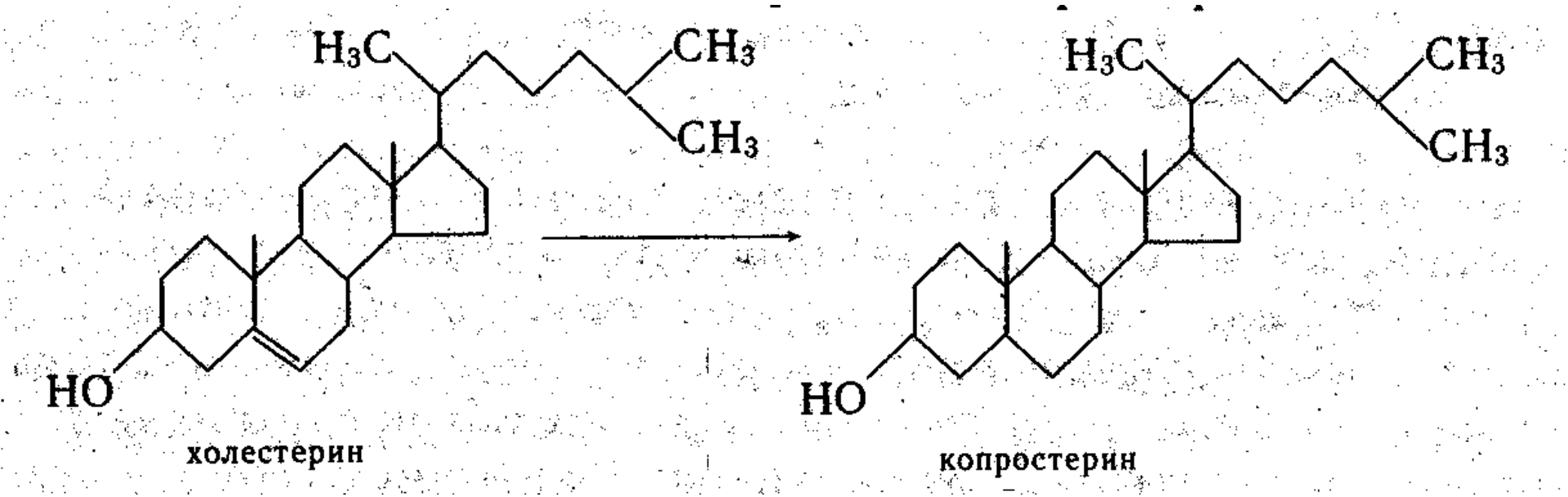
Наличие 11β-гидроксильной группы обусловливает физиологическую активность гидрокортизона (кортизола) и преднизолона.

- ***Дегидрогенизация стероидов.*** **Наличие двойных связей также существенно влияет на физиологическую активность препаратов. Используя *дегидрирование стероидов* получают преднизолон. Эту реакцию осуществляют бактерии и актиномицеты (Arthrobacter simplex, Mycobacterium globiforme, Corynebacterium, Nocardia).**

  Обычно микроорганизмы дегидрогенизируют положения 1,2 и 4,5, хотя возможно введение двойной связи и в положения 7,8; 8,9 и др.

Микробиологическое восстановление.

Осуществляется дрожжами и анаэробными бактериями, а также представителями микрофлоры кишечника млекопитающих, превращающих холестерин в копростерин.

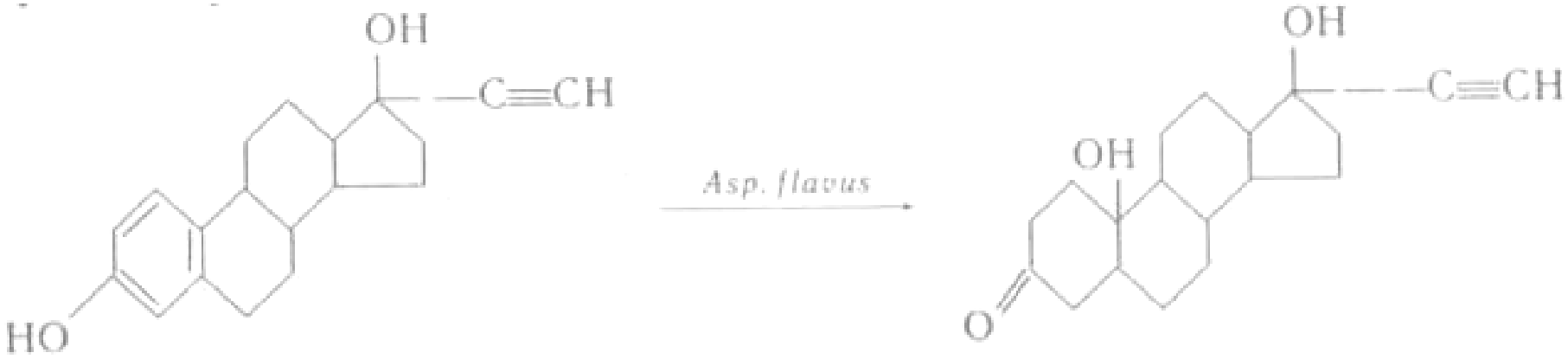


- ***Окисление гидроксильной группы в кетогруппу.*** **Эту реакцию могут осуществлять бактерии, актиномицеты, грибы.**

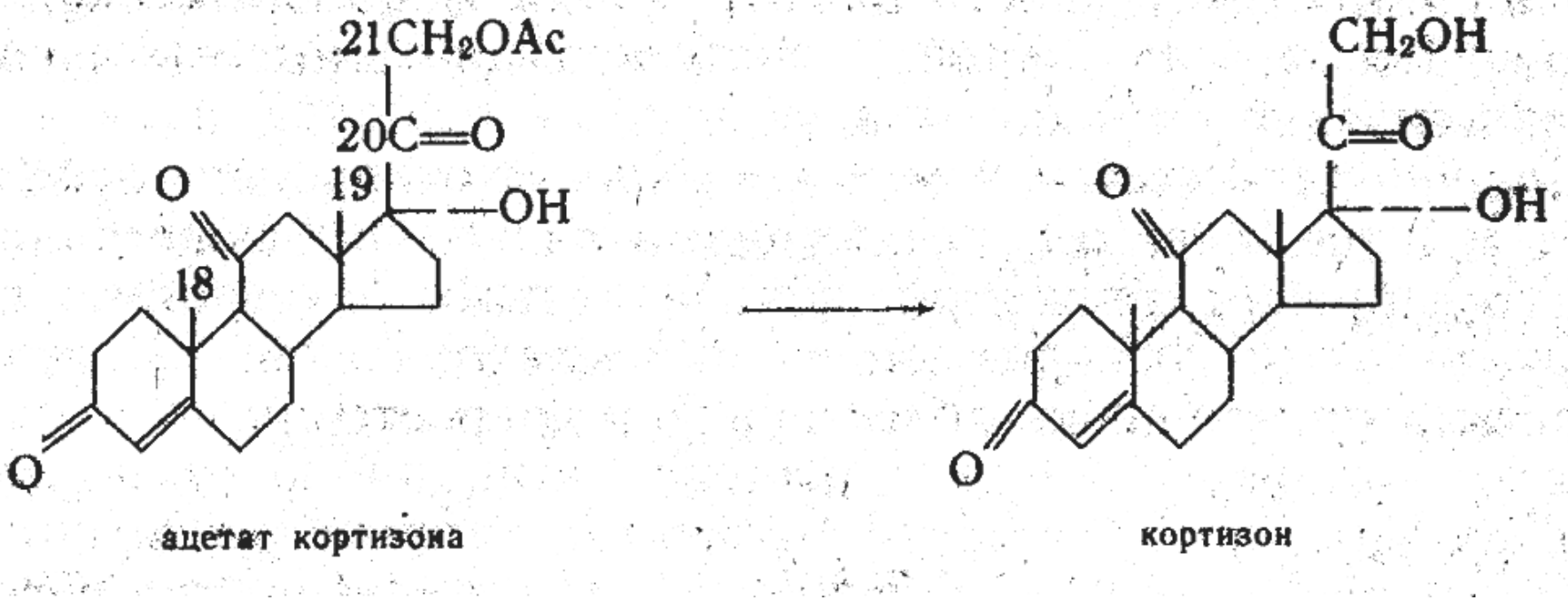
  Наиболее важными для практики являются окислительные превращения гидроксильных групп у 3,17 и 20-го атомов стероидной молекулы.

  Превращение гидроксильной группы в положении 3 легко осуществляется у стероидов с ненасыщенным кольцом А или при наличии двойной связи в положении 4.

  Введение в молекулу стероида кетогруппы также относится к этому типу превращений.



- ***Гидролиз эфиров стероидов.*** **Гидролиз ацильной группы легко осуществим и химическим путем, но при этом нередко появляются побочные нежелательные продукты. Биотехнологическим путем эта реакция проводится одновременно с гидроксилированием или дегидрогенизацией. Дезацилирующей способностью обладают микоформы, мукоровые и несовершенные грибы, актиномицеты.**



- ацетилирование (введение ацетильной группы CH_3CO)

Принципы и схема промышленного использования микробиологических трансформаций

Для микробиологических трансформаций используются чистые культуры микроорганизмов. Поэтому на всех стадиях технологического процесса предотвращают попадание в культуру и культуральную жидкость посторонней микрофлоры.

Выращивание культуры проводят путем трех последовательных пересевов на питательной среде, содержащей сахарозу, дрожжевой автолизат и комплекс минеральных веществ (для Curvularia lunata).

В сепараторе от полученной трансформирующей культуры отделяется мицелий и в виде водной суспензии смешивается с культуральной жидкостью, а затем переносится в ферментер для проведения основной реакции трансформации (вещества S).

Промышленного типа ферментер - это стальной аппарат, оборудованный аэрирующими и перемешивающими устройствами. Температура в нем поддерживается в пределах 24–33°С.



Питательную среду автоклавируют. Загрузку среды с трансформирующей культурой в ферментер производят передавливанием стерильным сжатым воздухом.

Стерины, предназначенные для окисления, вводят в среду в небольших концентрациях – около 1 г/л в растворителе (ацетоне, спирте, диметилформамиде). Для предотвращения роста посторонней микрофлоры нередко добавляют антибиотик.

В более высоких концентрациях стерины вносятся в виде мелкоизмельченной пудры или водной суспензии (до 140 г/л стерина).

Стерины используются микроорганизмами в качестве источника углерода. Добавление в питательную среду соевого, арахисового, рапсового и других масел повышает интенсивность роста микроорганизма и выход продукта трансформации.

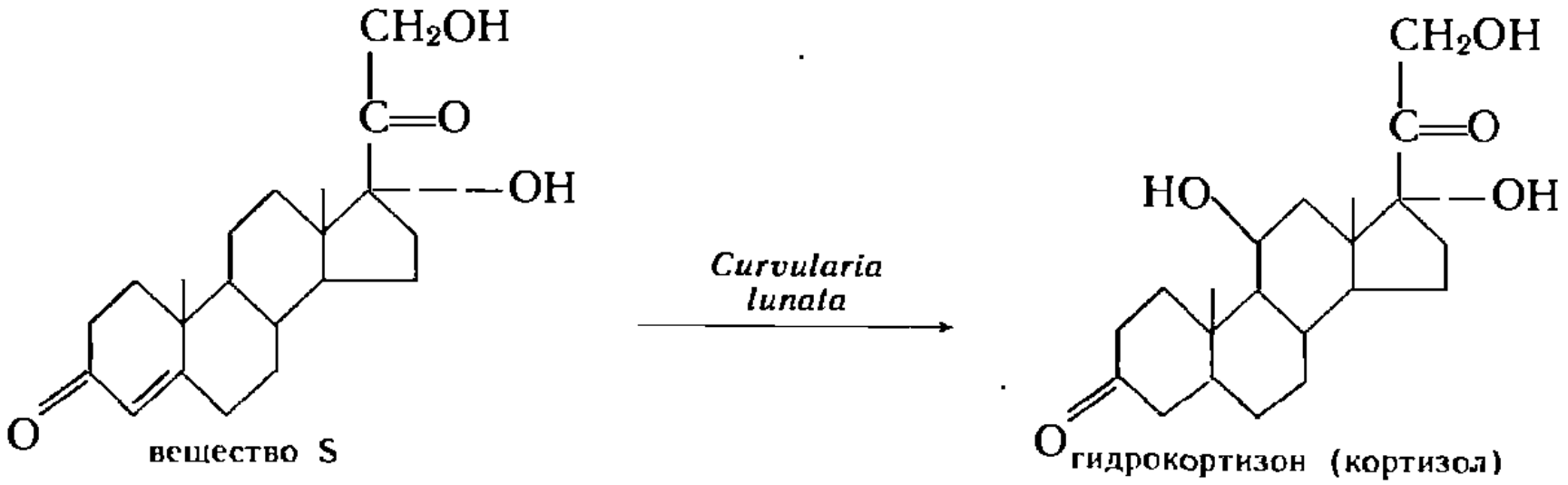
Контроль реакции трансформации осуществляется путем отбора проб и анализа их. Время роста культур микроорганизмов различно – от нескольких ч до нескольких суток. Максимальная трансформирующая активность наблюдается в период снижения скорости роста культуры.

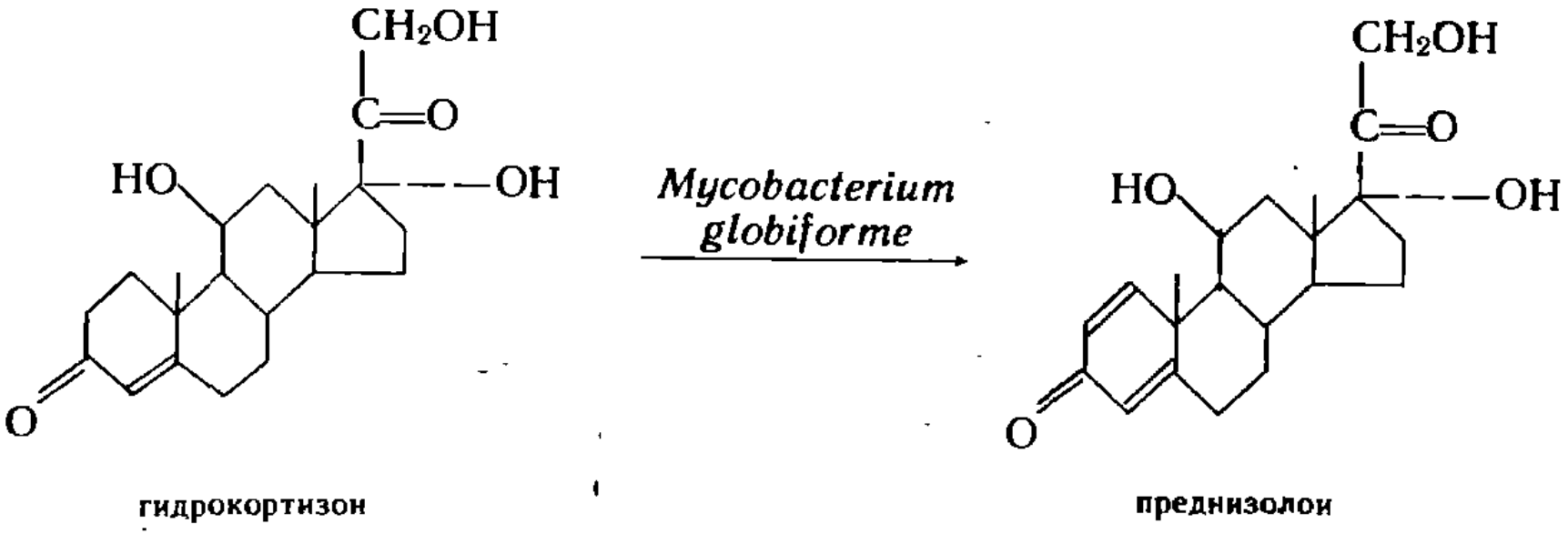
После завершения трансформации культуральную жидкость вместе мицелием сепарируют. Отделенный мицелий промывают водой. Основную и промывную жидкость смешивают.

Из нее органическим растворителем производят экстракцию-сепарацию продукта трансформации (гидрокортизона).

Экстракт осветляют активированным углем, затем упаривают с различными растворителями, опять осветляют и упаривают досуха и, наконец, промывают растворителем.

Для получения преднизолона осуществляют микробиологическое восстановление вещества S с помощью Curvularia lunata в гидрокортизон (кортизол), а затем таким же способом трансформируют гидрокортизон в преднизолон с помощью Mycobacterium globiforme.





гидрокортизон

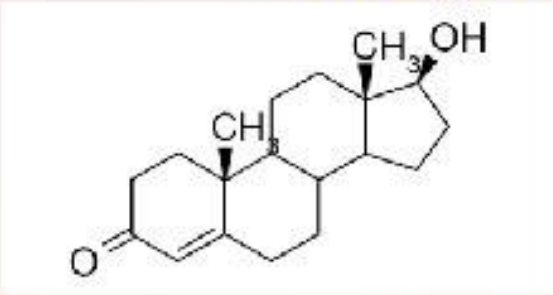
преднизолон

Трансформация гидрокортизона в преднизолон

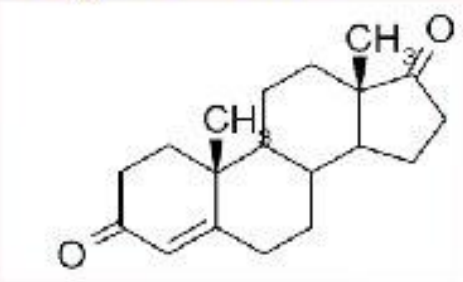
Препараты обладают противовоспалительными, противошоковыми и противоаллергическими свойствами

- **Другой важной группой соединений, модифицируемых с помощью микробов, являются андростаны и эстраны. Их используют в промышленном синтезе половых гормонов.**
- **Примером таких превращений служит превращение дрожжами 4-андростен-3,17-диона в тестостерон.**

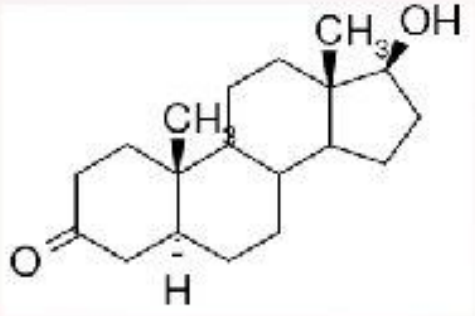
Андрогенные стероиды



Тестостерон
17β-гидроксиандрост-4-ен-3-он



Андростендион
Андрост-4-ен-3,17-дион



5α-дигидротестостерон
17β-гидрокси-5β-андростан-3-он

© 2007, В.Г.Зайцев

2. Гормональные препараты и их применение

Индуцирование родов

У кобыл **роды индуцируют не ранее 320 дней.**

Если у кобылы шейка матки созревшая, то можно ввести 120 ЕД окситоцина. Роды наступят через 15–60 мин.

Если шейка матки не созревшая, то сначала вводят 30 мг стильбэстрола дипропионата, а через 12–24 часа – окситоцин. Через 10–15 минут после инъекции окситоцина желательно провести вагинальное исследование.

После индуцированных таким образом родов возможно задержание последа, особенно если доза окситоцина уменьшена до 60 мг.

У коров **роды стимулируют не ранее 270-го дня для того:**

- **чтобы быстрее перевести животных на пастбищное содержание;**
- **снизить живую массу телят и число случаев патологических родов (масса плода у многорожавших фризских животных в пределах 42–45 кг; у ангусов и герефордов около 40 кг; у двухлетних шароле 35 кг, у трехлетних – 40–45 кг);**
- **чтобы в момент индуцированных родов присутствовал квалифицированный специалист**
- **при ряде заболеваний, которые угрожают жизни животному (гидраллантоис, залеживание и др.);**
- **в случае вынужденного убоя животных в конце стельности, чтобы не потерять теленка.**

Для синхронизации родов чаще используют кортикостероиды.

Синтетические препараты по длительности действия делят на три категории:

длительного,

среднего и

короткого действия.

После их инъекции роды наступают соответственно через 11–18, 5–11 и 1–6 дней.

Коровам породы шароле необходимо ввести 35 мг бетаметазона.

Кортикостероиды обладают иммуносуппрессивным действием и при наличии инфекции их следует применять в комплексе с антибиотиками широкого спектра действия.

Регуляция полового цикла

- ***Прогестерон кристаллический*** **получают из сапогенинов растений, растворим в этиловом спирту и растительных маслах. Для подкожных и внутримышечных инъекций применяется в виде 1- или 2,5 %-ного масляного раствора, расфасованного в ампулы по 1 мл.**

Прогестерон задерживает наступление течки и охоты и может быть использован для синхронизации половых циклов, предупреждения гибели зародышей и сохранения беременности, для лечения животных с заболеваниями яичников. Доза коровам (внутримышечно) 60–125 мг, свиньям – 30–40 мг.

- **PRID *(progesterone-releasing intravaginal device)* – прогестерон-выделяющее внутривлагалищное устройство в виде спирали; содержит 1,55 г прогестерона и дополнительно 10 мг эфира эстрадиола, который обладает слабым лютеолитическим действием.**

  Используется для синхронизации охоты у коров и телок, при истинном анэструсе (гипофункции яичников). Вводится на 12 дней во влагалище. За 24 часа до извлечения устройства делается инъекция простагландина. Охота наблюдается через 2–5 дней после извлечения устройства.

- **Внутривлагалищное прогестерон-выделяющее устройство EASI-BREED "CIDR" содержит 1,38 г прогестерона; вводится во влагалище на 7–12 дней. Простагландин инъецируют в день извлечения устройства. Применяется в тех же целях, что и PRID.**

Синтетические прогестогены

- ***Оллитренболон*** **– жидкая субстанция, содержит 2,2 мг вещества в мл. Применяется кобылам для стимулирования половой цикличности, контроля сроков проявления или задержки охоты в случной сезон. Вводится с кормом в дозе 27,5–33 мг в течение 10 или 15 дней. Охота наступает в течение 8 дней после последней дачи, овуляция – через 7–13 дней.**
- ***Альтреногест*** **– суспензия, содержит 4 мг вещества в мл. Применяется для синхронизации половой охоты у свинок. Помещается на корм непосредственно в момент кормления животных. Скармливается в дозе 20 мг (5 мл) в течение 18 дней. Охота наступает через 2–3 дня.**

- ***"Крестар", Synchro-Mate B system*** **– включает имплантант (длина 1,9 см, диаметр 3 мм; содержит 3 мг синтетического прогестерона норгестамета) и 2 мл жидкости, содержащей 3 мг норгестамета и 5 мг эстрадиола бензоата.**

  Применяют только коровам мясных пород и телкам. Имплантант вводят под кожу снаружи в области корня уха, а жидкую часть препарата – внутримышечно.

  Инъецированный прогестерон действует немедленно и предотвращает овуляцию зрелых фолликулов, а имплантированный гормон тормозит созревание фолликулов в течение последующих 9 дней; эстрадиол способствует регрессии желтого тела, если оно имелось в яичниках в начале обработки.

  На 9-й день имплантант извлекают путем надреза кожи кончиком скалпеля.

- ***Флуорогестона ацетат*** **("Chronogest"), *медроксипрогестерона ацетат* ("Veramix", "Veramix Plus«) интравагинальные пессарии – используются для синхронизации полового цикла у овец и коз, чаще в комбинации с ГСЖК. Пессарии вводят в переднюю часть влагалища на 12–14 дней, ГСЖК инъецируют в момент извлечения пессариев.**
- ***Медроксипрогестерона ацетат*** **("Perlutex", таблетки) применяют для прерывания или задержки полового цикла у сук и кошек. Сукам дается препарат в дозах 10–20 мг в течение 4-х дней с момента появления кровянистых выделений, затем по 5–10 мг в последующие 12 дней; для задержки цикла – ежедневная дача в дозах 5–10 мг. Дозы для кошек–2,5 мг.**
- **Медроксипрогестерона ацетат ("Promone-E", для инъекций) применяют для задержки эструса у сук и предупреждения гиперплазии предстательной железы у кобелей. Сукам инъецируют подкожно 50–150 мг в период анэструса; самцам – 50–100 мг каждые 3–6 месяцев.**

- ***Депо-Промон*** **(медроксипрогестерона ацетат) применяют собакам и кошкам для задержки полового цикла. Инъецируют подкожно во вторую половину анэструса по 1 мл с 6-месячными интервалами у собак и с 4-месячными – у кошек.**
- ***Пролигестон для инъекций*** **("Covinan") применяется для прекращения или задержки эструса у сук и кошек. Сукам в начале проэструса вводится подкожно в дозе 100–600 мг, кошкам в начале проэструса или эструса – 100 мг. В таких же дозах используется этот препарат в конце периода анэструса для непродолжительной задержки полового цикла или же с интервалом в 3, 4, а затем 5 месяцев для задержки цикла в течение длительного периода.**

Применение прогестинов у сук и кошек может предрасполагать к развитию пиометры.

- ***Агофоллин*** **содержит в 1 мл эстрадиола дипропионата 1 мг. Выпускается во флаконах по 15 мл.**

При введении в организм эстрогены вызывают течку с ее обычными внешними признаками, но при отсутствии овуляции. У коров течка проявляется через 12-48 часов. После осеменения в период стимулированной течки и охоты оплодотворение не происходит.

Овуляция, а затем проявление нормальной половой цикличности возможны тогда, когда в яичниках в момент применения гормона имелись созревающие фолликулы. В таких случаях эстрогены стимулируют выброс овуляторных количеств ЛГ и овуляцию, которая могла быть и без применения их.

Рекомендуются эстрогены для

стимулирования созревания шейки матки у кобыл перед применением окситоцина;

при консервативном лечении задержания последа и эндометрита у коров в комплексе с другими гормональными препаратами или лекарственными средствами;

предотвращения беременности в течение 5 дней после спаривания у сук;

гиперплазии простаты у кобелей;

понижения гиперсексуальности у кобелей.

Дозы кобылам 3–6 мг, коровам – 3–5 мг; сукам для предотвращения беременности 5–10 мг (вызывает отек слизистой оболочки яйцепроводов и продвижение зигот); кобелям при гиперплазии простаты 1 мг в день.

- **Андрогены естественные или синтетические аналоги их применяются редко. Коммерческие препараты: метилтестостерон ("Orandrone", таблетки), тестостерона (фенил)пропионат для инъекций ("Androject) и тестостерона эфир для инъекций ("Durateston").**

Пропионат тестостерона активнее и обладает более продолжительным действием. Выпускают его в виде масляного раствора по 1 мл в ампуле в концентрации от 0,5 до 5%-ной.

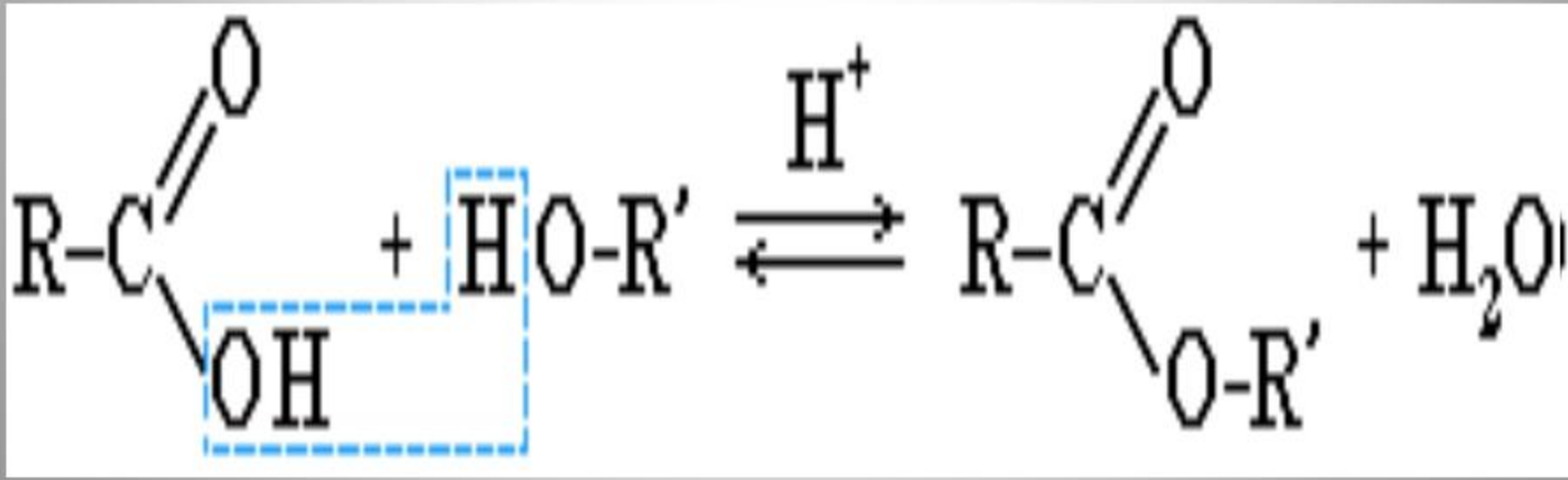
В низких количествах тестостерон у самцов усиливает половое влечение и благоприятно влияет на сперматогенез. В дозах, превышающих норму, блокирует секрецию гонадотропинов и вызывает прекращение сперматогенеза.

Применяют андрогены самцам при половом недоразвитии и функциональных нарушениях полового аппарата, а также при сосудистых и нервных расстройствах.

Андрогены обладают анаболическим эффектом и поэтому могут быть использованы при лечении ослабленных животных.

Реакция этерификации

реакции между спиртами и кислотами, в результате которых образуются сложные эфиры и выделяется вода (от лат. *ether* – эфир). *Катализаторами являются минеральные кислоты.*



Изомериза́ция, превращение химических соединений в соединения другого строения без изменения состава и молекулярной массы (т. е. в изомеры).

Технологическая биоэнергетика

Литература

1. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учебник / Ю. А. Горбунов, Г. Ф. Медведев, Н. Г. Минина и др.]; под ред. Ю. А. Горбунова. — Минск: ИВЦ Минфина, 2016. – 344 с.
2. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности «Зоотехния» / Ю. А. Горбунов, Г.Ф. Медведев, Н. Г. Минина [и др.]; под ред. Ю. А. Горбунова. — Минск: ИВЦ Минфина, 2010 – 288 с.
3. Биотехнология/ Под. Ред. Н. С. Егорова, В.Д.Самуилова. – М.: Высшая школа, 1987. - Т. 6. – С. 135.
4. Биотехнология: Учебник / И.В. Тихонов, Е. А. Рубан, Т. Н. Грязнева и др.; Под. ред. академика РАСХН Е. С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.
5. Сельскохозяйственная биотехнология./В.С. Шевелуха, С.В., Дегтярев, Г.М. Артамонова и др. – М.: Из-во МСХА, 1995.
7. Биотехнология. Принципы и применение/Под ред. И.Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
8. Basic Biotechnology. Third Edition. Edited Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen. Cambridge university press. 2006. P. 666.

1. **Утилизация навоза**
2. **Получение высококачественного топлива из биологического сырья (биомассы)**
3. **Получение биогаза. Сущность метангенеза**
4. **Использование получаемых продуктов и отходов ферментации**

1. Утилизация навоза

Традиционный путь утилизации **– использование для повышения плодородия почв.**

- **В навозной биомассе содержится азот, фосфор, калий (N, P, K) и органические вещества.**
- **Внесение навоза в почву увеличивает сбор наземной биомассы и способствует повышению биосинтетической активности автотрофных микроорганизмов.**

(*автотрофные* микроорганизмы способны сами синтезировать органические вещества)

Ограничения на повсеместное применение навоза в качестве удобрения связано с необходимостью соблюдения санитарно-гигиенических и экологических требований.

- **В навозе содержится ряд возбудителей заразных болезней, долго сохраняющихся во внешней среде.**
- **При длительном использовании жидкой фракции навоза свинокомплексов в почве накапливаются соли тяжелых металлов (меди и цинка др.), что связано с применением препаратов поросятам.**
- **В растительности увеличивается содержание нитратных форм азота, а**
- **расширение площадей для утилизации навоза увеличивает затраты на его транспортировку.**

Справочно. В свином навозе сухих веществ 1–10 %. На комплексе с поголовьем 24 тыс. количество твердой фракции и ила и жидкой фракции 23 и 110 тыс. т в год.

Утилизация навоза возможна путем:

- ***минерализации органических веществ в почве или водоемах (*требуются большие капиталовложения и затраты энергии);**
- **при переработке отходов *в результате жизнедеятельности микроорганизмов* образуется активный ил с высоким содержанием микробного белка, который можно использовать для скота.**

В сухой массе такого корма неочищенный белок составляет 30–40 %.

Включение переработанного навоза в рацион животных практиковалось, **но**

- **в продукции накапливались ксенобиотики (тяжелые металлы, антибиотики и др. вещества с токсическим действием);**
- **требовались затраты на переработку навоза (высушивание, обеззараживание, измельчение);**
- **возникали социально-психологические проблемы при применении навоза в корм.**

- **Справочно: На свинокомплексе с поголовьем 30 тыс. при откорме ежедневно выделяется в виде навоза 12,6 т сухого вещества.**
- **В надосадочную жидкость (243 м^3) переходит 10,8 т сухого вещества, а 1,8 т его сосредоточивается в нерастворимой фракции.**
- **Из сухого вещества жидкой фракции в течение суток образуется 15200 кг биомассы, или 3800 кг сухого вещества, в котором содержится 1900 кг протеина.**
- **Полученный продукт можно использовать в корм рыбам.**
- **При условии удаления из него тяжелых металлов возможно использование и в корм скоту.**

Ограничения в утилизации навоза традиционными методами стимулировали разработку биотехнологических способов использования его в качестве сырья (биомассы) для получения энергетических и других веществ.

2. Получение высококачественного топлива из биомассы

- ***Биомасса*** **– биологические отходы с.-х. производства или пищевой промышленности, или растения, выращенные для получения топлива и веществ специального назначения.**
- **Биомасса – возобновляемый источник энергии.**

Справочно. В течение года производится столько биомассы, из которой можно получить 26,65 ТВт (тера ватт) энергии, что почти в 3 раза превышает количество электроэнергии, которое было потреблено в мире в 1981 г.

В начале 80-х годов за счет трансформации аккумулированной биомассой солнечной энергии было получено почти 700 млрд. кВт часов энергии.

-

Накопление энергии в биомассе происходит в результате фотосинтеза, а превращение ее в ценное топливо – путем ферментации.

Задачи биотехнологии в этой области:

- **выведение сортов растений с высокой урожайностью,**
- **создание новых форм микроорганизмов для получения доступной энергии и**
- **комбинированных систем, включающих растения, микроорганизмы и животных.**

- **Справочно: Получение топлива по схеме: биомасса – биотехнология основывается на сочетании фотосинтеза, кормопроизводства и животноводства и ферментации с использованием соответствующих микроорганизмов.**

В этой системе единственным поставщиком энергии является солнечный свет.

Солнечная энергия поступает неравномерно и диффузно. Поэтому необходимы:

- **системы накопления, которые могут обеспечить расходование ее по потребности и**
- **иметь коллекторы большой площади.**

<u>Производство биомассы решает эти проблемы:</u>

- **в получаемом продукте солнечная энергия запасается в форме органических веществ и**
- **ее можно хранить во времени и перемещать в пространстве;**
- **коллекторы можно создавать из семян на больших площадях.**

Эффективность использования солнечной энергии низкая. Для получения богатого энергией сырья необходимо:

- **осуществить его сбор, перевозку, удаление воды и уменьшение объема, или же**
- **химическую, механическую или биологическую переработку и упаковку;**
- **вид получаемого топлива должен быть совместим с предназначенной технологией, а**
- **количество запасенной солнечной энергии в конечном продукте не должно быть меньше той энергии из других источников, которую затрачивают на превращение ее в желательную форму.**

Справочно. Однако не всегда вопросы экономики главные. Большое значение имеет само обеспечение энергией, занятость людей и т.д.

Многие системы дают относительно небольшой энергетический доход, а нередко в них энергия теряется. Это относится и к процессу получения биогаза из навоза.

3. Получение биогаза. Сущность метангенеза

- **Образование биогаза (метана) происходит в результате жизнедеятельности микроорганизмов, которые используют любые органические вещества.**

В связи с этим может быть использована биомасса различного состава.

- **Метан генерирующие бактерии (метаногены) наиболее древние бактерии. В качестве субстрата они используют углекислый газ и водород.**

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O + \text{Энергия}$$

Ряд таких бактерий может использовать для образования метана окись углерода.

$$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + \text{Энергия}$$

$$CO + 3H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O + \text{Энергия}$$

Сущность метаногенеза

Процесс образования метана (метаногенеза) происходит в 3 этапа.

- **На первом этапе в результате воздействия гидролаз анаэробных не спорообразующих бактерий происходит разложение высокомолекулярных веществ (углеводов, белков и нуклеиновых кислот, липидов) до:**
- **моно- и олигосахаридов,**
- **аминокислот и пептидов, азотистых оснований,**
- **глицерина и различных карбоновых кислот, а также**
- **диоксида углерода (CO_2) и водорода.**

- **Гидролазы – катализируют разрыв химической связи с присоединением элементов молекулы воды**

На втором этапе:

- **из выделенных на 1-м этапе продуктов (кроме уксусной кислоты, CO_2 и водорода) под воздействием кислотообразующих микроорганизмов образуются органические кислоты, которые затем окисляются до ацетата и CO_2;**
- **на этой стадии образуются также водород, аммиак и сероводород.**

На третьем этапе:

- **органические вещества превращаются в CH_4 и CO_2.**
- **Реакции протекают при участии ферментов анаэробных споро- и не спорообразующих сарцино- и сарциноподобных микроорганизмов.**
- **Метанобразующие бактерии растут медленно и они очень чувствительны к резким изменениям загрузки реактора и накоплению водорода.**
- **Угнетает активность метанообразующих бактерий и накопление углекислого газа и сероводорода.**
- **Для увеличения метаногенной активности бактерий используют методы отбора и методы генетической инженерии.**

- **Продолжительность процесса ферментации биомассы в условиях биогазовой установки при температуре 30–37 °С около 1 мес. или более.**
- **На 1 кг сухого вещества биомассы получают в среднем 0,4–0,6 м^3 биогаза.**
- **Не все сухое вещество биомассы трансформируется в биогаз, а только 40–50 %.**
- **Из биомассы куриного помета выход биогаза выше, чем из навоза крупного рогатого скота и свиней.**

- **Справочно. При проектировании биогазовых установок учитывают, что от одной коровы живой массой 500 кг можно получить в сутки с навозом до 4,8 кг сухого органического вещества.**
- **При переработке месячного количества его в реакторе образуется 1,0–2,4 м^3 биогаза.**
- **Такое количество его можно получить из навоза, производимого в течение суток 9 свиньями на откорме (живая масса 60 кг) или 5 свиноматками.**

Свойства биогаза

- **Биогаз содержит до 60–70 % метана, 30–40 % диоксида углерода (CO_2), немного сероводорода и примеси водорода, аммиака (NH_3), оксидов азота.**
- **При высоком содержании в биомассе клетчатки в составе биогаза образуются равные количества метана и CO_2;**
- **увеличение азотсодержащих веществ и жира приводит к повышению содержания метана и уменьшению содержания CO_2.**
- **Энергетическая ценность биогаза с содержанием 50 % метана – 17,8 МДж/м^3, а при 70 % – до 25 МДж/ м^3; природного газа и жидкого топлива соответственно 34 и 42 МДж в расчете на м^3 или 1 кг.**
- **Получаемый биогаз используется для приготовления пищи, как источник тепла и света или же преобразуется в электрическую энергию, что наиболее выгодно.**

Обеспечивают высокое содержание метана (до 75 %) в биогазе:

- **соблюдение биотехнологического режима ферментации и**
- **оптимальный состав биомассы (концентрация сухих веществ в среде 10–12 %).**

В таком субстрате происходит свободное перемешивание жидкости с частицами навозной биомассы, микробными клетками и пузырьками газа.

- **Увеличение вязкости субстрата и содержания сухих веществ препятствует свободному перемешиванию, ухудшает условия для ферментации и снижает выход биогаза.**
- **Наиболее благоприятным соотношением C:N в среде 10–30:1.**

- **При температуре 54–55°С скорость образования биогаза в 2,5–3 раза выше, чем при температуре 32–35°С; однако доля метана при этом снижается.**
- **Поддержание температуры в пределах 30–35°С в биотехнологическом процессе анаэробной ферментации более экономично.**
- **Имеет значение и pH среды: оптимальная реакция в пределах 6,8–7,4.**

Резервуар хранения биоотходов



Мешалка с приводом от электродвигателя



Биогазовая установка
ОАО «Гомельская птицефабрика»



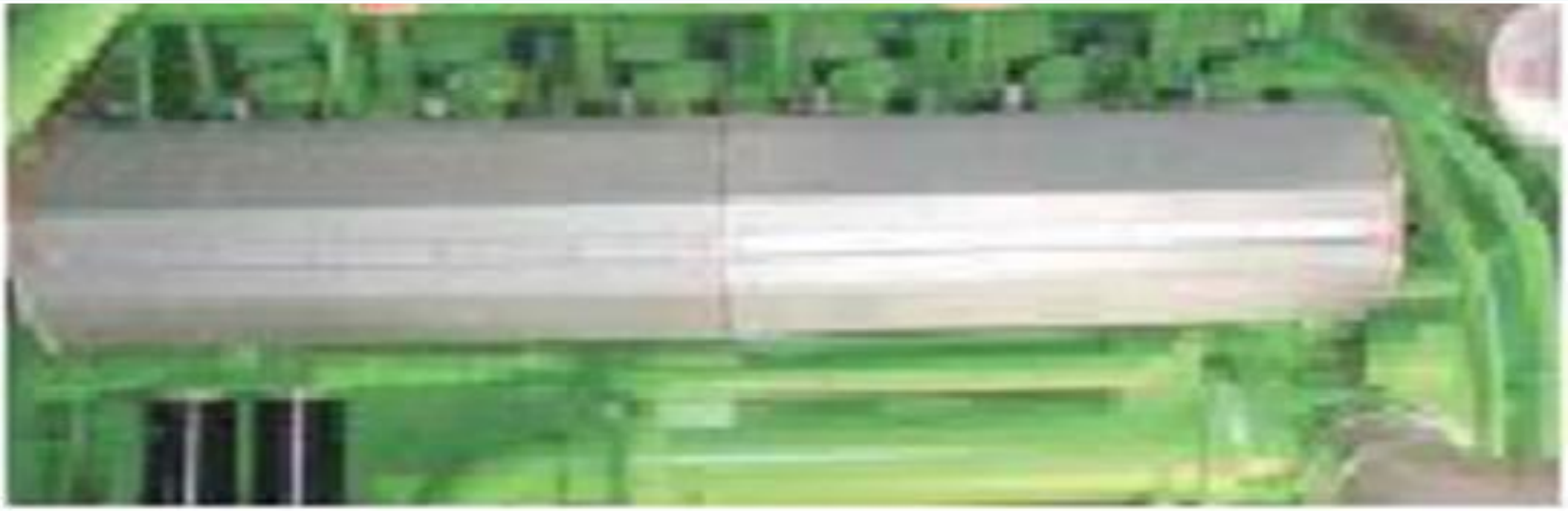
Реактор (ферментатор)



Теплоэлектрогенератор



Теплоэлектрогенератор



Насосная станция



Биотходы с биогазовой установки



Чаши для хранения жидких удобрений





На задней левой конечности красная повязка – мастит. Молоко от маститных коров уничтожается.

Подстилка – переработанный навоз.






Jenbacher
gas engines

4. Использование получаемых продуктов и отходов ферментации

- **При ферментации биомассы уменьшается в шламе содержание сухого органического вещества на 50 % за счет включения 10–15 % углерода в микробную биомассу, метан и углекислый газ.**
- **Остающиеся в шламе калий и фосфор и другие питательные вещества приобретают более доступную для растений форму, чем в навозе.**
- **Все это определяет шлам как высококачественное органическое удобрение.**

Надосадочная жидкость, как и шлам,

- **не имеет неприятного запаха,**
- **содержит меньше органических веществ, чем до момента ферментации (на 80 %);**
- **биологическая потребность в кислороде также ниже, поэтому**
- **ее можно спускать в канализационную сеть или водоемы.**

- **В некоторых странах навоз после механической обработки идет на выращивание гидробионтов. Быстро накопливается биомасса и в последующем выход биогаза увеличивается на 40–50 %.**

В Московском университете в 1980 году была создана экспериментальная бисолярная установка по производству биомассы микро водорослей и последующей трансформации ее в метан.

- ***Практическая реализация получения биогаза***

  В последние годы во многих странах мира уделяется большое внимание переработке биомассы (навоза) с помощью биогазовых установок.

  При этом решается вопрос безотходного производства и защиты окружающей среды и получения экологически чистого энергоносителя (биогаза).

  С учетом естественных климатических условий разработаны и используются несколько типов таких установок.

- **В наиболее простых установках, которые функционируют в странах с жарким климатом, сбраживаемая масса не подогревается и не перемешивается.**
- **Метантенк (камера для сбраживания) с полезным объемом 8–10 м^3 и газгольдер (емкость для сбора газа) в ней заглублены в землю и совмещены. Регулировка и контроль за процессом ферментации отсутствуют.**
- **Биомасса сбраживается в течение 40 дней или более. На 1 м ^{3} объема камеры получают около 0,3–0,5 м^3 биогаза.**
- **Иногда используются на фермах крупного рогатого скота до 100 голов. Выход биогаза за сутки на голову до 1,5 м^3**

- **В Китае количество таких установок ("Габор") превышает 7 млн. Получаемый на них биогаз используется для бытовых целей (освещения, приготовления пищи).**
- **На более крупных установках, которых более 35 тыс., вырабатываемый биогаз используют для получения электроэнергии.**
- **Небольшие биогазовые установки типа "Габор" используются широко и в Индии. Там их насчитывается до 100 тыс. Производительность - 1,72 м ^{3} биогаза в сутки.**
- **Созданы и более мощные установки производительностью 142 м^3 биогаза в сутки.**
-

Современная биогазовая установка состоит из:

- **емкости для сбора и хранения навоза,**
- **ферментера (реактор, метантенк, бродильная камера),**
- **резервуара для биогаза (газголдер, газосборник),**
- **устройств для нагревания и перемешивания,**
- **насосов, газовых компрессоров и трубопроводов,**
- **центрифужных устройств,**
- **контрольно-измерительных приборов, средств автоматизации.**
- **Разработанные и используемые современные модели биогазоавых установок типа "Дормштадт", "Липп", "Райки", "МББ", "БИМА" (Германия) позволяют получать биогаза в 4–15 раз больше из расчета на 1 $м^3$ объема, чем в установках "Габор".**


Реактор
Газгольдер
Утеплитель
Балочный свод
Шнековый загрузчик твердого сырья
Биогаз
Перемешивающее устройство
Ферма
Насосная станция
Отвод переброженой массы
Подогрев реактора теплой водой
Когенерационный блок
Отходящие газы
Конденсато-отводчик
Емкость сбора и гомогенизации жидкого сырья
Блок автоматики
Тепло на технологические нужды, отопление
Электроэнергия
www.zorg.ua

В реакторы современных установок при непрерывной (проточной) схеме

- **подготовленная биомасса подается непрерывно или через небольшие интервалы (до 10 раз в сутки), а часть перебродившей удаляется;**
- **объемы загружаемого и перебродившего навоза должны быть одинаковы.**
- **Остающаяся часть шлама служит затравкой, благодаря которой через несколько дней начинается метаногенез. Интенсивность его нарастает и после достижения максимума, снижается.**
- **Для равномерного и непрерывного получения биогаза необходимо иметь несколько объединенных в один блок реакторов.**

- **Для периодического заполнения реакторов требуются запасы навоза в навозохранилище.**
- **При выгрузке шлама из реакторов предотвращение попадания воздуха в них достигается за счет заполнения биогазом.**
- **Загружаемый в камеру навоз подогревают до необходимой температуры.**
- **Для подогревания используют тепло выгружаемого шлама.**

- **Биогазовые установки работают в Швейцарии (около 100), во Франции (60), в Англии (50), в Японии (10).**
- **В США построены БГУ средних (с объемом бродильной камеры 100-190 м^3) и крупных размеров, способные перерабатывать до 500 т и более навоза с ежедневным выходом биогаза 43,2-73 тыс. м^3.**
- **В 1973 г. в Чехословакии была введена в эксплуатацию БГУ с объемом двух бродильных камер 6 тыс. м^3. В качестве биомассы используется свиной навоз и осадок городских сточных вод.**
- **На установке в течение года производят более 3 тыс. т удобрений, 6 т серы и 70 тыс. м^3 воды, которую используют для полива.**

- **Несколько установок работает в Венгрии, Болгарии, на которых суточный выход биогаза достигает 1000 м^3, что по энергетической ценности равно 600 л дизельного топлива.**
- **Экспериментальные установки были построены и в странах СНГ. В совхозе "Рассвет" Запорожской области в биогазовой установке на 1 м^3 бродильной камеры производят 3 м^3 биогаза**

- **Первый двигатель Рудольфа Дизеля работал на арахисовом масле. Солярка из нефти стала для него топливом уже после смерти изобретателя.**
- **В 19 веке рапсовым маслом заправляли фонари. Из рапсового масла производят и биодизель. Для этого масло варят при высокой температуре с метанолом и щелочью. В верхней части собирается биотопливо, а вниз оседает глицерин.**
- **Дизельному «Фольксфагену» мощностью 120 лс на 100 км понадобится 5 л биотоплива.**
- **В настоящее время во многих странах наряду с дизтопливом продается и биотопливо. Применяется только рафинированное масло. В двигателе вместо резиновых топливных трубок и сальников используются силиконовые.**
-





Технология получения дизельного биотоплива из рапсового масла

Характеристики биотоплива:

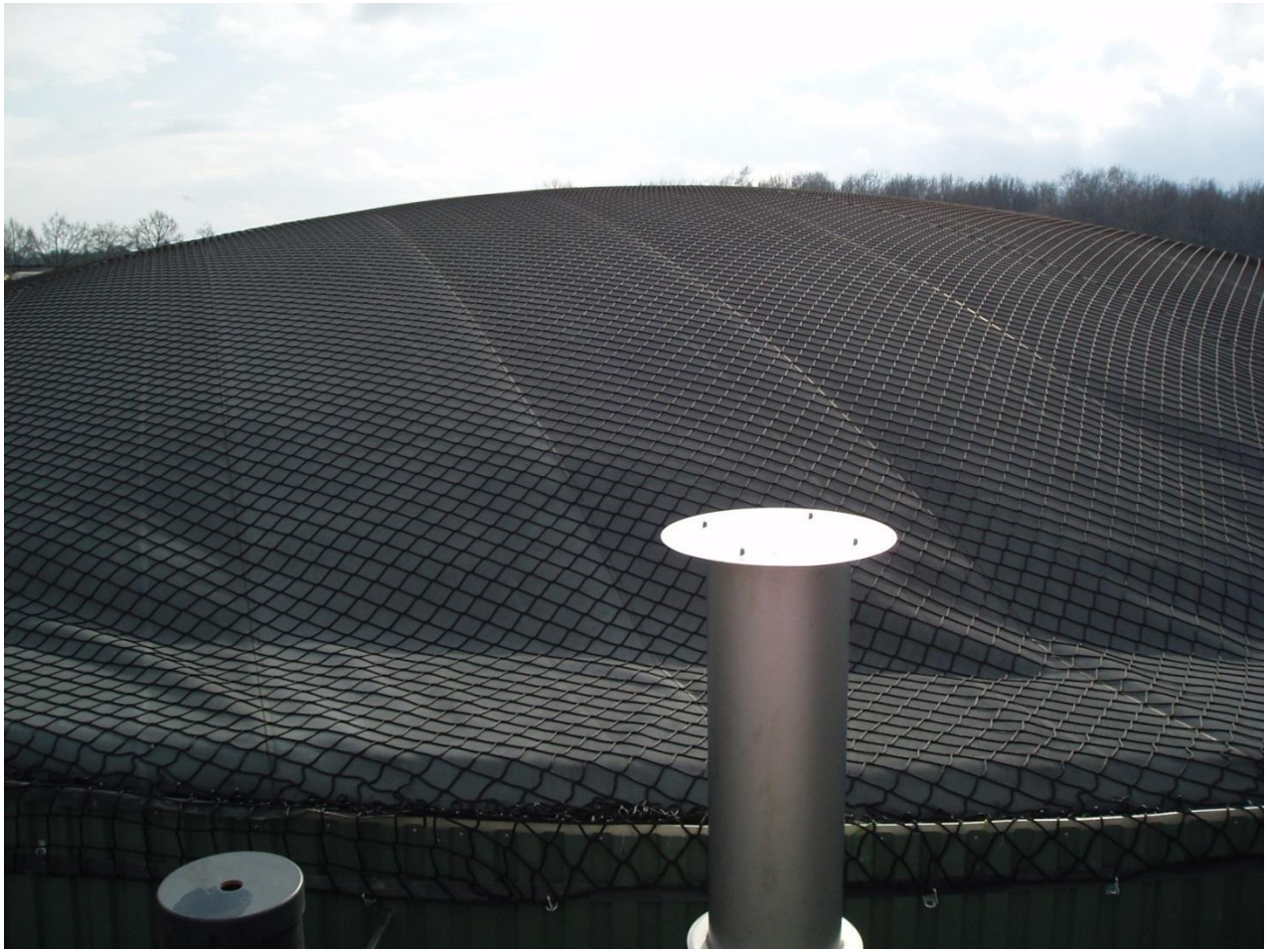
- представляет собой смесь метиловых эфиров высших жирных кислот (более 90%, составляют эфиры олеиновой, линолевой и пальмитиновой кислот) вязкая жидкость светло-желтого цвета
- легко растворимо в неполярных и хлорированных органических растворителях мало растворимо в воде

Преимущества биотоплива и технологии его получения:

- **использование возобновляемого сырья (рапса) для получения основного компонента**
- **получение ценных сопутствующих продуктов: твердого топлива, жмыха для приготовления кормов, технического мыла, глицерина**
- **небольшое количество сточных вод**
- **отсутствие вредных газообразных выбросов**
- **технология получения биотоплива является материало- и ресурсосберегающей**

Биоэтанол конкурент бензину. В ряде стран производится для двигателей автомобилей.

- **В Бразилии его получают из сахарного тростника и кукурузы.**
- **В Европе большая часть этанола применяется в качестве добавки к дизтопливу и только 15% его идет для приготовления спиртных напитков.**
- **Биодизель. В Малайзии планировалось строительство 52 заводов по производству биодизеля из пальмового масла.**
- **На Украине планировалось построить 20 заводов по производству биодизеля (623 тысячи тонн).**
- **К 2010 г. ожидалось, что 2 млн. автомобилей будет работать на биодизеле.**
- **В США на 1000 энергетических объектах в качестве топлива используется древесина из гибрида тополя и ивы. Это дерево за год вырастает до 5 м.**






Реактор
Газгольдер
Утеплитель
Балочный свод
Шнековый загрузчик твердого сырья
Биогаз
Перемешивающее устройство
Ферма
Насосная станция
Отвод переброженой массы
Подогрев реактора теплой водой
Когенерационный блок
Отходящие газы
Конденсато-отводчик
Блок автоматики
Емкость сбора и гомогенизации жидкого сырья
Тепло на технологические нужды, отопление
Электроэнергия
www.zorg.ua










БИОГАЗ
БИОГАЗ

Зорг Украина Адрес: ул. Владимирская 81-а,офис 4, Киев, 01033



Применение стероидных гормонов

Половые (гонадальные) гормоны:

прогестины

андрогены

эстрогены

- ***Прогестерон*** **секретируется желтым телом, в небольших количествах фолликулом перед овуляцией, надпочечниками и плацентой.**

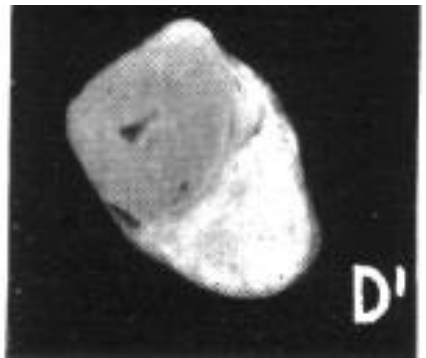
Действует на матку, увеличивает активность желез эндометрия и они выделяют *маточное молоко*. Это способствует прикреплению и питанию зародыша.

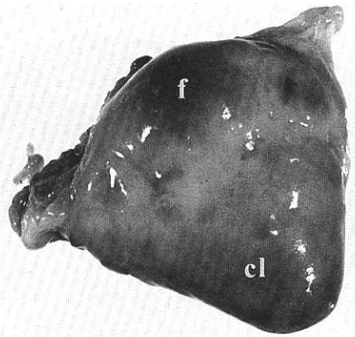
Шейка матки выделяет густую слизь, которая закупоривает ее канал.

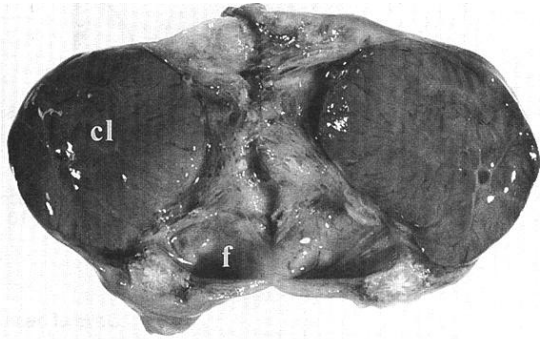
Под влиянием прогестерона сократительная функция матки и чувствительность ее к раздражителям понижаются, происходит ее растяжение растущим плодом.

Прогестерон тормозит развитие фолликулов и овуляцию, стимулирует развитие альвеол и долек в вымени.









Яичник коровы с желтым телом

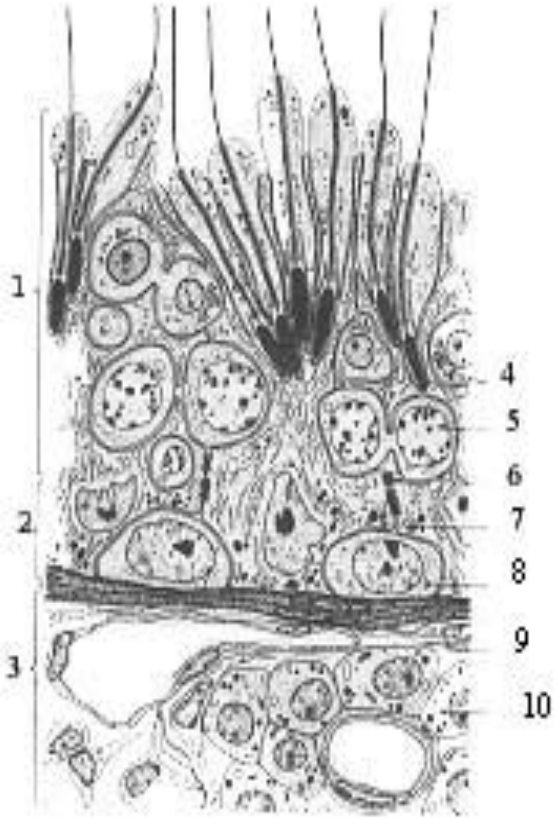
Прогестерон превращается в

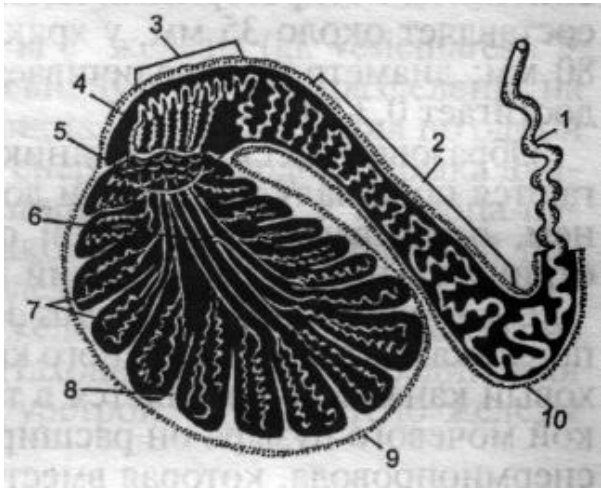
- **андрогены.**

В семенниках клетками Лейдига и Сертоли секретируется *тестостерон*.

Совместно с ФСГ, этот гормон стимулирует размножение сперматогоний и образование сперматозоидов.

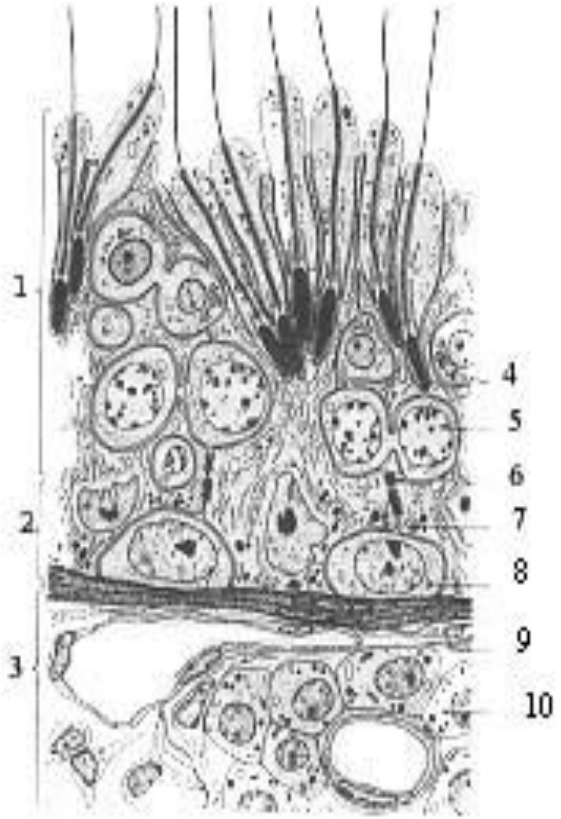
Тестостерон влияет на развитие и функционирование придатка семенника, семяпроводов, уретры, придаточных половых желез.

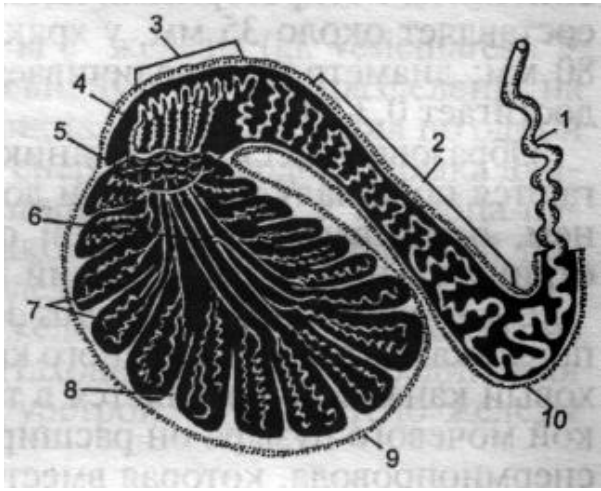




Посредством влияния на обмен веществ андрогены
***стимулируют рост волос,**
***характерное телосложение и**
***развитие у самцов голосовых связок, обусловливающее более низкий голос (вторичные половые признаки).**

Половое влечение (libido) у самцов и самок, и агрессивность у самцов зависят от андрогенов.



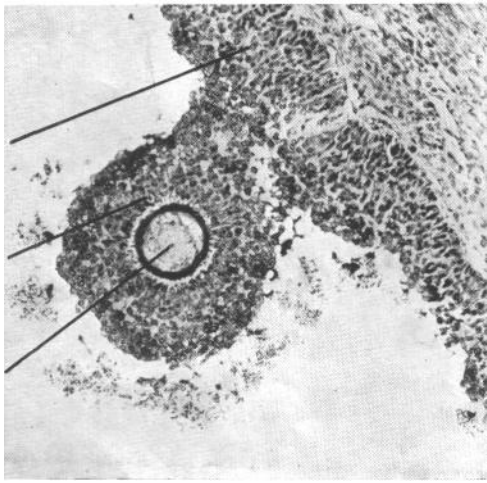


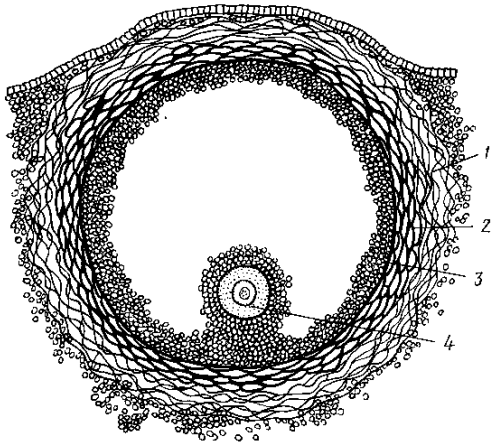
Андрогены превращаются в *эстрогены*: эстрон, 17α- и 17β-эстрадиол (наиболее активный), эстриол.

Секретируются эти гормоны фолликулами,

- **плацентой,**
- **в небольших количествах надпочечниками и**
- **семенниками.**

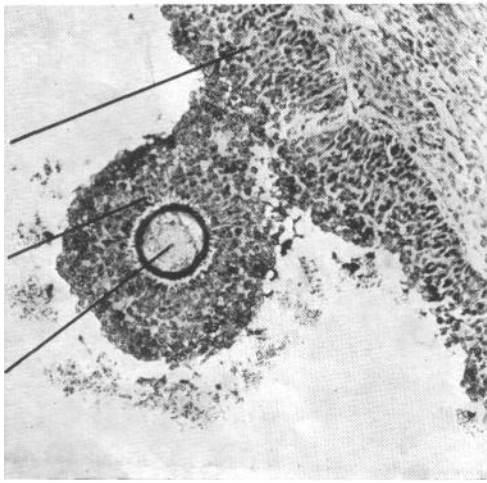
Накапливаются эстрогены в фолликулярной жидкости и из нее попадают к половым органам.

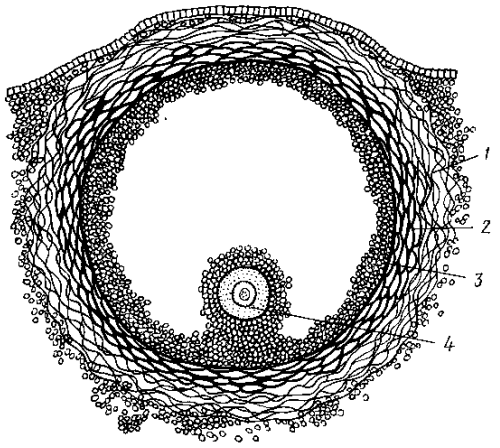




Эстрогены

- усиливают кровообращение в половых органах,
- стимулируют рост слизистых оболочек матки и влагалища и секрецию слизи,
- способствуют разрастанию миометрия и усиливают сократительную функцию его;
- повышают устойчивость матки к инфекции.
- Эстрогены вызывают половую охоту.
- Они играют важную роль в наступлении предродовых изменений в половых органах,
- стимулируют развитие молочных протоков вымени.





Прогестины

При введении в организм экзогенного прогестерона в течение длительного периода (до 16–19 дней) задерживается наступление течки и охоты, но желтое тело регрессирует, половые центры сенсибилизируются к эндогенным или введенным извне гонадотропинам.

После прекращения введения гестагена следует периодическое выделение ГнРГ, который вызывает выделение гонадотропинов и через 2–6 дней проявляется охота. Наступление ее можно ускорить введением ГСЖК.

- **Норгестамет вводят (имплантируют) подкожно снаружи в области корня уха в дозе 6 мг на 8–12 дней с последующей инъекцией простагландина за 24 часа до извлечения имплантата.**

В начале обработки дополнительно делают инъекцию эстрадиола валерата (5 мг). После удаления имплантата охота наступает через 24–120 часов (чаще через одни–двое суток) у 80% или более животных.

Осеменяют в фиксированное время через 48 и 72 часа. Нередко простагландин в такую схему обработки животных не включают.

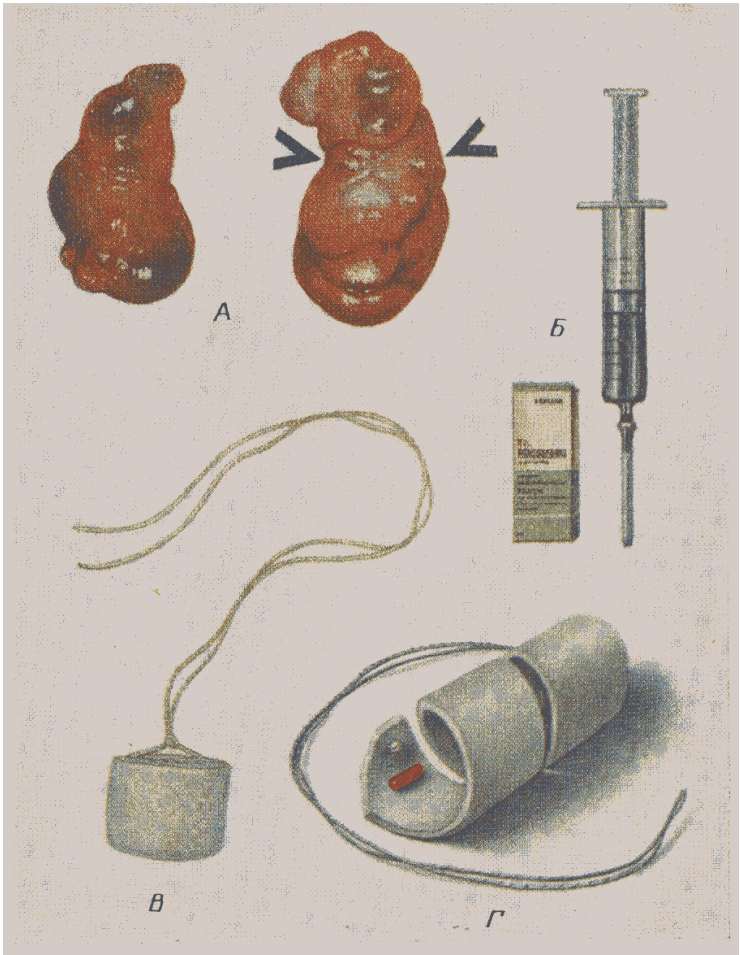
- **"Крестар", Synchro-Mate B system – включает имплантат (длина 1,9 см, диаметр 3 мм; содержит 3 мг синтетического прогестерона норгестамета) и 2 мл жидкости, содержащей 3 мг норгестамета и 5 мг эстрадиола бензоата.**
- **Этот препарат применяют коровам мясных пород и телкам. Имплантат вводят под кожу снаружи в области корня уха на 10 или 9 дней, а жидкую часть препарата - внутримышечно.**
- **Лактирующим коровам, молоко которых используется в пищу людям, применять нельзя.**

Инъецированный прогестерон действует немедленно и предотвращает овуляцию зрелых фолликулов, а имплантированный гормон тормозит созревание фолликулов в течение последующих 9 дней;

эстрадиол способствует регрессии желтого тела, если оно имелось в яичниках в начале обработки. На 9-й день имплантат извлекают путем надреза кожи кончиком скальпеля.

Осеменяют животных также через 48 и 72 часа после извлечения трансплантата.

По данным Wishart and Drew (1977) процент стельности составил 66,2 при осеменении через 48 и 60 часов, 62,1 – через 48 и 72 часа и 65,7 – при однократном осеменении через 54 часа.


А
Б
В
Г

- **Внутривлагалищно прогестины вводят в виде металлической спирали, покрытой импрегнированной прогестероном селиконовой трубкой (внутривлагалищные пргестерон-выделяющие устройства - PRID, EASI-BREED "CIDR"), или специальных пессариев, пропитанных 3 г прогестерона или 200 мг флюорогестона ацетата (кронолона) с помощью специального влагалищного зеркала (расширителя).**

  Слизистая оболочка влагалища абсорбирует прогестерон из устройства и в организме поддерживается высокая концентрация его (как во время диэструса) в течение всего периода обработки. PRID вводится на 12 дней; иногда дополнительно инъецируется эстрадиола бензоат.

- **PRID *(progesterone-releasing intravaginal device)* - прогестерон-выделяющее внутривлагалищное устройство в виде спирали; содержит 1,55 г прогестерона и дополнительно 10 мг эфира эстрадиола, который обладает слабым лютеолитическим действием.**
- **Используется для синхронизации охоты у коров и телок (предпочтительнее в комплексе с простагландином), при истинном анэструсе (гипофункции яичников).**
- **Вводится на 12 дней во влагалище.**
- **За 24 часа до извлечения устройства делается инъекция простагландина.**
- **Охота наблюдается через 2–5 дней после извлечения устройства.**

- **Внутривлагалищное прогестерон-выделяющее устройство EASI-BREED "CIDR" содержит 1,9 г прогестерона; вводится во влагалище на 7-12 дней. После извлечения устройства охота наступает через 2-3 дня. Осеменяют животных в фиксированное время через 57 и 74 часа.**

  Более высокие результаты синхронизации и оплодотворяемость обеспечиваются при введении спирали на 13–14-й день цикла, по сравнению с 2–3-м днями.

  Целесообразно за 24 часа до извлечения устройства сделать инъекцию простагландина. В таких случаях обеспечивается синхронизация охоты у 100% животных.

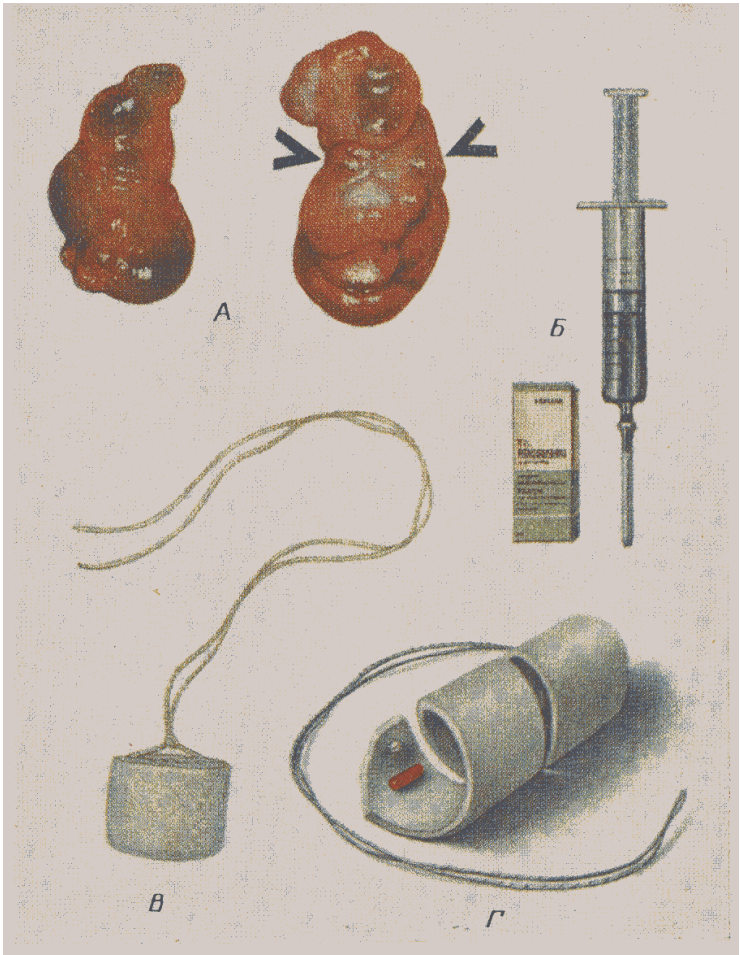
  Пессарии вводятся во влагалище на 9–10 дней. Одновременно с использованием пессариев инъецируют прогестерон и эстрогены.

- **Оллитренболон – жидкая субстанция, содержит 2,2 мг вещества в мл. Применяется кобылам для стимулирования половой цикличности, контроля сроков проявления или задержки охоты в случной сезон. Вводится с кормом в дозе 27,5–33 мг в течение 10 или 15 дней. Охота наступает в течение 8 дней после последней дачи, овуляция – через 7–13 дней.**
- **Альтреногест – суспензия, содержит 4 мг вещества в мл. Применяется для синхронизации половой охоты у свинок. Помещается на корм непосредственно в момент кормления животных. Скармливается в дозе 20 мг (5 мл) в течение 18 дней. Охота наступает через 2–3 дня.**

- ***Депо-Промон*** **(медроксипрогестерона ацетат) применяют собакам и кошкам для задержки полового цикла. Инъецируют подкожно во вторую половину анэструса по 1 мл с 6-месячными интервалами у собак и с 4-месячными - у кошек.**
- **Пролигестон для инъекций ("Covinan") применяется для прекращения или задержки эструса у сук и кошек. Сукам в начале про-эструса вводится подкожно в дозе 100-600 мг, кошкам в начале про-эструса или эструса - 100 мг.**
- **В таких же дозах используется этот препарат в конце периода анэструса для непродолжительной задержки полового цикла или же с интервалом в 3, 4, а затем 5 месяцев для задержки цикла в течение длительного периода.**
- **Применение прогестинов у сук и кошек может предрасполагать к развитию пиометры.**

- **Медроксипрогестерона ацетат ("Perlutex", таблетки) применяют для прерывания или задержки полового цикла у сук и кошек. Сукам дается препарат в дозах 10-20 мг в течение 4-х дней с момента появления кровянистых выделений, затем по 5-10 мг в последующие 12 дней; для задержки цикла - ежедневная дача в дозах 5-10 мг. Дозы для кошек - 2,5 мг.**
- **Медроксипрогестерона ацетат ("Perlutex", для инъекций) применяют для задержки эструса у сук и предупреждения гиперплазии предстательной железы у кобелей. Сукам инъецируют подкожно 50-150 мг в период анэструса; самцам - 50-100 мг каждые 3-6 месяцев.**

- **Флуорогестона ацетат ("Chronogest", интравагинальные пессарии), медроксипрогестерона ацетат ("Veramix", "Veramix Plus", интравагинальные пессарии) - используются для синхронизации полового цикла у овец и коз, чаще в комбинации с ГСЖК. Пессарии вводят в переднюю часть влагалища на 12-14 дней, гонадотропин инъецируют в момент извлечения пессариев.**


А
Б
В
Г

- **Эстрон *(фолликулин)* - естественный эстрогенный гормон, выпускается в масляном растворе в ампулах по 1 мл (10000 ЕД).**
- **Три другие естественные эстрогены - эстрадиола бензоат и эстрадиола дипропионат, а также эстрадиола валерат - обладают более выраженным, чем у эстрона, пролонгированным действием. Выпускаются в ампулах по 1 мл 0,1%-ного раствора.**
- **Все эти препараты надо вводить парэнтерально (внутримышечно).**
- **Активность естественных эстрогенов выражается в интернациональных единицах. Одна ИЕ равна 0,1 мкг стандартного эстрона или мышиной единице, или 1/3 крысиной единицы.**
- **Агофоллин содержит в 1 мл эстрадиола дипропионата 1 мг. Выпускается во флаконах по 15 мл.**

- **Из синтетических эстрогенов наиболее известные: диэтилстильбестрол и синэстрол.**
- **Диэтилстильбестрол обладает эстрогенным действием, в два раза превосходящим действие синэстрола и фолликулина.**
- **Диэтилстильбестрола пропионат или дипропионат - синтетические эстрогенные препараты пролонгированного действия.**
- **Синтетические эстрогены обладают таким же биологическим действием, как и естественные эстрогены. Но они не разрушаются в пищеварительном тракте и поэтому могут применяться внутрь.**
- **В настоящее время в ряде стран они не используются, так как наличие остаточных количеств их в продуктах питания придает им концерагенные свойства.**
-

- **При введении в организм эстрогены вызывают течку с ее обычными внешними признаками, но при отсутствии овуляции.**
- **У крупного рогатого скота особо высокая чувствительность к эстрогенам. После введения их течка проявляется через 12-48 часов. После осеменения в период стимулированной течки и охоты оплодотворение не происходит.**
- **Овуляция, а затем проявление нормальной половой цикличности возможны тогда, когда в яичниках в момент применения гормона имелись созревающие фолликулы. В таких случаях эстрогены стимулируют выброс овуляторных количеств ЛГ и овуляцию, которая могла быть и без применения их.**

- ***Рекомендуются*** **эстрогены для стимулирования созревания шейки матки у кобыл перед применением окситоцина;**
- **при консервативном лечении задержания последа и эндометрита (кроме острого токсического) у коров в комплексе с другими гормональными препаратами или лекарственными средствами;**
- **лечения misalliance в течение первых 4-х и предотвращения беременности - в течение 5 дней после спаривания, а также недержания мочи у овариэктомированных сук;**
- **гиперплазии простаты у кобелей;**
- **понижения гиперсексуальности у кобелей.**

Дозы

- **кобылам 3-6 мг,**
- **коровам - 3-5 мг;**
- **сукам при misalliance 0,1 мг/кг массы (не более 3 мг), для предотвращения беременности 5-10 мг (вызывает отек слизистой оболочки яйцеводов и продвижение зигот),**
- **при недержании мочи 1 мг ежедневно в течение 3-х дней, а затем каждые 3 дня;**
- **кобелям при гиперплазии простаты 1 мг в день.**

Андрогены естественные или синтетические аналоги их применяются редко. Наиболее известные коммерческие препараты:

- **метилтестостерон ("Orandrone", таблетки),**
- **тестостерона (фенил)пропионат для инъекций ("Androject) и**
- **тестостерона эфир для инъекций ("Durateston").**
- **Пропионат тестостерона в 2-3 раза активнее метилтестостерона и обладает более продолжительным действием. Выпускают его в виде масляного раствора по 1 мл в ампуле в концентрации от 0,5 до 5%-ной.**
-

- **В низких или физиологических количествах тестостерон у самцов усиливает половое влечение и оказывает благоприятное влияние на сперматогенез.**
- **Но в дозах, превышающих физиологическую норму, блокирует секрецию гонадотропинов и вызывает прекращение сперматогенеза.**
- **У самок введение тестостерона угнетает лактацию.**
- **Применяют андрогены самцам при половом недоразвитии и функциональных нарушениях полового аппарата, а также при сосудистых и нервных расстройствах.**
- **Андрогены обладают анаболическим эффектом и поэтому могут быть использованы при лечении ослабленных животных. Дозы согласно наставлениям по применению.**
-

Синхронизация полового цикла

При введении гормональных препаратов группе животных обеспечивается:

наступление охоты одновременно (синхронно) у большинства из них;

требуется меньше времени на выявление охоты;

улучшается организация искусственного осеменения, сокращаются сроки его проведения;

после осеменения можно разместить животных в одном помещении (загоне), обеспечить кормление и содержание в соответствии с физиологическим состоянием и затем наладить квалифицированный контроль за течением родов;

сезон для родов может быть выбран по желанию.

- **Наиболее целесообразна и эффективна синхронизация половой охоты у мясного скота. Одна обработка и затем осеменение в течение одного – двух дней дают возможность максимально использовать все преимущества искусственного осеменения.**
- **В молочном скотоводстве синхронизация половой охоты имеет как преимущества, так и недостатки:**

У нетелей более трудные роды и это требует тщательного контроля во время приема их. Так как продолжительность периода отелов при осеменении в синхронизированную охоту существенно уменьшается, контроль за течением родов осуществить проще.

С другой стороны, при раздое первотелок необходимо больше приложить усилий и напряжения и с группой животных успешно справиться труднее. Кроме того, некоторые владельцы не желают одновременно вводить в стадо большое количество первотелок.

- **В свиноводстве способ синхронизации полового цикла применяется в основном у молодых животных.**

  До начала обработки отбирают свинок в возрасте 245 дней или более, хорошо развитых и проявивших естественную половую охоту не менее двух раз. Оллитренболон или альтреногест вводят с кормом или водой ежедневно в течение 18 дней в дозе 15-20 мг. Растворяют их в чистом растительном масле из расчета одна доза в 5 мл раствора. Осеменяют свинок в фиксированное время (на 6 и 7 день) после прекращения дачи препарата. Процент опороса 64-73, численность приплода 9,5-9,8 на опорос. При осеменении в наблюдаемую охоту результаты могут быть выше. Взрослым свиноматкам эти препараты можно скармливать в дозе 20 мг в течение трех дней перед отъемом поросят.

- **Эффективно применение свиноматкам различного возраста ПГ- 600 в день отъема поросят - около 75% животных проявляют охоту через 4-5 дней.**

Стимуляция и синхронизация родов

Срок родов можно предвидеть, но нередко возникают показания для предопределения точного времени наступления их. Наиболее важное показание – желание принять роды в намеченный срок, чтобы обеспечить благоприятные условия для маток, наблюдение за родовым процессом и получить одновременно группу приплода.

Стимуляция родов необходима и тогда, когда беременность чрезмерно удлиняется, или когда в матке обнаруживают мумифицированный плод.

Кобылам **при размягчении шейки матки (пропускает 1 или 2 пальца через наружное отверстие) и нормальном расположении плода, можно ввести 120 ЕД окситоцина; роды наступят через 15–60 мин. Если шейка матки не созревшая, то вводят 30 мг стильбэстрола дипропионата (синэстрола 50 мг под кожу), а через 12–24 ч – окситоцин. Этим методом индуцируют роды не ранее 320 дней.**

Дексаметазон применяют после 321-го дня по 100 мг в течение 4-х дней. Роды наступают через 6–7 дней после первой инъекции препарата (у пони раньше).

У коров **роды стимулируют для:**

сокращения стельности и снижения живой массы телят при рождении;

в случае вынужденного убоя в конце стельности;

при заболеваниях, которые угрожают жизни животному (многоводие, залеживание и др.).

После 270-го дня вводят кортикостероиды или простагландины.

Динолитик/лутализ – 5 мл (25 мг динопроста) или энзапрост – 20–30 мг внутримышечно (20–50 мг динопроста или энзапроста – внутривенно); клопростенол – 500 мкг (внутримышечно).

Отел происходит через 1–8 дней, в среднем через 3 дня; у многих животных отмечается задержание последа.

Лучшие результаты получают после 275-го дня: роды наступают через 2–3 дня после инъекции. При удлинении беременности эти препараты инъецируют после 280-го дня.



Для ранней индукции родов (250–275 дней) делают инъекцию кортикостероида длительного действия (дексаметазона фенилпропионата, дексаметазона триметилацетата, 20 мг). Тем коровам, у которых роды не наступят на протяжении 8–12 дней, инъецируют клопростенол 500 мкг; роды после этого происходят в течение 3-х дней.

После 275 дней вводят кортикостероид средней продолжительности действия, а через 8 дней (если роды не происходят в это время) – препарат с коротким сроком действия или ПГ-Ф2α (или клопростенол). После 282 дней инъецируют простагландин или кортикостероид короткого срока действия (дексаметазон, флуметазон, бетаметазон).

При введении простагландина коровам с мумифицированным плодом аборт наступает через 7–14 дней. Во всех случаях выведение плодов неполное, их необходимо извлекать из влагалища.

- ***У овец*** **показание для инициации родов – проведение их в дневные часы и обеспечение сохранения новорожденных ягнят, а у каракульских овец – получение каракульчи.**
- **Стимуляция родов ранее 145–148 дней приводит к увеличению смертности ягнят. Обычно роды вызывают в этот срок путем инъекции 15 мг эстрадиола бензоата или 12–16 мг дексаметазона на 140–144-й день.**
- ***У коз*** **индуцировать роды можно введением АКТГ, кортикостероидов, ПГФ2α или его синтетических аналогов, или эстрогенов. Однако у них лактация иногда начинается раньше.**

В свиноводстве **синхронизация родов наиболее эффективна. Она позволяет:**

- **лучше организовать прием родов, проводить его под контролем опытного специалиста, в его рабочее время;**
- **проводить их в более удобное время недели и с меньшими затратами труда;**
- **стимулировать роды, так как нередко сокращается вторая стадия родов;**
- **получать одновозрастной приплод и обеспечить выращивание его при многоплодии или низкой молочности у маток;**
- **снизить частоту мертворожденных и гибель новорожденных.**



Мертвых поросят рождается 5–7 %. Около $^{3}/_{4}$ из них погибает во время родов.

До 80 % всех мертворожденных приходится на последнюю треть.

При удлинении второй стадии опороса число мертворожденных поросят увеличивается.

Мертвые плоды рождаются медленнее, чем живые.

Вероятная причина гибели поросят – преждевременный разрыв пуповины: почти у всех мертворожденных (до 95 %) пуповина разорвана, тогда как из всех родившихся поросят она разорвана только у 40 %.

Для стимуляции родов у свиноматок используют ПГ-Ф2α и кортикостероиды.

Энзапрост в дозе 20 мг вводят внутримышечно в области шеи на 111–112-й день беременности. Через 12–20 мин после инъекции у животного отмечается беспокойство, слюноотделение; свиноматка начинает готовить гнездо. Через 1 ч эти признаки исчезают. Роды наступают через 28–36 ч, иногда через 48 ч.

Динолитик/лутализ вводят в дозе 2 мл (10 мг динопроста). Желательно через 20 ч после инъекции препарата ввести окситоцин. Роды начинаются через 24–36 ч.

Клопростенол (эстрофан) применяют на 112–113-й день в дозе 150 мкг (0,7 мл). Роды начинаются в среднем через 28 ч.

Дексаметазон инъецируют ежедневно по 75 мг на 109, 110 и 111-й день беременности. Роды начинаются через 68–77 ч. Можно ввести препарат однократно на 109–111-й день в дозе 200 мг.

При слабой родовой деятельности рекомендуется вводить свиноматкам окситоцин в дозе до 10 ЕД. Если опорос не завершается через 1,5 часа, то гормон вводят повторно.

Ферменты. Иммобилизированные ферменты. Ферментные препараты.

1. **Ферменты, механизм действия, основные свойства**
2. **Классификация**
3. **Источники получения**
4. **Иммобилизированные ферменты**
5. **Методы иммобилизации**
6. **Применение иммобилизированных ферментов**

1. Ферменты, механизм действия, свойства

Ферменты (энзимы) – вещества белковой природы.

- **Катализируют химические реакции, реализуют генетическую информацию, обмен веществ и энергии.**
- **Высокая специфичность действия.**
- **Большая активность и скорость катализированных реакций.**

Пример: разложения мочевины, попадающей в песок с кошачьей мочой, на двуокись углерода и аммиак. Реакция катализируется ферментом уреазой. Образуют фермент бактерии, попадающие в песок из воздуха.

$$H_2N - CO - NH_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$$

Одна молекула уреазы способна за одну секунду расщепить до 30 000 молекул мочевины.

Активность фермента зависит:

от pH (высокая активность при pH около 7,0; пищеварительные ферменты работают при низких значениях pH);

температуры (высокая температура увеличивает активность катализируемой реакции, но при t° = или > 60 °С белковая часть фермента денатурируется).

Строение ферментов

Ферменты являются белками. Простые и сложные.

- **Простые состоят из аминокислот (пепсин, трипсин, лизоцим, уреаза, рибонуклеаза, фосфатаза и др.).**
- **Сложные (холоферменты) имеют в составе белковую часть (из аминокислот) – апофермент, и небелковую часть – кофактор.**

Кофактор: **кофермент** или **простетическая группа**.

Пример: **сукцинатдегидрогеназа (в цикле трикарбоновых кислот, содержит ФАД - флавинадениндинуклеотид — кофермент, принимающий участие во многих окислительно-восстановительных биохимических процессах); аминотрансферазы (содержат пиридоксальфосфат), пероксидаза (содержит гем).**

Для осуществления катализа необходим комплекс апофермента и кофактора.

Как многие белки, ферменты состоят из одной субъединицы (мономеры), и из нескольких субъединиц (полимеры).

В составе фермента: активный и аллостерический центры

1. активный центр **– комбинация аминокислотных остатков (обычно 12–16), обеспечивающая связывание с молекулой субстрата и осуществляющая катализ.**

Аминокислотные радикалы в центре могут находиться в любом сочетании, при этом рядом располагаются аминокислоты, значительно удаленные друг от друга в линейной цепи.

У ферментов, состоящих из нескольких мономеров, может быть несколько активных центров.

Две и более субъединицы могут формировать один активный центр.

У сложных ферментов в активном центре расположены функциональные группы кофактора.

В активном центре выделяют два участка:

- **якорный (контактный, связывающий) – отвечает за связывание и ориентацию субстрата в активном центре, и**
- **каталитический – непосредственно отвечает за осуществление реакции.**



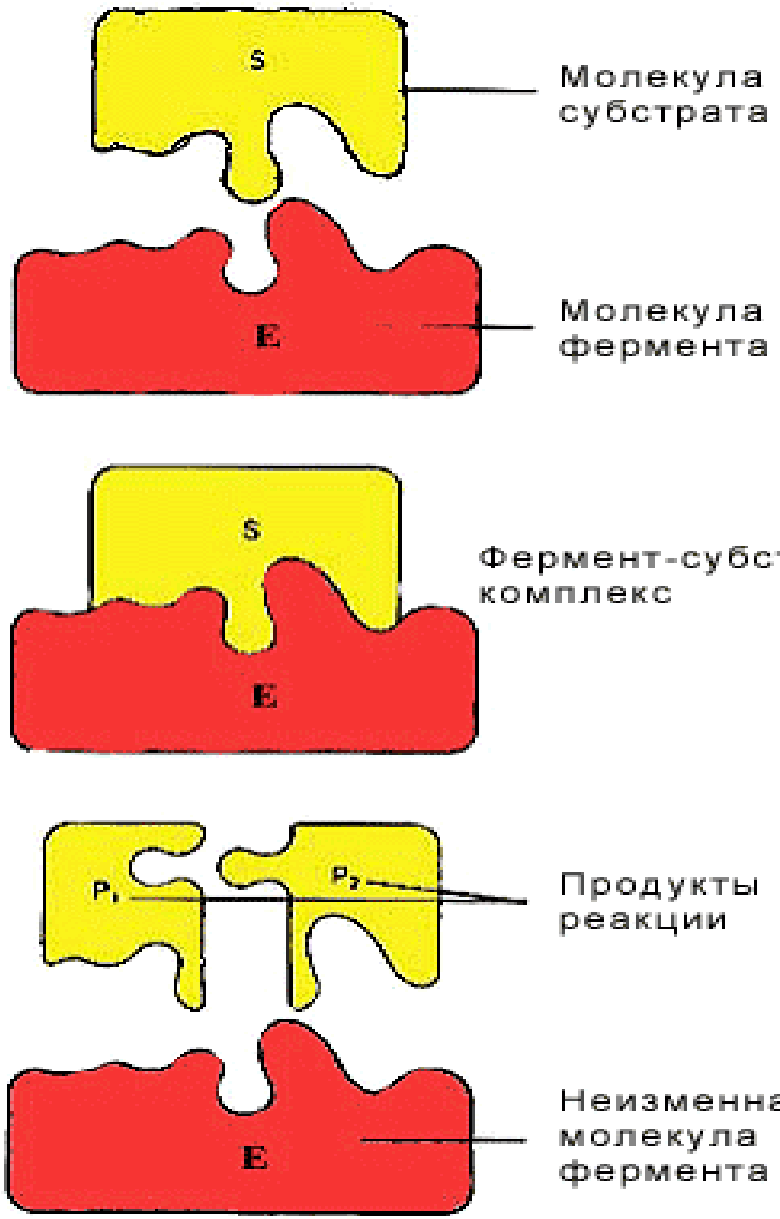
Схема строения ферментов

2. аллостерический центр **(allos – чужой) – центр регуляции активности фермента, отделен от активного центра; имеется у ферментов, состоящих из нескольких субединиц (полимеров). У них активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах.**

Связывание с центром молекулы активатора или ингибитора, эффектора, модулятора, регулятора вызывает изменение конфигурации белка-фермента и скорости ферментативной реакции.

В качестве такого регулятора может выступать продукт данной или одной из последующих реакций, субстрат реакции или иное вещество.

Механизм действия ферментов



I. Активация фермента

II. Узнавание ферментом своего субстрата

III. Образование неактивного фермент-субстратного комплекса с помощью слабых водородных связей между субстратом и аминокислотами контактных участков

IV. Образование активного фермент-субстратного комплекса за счет каталитического участка

V. Образование продуктов реакции.

2. Классификация ферментов

Название фермента отражает тип катализируемой реакции. До этого ферменты называли по имени субстрата, добавляя к нему суффикс «аза».

- **Оксиредуктазы – катализируют реакции окисления и восстановления.**
- **Трансферазы – отрывают химическую группу от одного соединения, связывают ее, а затем присоединяют к другому соединению (переносят химические группы).**
- **Гидролазы – катализируют разрыв химической связи с присоединением элементов молекулы воды.**

- **Лиазы – катализируют разрыв связей C-C, C-N, C-O, C-S с образованием двойных связей (декарбоксилирование).**
- **Изомеразы – катализируют различные процессы изомеризации (L-аминокислоты в D-аминокислоты, галактозу в глюкозу).**
- **Лигазы – катализируют процессы конденсации двух сочетающихся молекул за счет энергии распада АТФ (аминоацил-тРНК синтетазы присоединяют аминокислоту к молекуле транспортной РНК – белковый синтез).**

3. Источники получения ферментов

Ферменты выделяют из клеток всех видов живых организмов и растений.

В настоящее время ферменты получают преимущественно из бактерий, так как они примерно в сто раз дешевле ферментов, выделенных из клеток растений и животных.

Высокопродуктивные штаммы микроорганизмов получают благодаря использованию *мутационного процесса* и методов генетической инженерии.

Сочетание данных методов позволило японским исследователям добиться 200-кратного увеличения синтеза альфа-амилазы клетками сенной палочки Bacillus subtilis.

4. Иммобилизированные ферменты

Выделяемые из клеток свободные ферменты:

- **растворимы в воде и во время выделения или при хранении могут потерять активность;**
- **их невозможно регенерировать и трудно отделить от продуктов реакции,**
- **сам процесс с их участием характеризуется периодичностью и не поддается автоматизации.**

В настоящее время получают водонерастворимые формы – иммобилизованные ферменты.

Сущность иммобилизации –

- **прикрепление ферментов активной формы к нерастворимой основе,**
- **заключение в гель или в полунепроницаемую мембранную систему.**

Фиксированные таким образом ферменты обладают пролонгированным действием. Их устойчивость может быть повышена в 100-1000 раз.

Иммобилизированный фермент может быть отделен от полученного в результате реакции продукта, а

биотехнологический процесс превращается в непрерывный и поддается регулированию.

Еще в 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахароза, сорбированная на угле, сохраняла свою каталитическую активность, но только в 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт впервые осуществили ковалентные связывания амилазы, пепсина и карбоксипептидазы с таким нерастворимым носителем.

В 1981 г. на первой конференции по инженерной энзимологии был узаконен термин «иммобилизованные ферменты». В понятие «иммобилизация» в настоящее время вкладывают более широкий смысл, чем связывание на нерастворимом носителе, а именно — *полное или частичное ограничение свободы движения белковых молекул*.

Матрицами для иммобилизации ферментов служат органические полимерные материалы природного или синтетического происхождения и неорганические материалы.

Из *природных материалов* наиболее часто используются:

- полисахариды (целлюлоза, хитин, декстран, агароза, агар, альгиновые кислоты и их соли, гепарин и др.),

- белки (коллаген, кератин, нерастворимые белки – глобулины хлопчатника, казеин, миозин, фибриноген и др.),

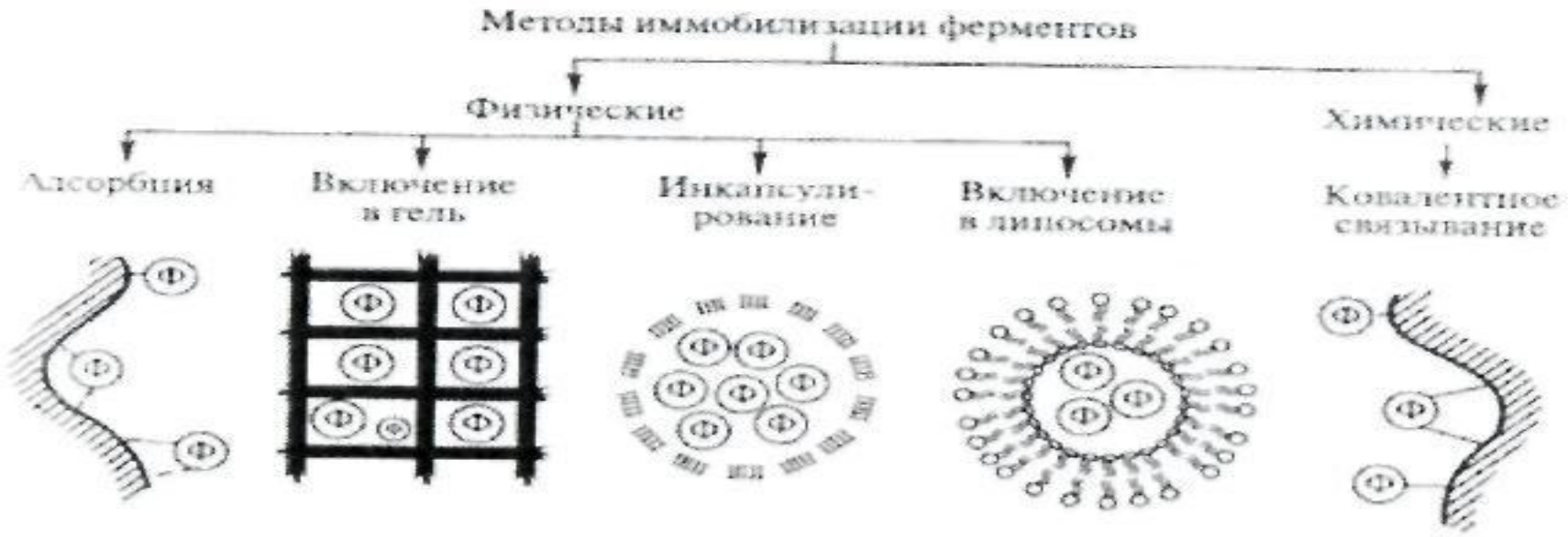
- **липиды (липосомы).**
- **Из *синтетических полимерных материалов* – вещества, полученные на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового и полиаллилового спиртов, а также определенные сорта полистиролов, нейлон, сополимеры стирола и малеинового ангидрида и др.**

4. Методы иммобилизации

Существуют два принципиально разных метода иммобилизации ферментов:

- **без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем *(физические методы* иммобилизации);**
- **с образованием ковалентной связи между ними *(химические методы* иммобилизации).**

Каждый из этих методов осуществляется разными способами



Физические методы иммобилизации ферментов реализуются посредством:

- адсорбции ферментов на нерастворимых носителях;
- включения энзимов в поры поперечно сшитого геля;
- включения ферментов в полупроницаемые структуры (инкапсулирование и включение ферментов в липосомы).

Абсорбция ферментов на нерастворимых носителях. При такой иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счет

электростатических,

гидрофобных,

дисперсионных взаимодействий и

водородных связей.

Абсорбция была первым методом иммобилизации ферментов (Дж. Нельсон, Э. Гриффин, 1916 г.), но и сейчас не потеряла своего значения и стала широко распространенным способом получения ферментов в промышленности. В литературе описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием таких носителей, как

кремнезем,

активированный уголь,

графитовая сажа,

различные глины,

пористое стекло,

полисахариды, синтетические полимеры, оксиды алюминия, титана и других металлов.

Последние применяются наиболее часто.

Недостаток – невысокая прочность связывания фермента с носителем.

- ***Иммобилизация ферментов путем включения в гель*. Способ иммобилизации ферментов путем включения в трехмерную структуру полимерного геля широко распространен благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только чистых ферментов, но даже отдельных клеток. Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами:**

1. фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента.

2. фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние.

Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры:

1. инкапсулирование;

2. включение ферментов в липосомы.

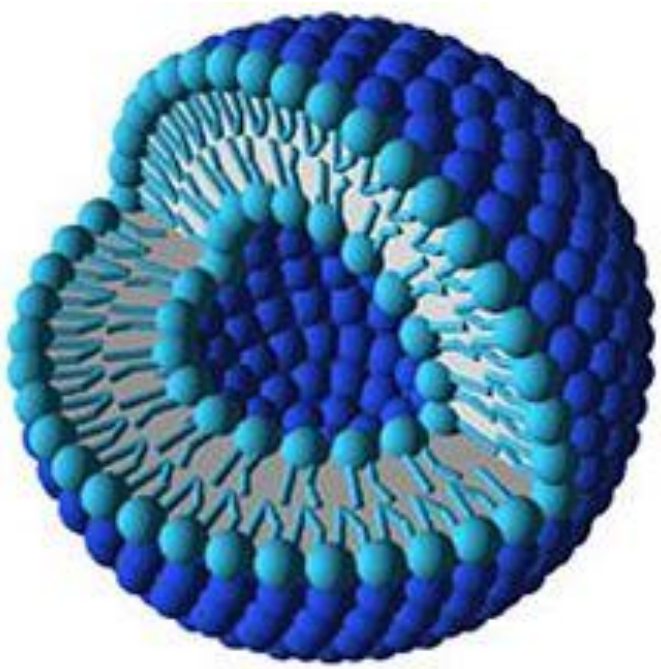
Сущность данных способов иммобилизации заключается в отделении водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов, но задерживающей большие молекулы фермента.

Разработано две модификации этого направления, которые представляют собой микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Липосомы

Липосомы — сферические везикулы, имеющие один или несколько липидных бислоёв. Образуются в смесях фосфолипидов с водой. Внутри липосом содержится вода или раствор, в котором проводилась ультразвуковая обработка.

Диаметр липосом составляет от 20 нм (моноламеллярные везикулы, стенка состоит из одного бислоя) до 10-50 мкм (мультиламеллярные везикулы, стенка состоит из десятков или сотен бислоёв).



Химические методы иммобилизации ферментов

Представляют иммобилизацию ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем — наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

В отличие от физических вариантов, такие методы иммобилизации обеспечивают прочную и необратимую связь фермента с носителем и сопровождаются стабилизацией молекулы энзима.

- **Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает трудности в осуществлении каталитического процесса.**
- **Ферменты отделяют от носителя с помощью вставки (сшивка, или спейсер), в роли которой чаще всего выступают полифункциональные агенты бромциан, гидразин, глутаровый диальдегид.**
- **В таком случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями.**

5. Применение иммобилизированных ферментов

Применение иммобилизованных ферментов в области *химической промышленности*:

1. добавление ферментов в стиральные порошки позволяет удалять застарелые, а также масляные и жировые пятна;

2. с помощью иммобилизованных ферментов с шкур удаляют волосяной покров и смягчают кожу после дубления;

3. из обрезков шкур с помощью иммобилизованных ферментов извлекают шерсть, которая используется для производства тканей;

4. иммобилизованные ферменты участвуют в получении из перекиси водорода кислорода, который необходим для превращения латекса в губчатую резину.

В *пищевой промышленности*:

1. осветление фруктовых соков с помощью иммобилизованных ферментов;

2. в результате ферментативного гидролиза целлюлозы получается глюкоза, которая используется в пищу человека и добавляется в корм животным;

3. получение глюкозофруктозных сиропов.

Фруктоза — важнейший в физиологическом и технологическом отношении природный моносахарид.

Превращаясь в печени и кишечнике животных в глюкозу, фруктоза включается в пластический и энергетический обмен клетки.

Она в 2,5 раза слаще глюкозы и в 1,7 раза слаще тростникового сахара (сахароза), благодаря чему фруктоза менее калорийный пищевой продукт по сравнению с последним;

4. в отличие от глюкозы обмен фруктозы не контролируется инсулином, поэтому фруктовый сахар может потребляться больными диабетом;

5. фруктоза не вызывает кариеса зубов;

6. в смеси с глюкозой фруктоза не кристаллизуется, поэтому широко используется для производства кондитерских изделий.

В *производстве молочных продуктов*:

Для коагуляции белков при изготовлении сыра применяют сычужный фермент *ренин (химозин),* получаемый из желудка (сычуга) молодых телят.

В настоящее время более 500 сортов сыра изготовляют с применением ренина (химозиновые сорта). Он является эффективным сгустителем казеина и расщепляет минимальное количество молочных белков до водорастворимых компонентов.

- **В молочной промышленности применяют каталазу совместно с пероксидом водорода; это исключает процесс пастеризации, необходимый для инактивации патогенной и посторонней микрофлоры.**
- **В результате пастеризации теряются естественные ферменты молока.**
- **Пероксид водорода в концентрации 0,2-0,3 % от объема молока выполняет функции дезинфектора, существенно не влияя на ферменты молока (липазу, протеазу, фосфатазу).**
- **Добавки каталазы инактивируют остатки пероксида водорода в молоке.**

- **Разработано несколько *биотехнологических приемов* для рационального использования сыворотки и пахты: На вторичном молочном сырье можно выращивать культуры кормовых дрожжей, обладающих лактозной активностью (Saccharomyces fragilis, Zygosaccharomyces lactis). Из таких дрожжей можно выделить лактозу.**
- **Весьма эффективным является выделение из депротеинизированной сыворотки сахаров путем биогидролиза молочного сахара с помощью иммобилизованной лактазы. Степень конверсии молочного сахара составляет 80 %.**
- **Продукты гидролиза (глюкоза и галактоза) успешно применяют в разных отраслях пищевой промышленности, например для приготовления мороженного. Добавление таких сахаров в мороженое препятствует кристаллизации сахаров, и его можно сохранять длительное время (до 4 месяцев).**

Необходимость извлечения лактозы из цельного молока вызвана тем, что некоторые люди (особенно Азии и Африки) не усваивают лактозу из-за отсутствия в их организме лактазы.

При употреблении в пищу цельного молока у них возникают различные расстройства пищеварительной системы.

После извлечения лактозы молоко может быть ими использовано.

Применение ИФ в медицине и ветеринарной медицине.

Ферменты могут быть использованы как лечебные препараты с целью замещения отсутствующих в организме катализаторов вследствие генетических или других нарушений, а также для разрушения накапливающихся токсических продуктов обмена.

Большой рынок сбыта занимают *тромболитические ферменты,* предназначенные для борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Препарат «стрептодеказа», содержащий *стрептокиназу,* предшественника *плазмина,* предотвращает образование тромба в кровеносной системе.

Для растворения тромбов в кровеносных сосудах используют *иммобилизованную стрептокиназу*.

Перспективным является и микрокапсулирование иммобилизированных ферментов, а также использование их в реакторах с помощью внеорганизменного шунта (искусственной почки).

В аппарате «искусственная почка», предназначенном для освобождения крови от мочевины и других шлаков, используется фильтрационная колонка с *иммобилизованной уреазой.* Уреаза разлагает мо-чевую кислоту с образованием углекислоты и аммиака. Фермент *аспарагиназа,* который разрушает некоторые незаменимые аминокислоты, используют для борьбы со злокачественным ростом опухолей.

- **Протеолитические ферменты *(трипсин, химотрипсин, коллагеназа),* иммобилизованные на волокнистых материалах *(целлюлоза, полиамид-ные волокна, декстран),* применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, абсцессов.**
- **Их белковые ингибиторы применяют в заместительной терапии для лечения эмфиземы и панкреатитов.**

Препараты получают обычно из культур бактерий или микроскопических грибов.

Очищенные ферментные препараты готовят путем экстракции ферментов из клеток микроорганизмов подходящим растворителем и осаждением фермента этанолом.

Широко применяются ферментные методы в диагностике и для анализа.

Ферментным методом определяют содержание

мочевины и мочевой кислоты,

аминокислот и органических кислот,

этанола,

антибиотиков,

глюкозы и других углеводов,

нуклеотидов,

токсических соединений,

а также неорганических веществ.

Ферментные препараты включают в рационы сельскохозяйственных животных, чтобы улучшить переваримость и повысить эффективность использования растительных кормов, вводят в количествах 0,1-1,5% сухой массы корма.

Ферменты — природные вещества, способные ускорять обменные процессы в организме животных, птиц, свиней, молодняка крупного рогатого скота.

Их применение

значительно удешевляет корма (до 10 %) и

улучшает их усвоение в организме.

Применение ферментов в кормлении бройлеров, поросят и свиней

увеличивает среднесуточный прирост живой массы на 4-5 %,

яйценоскость кур-несушек в среднем на 5 %

при снижении расхода кормов от 5 до 10 %.

При силосовании **применение ферментных препаратов способствует частичному расщеплению целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ и протеинов до пептидов и аминокислот и повышает питательность корма.**

При включении в комбикорма **ячменя, пшеницы, тритикале, овса и ржи используются ферментные препараты, позволяющие нейтрализовать антипитательные** ***растворимые некрахмалистые полисахариды*****.**

Решается проблема замены кукурузы без снижения усвояемости компонентов комбикорма и продуктивности животных и птицы.

- **Такие ферменты, как протеаза, амилаза, целлюлаза и их комбинации гидролизуют белки, крахмал, клетчатку и способствуют лучшему усвоению их организмом животных, усиливают и нормализуют процессы пищеварения.**
- **В животноводстве целесообразно использовать ферменты, синтезируемые микроорганизмами, обитающими в рубце животных.**

- **Чтобы обеспечить качественное и сбалансированное питание при разработке рационов для поголовья скота и птицы необходимо использовать**
- **качественные корма и кормовые смеси, и**
- **обязательно включать в них разнообразные биологические добавки и препараты, которые стимулируют рост животных, сокращают сроки их выращивания и не вредят здоровью.**
- **Важнейшим компонентом добавок являются ферменты и ферментные препараты.**

Эффект кормовых ферментных препаратов **при вводе их в комбикорма заключается:**

- **в разрушении стенок растительных клеток и повышении доступности содержащихся в них крахмала, протеина и жиров для ферментов пищеварительного тракта;**
- **в повышении переваримости питательных веществ и улучшение их всасывания в тонком отделе кишечника;**
- **в устранении негативного эффекта некрахмалистых полисахаридов, особенно растворимой их части;**
- **в компенсации дефицита собственных пищеварительных ферментов на ранних стадиях развития животных и птицы, при стрессах;**
- **в улучшении микрофлоры в тонком кишечнике за счет снижения вязкости содержимого кишечника и повышения уровня моносахаридов.**

- **Ферменты - это сложные молекулярные соединения, являющиеся своеобразными катализаторами разнообразных биохимических реакций.**
- **Благодаря ферментам, усвоение питательных веществ растительного происхождения и микроэлементов в организме животного происходит не только на порядок быстрее, но и эффективнее.**
- **Например: без использования ферментосодержащих препаратов организм скота или птицы в состоянии усвоить всего лишь 15- 30 % корма или смеси.**

- **Если же в корма добавлять ферментные препараты или биоактивные добавки на основе ферментов, то усвоение повышается в среднем на треть. Животное развивается быстрее, оперативное набирает вес или увеличивает производительность (предположим, у куриц несушек увеличивается яйценоскость).**
- **Поскольку пища усваивается лучше, количество, необходимых для стада, кормов может быть уменьшено, это в свою очередь позволяет снизить отходы жизнедеятельности животных, а значит и затраты по уходу за поголовьем уменьшаться автоматически**.

- **Использование ферментных препаратов серьезно экономит средства и одновременно увеличивает производительность птицеводства или животноводства.**
- **Науке известно около тысячи ферментов, однако наиболее часто для кормления животных и птицы используются шесть.**

- **Фитаза - повышает доступность в организм фосфора, магния, кальция, аминокислот, протеинов и т.д.;**
- **Протеаза - эффективно расщепляет протеин до пептидов и аминокислот;**
- **Амилаза – участвует в расщеплении зернового крахмала до декстринов и сахаров;**
- **Бета-глюконаза необходима для расщепления бета-глюканов, их наибольшее число содержится зерновых культурах;**
- **Целлюлаза - расщепляет целлюлозу до низкомолекулярных углеводов и глюкозы;**
- **Ксиланаза – без нее невозможно расщепление арабиноксиланов до низкомолекулярных углеводов и глюкозы.**

- **Каждое, из шести вышеперечисленных соединений, имеет большое значение для создания наиболее полного, качественного и эффективного, с точки зрения прироста поголовья, питательного рациона и именно поэтому ведущие специалисты биохимики уделяют самое серьезное внимание разработке новых ферментных препаратов.**
- **Создание научных лабораторий, в которых российские ученые получают возможность работать над усовершенствованием уже имеющихся добавок, а также для создания абсолютно новых препаратов, в условиях современной жизни, и сложившихся экономических отношений невероятно важная для сельского хозяйства тема.**

- **Вопросы импортазамещения дорогостоящих иностранных препаратов на отечественные аналоги совсем непраздный, интенсивная работа идет, и можно с уверенностью сказать, что в скором времени качественные, эффективные и полезные биологически активные добавки и ферментные препараты отечественного производства будут доступны всем.**

Ферменты кормового назначения получают преимущественно путем микробного синтеза с использованием грибов и бактерий.

- ***Ферменты грибкового происхождения:***

Мультиэнзимные (МЭК) кормовые добавки *«Кемзайм»* (США) соответствуют требованиям для пищевых продуктов, не содержат остатков питательной среды и посторонних микроорганизмов.

Устойчивы к длительному хранению, кратковременному высокотемпературному (до +80 °С) воздействию при переработке кормов (в частности, при гранулировании), и приспособлены к видовым и возрастным особенностям свиней и птицы.

Они содержат весь комплекс наиболее значимых для пищеварения ферментов (а-амилазы, р-глюканазы, протеазы, липазы и целлюлазы.

- «Кемзайм сухой» — для стандартных пшенично-ячменных рационов;
- «Кемзайм (Я) сухой» — для рационов с повышенным содержанием ячменя и других кормов, содержащих бета-глюканы;
- «Кемзайм (П) сухой» — для рационов с большим содержанием пшеницы, ржи, тритикале и других компонентов с высоким содержанием арабоксилазы и низким — жира;
- «Кемзайм (К) сухой» — для рационов с повышенным содержанием клетчатки (позволяет увеличить ввод в рацион подсолнечного шрота, отрубей и другого сырья с высоким содержанием клетчатки);
- «Кемзайм жидкий» — для нанесения на корм после его гранулиро-вания;
- «Кемзайм концентрат» — концентрированный кензайм для ввода в пре-миксы (норма ввода в расчете на 1 т готового корма уменьшена в 10 раз).

- **Кемзайм Плюс сухой (Kemzyme Plus dry) – кормовая добавка для повышения переваримости питательных веществ в рационах свиней и с.-х. птицы на основе пшеницы, ржи, тритикале, ячменя, овса, шротов и жмыхов. Энзимы - ксиланаза, β-глюканаза, целлюлаза, протеаза и амилаза.**
- **Содержит ферменты, которые расщепляют в кишечнике животных некрахмальные полисахариды (пентозаны, бета-глюканы, целлюлозу) и улучшают усвоение питательных веществ кормов.**
- **В результате использования добавки повышается рост и продуктивность, улучшается здоровье животных, снижается содержание влаги в помете, уменьшается содержание аммиака в воздухе внутри животноводческих помещений, улучшаются зоогигиенические условия содержания животных.**

Расфасован

- **по 1 и 5 кг в полимерные контейнеры;**
- **по 10, 15, 20 и 25 кг во влагонепроницаемые бумажные мешки с полимерным напылением или с полиэтиленовым вкладышем;**
- **по 500 и 1000 кг в биг-бэги.**

Бактериальные ферменты: ***«Белфид»*** **(Beldem, Бельгия).**

В кормах содержится большое количество арабоксиланов:

20 % от общего количества растворимых в воде,

80 % — не растворимых.

«Белфид Б 1100» (МП, МЛ) содержит глюканазу и используется для рационов из кукурузы, пшеницы, ячменя, ржи, овса, сои.

«Белфид БЕТА» содержит глюканазу и ксиланазу, используется для рационов птицы и свиней, содержащих более 30 % соевых бобов, и для птицы в рационах, содержащих более 50-60 % ячменя.

Использование ферментов в кормлении способствует увеличению жи-вой массы с 3 до 7 % у свиней и цыплят-бройлеров, снижение рас-хода кормов на 8 % и снижение падежа.

- Белфид В 1100МР (Ферментная добавка, содержащая ксиланазу и носитель (пшеничная мука около 95%)) и Белфид бета 1100МР применяют для повышения перевариваемости питательных веществ в рационах свиней и сельскохозяйственной птицы, с большим содержанием зерновых и бобовых культур, для производства премиксов и мультиэнзимных композиций. Организация производитель: фирма «Beldem S.A.» / «Белдем С.А.», Бельгия.

***«Фекорд-2004» («Fekord-2004») новая отечественная мулътиэнзимная композиция (*1996 г., РБ). В республике применяются следующие добавки:**

- **«Фекорд» (Я, П, ЯП) — мультиэнзимные композиции грибкового и бактериального происхождения.**
- **«Фекорд» (У) — жидкая мультиэнзимная композиция, предназначена для включения в комбикорма с содержанием пшеницы до 70 *%,* нешелушеных ячменя до 65 %, овса до 20 %, ржи до 20 *%,* подсолнечного шрота до 10 *%.***
- **«Фекорд» (У-4) — мультиэнзимная композиция, предназначена для включения в комбикорма с содержанием пшеницы до 70 %, тритикале до 40 *%,* нешелушеных ячменя до 30 % и овса до 30 *%,* ржи до 20 %, подсолнечного шрота или люпина до 20 %.**

- **«Фекорд» (Б) — мультиэнзимная композиция, предназначена для включения в комбикорма с содержанием пшеницы и кукурузы до 65 %, нешелушеных ячменя до 20 %, овса до 20 %, ржи до 20 %, подсолнечного шрота до 20 %.**

  «Фекорд-2004» безвреден, не содержит бактерий группы кишечной палочки и бактерий из рода Сальмонелл.

- **Ферментная кормовая добавка ФЕКОРД 2012**


ФЕРМЕНТ
ФЕКОРД-ПН
fermentpark.com


ФЕРМЕНТ
ФЕКОРД-КОНЦЕНТРАТ
25 кг
fermentpark.com
ООО «ФЕРМЕНТ», Республика Беларусь,
225373, Брестская область, Лунинецкий р-н,
д. Флерьяново, пер. Лермонтова, 2А,
тел. (01633) 640-03, тел/ф. (017) 209-37-11

- **ФЕКОРД-2012-Ф – комплекс ферментов грибного и бактериального происхождения (диапазон действия pH от 2.5 до 7.5), с оптимальными характеристиками для комбикормовой промышленности. В процессе грануляции выдерживает температуру до 90°С.**
- **ФЕКОРД-2012-Ф - обязательным компонентом в производстве комбикормов и кормовых смесей для расщепления некрахмалистых полисахаридов и повышения питательности корма.**
- **ФЕКОРД-2012-Ф рекомендуется включать в рационы птицы, рыбы, КРС, свиней любого возраста, которые содержат рожь, ячмень, овёс, пшеницу, пшеничные отруби, подсолнечный шрот, тритикале и другие кормовые средства с повышенным содержанием некрахмалистых полисахаридов (НПС).**

- **ФЕРМЕНТНЫЙ БИОКОМПЛЕКС ФЕКОРД-2012-С Добавка представляет собой оптимально сбалансированную композицию ферментов грибного и бактериального происхождения с широким диапазоном действия pH от 2,5 до 7,5. В процессе грануляции выдерживает температуру до 90°С. Кормовую добавку ФЕКОРД-2012-С обязательно включать в рационы сельскохозяйственных животных, рыбы и птицы любого возраста, содержащие пшеницу, рожь, ячмень, овёс, пшеничные отруби, подсолнечный шрот, тритикале и другие кормовые средства с повышенным содержанием некрахмалистых полисахаридов.**

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БЕЛКА И АМИНОКИСЛОТ

1. Типы белков, состав и функции
2. Свойства аминокислот и их использование
3. Биотехнология получения аминокислот

1. Биотехнология: Учебное пособие для вузов. В 8-ми кн. / Под. ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова.

Кн. 2: Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов/ В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высш. Шк., 1988. – 208 с.: ил.

Кн. 6: Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / Быков В. А., Крылов И. А., Манаков М. Н. и др. – М.: Высш. шк., 1987. – 143 с.: ил.

2. Биотехнология. Принципы и применение / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.– 368 с.: ил.

3. Basic Biotechnology. Third Edition. Edited by Colin Ratledge, BjØrn Kristiansen. Cambridge university press 2006, p. 666.

1. Типы белков, состав и функции

Белки (протеины)

от греч. prōtos – первый, главный

Белки (протеины) полнее, чем другие вещества, представлены в клетках. Они выполняют многие функции в организме:

- **из них состоит цитоскелет,**
- **входят в состав органелл,**
- **секретируются во внеклеточное пространство для обмена сигналами между клетками, гидролиза пищи и образования межклеточного вещества**

В составе белка:

углерод,
кислород,
водород и
азот.

Некоторые белки содержат серу.

Состоят белки из аминокислот.

По общему типу строения белки можно разбить на 3 группы:

- **Фибриллярные – образуют полимеры, их структура высоко регулируемая и поддерживается взаимодействиями между разными цепями.**
- **Глобулярные – водорастворимы, общая форма молекулы в целом сферическая.**
- **Мембранные (около 25 % всех белков) – встроены в клеточную мембрану (мембрану органеллы или ассоциированы с ней).**

- По общему типу строения белки можно разбить на три группы:
- Фибриллярные белки — образуют полимеры, их структура обычно высоко регулируемая и поддерживается, в основном, взаимодействиями между разными цепями. Они образуют микрофиламенты, микротрубочки, фибриллы, поддерживают структуру клеток и тканей. К фибриллярным белкам относятся кератин и коллаген.
- Глобулярные белки — водорастворимы, общая форма молекулы более или менее сферическая.
- Мембранные белки — имеют пересекающие клеточную мембрану домены, но части их выступают из мембраны в межклеточное окружение и цитоплазму клетки. Мембранные белки выполняют функцию рецепторов, то есть осуществляют передачу сигналов, а также обеспечивают трансмембранный транспорт различных веществ. Белки-транспортёры специфичны, каждый из них пропускает через мембрану только определённые молекулы или определённый тип сигнала.

К фибриллярным белкам относят

кератин и коллаген **– их называют структурными белками.**

Это главные компоненты волос, ногтей, рогов и копыт, сухожилий, связок и хряща.

Они образуют микрофиламенты, микротрубочки, фибриллы, поддерживают структуру клеток и тканей.

- **Цитоскеле́т — это клеточный каркас или скелет, находящийся в цитоплазме живой клетки.**
- **Он присутствует во всех клетках эукариот, а в клетках прокариот обнаружены гомологи всех белков цитоскелета эукариот.**
- **Цитоскелет — динамичная, изменяющаяся структура, в функции которой входит поддержание и адаптация формы клетки ко внешним воздействиям, экзо- и эндоцитоз, обеспечение движения клетки как целого, активный внутриклеточный транспорт и клеточное деление.**



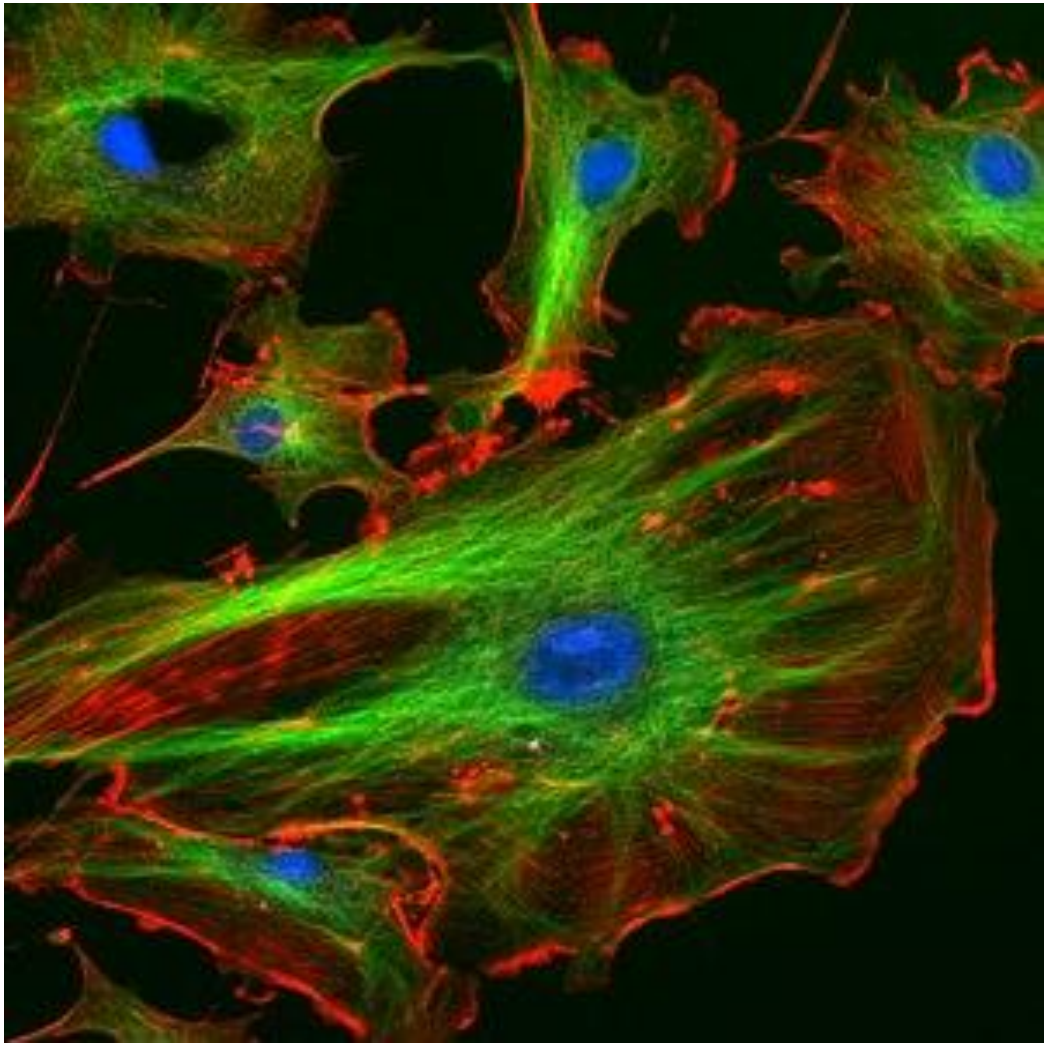
Hela, бессмертные клетки.

Сканирующая электронная микроскопия

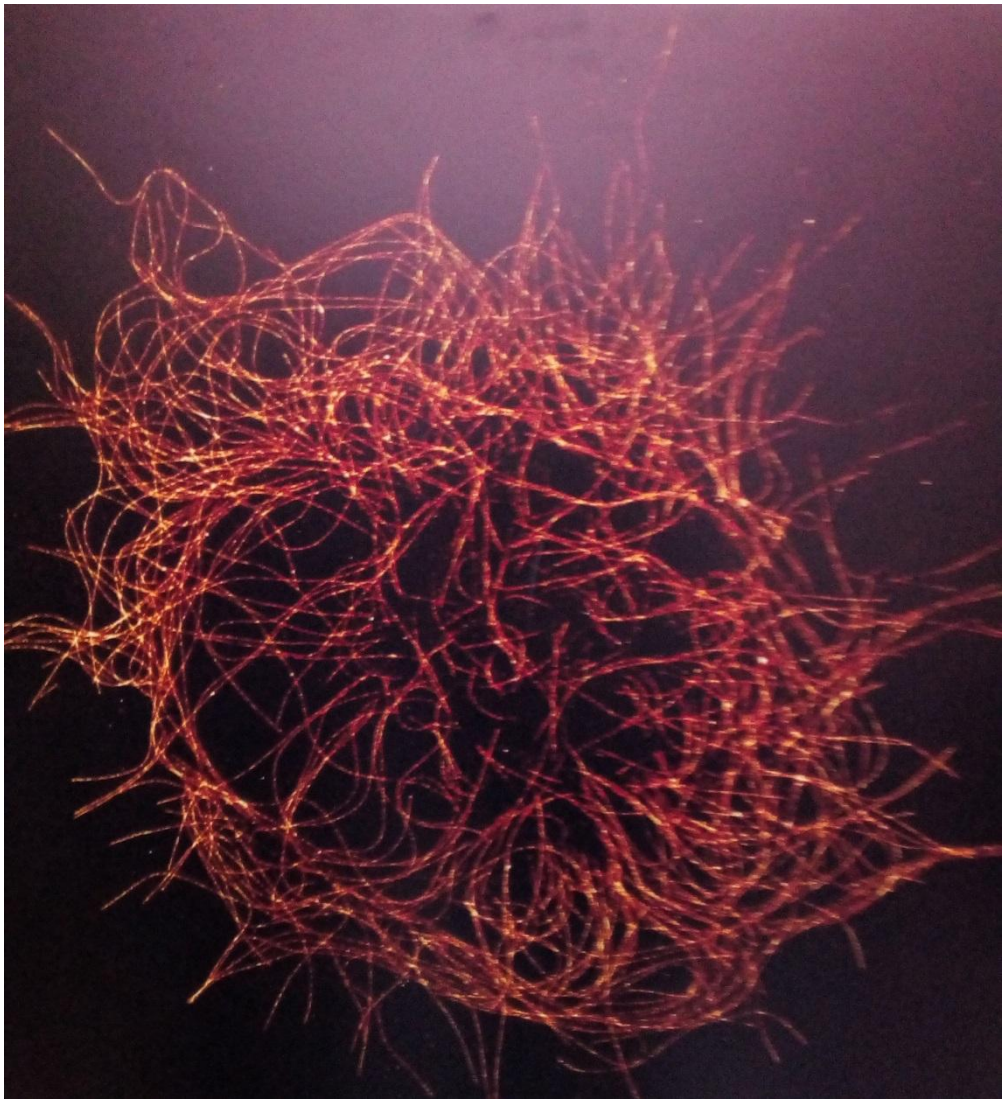
National Center for Microscopy and Imaging Research

- **Цитоскелет образован белками, выделяют несколько основных систем, называемых либо по основным структурным элементам, заметным при электронно-микроскопических исследованиях (микрофиламенты, промежуточные филаменты, микротрубочки), либо по основным белкам, входящим в их состав (актин-миозиновая система, кератины, тубулин-динеиновая система).**

- **Сократительные белки – *актин и миозин* – осуществляют мышечное сокращение, также входят в состав цитоскелета.**



Цитоскелет эукариот. Актиновые микрофиламенты окрашены в красный, микротрубочки — в зелёный, ядра клеток — в голубой цвет



Цитоскелет. **Freely Universitat Berlin and the Dutch University of Utrecht**



Клетка кожи (кератиноцит). **Torsten Wittmann**

- **Транспортные белки** ***(гемоглобин, сывороточный альбумин*****) переносят кислород, жирные кислоты**

- **Резервный белок** ***казеин*** **входит в состав молока, а** ***ферритин*** **депонирует железо в селезенке и яичном желтке**

- **Гормоны-белки регулируют многие функции в организме (например,** ***инсулин*** **регулирует потребление глюкозы,** ***вазопрессин*** **стимулирует обратное всасывание воды в почках).**

• **Белки-ферменты** (***амилаза*** **– превращает крахмал в глюкозу,** ***ДНК-полимераза I*** **осуществляет репарацию молекул ДНК и т.д.).**

Благодаря ферментативной активности белки выполняют многие функции:

- двигательный белок миозин,

- регуляторные белки протеинкиназы,

- транспортный белок натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза и др.

• **Токсические вещества – *нейротоксин* (змеиный яд), который блокирует передачу нервного импульса**

• **Нейропептиды, ответственные за важнейшие жизненные процессы: сна, памяти, боли, чувства страха, тревоги.**

• **Белки (протеины) – важнейшая часть пищи:**

- они хорошо перевариваются и усваиваются,

- при оптимальном уровне их наиболее полно проявляются биологические свойства всех других пищевых веществ.

В процессе пищеварения ферменты разрушают потреблённые белки до аминокислот, которые используются для биосинтеза собственных белков организма или подвергаются дальнейшему распаду для получения энергии.

Организм не обладает большими резервами белка. При пониженном его поступлении с пищей:

- **быстро сокращается обновление клеток и тканей,**
- **замедляется рост,**
- **резко уменьшается образование ферментов и гормонов.**

При средней продолжительности жизни человека белки обновляются около 200 раз.

Простые белки состоят только из аминокислотных остатков.

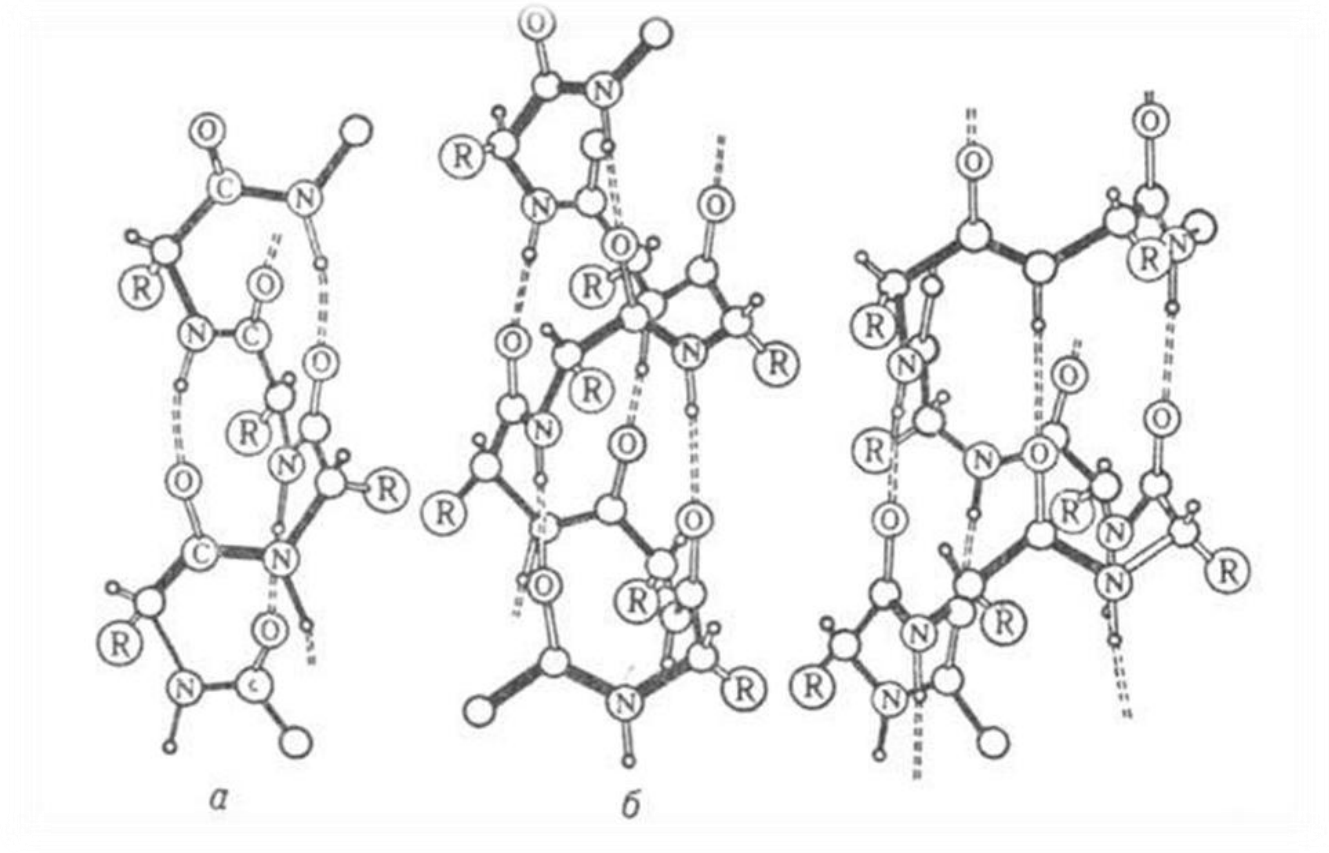
Сложные белки включают и *простетические* группы.

- **Гликопротеиды** содержат углеводные остатки. Большая часть внеклеточных белков (иммуноглобулины, гормоны ФСГ, ЛГ и др.) — гликопротеиды.
- **Липопротеиды** (содержат липиды) выполняют функцию транспорта липидов.
- **Металлопротеиды** (содержат не гемовые ионы металлов):

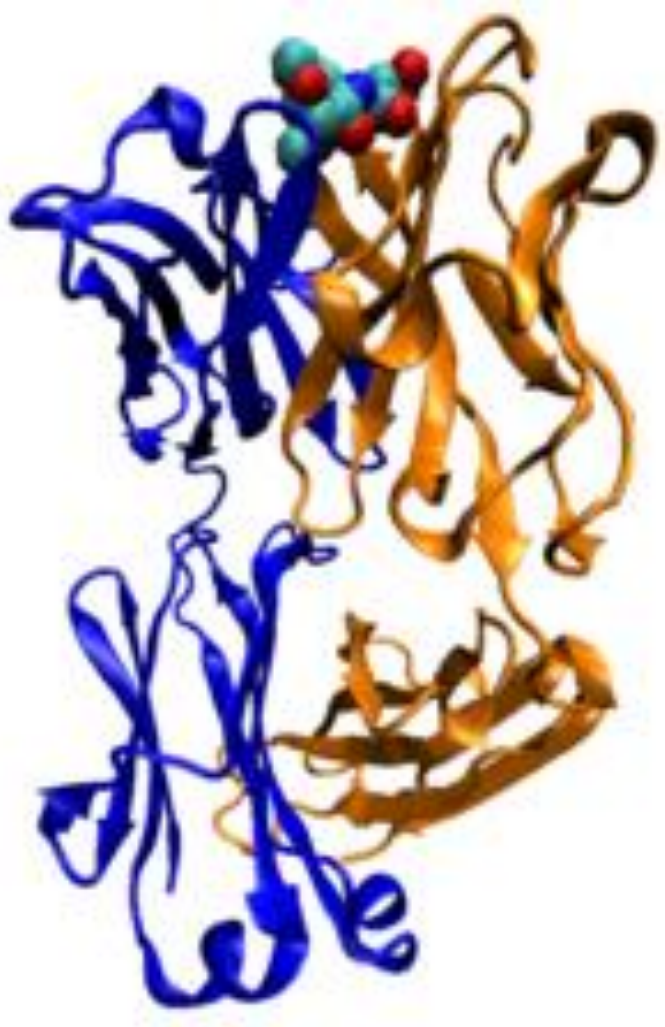
  - выполняют депонирующие и транспортные функции (**жезо**содержащие ферритин и трансферрин) и
  - ферменты (**цинк**содержащая **карбо**ангидраза и различные **супер**оксид**дисмутазы**, содержащие ионы меди, марганца, железа и других металлов).

- **Нуклеопротеиды (содержат ДНК или РНК) – хроматин, из которого состоят хромосомы.**

  (В хроматине: ДНК, ДНК-полимеразы, РНК и низкомолекулярный основной белок – гистон; ДНК с гистоном образует нуклеопротеидный комплекс)
- **Фосфопротеиды (содержащие остатки фосфорной кислоты) – казеин молока.**
- **Хромопротеиды – название сложных белков с окрашенными простетическими группами (гемоглобин, хлорофиллы),**
- **флавопротеиды и др.**

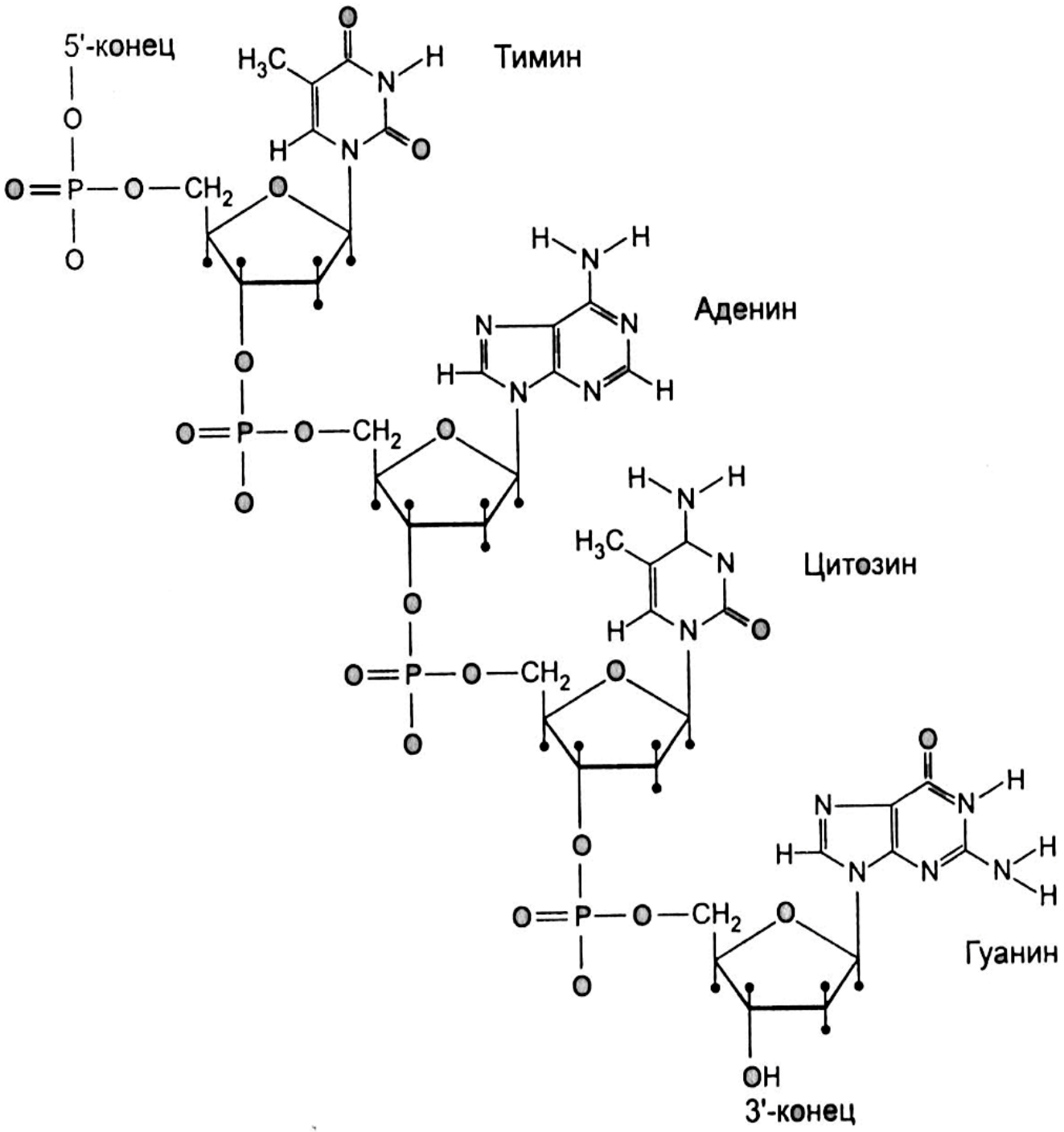


ные конформации полипептидных цепей: а - 310-спираль, б -
в - π-спираль (пунктирные линии - водородные связи).



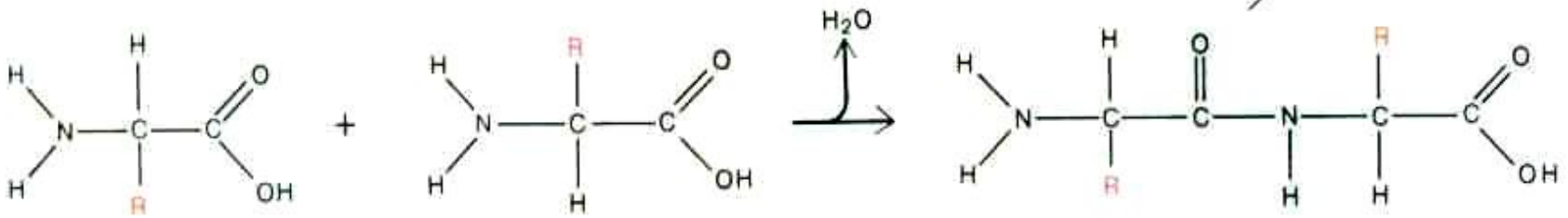
Мышиное антитело против холеры,
присоединённое к углеводородному антигену (в

- **Первичная структура биологической молекулы — точное обозначение атомной структуры и расположения химических связей между атомами (включая стереохимию).**
- **Для стандартного биополимера, в молекуле которого нет разветвлений и перекрестных связей (например, ДНК, РНК или белков) понятие первичной структуры является синонимом последовательности остатков мономеров (нуклеотидов или аминокислот).**
- **Первичную структуру белка записывают начиная с N-концевого остатка аминокислоты в направлении к карбоксильному концу (С), а первичную структуру нуклеиновых кислот — от 5’-конца к 3’-концу.**

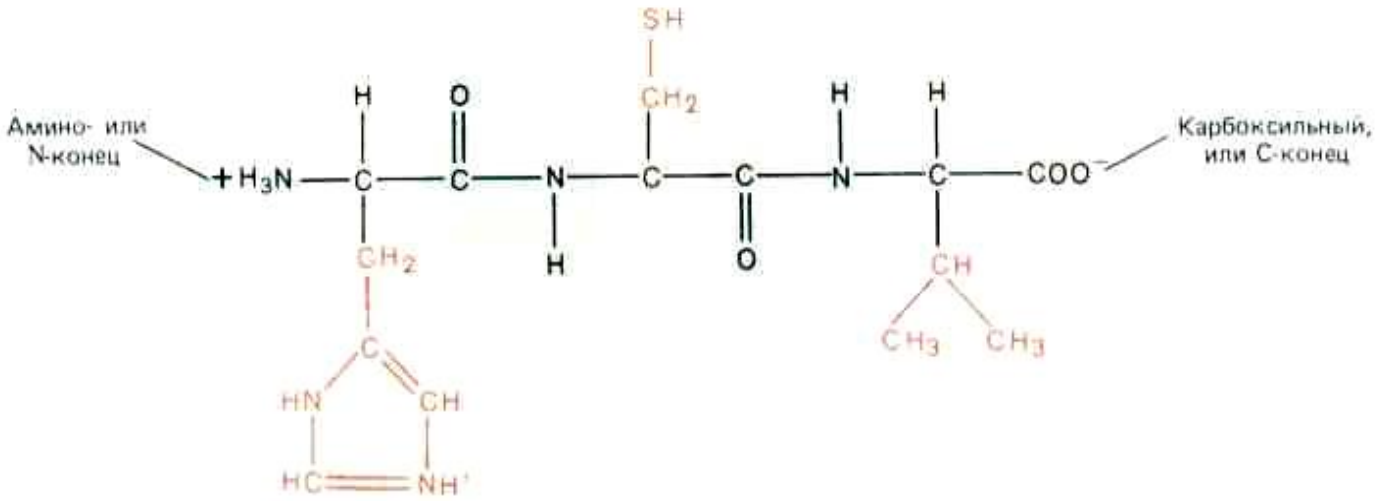

5'-конец
Тимин
Аденин
Цитозин
Гуанин
OH
3'-конец

ПЕПТИДНЫЕ СВЯЗИ

Аминокислоты обычно соединяются друг с другом при помощи амидной связи, называемой пептидной связью



Белки – это длинные полимеры, которые состоят из аминокислот, связанных пептидными связями; они обычно изображаются так, что N-конец оказывается слева



гистидин **цистеин** **валин**

- **Вторичная структура — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями.**

  Самые распространённые типы вторичной структуры белков:
- **α-спирали — плотные витки вокруг длинной оси молекулы. Один виток составляет 3,6 аминокислотных остатка, шаг спирали равен 0,54 нм (на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм).**
- **Спираль стабилизирована водородными связями между H и O пептидных групп, отстоящих друг от друга на 4 звена. Хотя α-спираль может быть как левозакрученной, так и правозакрученной, в белках преобладает правозакрученная.**

- **Спираль нарушают электростатические взаимодействия глутаминовой кислоты, лизина, аргинина.**
- **Расположенные близко друг к другу остатки аспарагина, серина, треонина и лейцина могут стерически мешать образованию спирали, остатки пролина вызывают изгиб цепи и тоже нарушают α-спирали;**

- **β-листы (складчатые слои) — несколько зигзагообразных полипептидных цепей, в которых водородные связи образуются между относительно удалёнными друг от друга (0,34 нм на аминокислотный остаток) аминокислотами в первичной структуре или разными цепями белка (а не близко расположенными, как в α-спирали).**
- **Эти цепи обычно направлены N-концами в противоположные стороны (антипараллельная ориентация) или в одну сторону (параллельная β-структура).**

- **Также возможно существование смешанной β-структуры, состоящей из параллельной и антипараллельной β-структур.**
- **Для образования β-листов важны небольшие размеры боковых групп аминокислот, преобладают обычно глицин и аланин;**
- **π-спирали;**
- **3_{10}-спирали;**
- **неупорядоченные фрагменты.**

- **Третичная структура — пространственное строение полипептидной цепи. Структурно состоит из элементов вторичной структуры, стабилизированных различными типами взаимодействий, в которых гидрофобные взаимодействия играют важнейшую роль.**
- **Между уровнем вторичной структуры и атомарной пространственной структурой можно выделять ещё один уровень — мотив укладки (архитектура, структурный мотив). Например:**
- **α/β-цилиндр: 8 параллельных β-тяжей формируют β-цилиндр внутри ещё одного цилиндра, сложенного из 8 α-спиралей. Такой мотив обнаруживается примерно в 10 % белков.**

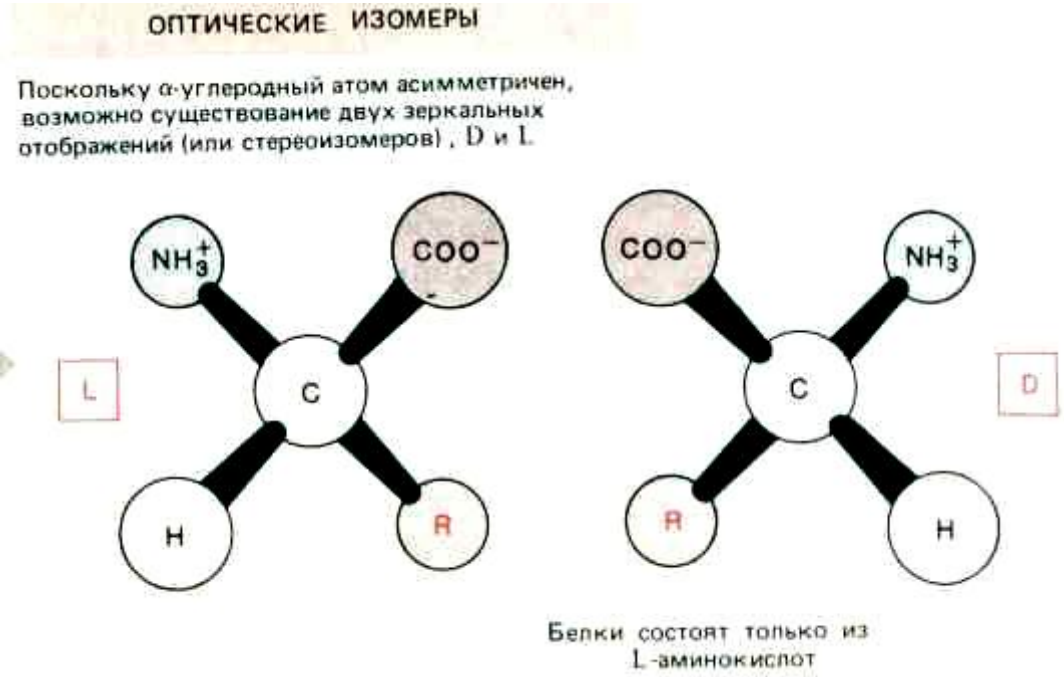
- **В стабилизации третичной структуры принимают участие:**
- **ковалентные связи (между двумя остатками цистеина — дисульфидные мостики);**
- **ионные связи между противоположно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков;**
- **водородные связи;**
- **гидрофобные взаимодействия.**
- **При взаимодействии с окружающими молекулами воды белковая молекула сворачивается так, чтобы неполярные боковые группы аминокислот оказались изолированы от водного раствора; на поверхности молекулы оказываются полярные гидрофильные боковые группы.**

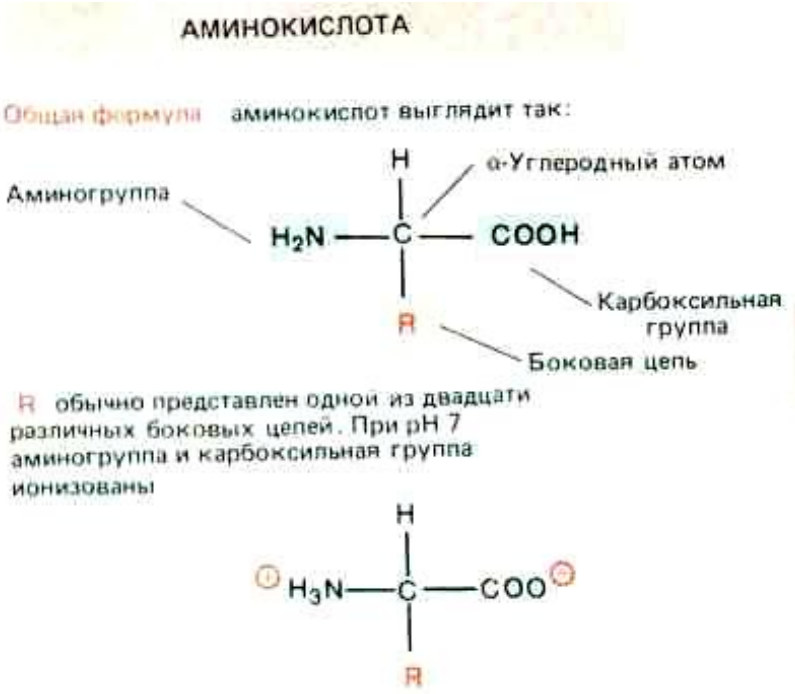
- ***Четвертичная структура*** **(или субъединичная, доменная) — взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса.**
- **Белковые молекулы, входящие в состав белка с четвертичной структурой, образуются на рибосомах по отдельности и лишь после окончания синтеза образуют общую надмолекулярную структуру.**
- **В состав белка с четвертичной структурой могут входить как идентичные, так и различающиеся полипептидные цепочки. В стабилизации четвертичной структуры принимают участие те же типы взаимодействий, что и в стабилизации третичной. Надмолекулярные белковые комплексы могут состоять из десятков молекул.**

2. Свойства аминокислот и их использование

В аминокислоте имеется карбоксильная группа (--COOH) и аминогруппа (--NH_2), присоединенные к одному и тому же атому углерода.

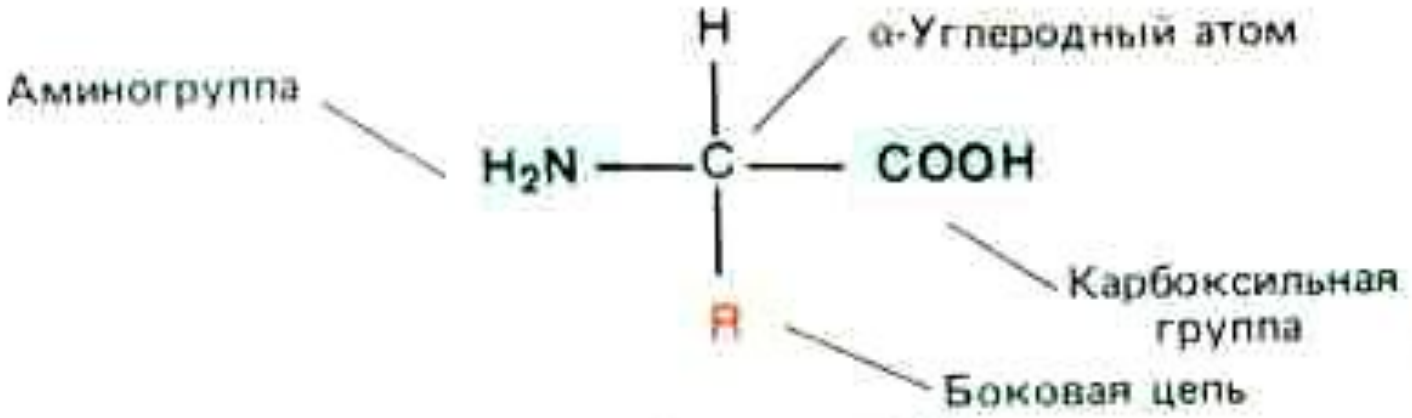
К этому атому углерода присоединена боковая группа.



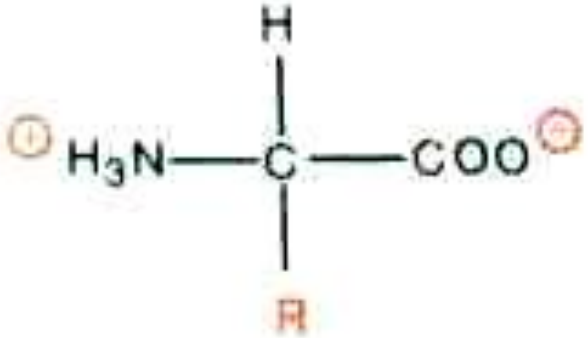


АМИНОКИСЛОТА

Общая формула аминокислот выглядит так:

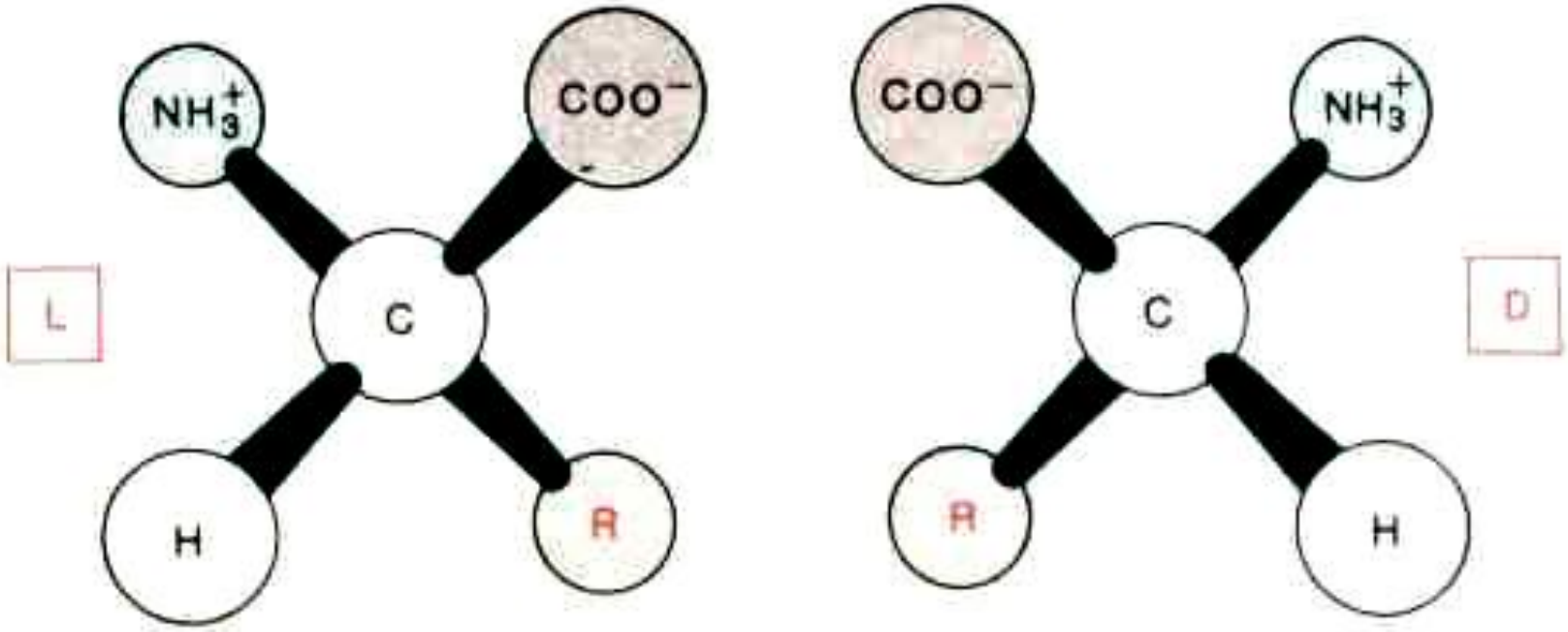


R обычно представлен одной из двадцати различных боковых цепей. При pH 7 аминогруппа и карбоксильная группа ионизованы



ОПТИЧЕСКИЕ ИЗОМЕРЫ

Поскольку α-углеродный атом асимметричен, возможно существование двух зеркальных отображений (или стереоизомеров), D и L.



Белки состоят только из L-аминокислот

Аминокислоты подразделяются на группы в с учетом свойств их боковых цепей:

***кислотные**

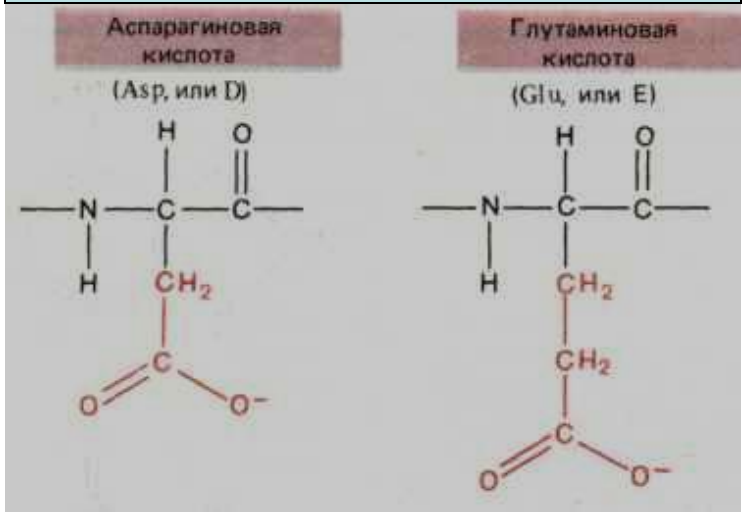
***основные**

***полярные незаряженные**

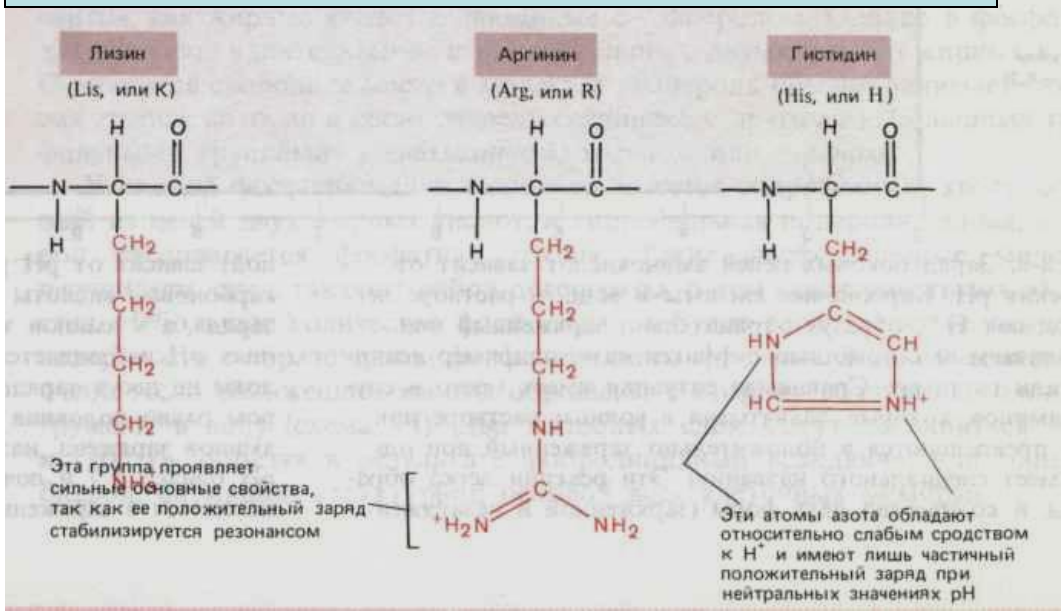
***неполярные**

Обозначаются три- или одна-буквенными символами. Например: аланин = Ala = A

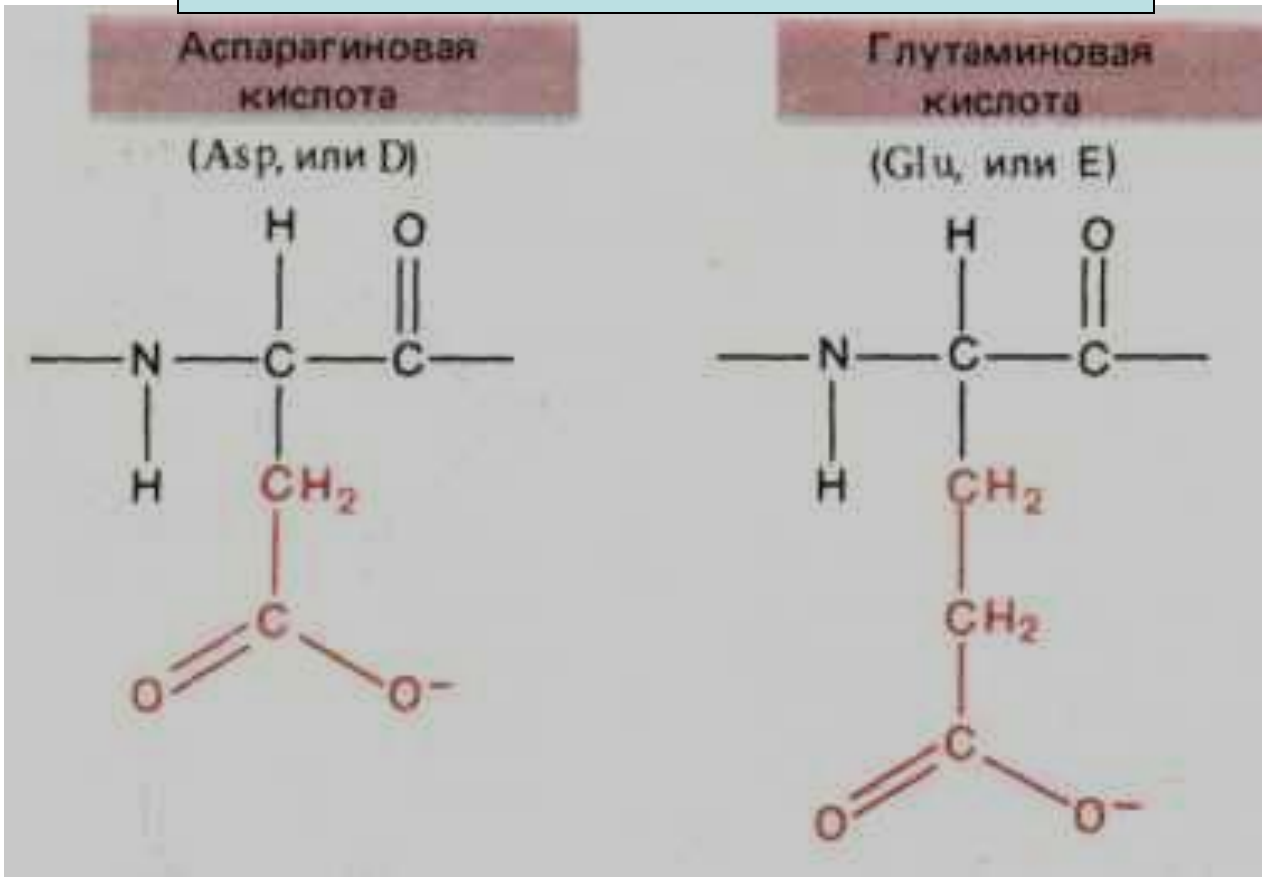
Кислотные боковые цепи



Основные боковые цепи



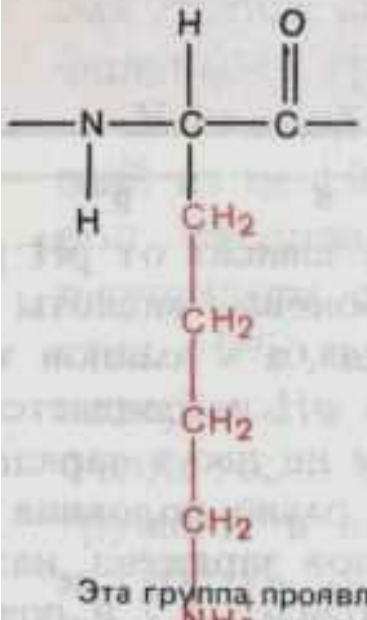
Кислотные боковые цепи



ОСНОВНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ

Лизин

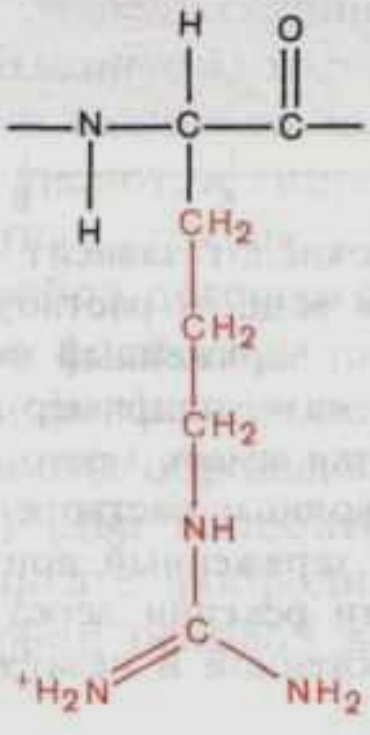
(Lis, или K)



Эта группа проявляет сильные основные свойства, так как ее положительный заряд стабилизируется резонансом

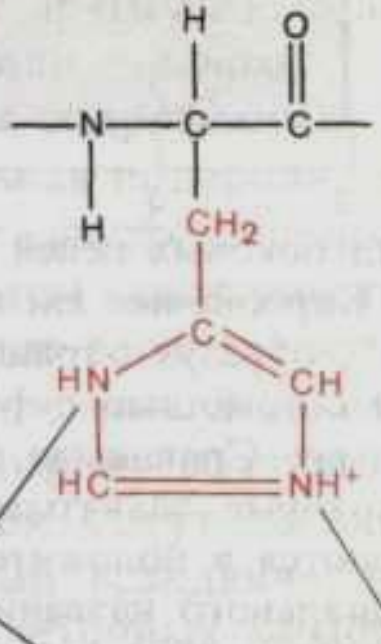
Аргинин

(Arg, или R)

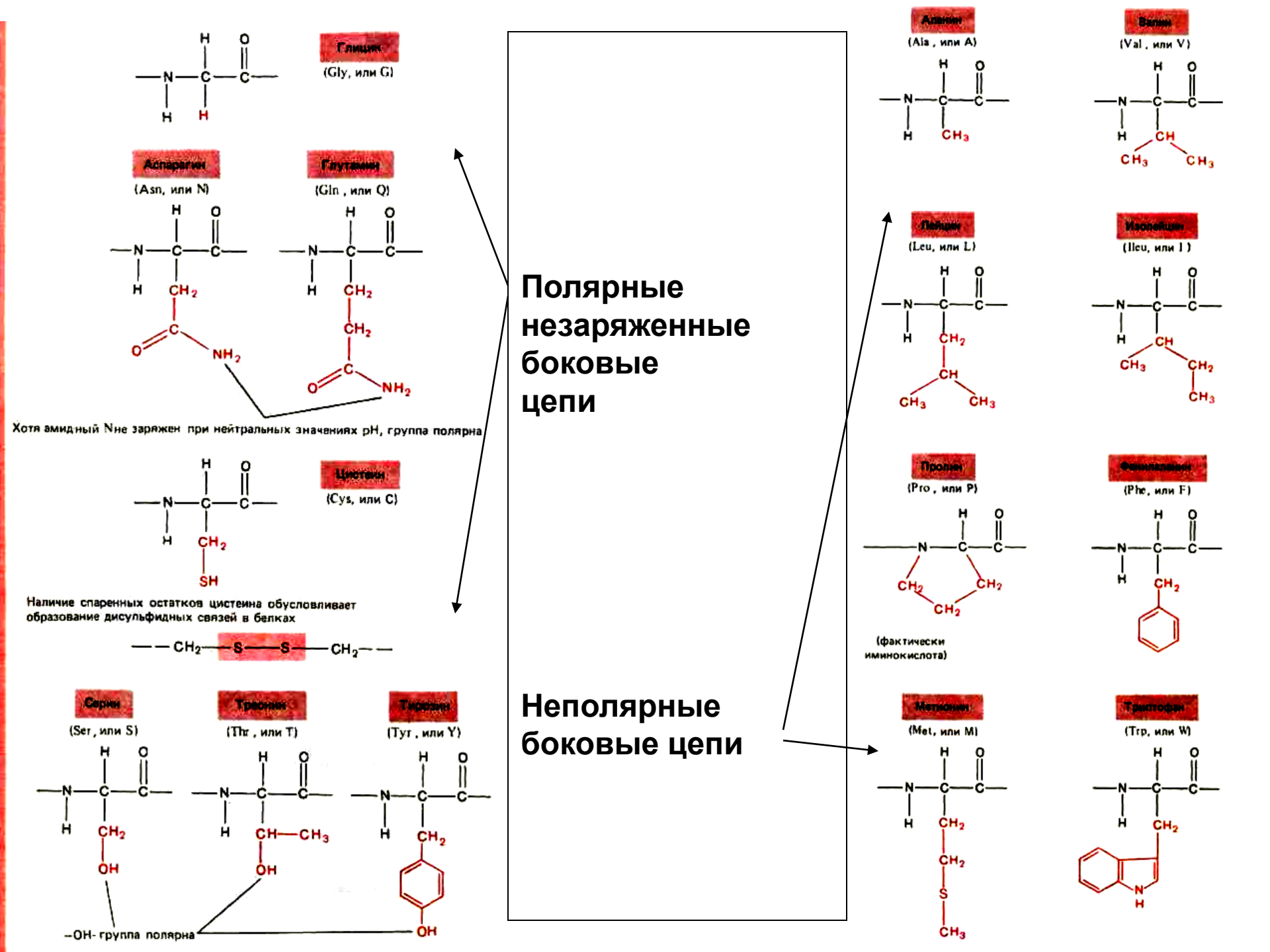


Гистидин

(His, или H)

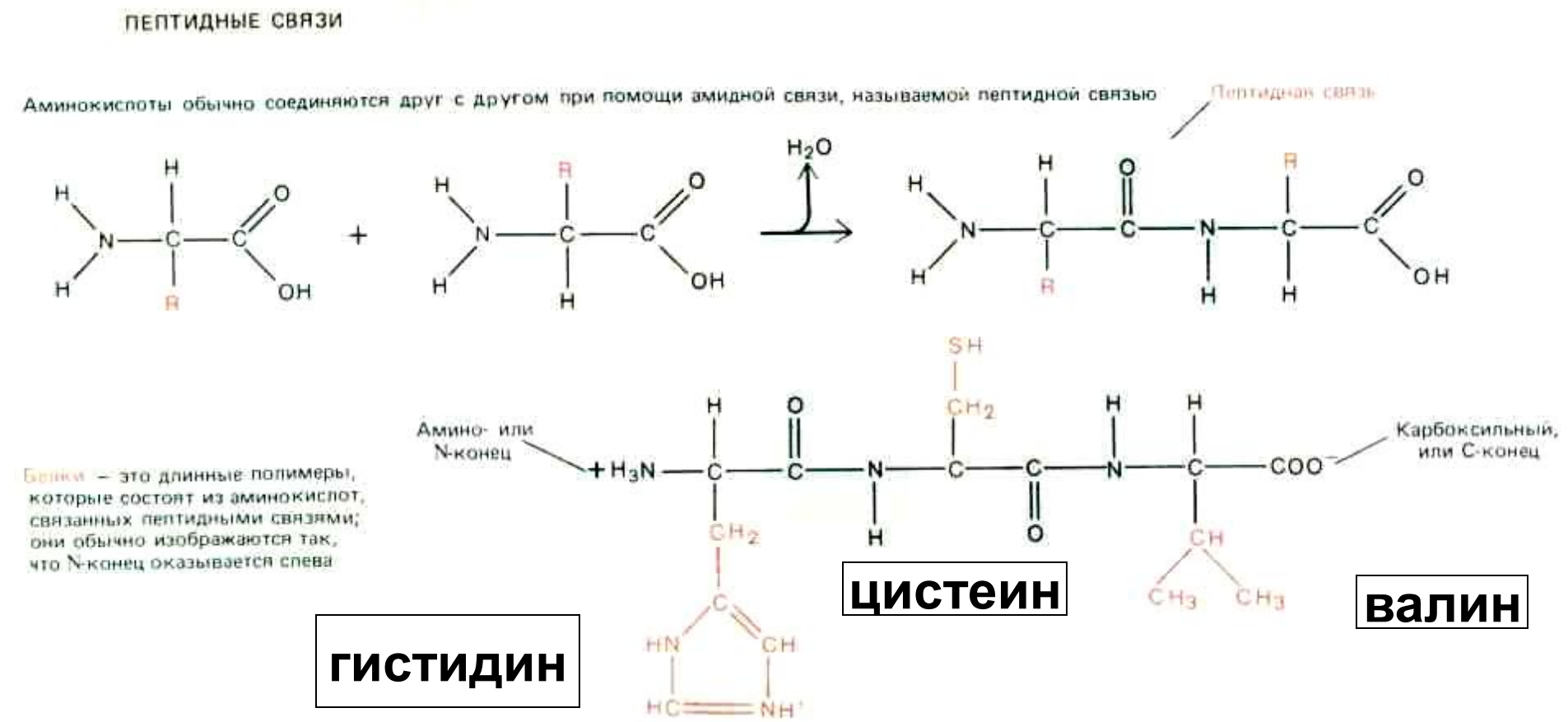


Эти атомы азота обладают относительно слабым сродством к H^+ и имеют лишь частичный положительный заряд при нейтральных значениях pH


Глицин
(Gly, или G)
Аспарагин
(Asn, или N)
Глутамин
(Gln , или Q)
Хотя амидный N не заряжен при нейтральных значениях pH, группа полярна
Цистеин
(Cys, или C)
Наличие спаренных остатков цистеина обусловливает образование дисульфидных связей в белках
Серин
(Ser , или S)
Треонин
(Thr , или T)
Тирозин
(Tyr , или Y)
–OH- группа полярна
Полярные незаряженные боковые цепи
Неполярные боковые цепи
Аланин
(Ala , или A)
Валин
(Val , или V)
Лейцин
(Leu, или L)
Изолейцин
(Ileu, или I)
Пролин
(Pro , или P)
(фактически иминокислота)
Фенилаланин
(Phe, или F)
Метионин
(Met, или M)
Триптофан
(Trp, или W)

Разные белки образуются в результате соединения аминокислот в различной последовательности.

Длинная цепь из 100–300 аминокислот составляет *полипептид*. Молекулы отдельных белков состоят из одного полипептида, другие – из нескольких.



Ala – аланин
Arg – аргинин
Asn – аспарагин
Asp – аспарагиновая кислота
Cys – цистеин
Gln – глутамин
Glu – глутаминовая кислота
Gly – глицин
His – гистидин
Ile – изолейцин ---
Leu – лейцин ---
Lys – лизин (БНБК)
Met – метионин
Phe – фенилаланин
Pro – пролин
Ser – серин
Thr – треонин (БНБК)
Trp – триптофан (БНБК)
Tyr – тирозин
Val – валин ---

В различных белках встречается 18 аминокислот и два амида (аспарагин и глютамин).

Аминокислоты используются как:

- **пищевые добавки,**
- **приправы,**
- **усилители вкуса,**
- **сырье в парфюмерной и фармацевтической промышленности:**

- растворы для внутривенных введений – капельницы,
- для лечения психических заболеваний,

- вводятся в сбалансированные растворы и буферы для культивирования клеток и тканей,

- **сырье для различных веществ и материалов.**

- ***Лизин*, *триптофан* и *треонин*** **используются:**
  - для обогащения растительных белков; кроме того,
  - лизин является сырьем для получения синтетических волокон и пленки.
- ***Метионин*** **служит пищевой и кормовой добавкой, его включают в блюда из сои.**

- ***L-энантиомер мононатриевой соли глутаминовой кислоты*** **обладает хорошо выраженным вкусом мяса, и его применяют в качестве усилителя вкуса, а *глутаминовую кислоту* для лечения психических заболеваний.**
- ***Аспарагиновая кислота*** **используется и как усилитель вкуса, и как сырье для синтеза аспартама.**
- ***Фенилаланин*** **также используется в качестве сырья для синтеза аспартама.**
- ***Глицин*** **добавляют как подсластитель, бактериостатическое вещество и антиоксидант.**
- ***Гистидин*** **является противовоспалительным средством.**
- **Фармацевтическим препаратом служит и *цистеин*.**

В организме животных и человека аминокислоты: *валин*, *гистидин*, *лейцин*, *изолейцин*, *лизин*, *метионин*, *треонин*, *триптофан*, *фенилаланин* не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты пищи.

Наибольшую потребность в них (особенно в лизине, метионине, триптофане) испытывают моногастричные животные и птицы, так как этих аминокислот недостает в производимых для них кормах.

Источниками *«незаменимых»* аминокислот для животных являются в основном растительные белки.

- **Отсутствие в пище незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток в кормах снижает продуктивность животных.**
- **«Незаменимые» аминокислоты должны содержаться в белках пищи в строго определенных пропорциях, соответствующих потребностям организма.**
- **Если не достает одной аминокислоты, то другие аминокислоты, оказавшиеся в избытке, не будут использоваться для синтеза белков.**
- **В таких случаях для поддержания жизнедеятельности организма потребуется дополнительное количество кормового белка, а это приведет к перерасходу кормов.**
- **Поэтому при содержании белков в растительной массе, используемой для кормления животных, ниже, чем требуется по нормам, количество белка балансируют путем введения белковых добавок.**

Потребность ряда сельскохозяйственных животных в незаменимых аминокислотах (% к сырому протеину)

Аминокислота	Свино-матки	Куры-несушки	Коровы
Лизин	5,0	5,0	4,5
Метионин	3,2	3,6	1,7
Триптофан	1,2	1,2	—
Треонин	6,0	4,0	3,4

Потребность человека в незаменимых аминокислотах

Аминокислота	Потребность, мг/кг массы тела в сутки	
	младенцы	взрослые
Валин	92	14
Гистидин	33	10
Изолейцин	83	12
Лейцин	135	16
Лизин	99	12
Метионин (и цистеин)	49	10
Фенилаланин (и тирозин)	141	16
Треонин	68	8
Триптофан	21	3

3. Биотехнология получения аминокислот

• **Растения и многие микроорганизмы синтезируют из углекислоты, воды и минеральных веществ входящие в их состав аминокислоты.**

• **У микроорганизмов высокая интенсивность синтеза белка, а содержание его в сухой массе достигает 60 % массы микроорганизмов.**

• **Белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот.**

• **В микробных клетках образуются и другие ценные питательные вещества:**

- **легкоусвояемые углеводы,**
- **липиды с повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот,**
- **витамины,**
- **макро- и микроэлементы.**

Эти свойства микроорганизмов используются для получения аминокислот и других продуктов.

В наибольшем количестве вырабатываются три продукта: *глутамат натрия*, *метионин* и *лизин*.

- **Глутамат натрия служит усилителем вкуса. Ежегодное производство L-глутаминовой кислоты > 1300 тыс. т.**
- **Лизин используется как пищевая добавка. Производство L- лизина > 1750 тыс. тон.**
- **Производство D,L- метионина > 2 млн. т, L-треонина > 40000 т, глицина > 16000 т и др.**

Наибольшую часть этих веществ поставляют японские фирмы.

В последнее время производство аминокислот почти удваивалось каждые 10 лет.

Потребность человечества даже в нескольких незаменимых аминокислотах значительно выше – лизина 5 млн. т., метионина 4 млн. т., треонина 3,7 млн. т. и триптофана 2 млн. т.

В промышленных масштабах белковые аминокислоты получают:

1) **гидролизом природного белоксодержащего сырья (из природных продуктов);**
2) **химическим синтезом**
3) **микробиологическим синтезом**
4) **биотрансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-микробиологический метод).**

Наибольшее значение имеют химический и микробиологический синтез.

- **Белорусская национальная биотехнологическая корпорация (Пуховичский район)**

Одна из 4-х стран, которая обладает таким производством: 14 современных самостоятельных заводов и производств.

Основные производственные объекты:

- **зернохранилище мощностью 450 тысяч тонн зерна;**
- **завод по производству комбикормов для КРС и птицы – 60 тонн в час;**
- **завод по производству комбикормов для свиней – 40 тонн в час;**
- **завод по производству премиксов – 20 тонн в час.**

- **Глубокая переработка зерна по современным методам биотехнологии с получением незаменимых аминокислот и высокопродуктивных сбалансированных комбикормов и премиксов для всех видов животных**

Мощности биотехнологического производства (в год):

- **L-лизин сульфат – 37000 т,**

  L-лизин моногидрохлорид – 40000 т,
- **L-треонин – 8000 т,**
- **L-триптофан – 1600 т,**
- **глютен – 25000 т.**

L-лизин сульфат – стартовая цена 2,5 тыс. $ за тонну, поднимается до 4 тыс.

При гидролизе **белоксодержащее сырье (отходы пищевой и молочной промышленности) нагревают при температуре 100–105 ºС в 20 %-м растворе соляной кислоты в течение 20–48 ч.**

Для ускорения реакции гидролиза белков могут быть использованы иммобилизированные протеолитические ферменты и ионообменные смолы.

При таких условиях белок подвергается глубокому гидролизу, в результате которого происходит рацемизация и разрушение некоторых аминокислот.

Полностью разрушается триптофан, отмечаются большие потери цистеина, метионина и тирозина (до 10–30 %).

Для уменьшения потерь аминокислот гидролиз проводят в вакууме или в атмосфере инертного газа и строго выдерживают соотношение кислоты и массы белка (200:1).

Рациональное использование сырья при гидролизе способствует созданию безотходных технологий и оздоровлению окружающей среды.

При химическом синтезе **получают продукт-рацемат в виде D- и L-стереоизомерных форм аминокислот.**

Большинство природных аминокислот относится к L-ряду.

D- аминокислоты входят в состав гликопротеинов клеточных стенок бактерий, антибиотиков и некоторых токсинов.

Проницаемость L-аминокислот в клетке в 500 раз превышает проницаемость ее антипода.

Стереоспецифичны транспорт и метаболизм аминокислот (кроме *метионина, поэтому* метионин получают преимущественно химическим синтезом).

После химического синтеза необходима последующая обработка с целью получения оптически чистой аминокислоты.

Разделение рацематов аминокислот – дорогая и чрезвычайно трудоемкая процедура. Проводится с помощью микробиологического или ферментативного синтеза.

- **D, L-метионин получают из акролеина. Разделение рацемата не требуется.**
- **D, L-триптофан получают из индола и нитроуксусного эфира. При получении для кормовых целей разделение рацемата можно не проводить.**
- **L-глутамат натрия получают из акрилонитрила. Образующийся рацемат растворим лучше, чем оба изомера. Для выделения L-формы из насыщенного раствора добавляют кристаллы L-глутамата натрия.**

- **L-лизин получают из циклогексанона. Разделение изомеров основано на различной растворимости солей, получаемых при взаимодействии рацемата с L-винной кислотой.**

  Соль D-лизина и винной кислоты наименее растворима.

  После разделения изомеров лизина:

  соли разрушают, L-форму освобождают от L-винной кислоты с помощью ионного обмена на колоннах, а D-лизин используют снова для рацемизации.

Микробиологический синтез

Более 60 % всех производимых промышленностью высокоочищенных препаратов белковых аминокислот получают этим способом.

Главное преимущество – возможность получения L-аминокислот на основе возобновляемого сырья.

Используется и биотрансформация предшественников аминокислот, получаемых химическим путем, особенно с помощью иммобилизованных ферментов или клеток микроорганизмов.

Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия способности у некоторых микроорганизмов выделять в культуральную среду какую-либо одну аминокислоту.

Большинство диких штаммов микроорганизмов продуцируют аминокислоты во внешнюю среду в очень незначительных количествах.

Среди продуцентов глутаминовой кислоты 30 % дрожжи, 30 % – стрептомицеты, 20 % – бактерии и 10 % – микроскопические грибы.

Corynebacterium glutamicum способен к свехсинтезу глутамата.

Этот штамм использовали при организации первого в мире крупномасштабного производства глутаминовой кислоты микробиологическим методом в Токио.

В России в области промышленного синтеза аминокислот работы были начаты в 50-х годах прошлого столетия по инициативе академика А. А. Александрова.

Перспективные штаммы продуцентов постоянно улучшаются посредством селекции мутантов с измененной генетической программой и регуляторными свойствами.

Микроорганизмы — продуценты аминокислот

Аминокислота	Микроорганизмы
Аргинин	*E. coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum*
	Brevibacterium flavum, Serratia marcescens
Гистидин	*B.flavum, C. glutamicum, S.marcescens,* виды *Streptomyces*
Изолейцин	*B. flavum, C. glutamicum, B. subtilis, S. marcescens*
Лейцин	*Brevibacterium lactofermentum, S. marcescens, C. glutamicum*
Лизин	*B. flavum, C glutamicum*
Фенилаланин	*B. flavum, C glutamicum*
Пролин	*B. flavum*
Серии	*C. glutamicum*
Треонин	*B. flavum, C. glutamlcum, E. coli, Arthrobacter parafintns Arthrobacterparafinens,*
	S. marcescens
Триптофан	*Micrococcus, Candida utlls, B. subtilis*
Тирозин	*B. flavum, C. glutamlcum*

- **Производство лизина.** **По содержанию лизина наименее сбалансированы белки злаковых культур, у которых дефицит его составляет от 20 до 50 %.**

  Для удовлетворения потребностей животноводства в лизине крупнотоннажное производство налажено в Испании, Франции, Японии и США.

  В клетках микроорганизмов лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты и служит конечным продуктом разветвленного метаболического пути биосинтеза, общего для трех аминокислот – лизина, метионина и треонина.

- **Таким образом, в процессе новообразования аминокислот из общего предшественника одновременно с лизином возникают две другие аминокислоты — метионин и треонин.**
- **Эффекта накопления в среде всего одной целевой аминокислоты добиваются путем блокирования процессов, ведущих к синтезу побочных амино-кислот, возникающих в связи с разветвлением метаболического пути.**

Технология получения лизина (принцип)

- **Приготовление и стерилизация питательной среды, технологического оборудования и коммуникаций**
- **Получение посевного материала в производственных инокуляторах или посевных аппаратах**
- **Культивирование продуцента и биосинтез лизина в промышленных ферментерах**

- **Образование лизина в клетке бактерии находится под строгим метаболическим контролем. У типичных продуцентов L-лизина — *Brevibactehum flavum* и *Corynebacterium glutamlcum* — фермент аспартаткиназа, открывающий метаболический путь, является алло-стерическим белком, чувствительным к ингибированию по прин-ципу обратной связи при совместном и согласованном действии побочных продуктов L-треонина и L-лизина.**
- **При накоплении тре-онина и лизина в избыточной концентрации ингибируется аспартаткиназа и их синтез останавливается, при пониженной концен-трации любой из двух аминокислот процесс активизируется.**
- **Чтобы добиться образования лизина в больших количествах, получают мутанты двух типов. У мутантов первого типа не синтезируется треонин.**

- **Ферментативный синтез аминокислот одно- и многостадийным.**

  Методы в этих процессах могут заключаться в применении in situ интактных, но не растущих организмов,

  или же в применении иммобилизированных препаратов.

  Используется 5 классов ферментов.
- **Гидролазы – при синтезе L-лизина, L-цистеина.**
- **Лиазы – в реакциях дезаминирования при получении L-аспартата из фумарата аммония.**
- **Ферменты, содержащие пиридоксальфосфат, это обычные коферменты, которые используются для синтеза тирозина, триптофана и др.**

- **Дегидрогеназы аминокислот катализируют обратимые реакции дезаминирования.**

  Применяют их в непрерывных процессах синтеза аминокислот из соответствующих кетоаналогов.
- **Глутаминсинтаза катализирует АТР-зависимую реакцию аминирования глутамата, которая сопряжена со сбраживанием сахара дрожжами.**

  Высвобождающаяся при брожении энергия используется для синтеза глутамина.

  Для разделения рацемической смеси наиболее подходящим является метод, основанный на использовании плесневой аминоацилазы.

  Фермент специфически гидролизует только ацил-L-аминокислоту; ацил-D-аминокислота остается неращепленной и образующаяся смесь L-аминокислоты и ацил-D-аминокислоты в последующем легко разделяется.

Из ацил-D-аминокислоты при воздействии рацемазы получают рацемическую смесь ацил-D, L-аминокислот и процесс получения L-аминокислоты повторяется.

Аминоацилаза может быть использована для разделения многих аминокислот.

Впервые такая технология получения аминокислот была внедрена в производство японской компанией "Танабе Сейяку". В 1969 году компания наладила крупнотоннажное производство метионина с применением иммобилизированной на ДЭАЭ-сефадексе аминоацилазы в реакторе с неподвижным слоем.

Итальянской фирмой "Снам Проджетти" иммобилизация фермента проведена путем включения его в полые волокна триацетатцеллюлозы. Иммобилизированный фермент был использован для получения триптофана на пилотной установке.

Третью из незаменимых аминокислот - L-лизин также получают путем гидролиза D-,L-α-амино-ε-капролактама, который является побочным продуктом найлонового производства. Его получают химическим путем из циклогексена. Используют два фермента.

При производстве L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония пришлось применить аспартазу микробного происхождения путем иммобилизирования целых клеток E. coli. Внутриклеточный фермент аспартаза даже при иммобилизации оказался мало стабильным.

Нередко в качестве заменителя лимонной кислоты в пищевой и фармацевтической промышленности используется L-яблочная кислота.

Рацемическую смесь D, L-яблочной кислоты получают химическим путем. Методом микробиального синтеза получают только L-яблочную кислоту.

- **Японская фирма "Танабе Сейяку" в процессе получения этой кислоты использует иммобилизированные в полиакриламидном геле микробные клетки, продуцирующие фумаразу. Причем, чтобы не образовывалась и янтарная кислота, необходима дополнительная обработка микробных клеток. В Италии при производстве L-яблочной кислоты используют не микробный фермент, а иммобилизированный фермент посредством включения его в полые волокна триацетатцеллюлозы. Экономические результаты сопоставимы.**

Для производства аминокислот бактерии стали использоваться с начала 50-х годов. Штаммы их постоянно улучшали генетическими методами. При этом выделяли ауксотрофные мутанты и мутанты с измененными регуляторными свойствами.

Для обеспечения образования аминокислот в больших количествах необходимо изменение условий среды, а следовательно и системы регуляции обмена.

Этого можно добиться изменением концентрации субстрата, pH, концентрации продукта, или же путем установления критических уровней содержания других веществ (ионов металлов, органических веществ) в среде. При этом либо стимулируется потребление субстрата и выделение аминокислот в среду, либо подавляются побочные реакции и процессы деградации аминокислот.

- **Производство L-аминокислот глутамата, валина, глутамина и пролина, а также рацемической смеси аланина (DL-) основано на использовании особенностей метаболизма диких штаммов бактерий или стимуляции образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды. Образовывать аминокислоты в количествах, рентабельных для производства, способны бактерии многих родов. Так, при выращивании на углеводном сырье (гидролизат крахмала, мелассы из сахарного тростника и свеклы), на этаноле или ацетате виды Corynebakterium или Brevibakterium при наличии достаточного количества биотина в среде способны синтезировать до 30 г/л глутамата. Для накопления этой аминокислоты важным условием является полное или частичное подавление активности 4 а 0-кетоглутаратдегидрогеназы. Образование продукта увеличивается при добавлениеи 4 в 0-лактамных антибиотиков, поверхностно-активных веществ и жирных кислот. Путем изменений условий среды процесс ферментации, в ходе которого образуется глутамат, может быть переключен на синтез глутамина или пролина.**

  При высокой концентрации ионов аммония и цинка в слабокислой среде увеличивается синтез глутамина, а высокая концентрация биотина и аммония создают благоприятные условия для образования пролина. DL-аланин образуется при участии пирувата.

Ауксотрофные мутанты используются для получения веществ-предшественников, а также для синтеза соединений, являющихся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций. Так, L-аспартат является общим предшественником для лизина, треонина,метионина и изолейцина.

Получить ауксотрофные мутанты, которые бы накапливали конечные продукты неразветвленных цепей биосинтеза, например L-аргинин, невозможно. В таких случаях отбирают мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, что обеспечивает повышенный выход конечного продукта. Это регуляторные мутанты.

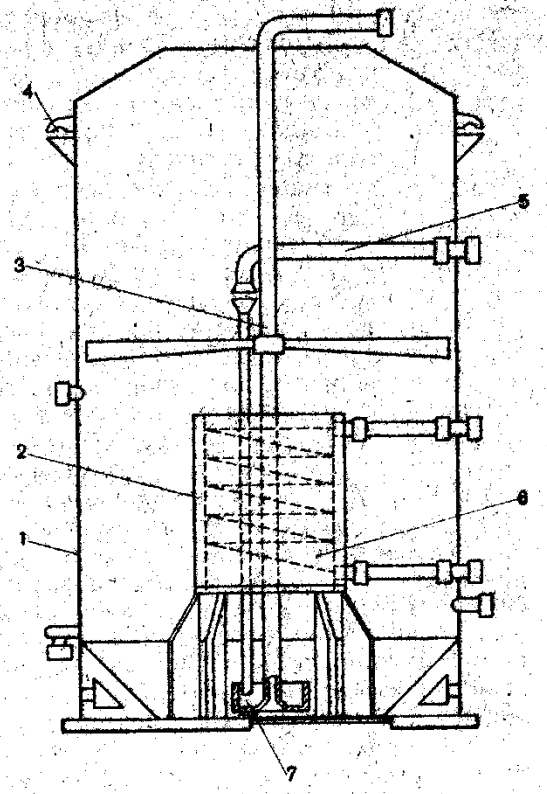


Рис. 25. Схема эрлифтного ферментера объемом 600 м^3 (по И. И. Бортникову, А. М. Босенко, 1982)

Основной источник незаменимых жирных кислот для сельскохозяйственных животных — различные растительные продукты, входящие в состав кормов. Однако в растительных кормах содержится мало липидов или они имеют неблагоприятный состав жирных кислот, что ухудшает питательную ценность кормов. В целях балансирования кормовых рационов сельскохозяйственных животных по содержанию незаменимых жирных кислот осуществляется поиск новых источников биологически полноценных липидов, которые можно было бы использовать в качестве высококонцентрированных кормовых добавок.

Наиболее перспективными промышленными продуцентами липидов, близкими по составу к растительным жирам и пригодными для использования в кормовых целях, являются *дрожжи* и *микроскопические грибы,* которые накапливают внутриклеточные липиды. Однако известны виды, способные выделять липиды в культуральную жидкость. В клетках таких микроорганизмов обычно содержится от 25 до 70 % липидов в расчете на сухую массу, которые на 40-90 % представлены *триацилглицеринами* и на 5-50 % - *фосфолипидами.* В них также содержится много стероидных веществ (до 1-1,5 % на сухую массу), представленных главным образом *эргостерином,* из которого в организме животных образуется витамин D_2.

Много липидов (50-60 % от сухой массы) способны накапливать некоторые штаммы дрожжей Phodotorula, Lipomyces. Клетки дрожжей рода Candida синтезируют меньше липидов (20-40 %), однако отличаются высокой скоростью роста и способностью хорошо утилизировать разнообразные источники сырья. Микроскопические грибы могут синтезировать до 40-50 % высокоценных липидов, сходных по составу жирных кислот с растительными маслами (табл. 12.4).

Вследствие образования в клетках микроорганизмов активных комплексов гидролитических ферментов они способны утилизировать в качестве источников углерода различные субстраты – гидролизаты растительных отходов, послеспиртовую барду, молочную сыворотку, мелассу, отходы зерноперерабатывающей промышленности и др.

Основной источник незаменимых жирных кислот для сельскохозяйственных животных — различные растительные продукты, входящие в состав кормов. Однако в растительных кормах содержится мало липидов или они имеют неблагоприятный состав жирных кислот, что ухудшает питательную ценность кормов. В целях балансирования кормовых рационов сельскохозяйственных животных по содержанию незаменимых жирных кислот осуществляется поиск новых источников биологически полноценных липидов, которые можно было бы использовать в качестве высококонцентрированных кормовых добавок.

Наиболее перспективными промышленными продуцентами липидов, близкими по составу к растительным жирам и пригодными для использования в кормовых целях, являются *дрожжи* и *микроскопические грибы,* которые накапливают внутриклеточные липиды. Однако известны виды, способные выделять липиды в культуральную жидкость. В клетках таких микроорганизмов обычно содержится от 25 до 70 % липидов в расчете на сухую массу, которые на 40-90 % представлены *триацилглицеринами* и на 5-50 % - *фосфолипидами.* В них также содержится много стероидных веществ (до 1-1,5 % на сухую массу), представленных главным образом *эргостерином,* из которого в организме животных образуется витамин D_2.

Много липидов (50-60 % от сухой массы) способны накапливать некоторые штаммы дрожжей Phodotorula, Lipomyces. Клетки дрожжей рода Candida синтезируют меньше липидов (20-40 %), однако отличаются высокой скоростью роста и способностью хорошо утилизировать разнообразные источники сырья. Микроскопические грибы могут синтезировать до 40-50 % высокоценных липидов, сходных по составу жирных кислот с растительными маслами (табл. 12.4).

Вследствие образования в клетках микроорганизмов активных комплексов гидролитических ферментов они способны утилизировать в качестве источников углерода различные субстраты – гидролизаты растительных отходов, послеспиртовую барду, молочную сыворотку, мелассу, отходы зерноперерабатывающей промышленности и др.

Основной источник незаменимых жирных кислот для сельскохозяйственных животных — различные растительные продукты, входящие в состав кормов. Однако в растительных кормах содержится мало липидов или они имеют неблагоприятный состав жирных кислот, что ухудшает питательную ценность кормов. В целях балансирования кормовых рационов сельскохозяйственных животных по содержанию незаменимых жирных кислот осуществляется поиск новых источников биологически полноценных липидов, которые можно было бы использовать в качестве высококонцентрированных кормовых добавок.

Наиболее перспективными промышленными продуцентами липидов, близкими по составу к растительным жирам и пригодными для использования в кормовых целях, являются *дрожжи* и *микроскопические грибы,* которые накапливают внутриклеточные липиды. Однако известны виды, способные выделять липиды в культуральную жидкость. В клетках таких микроорганизмов обычно содержится от 25 до 70 % липидов в расчете на сухую массу, которые на 40-90 % представлены *триацилглицеринами* и на 5-50 % - *фосфолипидами.* В них также содержится много стероидных веществ (до 1-1,5 % на сухую массу), представленных главным образом *эргостерином,* из которого в организме животных образуется витамин D_2.

Много липидов (50-60 % от сухой массы) способны накапливать некоторые штаммы дрожжей Phodotorula, Lipomyces. Клетки дрожжей рода Candida синтезируют меньше липидов (20-40 %), однако отличаются высокой скоростью роста и способностью хорошо утилизировать разнообразные источники сырья. Микроскопические грибы могут синтезировать до 40-50 % высокоценных липидов, сходных по составу жирных кислот с растительными маслами (табл. 12.4).

Вследствие образования в клетках микроорганизмов активных комплексов гидролитических ферментов они способны утилизировать в качестве источников углерода различные субстраты – гидролизаты растительных отходов, послеспиртовую барду, молочную сыворотку, мелассу, отходы зерноперерабатывающей промышленности и др.

Клонирование ДНК

Введение фрагмента ДНК в самореплицирующийся генетический аппарат

Важный элемент технологии рекомбинантных ДНК – введение чужеродных генов в клетку с помощью векторов (*вектор – экипаж*).

Чаще векторами являются плазмиды и ДНК фага λ.

- ***Плазмиды***

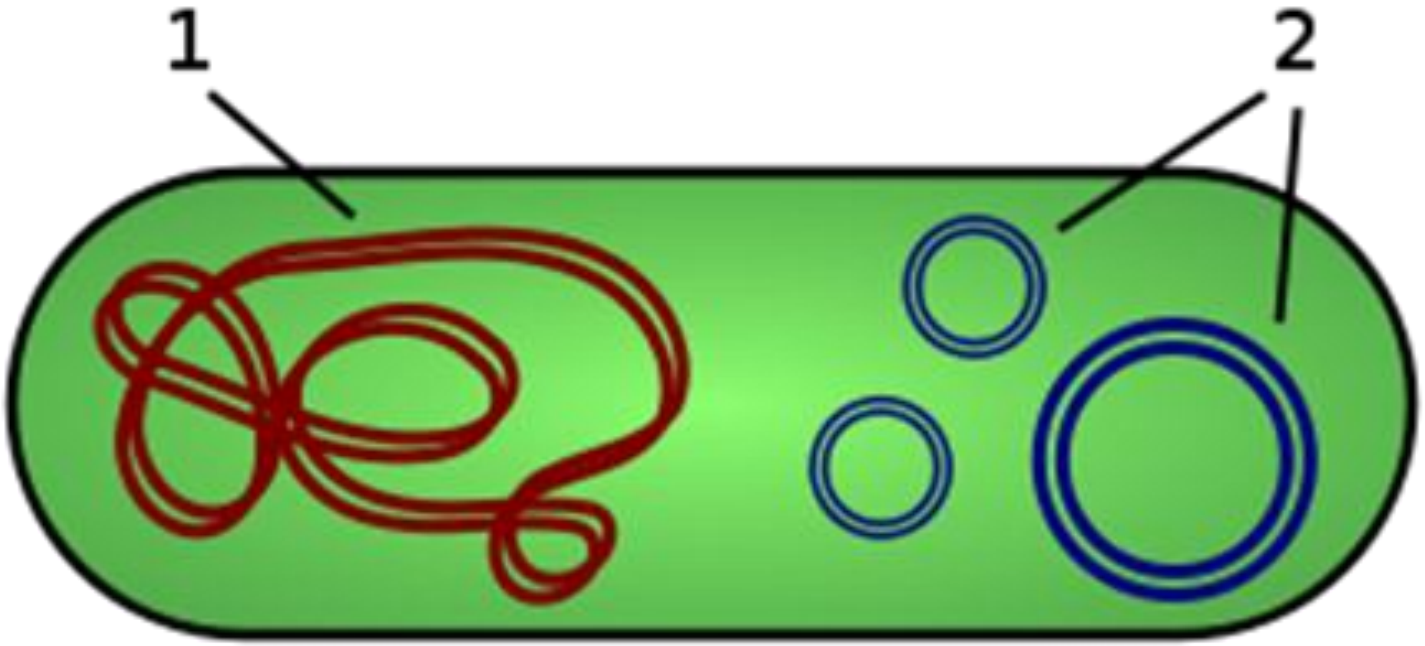
- **У прокариотических организмов генетический элемент – хромосома, кольцевая молекула ДНК.**

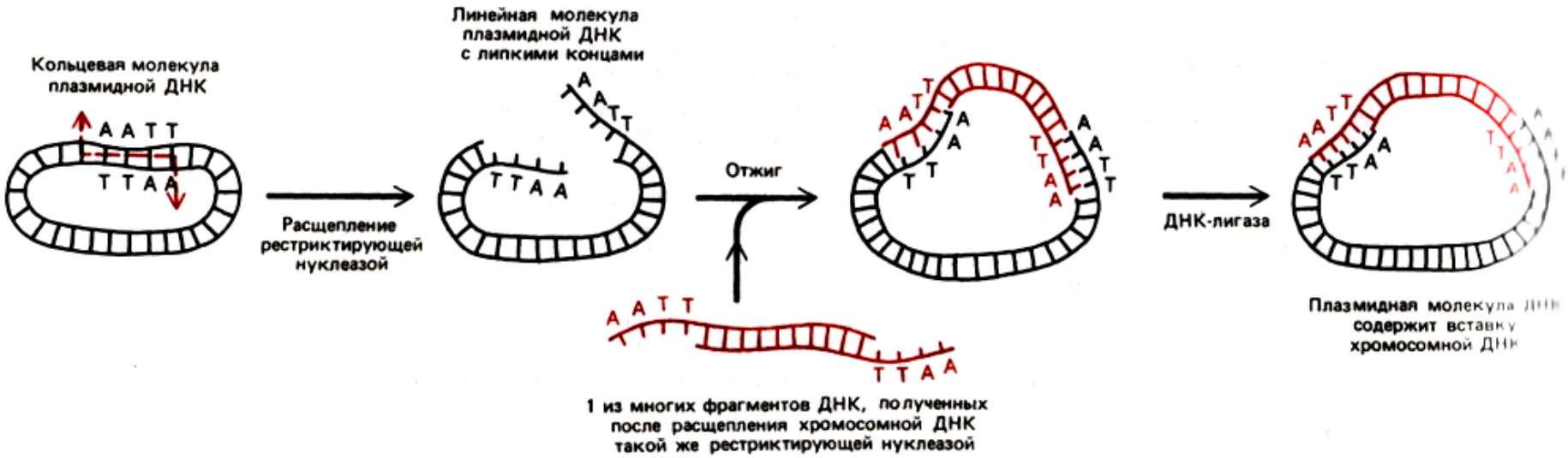
  Она способна к саморепликации.

  После репликации начинается деление клетки.

- **Кроме хромосомы в бактериальной клетке имеется дополнительный генетический материал виде плазмидной или фаговой ДНК.**

Хромосомная ДНК (1) и плазмиды (2) в бактериальной клетке [Википедия]





При наличие липких концов происходит соединение двух фрагментов ДНК в результате спаривания комплементарных нуклеотидов.

Соединенные фрагменты ДНК могут быть связаны ковалентными связями под действием ДНК-лигазы.

Образующаяся гибридная молекула плазмидной ДНК будет содержать фрагмент (вставку) хромосомной ДНК.

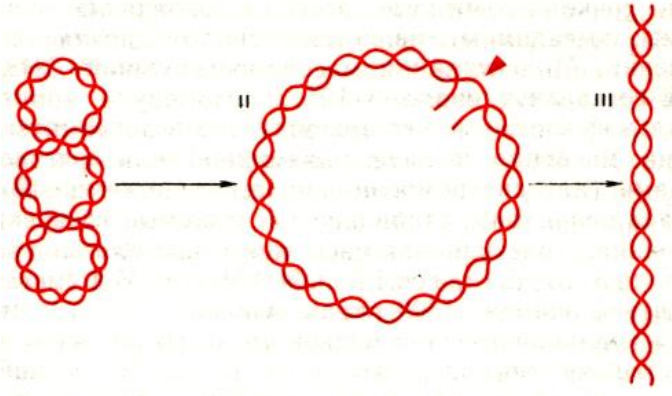
Плазмиды **– замкнутые в кольцо, наследуемые ДНК.**

В плазмиде от 2 до 100 тысяч пар оснований (равноценно нескольким, а иногда и многим генам).

Плазмидная ДНК – это сверхскрученные кольцевые молекулы.

Если разрывается одна нить ДНК, то образуется открытая кольцевая, или *релаксированная* молекула;

при разрыве обоих нитей образуется *линейная* молекула.



Формы молекул ДНК плазмид:
/ – сверхскрученная молекула, у которой обе цепи ковалентно замкнуты.
// – релаксированная двухцепочечная молекула;
/// – линейная двухцепочечная молекула;

Сверхскрученные молекулы хуже связывают *этидий бромид* и при обработке этим красителем сохраняют большую плотность, чем две другие формы молекул. Это используется для выделения плазмидных ДНК.

В щелочных растворах линейные и релаксированные молекулы ДНК разъединяются (денатурация), а цепи замкнутых молекул полностью не отделяются друг от друга. Поэтому после нейтрализации быстро ренатурируют.

Молекулярная масса плазмид от $1{,}5 \cdot 10^6$ до $3 \cdot 10^8$ Д или 1,5–300 мегадальтон (МД равняется примерно 1500 парам оснований, которые обеспечивают кодирование 1–2 белков среднего размера).

Мелкие плазмиды кодируют 1–2 белка, а более крупные – до 300 белков, в том числе и множество ферментов.

Присутствуют плазмиды в цитоплазме большинства видов бактерий. Маленьких плазмид может быть 20 и более копий, а крупного размера – не более 1–2 копий.

Плазмиды легко выделить и отделить от бактериальных хромосом, от которых они отличаются по размеру, нуклеотидному составу и плотности.

Плазмиды обладают двумя замечательными свойствами:

- ***во-первых*, они сами могут переходить от одной клетки к другой и даже от бактерии одного вида к бактерии другого;**
- ***во-вторых*, в них можно встраивать чужеродные гены, которые затем в качестве «пассажиров» могут переноситься в клетку-хозяина и становиться там частью генома.**

Из клетки донора в клетку реципиента переносится одна нить плазмидной ДНК.

Синтез вторых нитей происходит в клетках донора и реципиента.

Контролируются эти процессы другими генами.

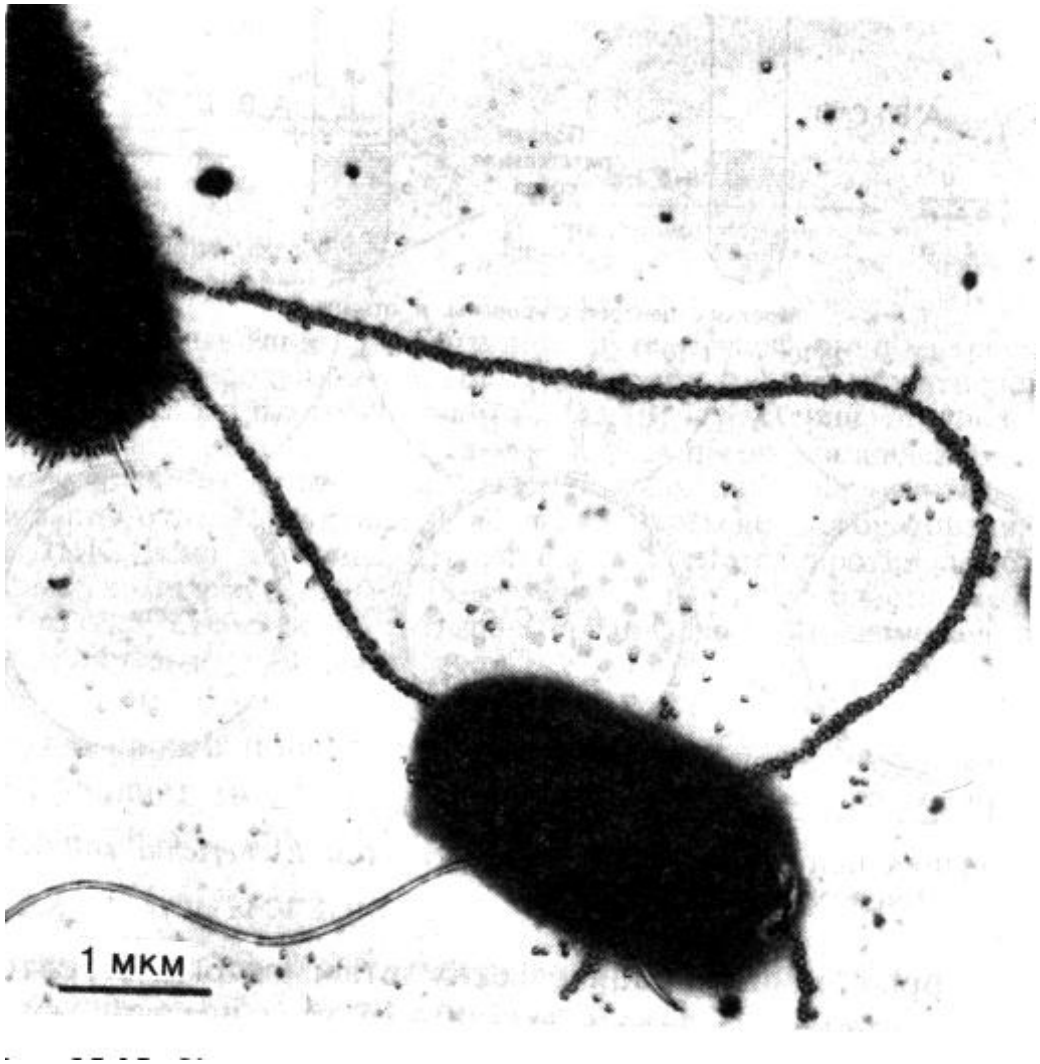
У бактерий контакт клеток осуществляется за счет образования коньюгационного мостика.

Способность к формированию его закодирована во многих плазмидах. По мостику плазмиды переносят свои гены, а в ряде случаев – и гены клетки-хозяина (т.е. они обладают способностью к мобилизации хромосом).

F-плазмида E. coli является фактором пола и способна к мобилизации хромосомы клеток не только своего вида, но и родственных энтеробактерий.

Клетки *Escherihia coli*, связанные между собой F-пилями.

Обе F-пили клетки Hfr помечены донор-специфическими РНК-фагами MS-2. Многочисленные пили типа I клетки-реципиента (в верхнем левом углу) короткие и не адсорбируют бактериофага.



Плазмиды найдены у отдельных продуцентов антибиотиков (Streptomyces coelicor), близкие по своим свойствам к F-плазмиде E. Coli.

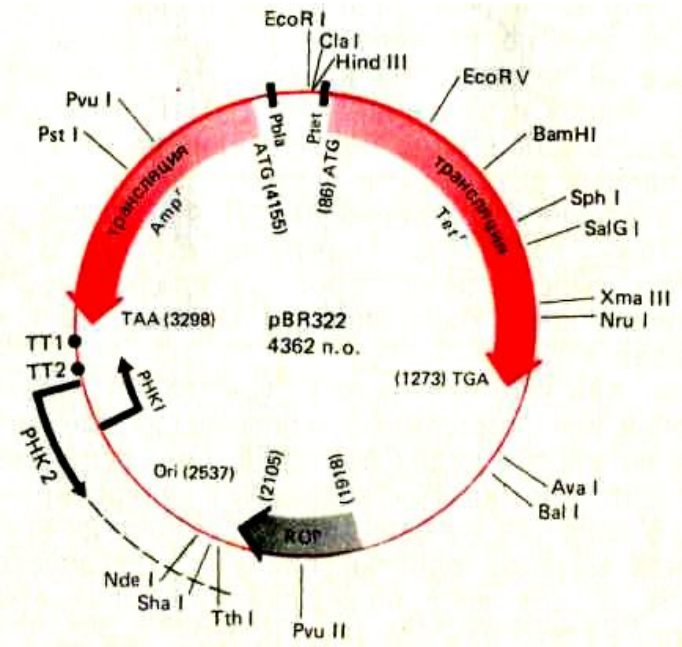
Так, плазмида Scp1 может встраиваться в хромосому Streptomyces, а также включать фрагменты хромосомной ДНК.

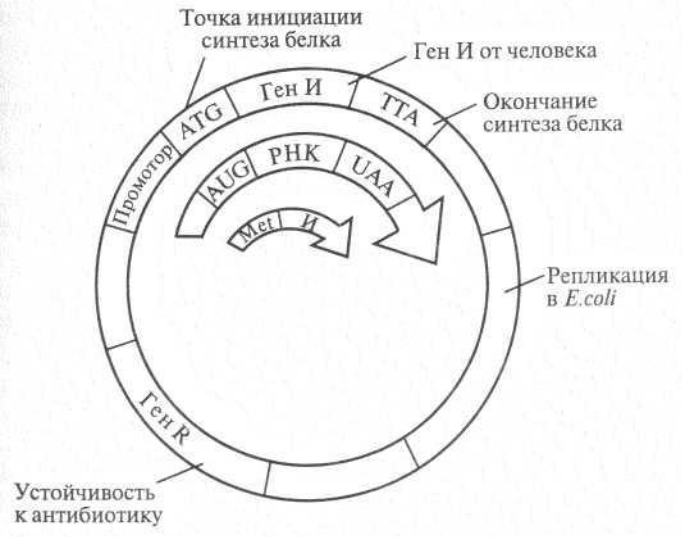
Полученные путем трансформации ДНК рекомбинанты позволили существенно повысить эффективность промышленного биотехнологического процесса.

Плазмиды имеют детерминанты, регулирующие их репликацию. Это:

- **последовательность нуклеотидов, на которой происходит инициация репликации (oriV);**
- **структурный ген, контролирующий репликацию (rep);**
- **детерминанты, негативно контролирующие количество плазмидных копий (cop);**
- **детерминанты, обеспечивающие распределение плазмидных копий между дочерними клетками (par).**

Рестрикционная карта плазмиды pBR 322: цифрами указаны номера нуклеотидов; тонкие черные стрелки—единичные сайты, узнаваемые рестриктазами; красные стрелки — направление транскрипции; PBIa — промотор гена Amp^r — устойчивость к ампициллину; Ptet — промотор гена Tet^r — устойчивость к тетрациклину. Тт1 — Rho-независимый терминатор транскрипции (положение 3140 — 3160); Тт2 — положение 3080—3110; ROP — белок, способствующий образованию дуплексов между РНК 1 и РНК 2 (негативный регулятор копийности); РНК 1 — контрольная РНК (контролирует копийность пламиды); РНК 2 — «праймерная» РНК (служит затравкой для репликации); толстые черные стрелки — направление транскрипции РНК 1 и РНК 2





За счет репликации регулярно увеличивается количество плазмидных копий, и они равномерно распределяются между потомством делящейся бактериальной клетки.

Распознаются плазмиды по особым свойствам, которые придают клеткам. Они могут определять:

- **устойчивость бактерий к антибиотикам (R-плазмиды), к ионам тяжелых металлов;**
- **способность разлагать органические соединения (плазмиды биодеградации),**
- **синтез токсинов, бактериоцинов, антибиотиков.**

Многие плазмиды с молекулярной массой 25 МД или более имеют генетические системы, детерминирующие перенос плазмид в другие клетки в результате конъюгации.

Фаг λ

Для переноса чужеродного гена используют и ДНК фага λ.

Если рекомбинировать ДНК фага λ и смешать с белком оболочки фага, то образуется инфекционная фаговая частица.

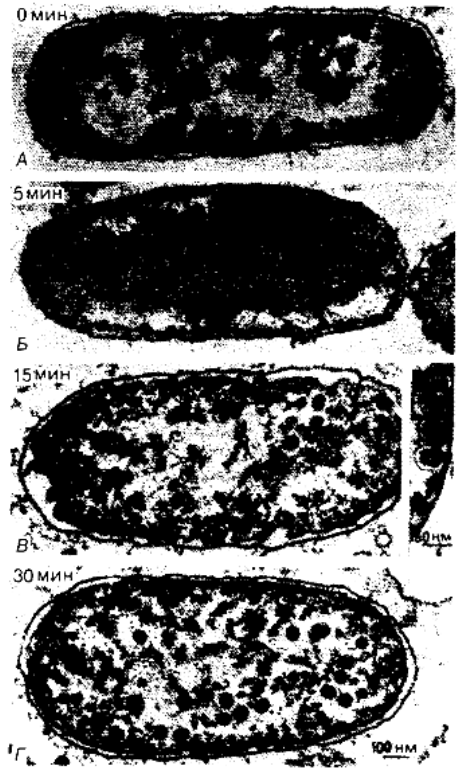
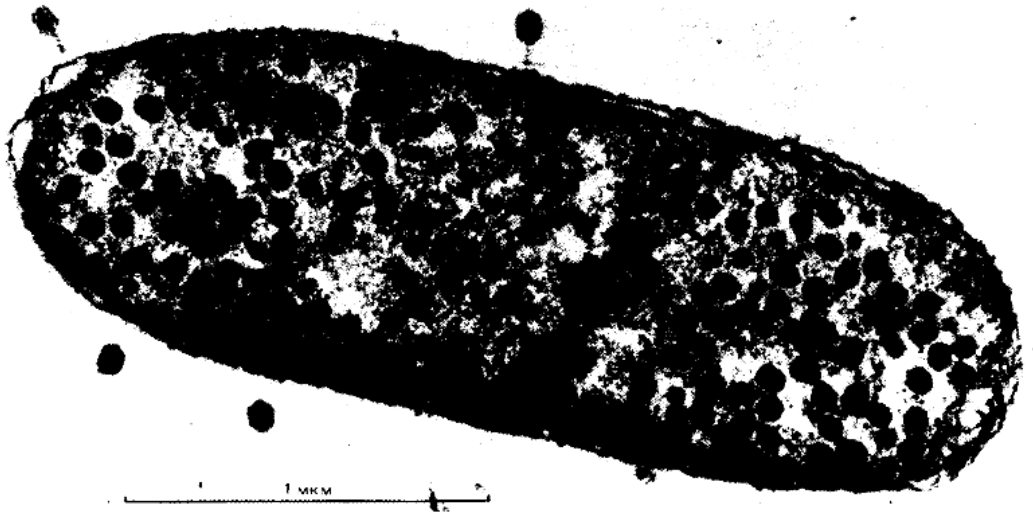


Рис. 1-9. Серия электронных микрофотографий, показывающих развитие вируса внутри бактериальной клетки. Инфицирование начинается с прикрепления вируса к наружной оболочке бактерии (см. также рис. 1-10) и впрыскивания вирусной ДНК в бактериальную клетку. За 5 мин эта ДНК направляет синтез белков, одни из которых разрушают ДНК бактерии-хозяина, а другие катализируют репликацию вирусной ДНК. Плотные частицы, наблюдаемые в клетке через 15 мин после заражения, это незрелые вирусные частицы, состоящие из вирусной ДНК, упакованной в сферические белковые оболочки. (Оболочки, как показано на врезке, сначала собираются отдельно.) 30-минутный образец показывает, как вирусные частицы продолжают созревать и накапливаться. (С любезного разрешения E. Kellenberger.)

Рис. 1-10. Полученная с бо́льшим увеличением микрофотография зараженной вирусом бактериальной клетки. После заражения прошло более часа. Инфекционный цикл почти завершен, и бактериальная клетка вот-вот разорвется, высвободив в окружающую среду несколько сот новых инфекционных вирусных частиц. Вирус, показанный на этой микрофотографии и на микрофотографиях, приведенных на рис. 1-9,– бактериофаг T4. (С любезного разрешения E. Kellenberger.)



Фаг λ очень быстро инфицирует клетку хозяина, в то время как плазмиды проникают в интактную клетку лишь изредка.

ДНК фага λ вместе с встроенным геном, способна встраиваться в ДНК клетки хозяина, где будет реплицироваться при каждом цикле клеточного деления.

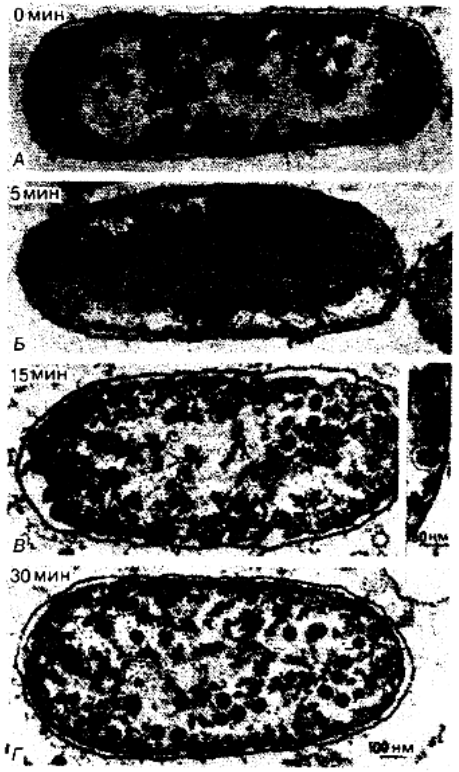
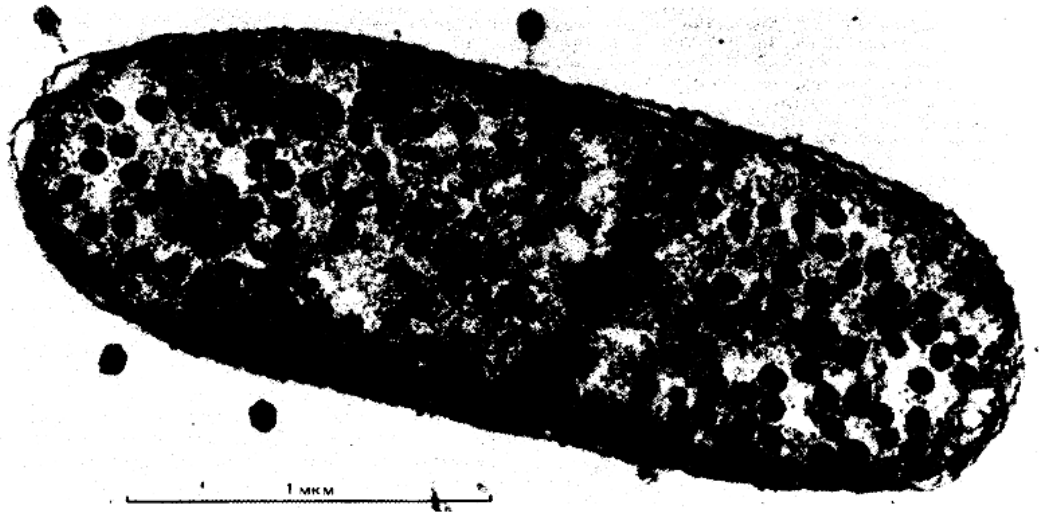


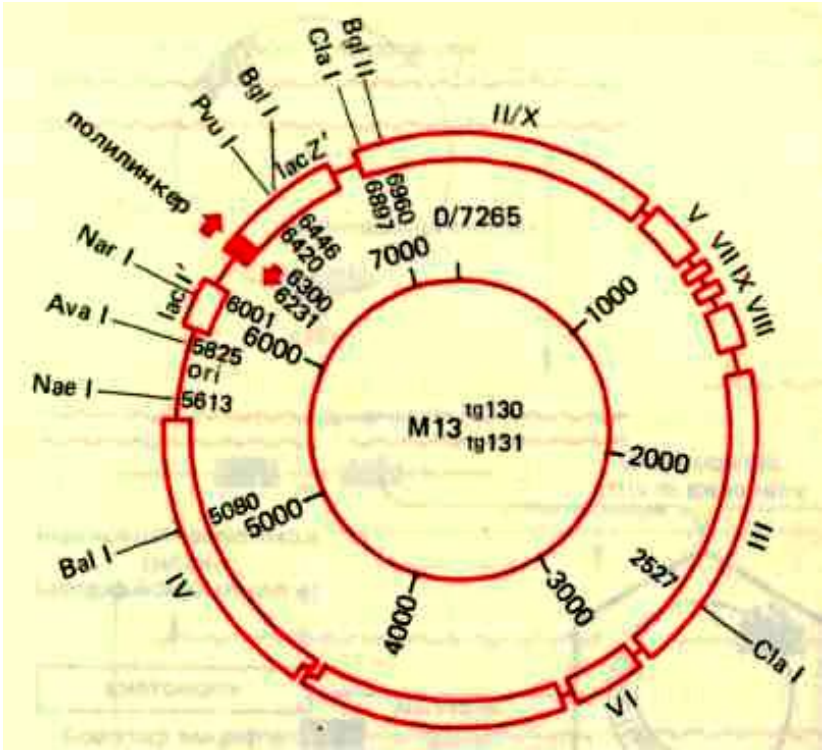
Рис. 1-9. Серия электронных микрофотографий, показывающих развитие вируса внутри бактериальной клетки. Инфицирование начинается с прикрепления вируса к наружной оболочке бактерии (см. также рис. 1-10) и впрыскивания вирусной ДНК в бактериальную клетку. За 5 мин эта ДНК направляет синтез белков, одни из которых разрушают ДНК бактерии-хозяина, а другие катализируют репликацию вирусной ДНК. Плотные частицы, наблюдаемые в клетке через 15 мин после заражения, это незрелые вирусные частицы, состоящие из вирусной ДНК, упакованной в сферические белковые оболочки. (Оболочки, как показано на врезке, сначала собираются отдельно.) 30-минутный образец показывает, как вирусные частицы продолжают созревать и накапливаться. (С любезного разрешения E. Kellenberger.)

Рис. 1-10. Полученная с бо́льшим увеличением микрофотография зараженной вирусом бактериальной клетки. После заражения прошло более часа. Инфекционный цикл почти завершен, и бактериальная клетка вот-вот разорвется, высвободив в окружающую среду несколько сот новых инфекционных вирусных частиц. Вирус, показанный на этой микрофотографии и на микрофотографиях, приведенных на рис. 1-9,– бактериофаг T4. (С любезного разрешения E. Kellenberger.)



- **Векторы на основе фага M13**

Арабскими цифрами указана нумерация нуклеотидов; римскими – гены фага; lac I′ – С-концевой участок гена, кодирующий lac-репрессор; lacZ′ – N-концевой участок, гена, кодирующего β-галактозидазу, которая становится активной в тесте на α-комплементацию (полилинкер может быть вставлен в вектор в двух противоположных ориентациях, указанных стрелками, по EcoRI-сайтам, которые соответствуют нуклеотидам 6231 и 6300 (по M. Kicny et al., 1983).



Конструирование вектора

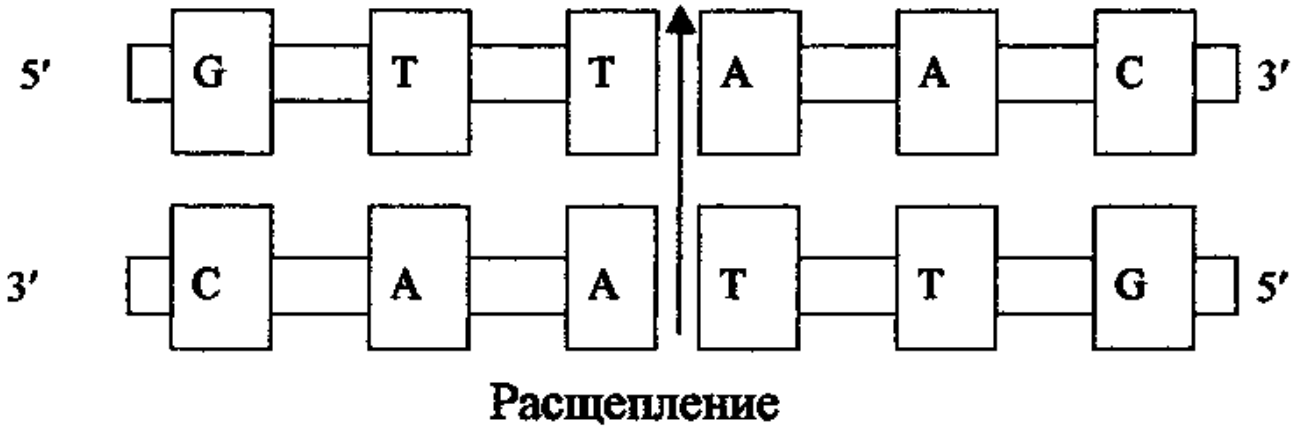
Полученную кДНК встраивают в плазмиду или другой вектор. Для этого кДНК снабжают соответствующими хвостами или липкими концами.

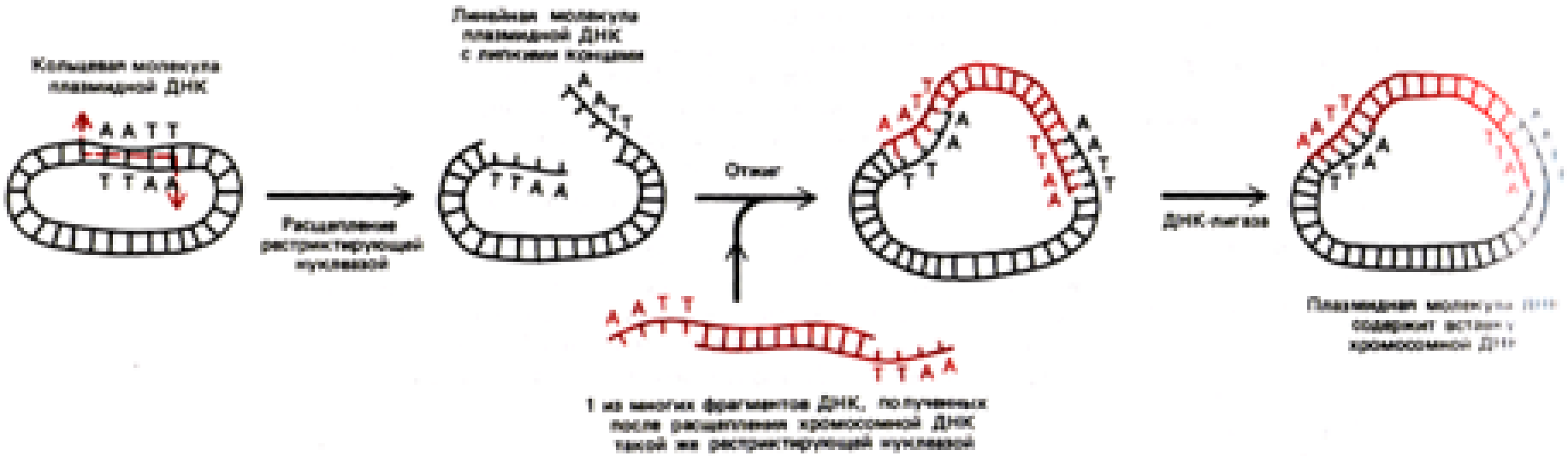
Плазмиду переводят в линейную форму, расщепляя ее в одной точке рестриктирующей эндонуклеазой с образованием в месте расщепления тупых концов. Затем 3'-концы линейной плазмиды снабжают хвостами, комплементарными основаниями.

Путем гибридизации получают увеличенную кольцевую плазмиду. Она содержит новый ген, который связан с ней только за счет комплементарного воздействия липких концов.

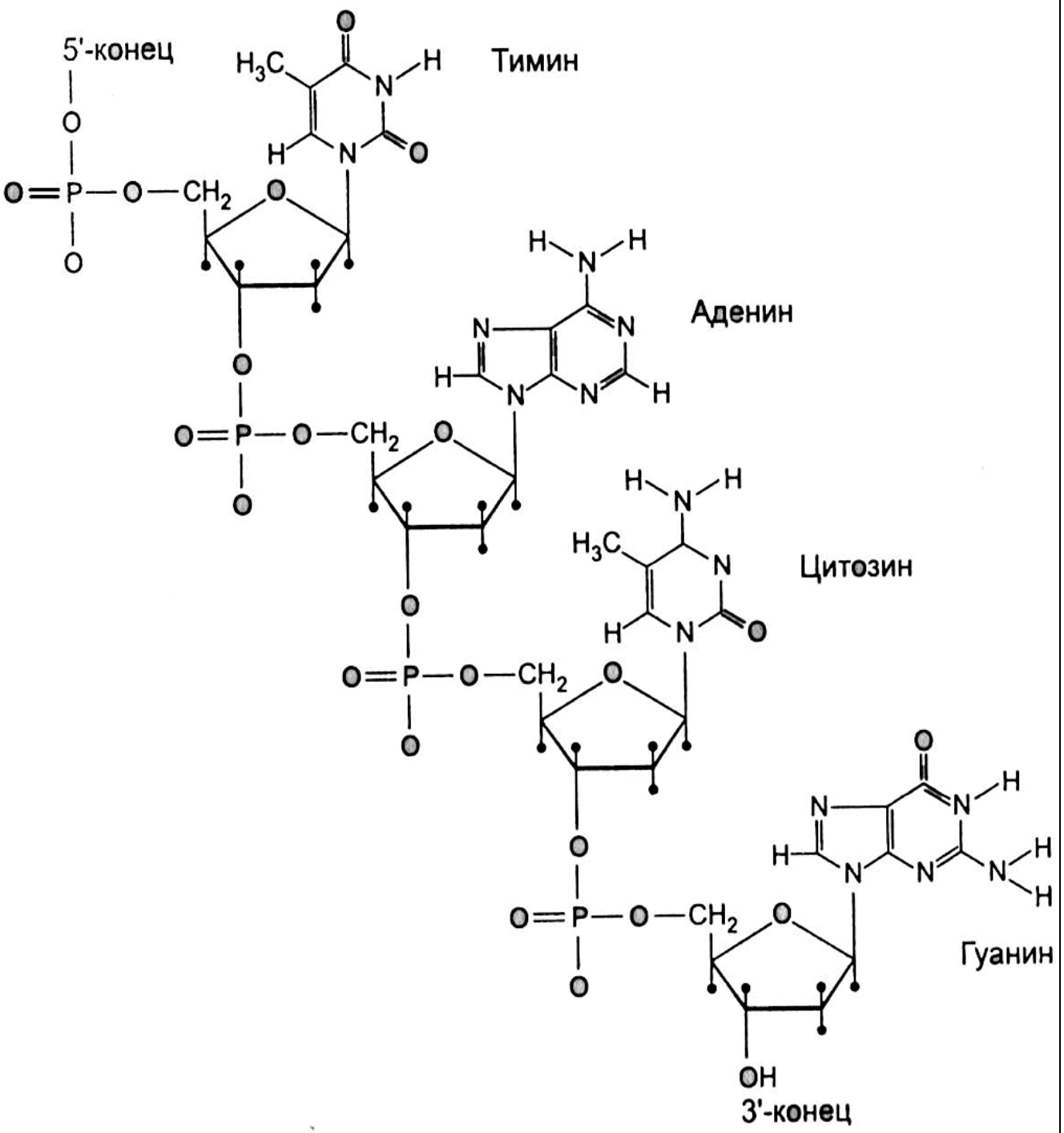
Эти концы ковалентно соединяют с помощью ДНК-лигазы, в результате чего образуется ковалентно замкнутая кольцевая плазмида, несущая новый ген.

HPA 1 (Haemophilus parainfluenzae)





Наличие липких концов, образовавшихся под действием рестриктирующей нуклеазы, приводит к соединению двух фрагментов ДНК в результате спаривания комплементарных нуклеотидов. Соединенные таким образом фрагменты ДНК могут затем связываться ковалентными связями под действием ДНК-лигазы. Образующаяся в результате гибридная молекула плазмидной ДНК содержит фрагмент (вставку) хромосомной ДНК.


5'-конец
Тимин
Аденин
Цитозин
Гуанин
OH
3'-конец

После обработки рестриктазой из ДНК хромосомы бактерии образуется приблизительно1000 разных фрагментов, а при обработке этим же ферментом ДНК плазмиды-вектора чаще всего образуется один линейный фрагмент.

При отжиге и лигировании такой смеси образуются не только гибридные молекулы, но и исходные векторы.

Это усложняет дальнейшую работу, так как обычно отбор клеток, трансформированных рекомбинантной плазмидой, ведется сначала по маркерам вектора.

Клетки, получившие неизмененный вектор и рекомбинантную молекулу, будут неразличимы.

Чтобы получать преимущественно гибридные молекулы:

- **В одних случаях ДНК вектора расщепляют несколькими рестриктазами, и это уменьшает вероятность восстановления его (самосборки) *in vitro.***

Этот метод используется в том случае, когда при расщеплении ДНК вектора нужной рестриктазой образуется несколько фрагментов, не все из которых необходимы для создаваемой рекомбинантной молекулы.

- **Другой способ заключается в отщеплении концевых фосфатных групп от линейной ДНК под действием щелочной фосфатазы.**

Образование ДНК-лигазой кольцевых молекул ДНК *in vitro* будет возможным только в присутствии фрагментов ДНК, имеющих неповрежденные 5'-фосфатные группы на 5'-концах. В результате создаются гибридные кольцевые молекулы с однонитевыми разрывами в комплементарных нитях ДНК, которые репарируются клеткой *in vivo.*

Метод фосфатазной обработки широко используется при воссоединении фрагментов как по липким, так и по тупым концам.

Нередко возникает необходимость клонирования фрагмента ДНК, полученного с помощью одной рестриктазы, в векторе, который имеет сайт расщепления для другой рестриктазы.

С этой целью широко применяются короткие синтетические двуспиральные олигонуклеотиды, имеющие в своем составе сайты узнавания для одной или нескольких рестриктаз. Такие олиго-нуклеотиды *называют линкерами* или *полилинкерами* соответственно.

Встраивание рекомбннантных плазмид

Рекомбинантные плазмиды смешивают с клетками (например, бактериями E. Coli).

Попасть в бактериальную клетку и включиться в хромосому удаётся не многим плазмидам. Для повышения результатов добавляют ионы Ca_2^+.

В последующем для выявления клеток E. Coli, в которые попали новые гены:

их высаживают на твёрдую питательную среду, извлекают из каждой клеточной колонии ДНК и определяют, какая из колоний содержит ДНК, гибридизирующую с радиоактивной кДНК, синтезированной на выделенной ранее мРНК.

После этого выращивают колонию клеток E. Coli, содержащих рекомбинантную плазмиду, в ферментёрах в больших объёмах на свежей питательной среде.

Подобная рекомбинантная ДНК, несущая не родственные гены из двух разных видов организмов, называется «химерной» (мифическое существо из «Илиады» Гомера с головой льва, телом козы и хвостом змеи).

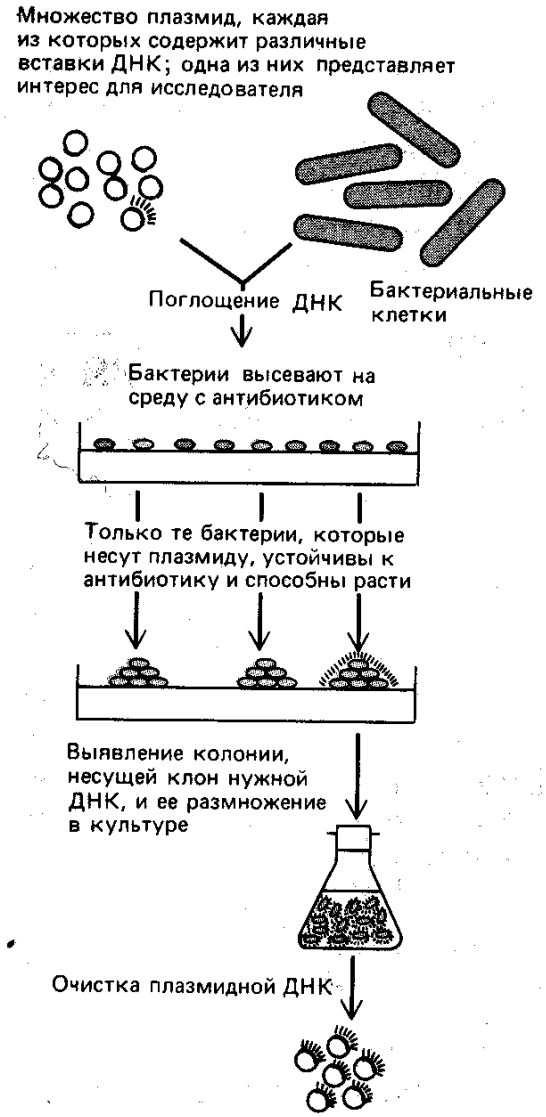


Рис. 4-49. Очистка и размножение специфических последовательностей ДНК с помощью клонирования ДНК в бактериях. Аналогичным путем осуществляется клонирование фрагментов ДНК в дрожжевых клетках.

- **Экспрессия клонированных генов. Для транскрипции многих генов и последующей трансляции их мРНК с образованием соответствующих белков необходимо участие промотора и**

  оператора –

  участков генов, которые указывают место, в котором РНК-полимераза связывается и начинает транскрипцию.

  В противном случае встроенный чужеродный ген не обязательно будет транскрибироваться и транслироваться.

  Чтобы обеспечить транскрипцию встроенного гена, помещают этот ген в участок ДНК плазмиды или фага, расположенный следом за промотор – операторной областью.

Например, ген можно встроить в участок ДНК E. Coli, содержащий lac-оперон.

Лактозный оперон кишечной полочки – это совокупность трёх генов, кодирующих ферменты, которые позволяют бактерии усваивать молочный сахар – лактозу.

Если теперь поместить клетки в среду с лактозой, но без глюкозы, то встроенный ген будет транскрибироваться и транслироваться вместе с участком ДНК lac-оперон.

- **С помощью методов, описанных выше, были клонированы гены эукариотических организмов: инсулина, соматотропина, соматостатина.**

Получение инсулина

Инсулин вырабатывается поджелудочной железой, регулирует обмен углеводов, понижает уровень сахара в крови.

При недостатке инсулина возникает тяжелое заболевание – сахарный диабет. Как причина смерти людей это заболевание может быть поставлено на третье место, после сердечно-сосудистых заболеваний и рака.

Инсулин – глобулярный белок. Состоит из двух полипептидных цепей. В них содержится 51 остаток аминокислот. Обе цепи связаны между собой двумя дисульфидными мостиками.

В процессе синтеза сначала образуется одноцепочечный препроинсулин, в котором есть:

- **сигнальный концевой пептид из 23 аминокислотных остатков и**
- **С-пептид (соединительный пептид из 35 остатков аминокислот).**

После удаления сигнального пептида в секретирующих клетках образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков. В нем цепи А и В соединены С-пептидом, который ориентирует их при формировании дисульфидных связей.

После протеолитического выщепления С-пептида образуется инсулин.

Для лечения диабета инсулин получали из поджелудочной железы убитых животных (крупного рогатого скота и свиней). Из 800–1000 кг исходного сырья выделяли до 100 г кристаллического инсулина.

Такой инсулин не идентичен по аминокислотной последовательности инсулину человека, и потому для некоторых людей неэффективен.

В 1980 г. датской компании «Ново Индастри» удалось заменить 30-й остаток аланина в цепи В инсулина свиньи на остаток треонина, который присутствует в инсулине человека. Оба инсулина не различались по активности и длительности действия.

Разработаны биотехнологические методы получения инсулина человека.

Синтетические гены цепей человеческого инсулина присоединяли к 3´-концу гена фермента β-галактозидазы и встраивали в плазмиду (pBR322). Плазмиду вводили в кишечную палочку.

Трансформированные клетки E. coli синтезировали белки, состоящие из фрагмента β-галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина.

При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождался. Образовывался инсулин, хотя формирование дисульфидных мостиков между двумя цепями инсулина происходило с трудом.

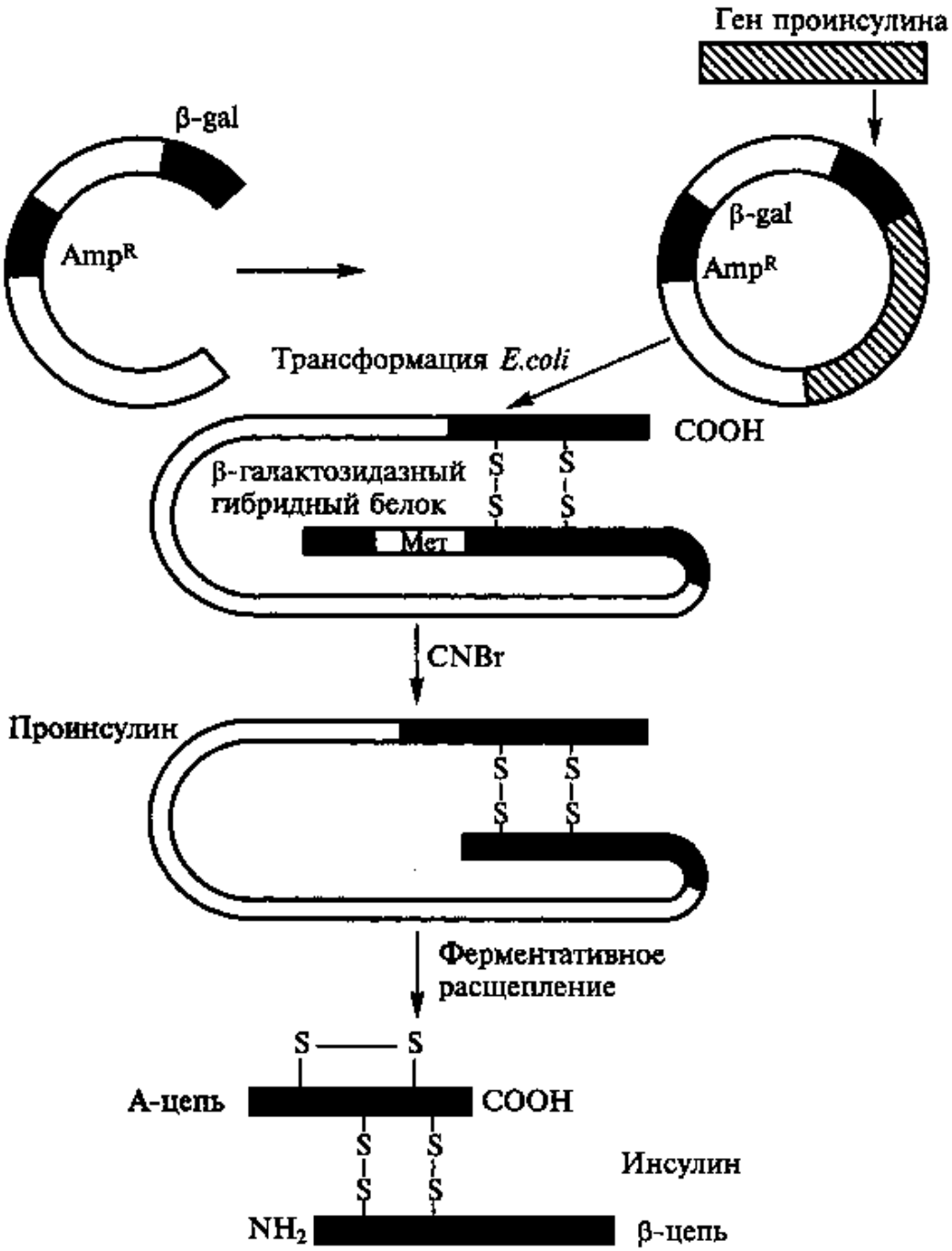


Схема синтеза инсулина

Синтетические гены цепей инсулина подстраивались к 3´-концу гена фермента β-галактозидазы и вводились в плазмиду (pBR322). Клетки E. coli, трансформированные рекомбинантными плазмидами, синтезировали белки, состоящие из фрагмента β-галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождался. Формирование дисульфидных мостиков между двумя цепями инсулина происходило с трудом.

У. Гильберт с сотрудниками (1980) выделили мРНК инсулина из опухоли β-клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с нее кДНК. Полученную кДНК встроили в плазмиду pBR322 E. Coli, в среднюю часть гена пенициллиназы.

Рекомбинантная плазмида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который можно было извлечь из такого белка трипсином.

Полученный таким способом синтетический инсулин уже применяется при лечении диабета.

Сходным образом получили человеческий соматотропина, который используется в лечебной практике.

Гормон роста животных и человека не идентичны, поэтому ранее применялся гормон, полученный из мозга умерших людей.

В клетках с встроенными генами можно получать разнообразные белки, полезные в сельском хозяйстве.

С помощью методов генетической инженерии была создана новая вакцина против ящура крупного рогатого скота, овец и свиней. Это вирусное заболевание неизлечимо, а заболевшие животные оказываются непригодными в пищу. Для получения вакцины против этого заболевания был использован клонированный белковый антиген вируса ящура.

Технология рекомбинантных ДНК включает ряд методов. Наиболее важные следующие.

- **Специфическое расщепление ДНК рестриктирующими нуклеазами.**

  Позволяет быстро выделять различные гены и манипулировать ими.

- **Быстрое определение последовательности (секвенирование) всех нуклеотидов в очищенных фрагментах ДНК.**

  Таким путем можно определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида.

- **Гибридизация нуклеиновых кислот.**

  Дает возможность выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания.

- **Клонирование ДНК.**

  Введение фрагмента ДНК в самореплицирующийся генетический аппарат (в плазмиду, вирус), который можно использовать для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий.

- **Генетическая инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.**

Специфическое расщепление ДНК рестриктирующими нуклеазами

- **В 1962 г. Арбер обнаружил существование ферментов (рестриктирующих нуклеаз), которые способны разрезать ДНК.**
- **Натанс и Смит выделили в чистом виде эти ферменты и использовали их для определения нуклеотидной последовательности ДНК.**

- ***Рестрикционные эндонуклеазы*** **(рестриктазы) разделяют обе цепи молекулы ДНК в специфических местах, содержащих определенные нуклеотидные последовательности с образованием выступающих или тупых концов.**

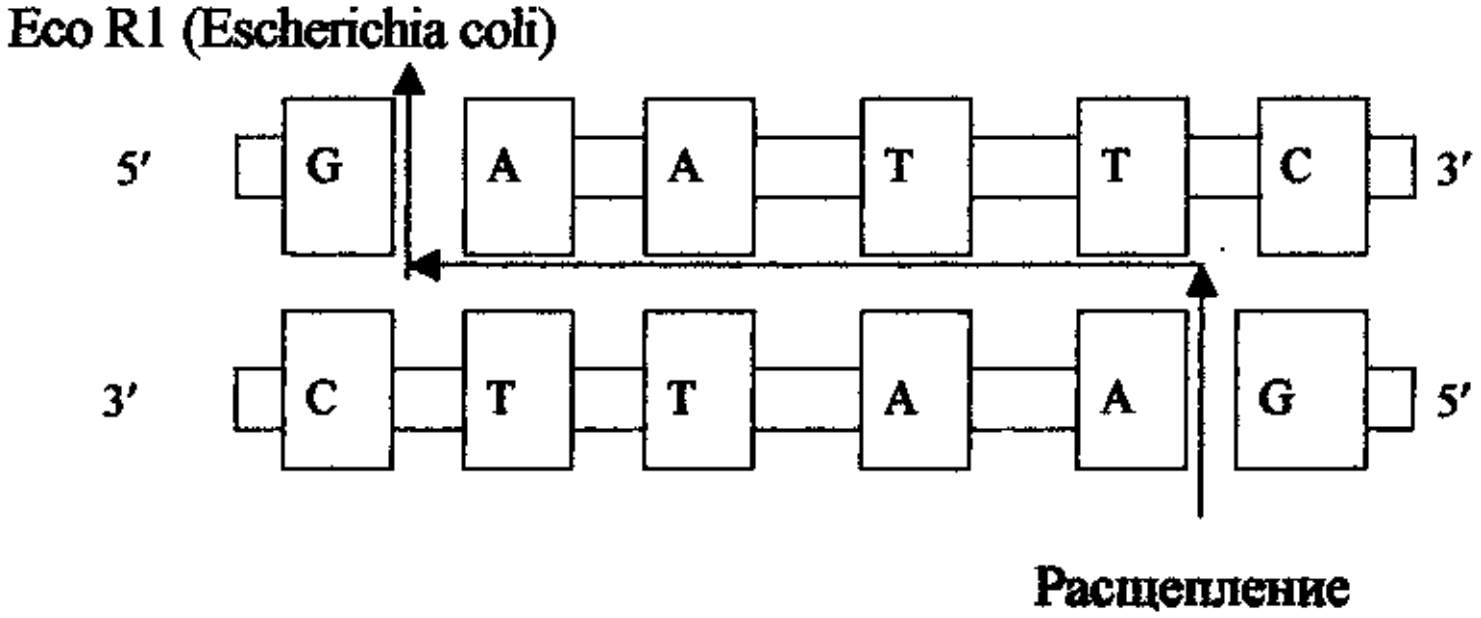
- **Рестриктазы узнают строго определенные нуклеотидные последовательности на двуспиральной ДНК.**

- **Одни ферменты расщепляют ДНК в любых местах, где имеется для них специфическая последовательность нуклеотидов. Это ферменты класса 1.**

К ним относится рестрикционная эндонуклеаза из бактериофага Р1.

- **Ферменты класса 2 разрывают цепи ДНК только в определенных точках.**
- **Это приводит к образованию совершенно определенных фрагментов ДНК.**
- **Рестрикционные эндонуклеазы класса 2 используются при молекулярном клонировании.**

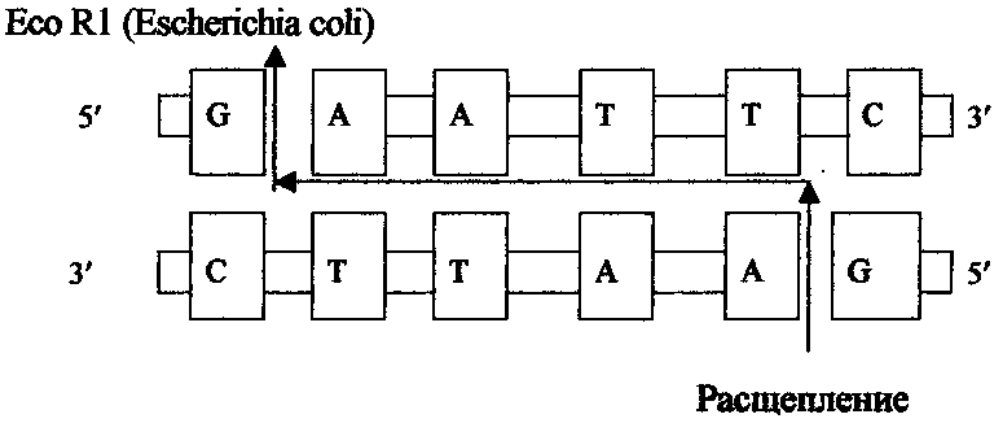
EcoR1 – рестриктаза класса 2. Последовательность, распознаваемая этим ферментом, состоит из 6 пар оснований, образующих *палиндром* (в двух цепях одинаковые последовательности идут в противоположных направлениях). Фермент расщепляет ДНК только в тех местах, где имеется GAATTC – последовательность нуклеотидов.

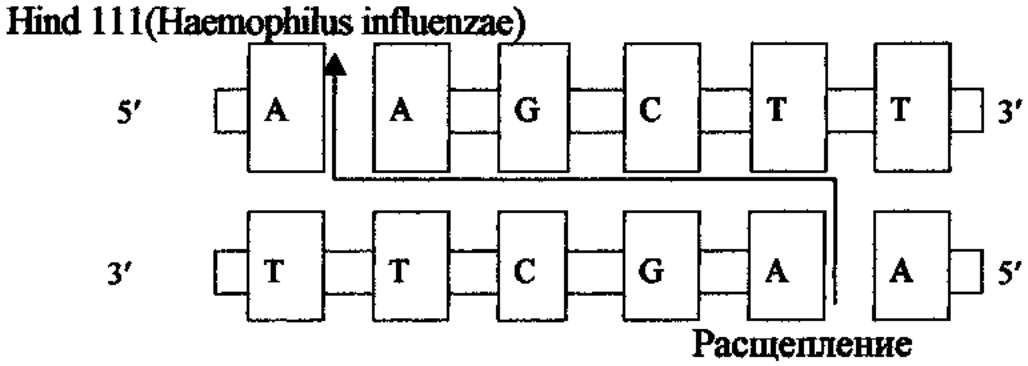


Две цепи ДНК разрезаются не прямо напротив друг друга, а наискосок, образуя липкие концы.

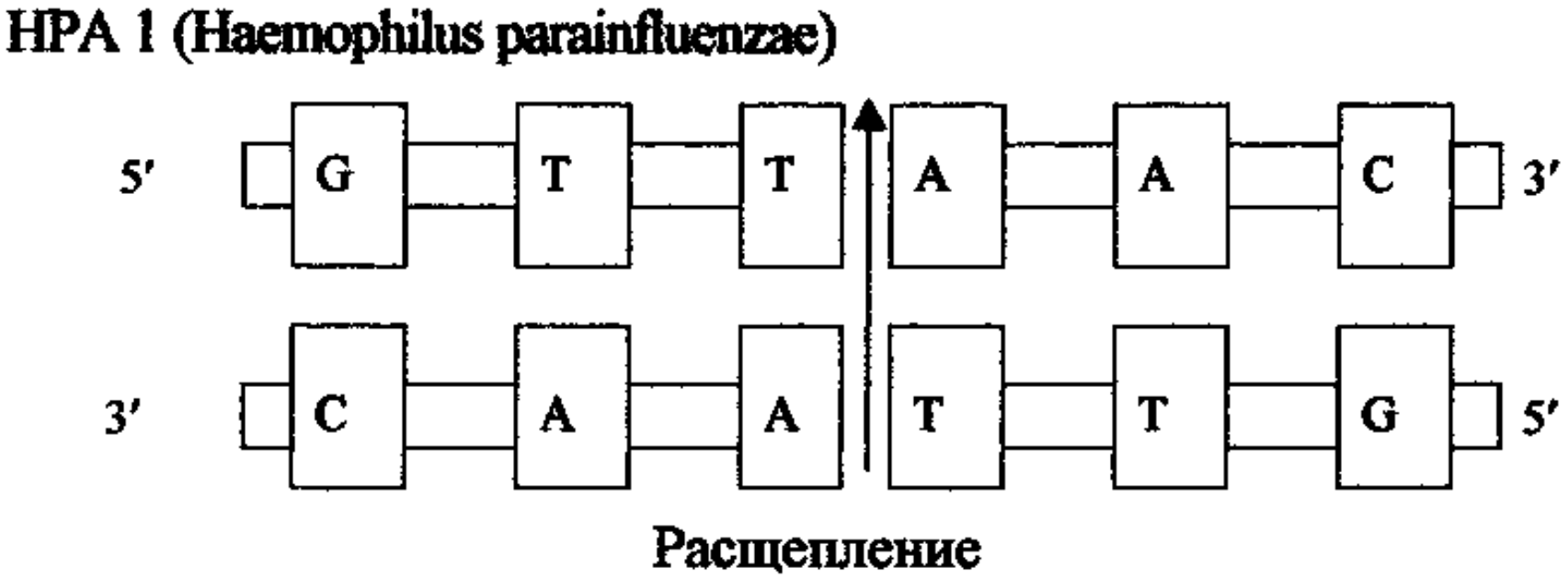
Места расщепления ДНК, указанные стрелками, лежат вне оси симметрии.

В результате несовпадения разрывов образуются одноцепочечные концы из четырех пар оснований.

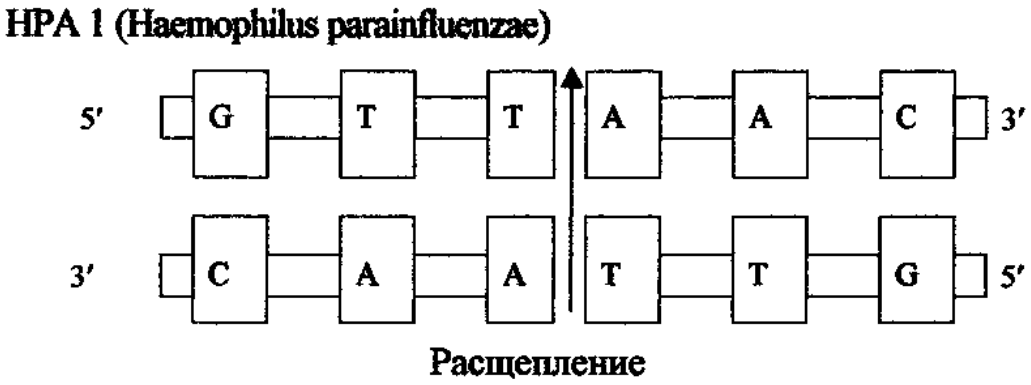


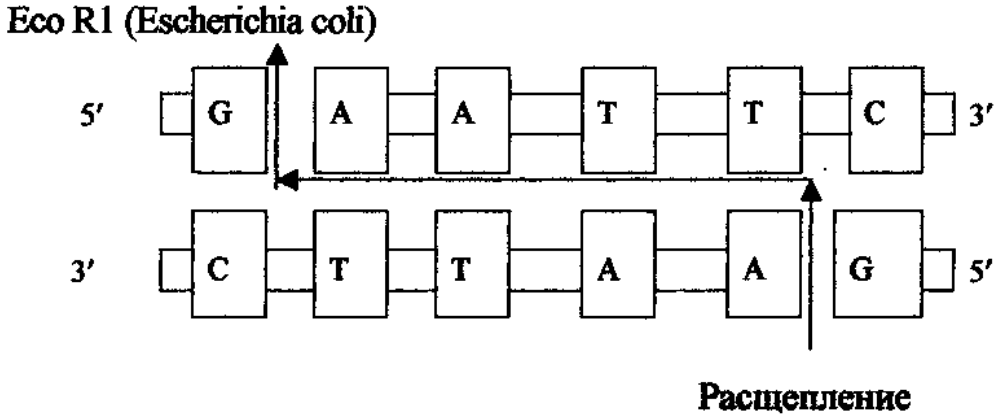


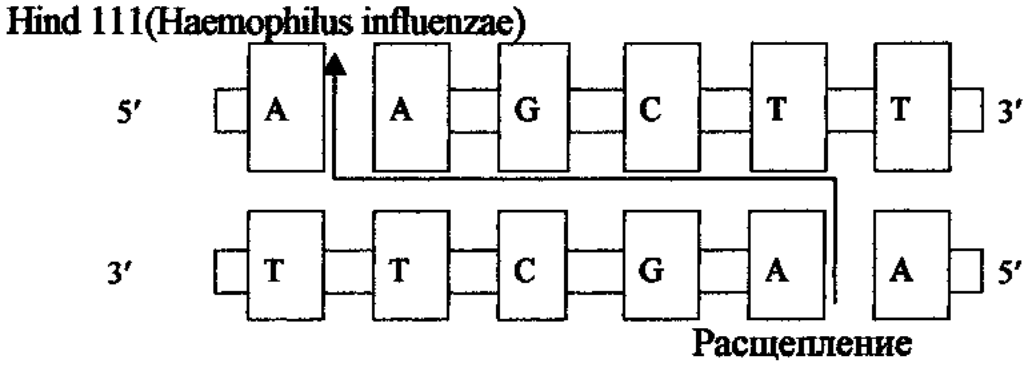
Фермент Hpa 1 (Haemophilus parainfluenzae) разрезает две цепи ДНК прямо напротив друг друга, образуя тупые концы.



Последовательности нуклеотидов, узнаваемые тремя рестриктирующими эндонуклеазами.







- **Для соединения фрагментов ДНК из разных организмов необходимо каждый из них в отдельности обработать одной и той же рестриктазой.**
- **В месте разрывов ДНК образуются выступающие концы. Они комплементарны концам каждого фрагмента ДНК, полученного с помощью одной рестриктазы, и такие концы называются «липкими».**
- **Если смешать эти фрагменты ДНК, нагреть и медленно охладить, то их выступающие концы могут образовать комплементарные пары оснований, в результате чего возникнет новая рекомбинантная ДНК.**

- **Метод специфического расщепления ДНК рестриктазами основан на явлении *рестрикции и модификации*.**
- **Они отражают характер взаимоотношений бактериофагов и бактерий.**
- **Бактериофаги обычно инфицируют один штамм бактерий или небольшое число других родственных организмов.**
- **Это обусловлено рецепторными свойствами поверхности бактериальных клеток и системой *рестрикции*.**

Если бактериофаг “А”, вырастить на штамме “А” *E. coli* и затем инфицировать полученным лизатом другой штамм “В”, то в культурах штамма “В” фаг будет расти значительно хуже, чем на штамме “А”.

Если же единичные фаговые частицы, образовавшиеся на штамме “В”, использовать для заражения другой культуры штамма “В”, то размножение фага вновь будет нормальным.

Но если перед этим фаг снова провести через исходный штамм “А”, то на штамме “В” он опять будет расти очень плохо.

- **Рестрикция (ограничение репродукции фага). Зависит от того хозяина, в котором данный фаг выращивали предыдущий раз.**

Обусловлена расщеплением инфицирующей фаговой ДНК ферментом, специфичным для штамма–хозяина.

Это и есть фермент *рестрикционная эндонуклеаза.*

Своим действием такие ферменты препятствуют проникновению чужеродной ДНК в бактериальную клетку.

- **Для защиты своей ДНК от рестрикционной эндонуклеазы в бактериальной клетке происходит изменение (метилирование или глюкозилирование) оснований ДНК (обычно A или C).**

Этот процесс называют *модификацией*.

Из него извлекают пользу и фаги, размножающиеся в клетках определенного штамма бактерий. На фаговую ДНК при ее синтезе в клетках данного типа накладывается тот же «отпечаток», что и на ДНК самой клетки: в присутствии модифицирующего фермента фаговая ДНК видоизменяется как и ДНК хозяина.

Она так же метилируется и приобретает свойства, защищающие ее от рестрикционных ферментов данного штамма бактерий.

В генной инженерии применяется около 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК в 120 различных местах.

С помощью рестриктаз получают фрагменты ДНК *(рестрикционные карты).*

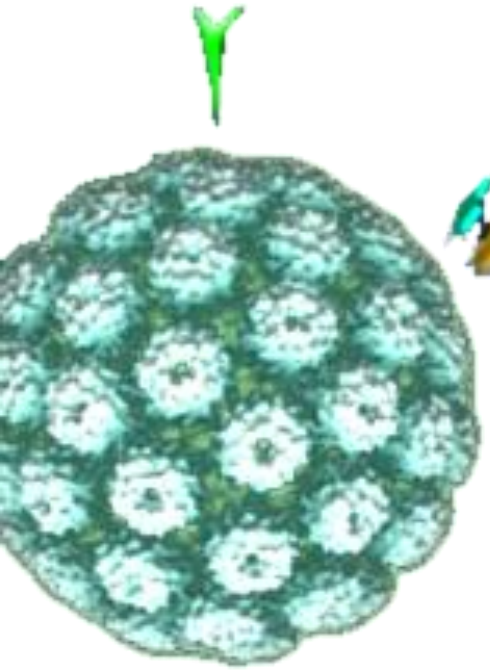
На этих картах

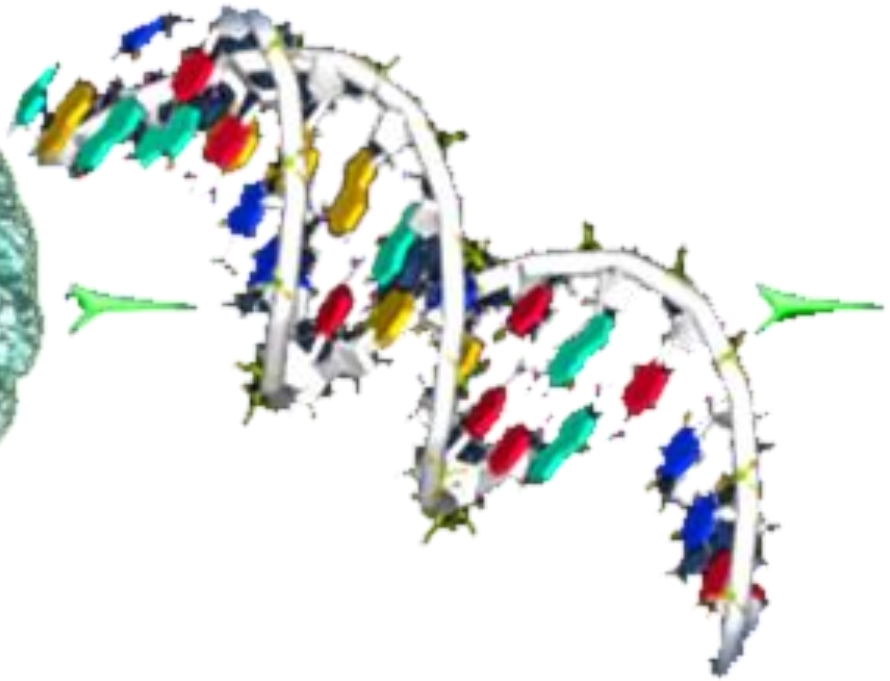
представлена последовательность всех нуклеотидов, входящих в этот фрагмент ДНК, а также

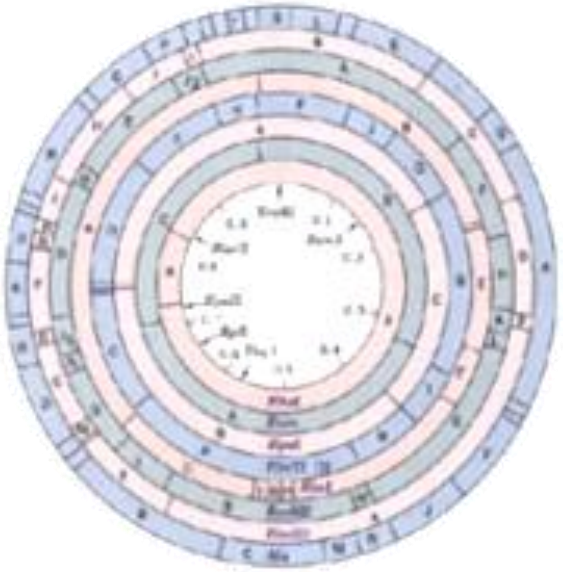
отмечены сайты (места) действия *рестриктаз.*

Первая такая карта была получена для вируса SW 40 (обезьяний вирус, вызывающий злокачественную трансформацию), содержащего 5423 пары оснований.









Определение последовательности (секвенирование) нуклеотидов в очищенных фрагментах ДНК

В геноме млекопитающих до 50–100 тысяч генов и каждый ген сформирован из многих нуклеотидов.

В молекуле ДНК вируса обезьян SV40 5 генов, в которых 5243 пары азотистых оснований.

После определения последовательности их выяснили и последовательность аминокислот в молекулах белков, кодируемых генами.

Найдены и участки, которые не кодируют белки, а участвуют в регуляции экспрессии генов и репликации ДНК.

Два метода секвенирования ДНК:

химический и

ферментативный.

Химический метод

- **Фрагмент ДНК метят по 5′-концу радиоактивным фосфором (^{32}P), а затем расщепляют по определенному нуклеотиду.**
- **Обе цепи ДНК разрываются в местах, где имеется такой нуклеотид.**
- **Образуются различной длины радиоактивные фрагменты.**
- **При электрофорезе в геле они разделяются по величине.**

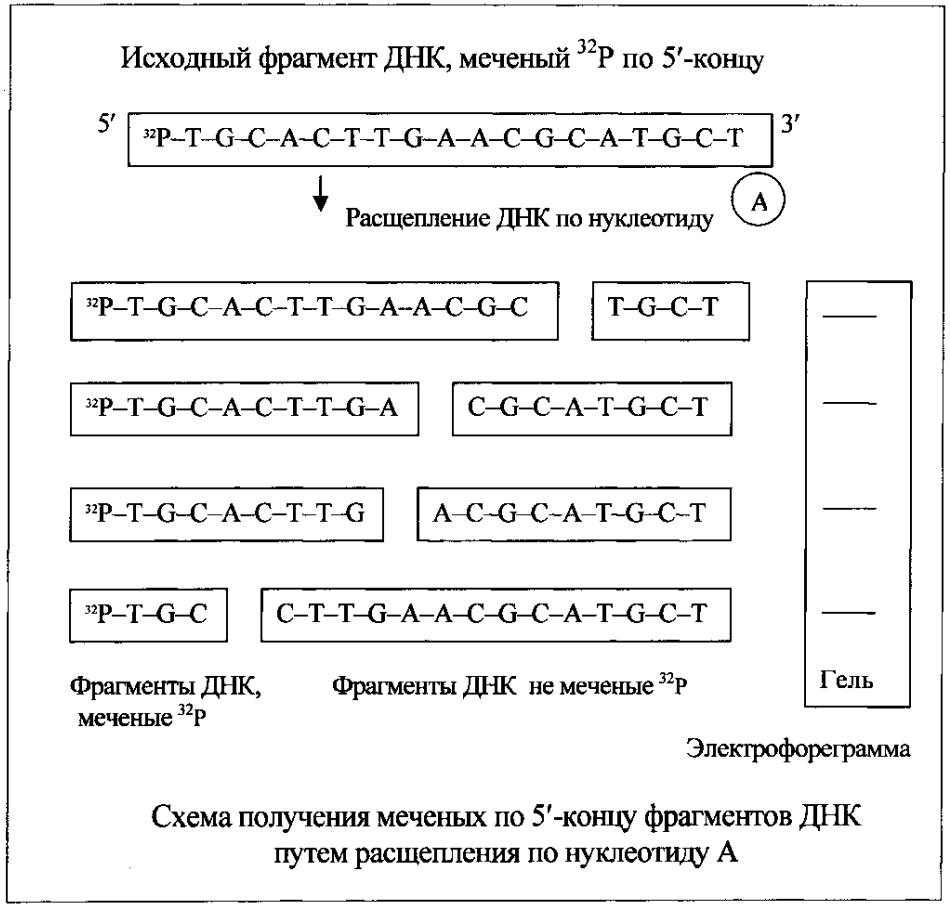
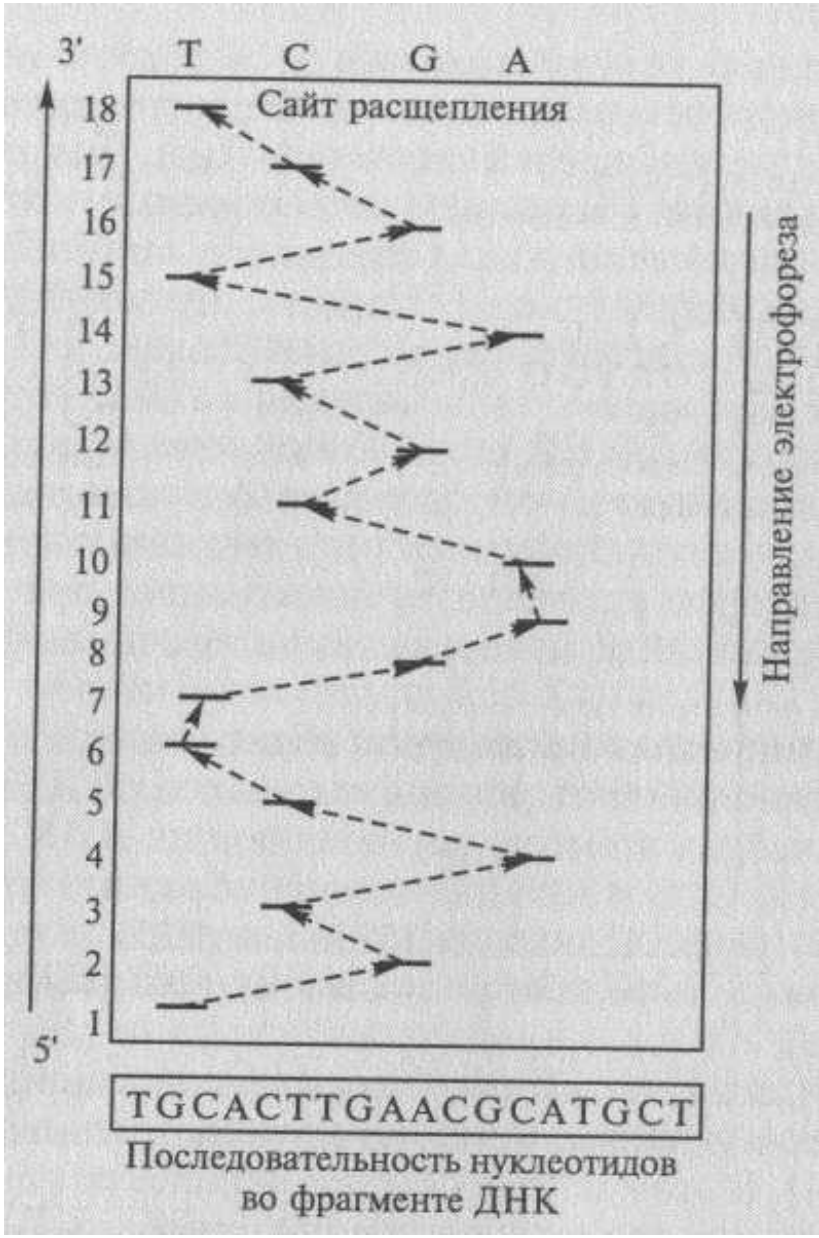


Схема получения меченых по 5′-концу фрагментов ДНК путем расщепления по нуклеотиду А

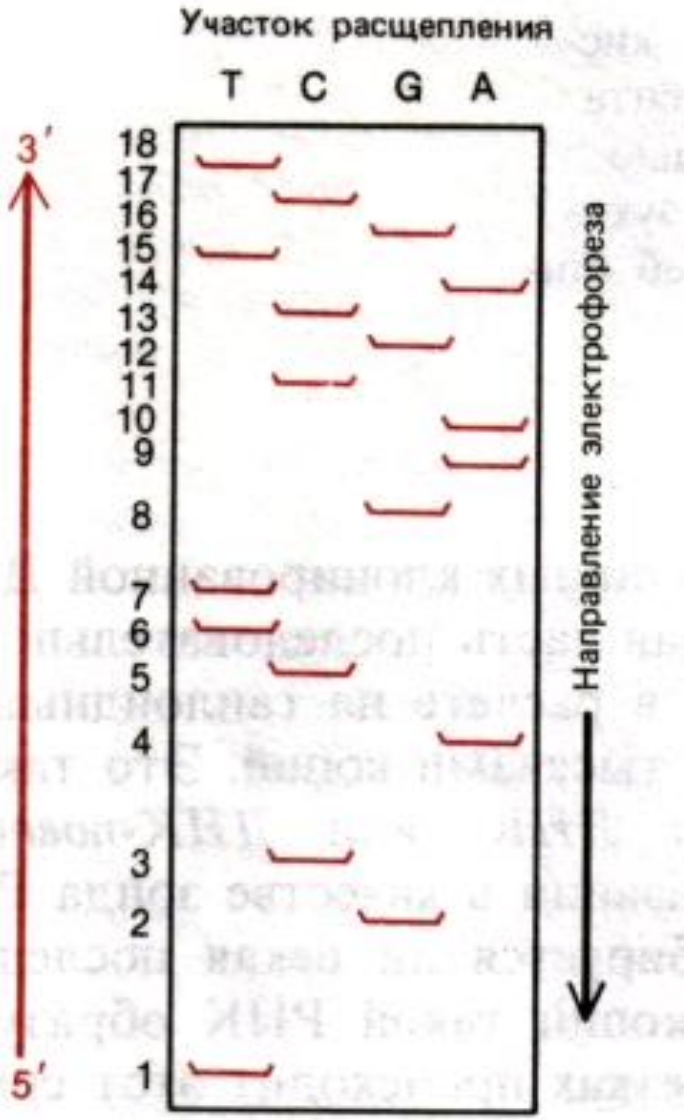
- **Одинаковые фрагменты ДНК одновременно обрабатывают различными химическими веществами. Они разрывают цепи ДНК по различным нуклеотидам.**
- **Затем проводится одновременно электрофорез в агаровом геле на 4-х дорожках. На каждой из них будут фрагменты, соответствующие определенному нуклеотиду.**
- **Для определения полной нуклеотидной последовательности проводят послойно анализ всех дорожек геля.**
- **На электрофореграммах выявляются радиоактивные фрагменты, по которым и определяют нуклеотидную последовательность ДНК.**

- В ДНК выщепляли цитозин (С) и при сканировании дорожки гелевой пластины радиоактивность выявлялась в фрагментах длиной 2 и 4 нуклеотида,

  следовательно цитозин находился в позициях 3 и 5 соответственно.
- В другом образце этой ДНК выщепляли гуанин (G) и после электрофореза выявлялись радиоактивные фрагменты с 1 и 7 нуклеотидами.
- Это указывало, что гуанин располагался в положениях 2 и 8.



- **Разделяя на одной гелевой пластине фрагменты ДНК по величине после специфического выщепления каждого из 4 нуклеотидов (A, G, C и T),**
- **можно «читать» нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК на электрофореграмме.**



- ***Ферментативный метод*** **разработан Сангером и Коулсоном в 1975 г.**
- **В основе метода – синтез с помощью ДНК-полимеразы комплементарной цепи ДНК изучаемому фрагменту ДНК, который используют в качестве матрицы.**

Метод называли «плюс–минус-метод», поскольку реакцию полимеризации проводили:

- **либо в отсутствии какого-либо одного нуклеотида («минус»–система),**
- **либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»–система).**

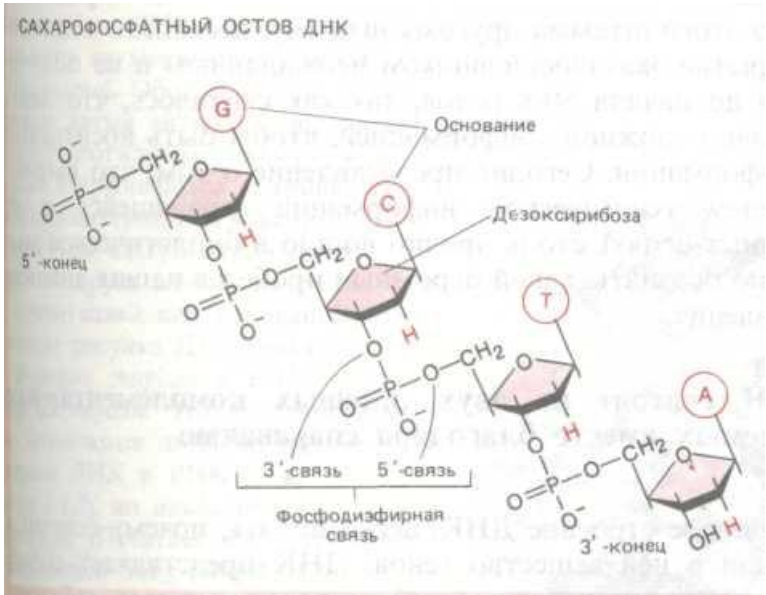
В обоих случаях ограничивалась возможность наращивания цепи из-за недостатка соответствующего нуклеотида.

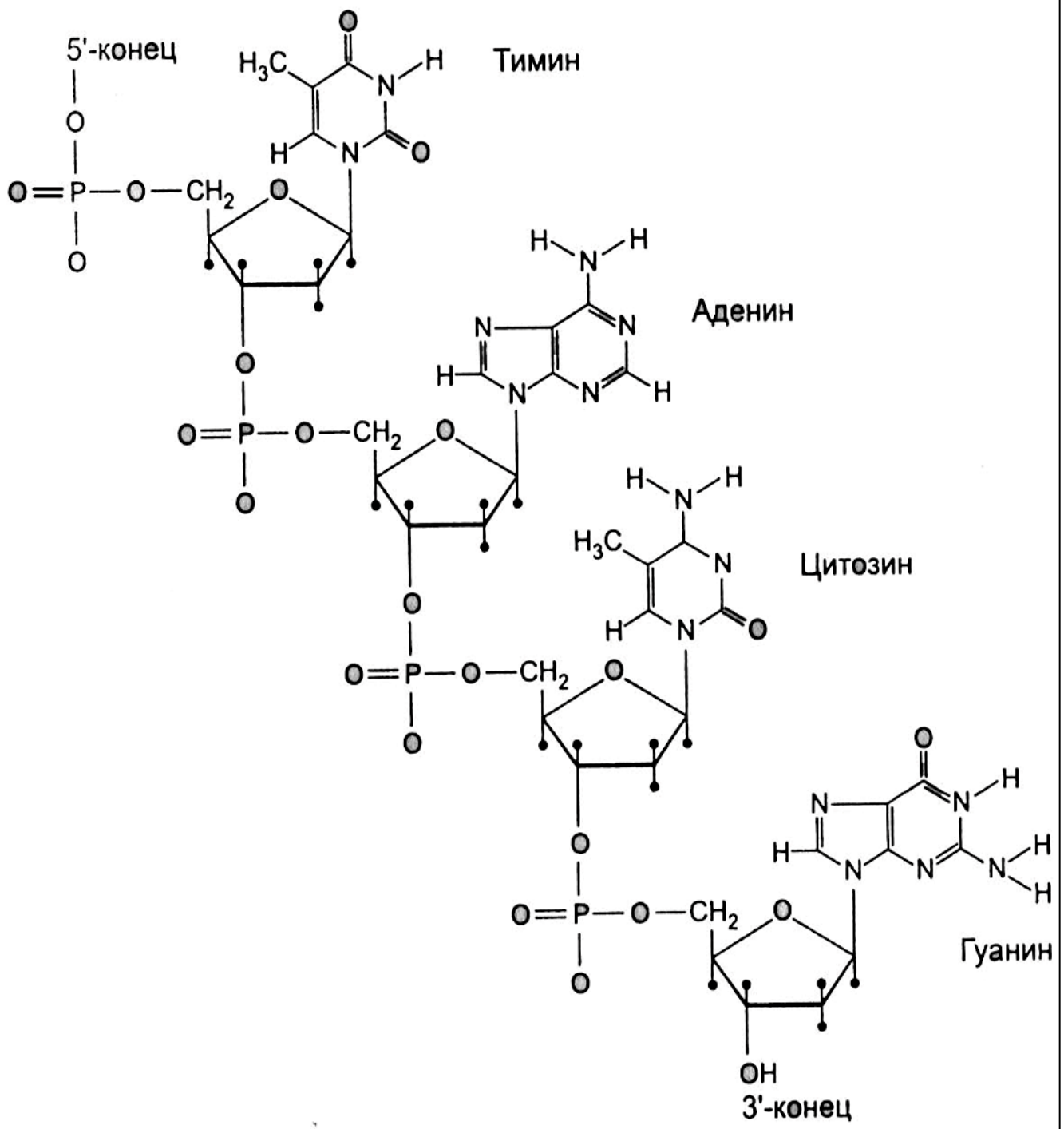
Для остановки синтеза обычно используют молекулы-терминаторы, обрывающие полинуклеотидную цепь.

В качестве таких молекул применили ди/дезоксирибо/нуклеозид/три/фосфаты (ddНТФ).

В них отсутствует дезоксирибоза -3′-ОН, входящая в состав нормальных нуклеотидов.

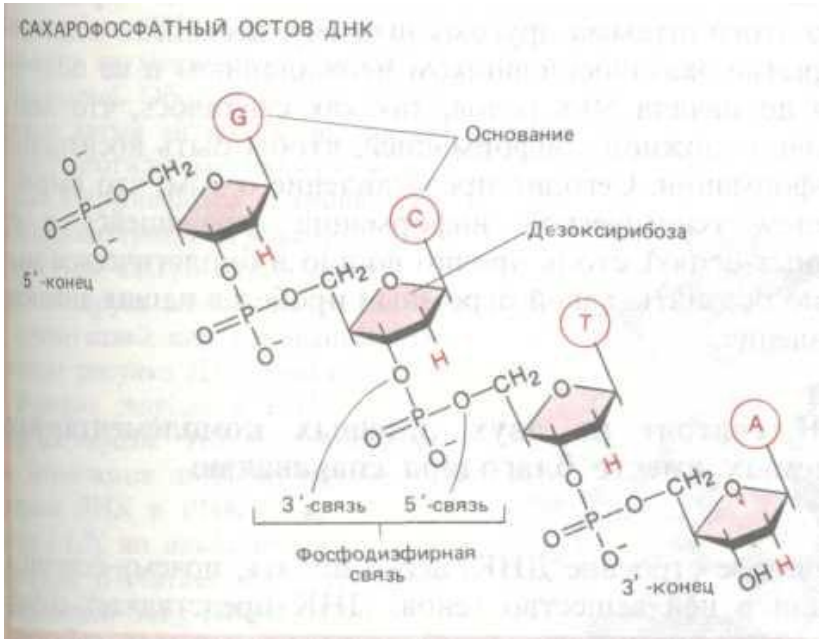
Такой измененный нуклеотид после внедрения в цепь ДНК блокирует присоединение следующего нуклеотида.




5'-конец
Тимин
Аденин
Цитозин
Гуанин
OH
3'-конец

Для секвенирования используют одноцепочечную ДНК, а также короткий олигодезоксинуклеотидный праймер (затравку), комплементарный небольшому участку анализируемой ДНК.

Одноцепочечная ДНК служит матрицей для ДНК-полимеразы, а новая (комплементарная) цепь наращивается начиная с 3'-ОН группы праймера путем присоединения соответствующих дезоксирибонуклеозидфосфатов (dНТФ).



Проводят одновременно четыре разных реакции копирования.

Для этого 4 одинаковых комплекса «матрица–праймер» инкубируют в присутствии всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов

(dATP, dGTP» dCTP и dTTP) и одного определенного ddНТФ,

который и служит терминатором синтеза после своего встраивания в растущую цепь ДНК.

Прекращение синтеза происходит в разных местах. Образуется набор фрагментов ДНК различной длины (в виде «лесенки»), начиная с 3'-конца праймера до места расположения соответствующего присоединенного ddНТФ.

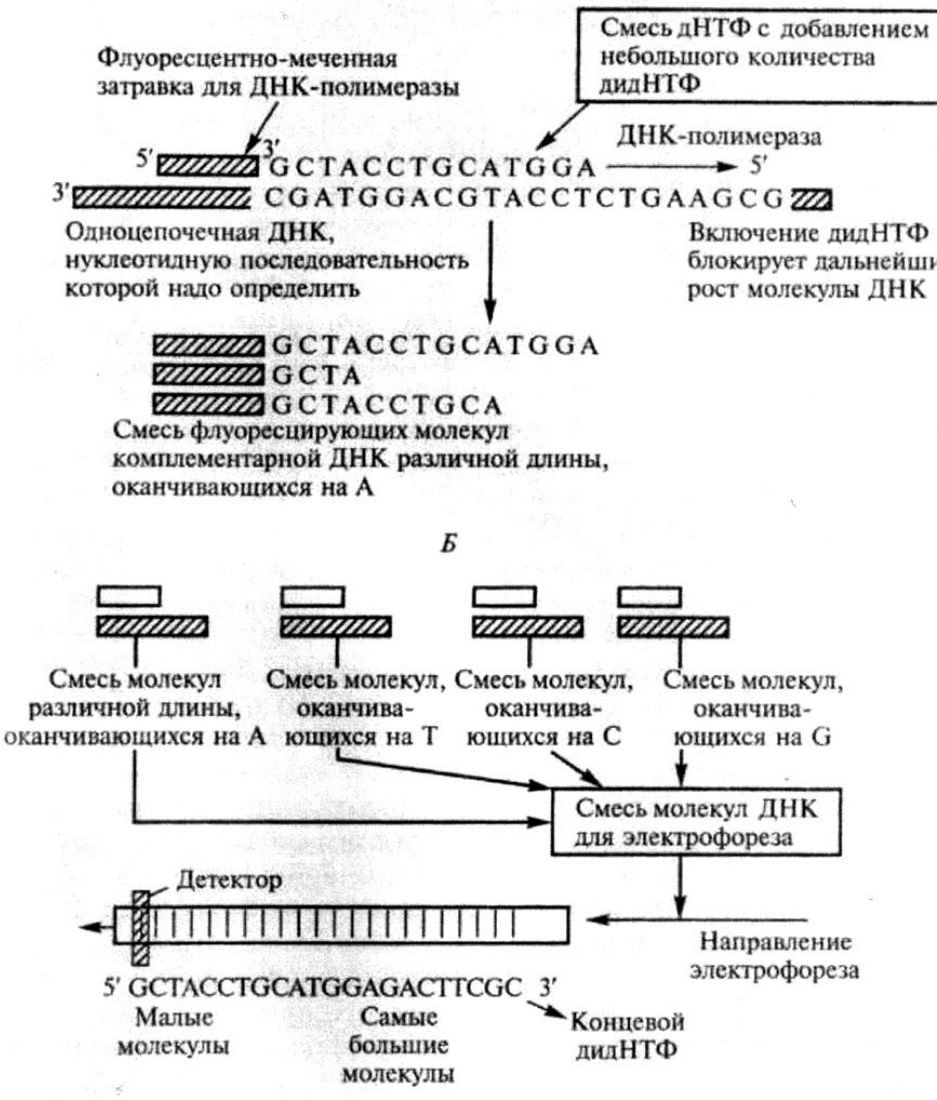
Синтезированные фрагменты являются радиоактивно меченными, так как для их синтеза используют меченый ddНТФ.

Метка вводится в праймер или по α-фосфатной группе дезоксинуклеозидтрифосфата, используемого для наращивания цепи ДНК.

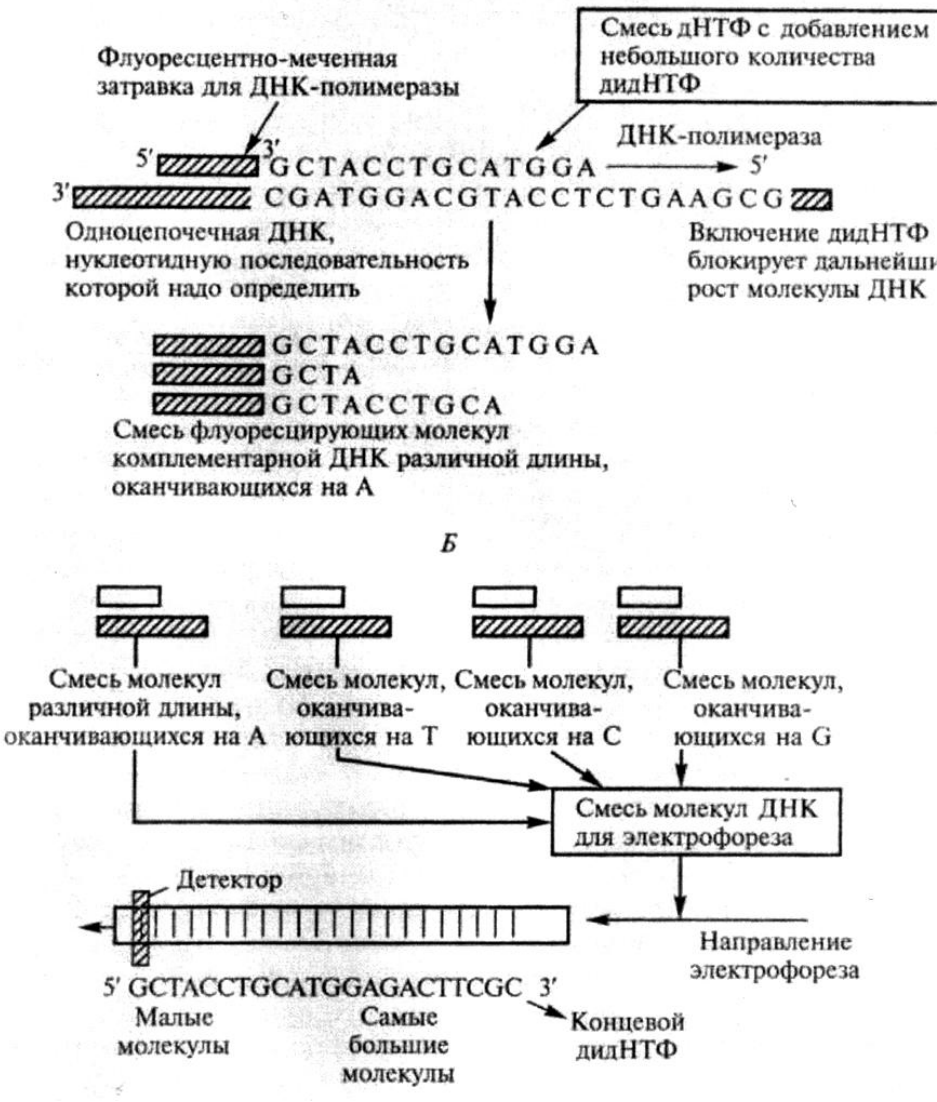
Используют атом фосфора ^{32}P или атом серы ^{35}S, заменяющий атом кислорода в фосфорном остатке нуклеотида.

Продукты четырех реакций анализируют методом электрофореза, и секвенируемую последовательность считывают с радиоавтографа как при анализе химического секвенирования.

Длина выявленного при электрофорезе радиоактивного фрагмента указывает место расположения комплементарного нуклеотида в анализируемом фрагменте ДНК.



Если при анализе на радиоавтографе пробы, полученной путем копирования в присутствии ddCTP, выявлены фрагменты длиной 3 и 4 нуклеотида, это значит, что в анализируемом фрагменте ДНК в соответствующих позициях расположен гуанин.



Для секвенирования ДНК методом Сангера созданы универсальные конструкции (векторы) на основе генома фага М13, в которые встраивают изучаемый фрагмент ДНК.

В такой конструкции встроенный фрагмент всегда будет ограничен (фланкирован) одними и теми же нуклеотидными последовательностями фаговой ДНК, что позволяет использовать универсальный праймер.

Комбинируя клонирование разных фрагментов ДНК и их секвенирование с помощью дидезокситерминатора, были определены последовательности митохондриальной ДНК человека (16569 н.п.) и ДНК фага λ (48 502 н. п.).

При секвестровании проводят одновременно четыре разных реакции копирования.

Для этого 4 одинаковых комплекса «матрица–праймер»

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

инкубируют в присутствии всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP и dTTP)

Определение нуклеотидных последовательностей крупных геномов, состоящих из миллионов и более нуклеотидов, проводится с использованием компьютерных программ, которые позволяют находить перекрывающиеся последовательности в анализируемых фрагментах и затем составить полную карту генома.

Геном человека состоит из 6 млрд. нуклеотидов.

Методы Максама–Гилберта и Сангера–Коулсона полностью автоматизированы.

В методе Сангера в 5'-конец праймера вводят флуоресцентные метки.

Для каждого из 4 нуклеотидов используют метки с различными спектральными характеристиками.

После электрофореза гель сканируют при различных длинах волн, и полученная информация обрабатывается на компьютере.

Все биохимические операции также проводятся роботом, и скорость секвенирования превышает 100 000 нуклеотидов в сутки.

Гибридизация нуклеиновых кислот

- **При нагревании ДНК до 100 ºС в сильно щелочной среде ослабевают водородные связи между комплементарными парами оснований, они разобщаются и ДНК разделяется на две цепи.**
- **Этот процесс называют *денатурацией* («плавлением»).**
- **Если выдержать комплементарные цепи при температуре 65 ºС, то произойдет их соединение и двойная структура ДНК восстановится.**
- **Это – ренатурация (гибридизация, «отжиг»).**

Гибридизация позволяет выявлять специфические нуклеотидные последовательности.

CCGCTATTAGCGTAAC

CCATACGGCGATAATCGCATTGATTC

Скорость ренатурации двойной спирали зависит от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей и их концентрации в растворе.

Это может быть использовано для определения концентрации любых последовательностей РНК или ДНК в смеси, содержащей и другие фрагменты нуклеиновых кислот.

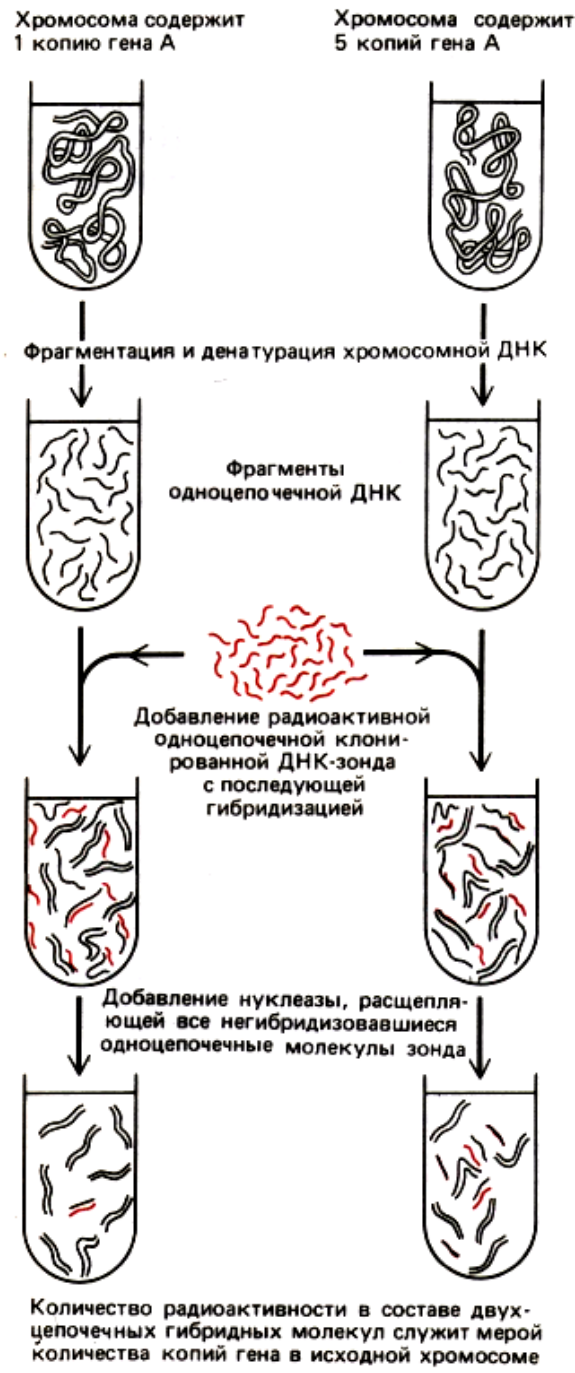
Для проведения реакции необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить.

Обычно фрагмент ДНК, полученный клонированием либо химическим путем, метят по ^{32}P в целях прослеживания включения фрагмента в состав дуплексов при гибридизации.

Одноцепочечную молекулу ДНК, используемую в данном методе в качестве меченого индикатора, называют ДНК-зондом.

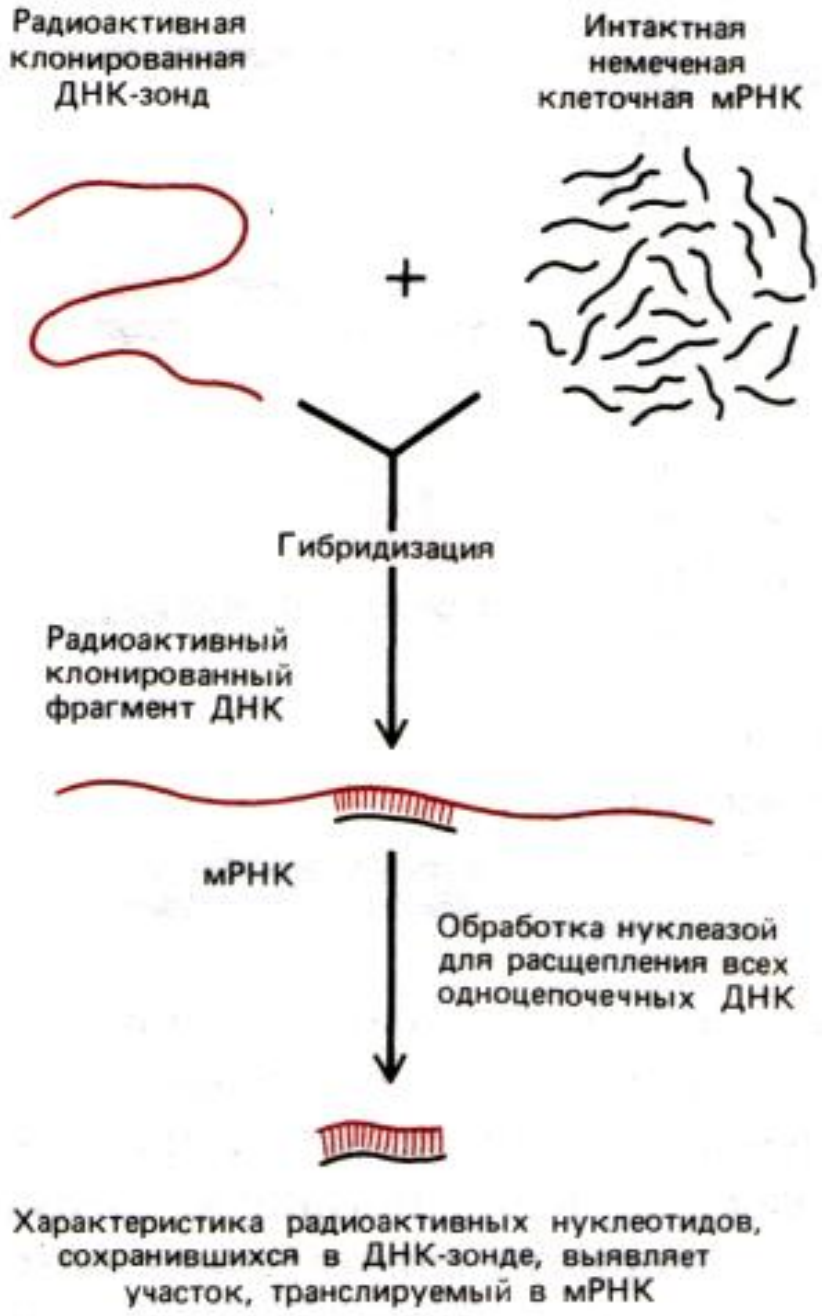
Размеры его варьируют от нескольких десятков до нескольких сотен и тысяч нуклеотидов.

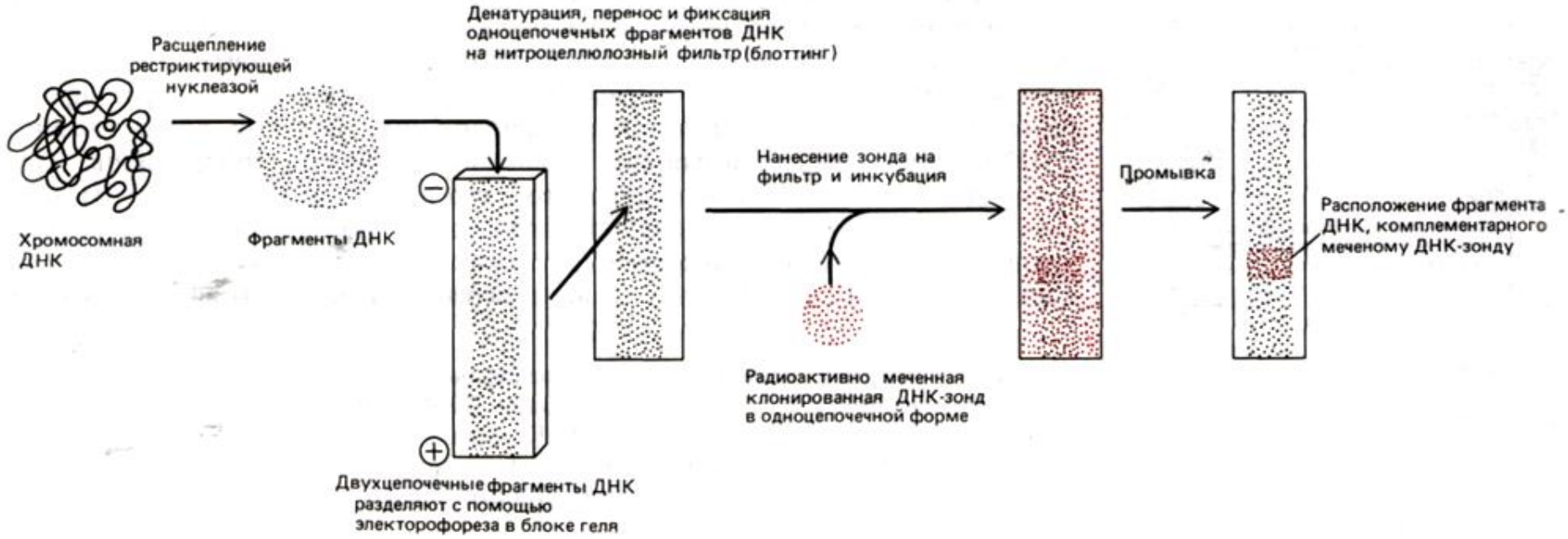
- **Измерение количества копий специфического гена в образце ДНК с помощью гибридизации ДНК.**
- **Одноцепочечный радиоактивный фрагмент ДНК, используемый в таких экспериментах, называют *ДНК-зондом:* хромосомная ДНК в данном случае не содержит радиоактивных атомов.**



Использование гибридизации нуклеиновых кислот для определения участка клонированного фрагмента ДНК, который транскрибируется в мРНК.

С помощью этого метода было открыто существование в генах эукариот вставочных (некодирующих) последовательностей (интронов).





После расщепления образца ДНК рестриктирующей нуклеазой и электрофоретического разделения множества полученных фрагментов ДНК переносят с помощью «блоттинга» на нитроцел-люлозный фильтр и затем гибридизуют с радиоактивной ДНК-зондом в течение длительного времени в условиях отжига. Затем фильтр тщательно промывают, чтобы радиоактивно меченными остались только те фрагменты, которые гибридизируются с ДНК-зондом. На радиоавтографе, полученном с листа нитроцеллюлозы, эти фрагменты выявляются в виде полос.

Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов позволяет:

выявить нуклеотидные последовательности в очень низкой концентрации и

определять, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки.

ДНК-зонды применяют:

для поиска родственных генов;

в реакциях гибридизации с РНК – для выявления экспрессии данного гена в различных клетках.

Для выявления молекул нуклеиновых кислот, комплементарных всему зонду (или его участку), ДНК-зонды часто сочетают с методом гель-электрофореза, что позволяет получать информацию о размерах гибридизируемых молекул ДНК.

Эффективное использование современных приборов, способных автоматически синтезировать любые нуклеотидные последовательности за короткий промежуток времени, дало возможность перестраивать гены, что представляет собой один из важных аспектов генной инженерии.

Выделение генов и получение комплементарной ДНК (кДНК)

Источники и способы получения генов различные. Чаще разделяют ДНК на фрагменты.

***Этот способ называется shotgun – дробовик*.**

Строение и размер геномов различных видов сильно различаются.

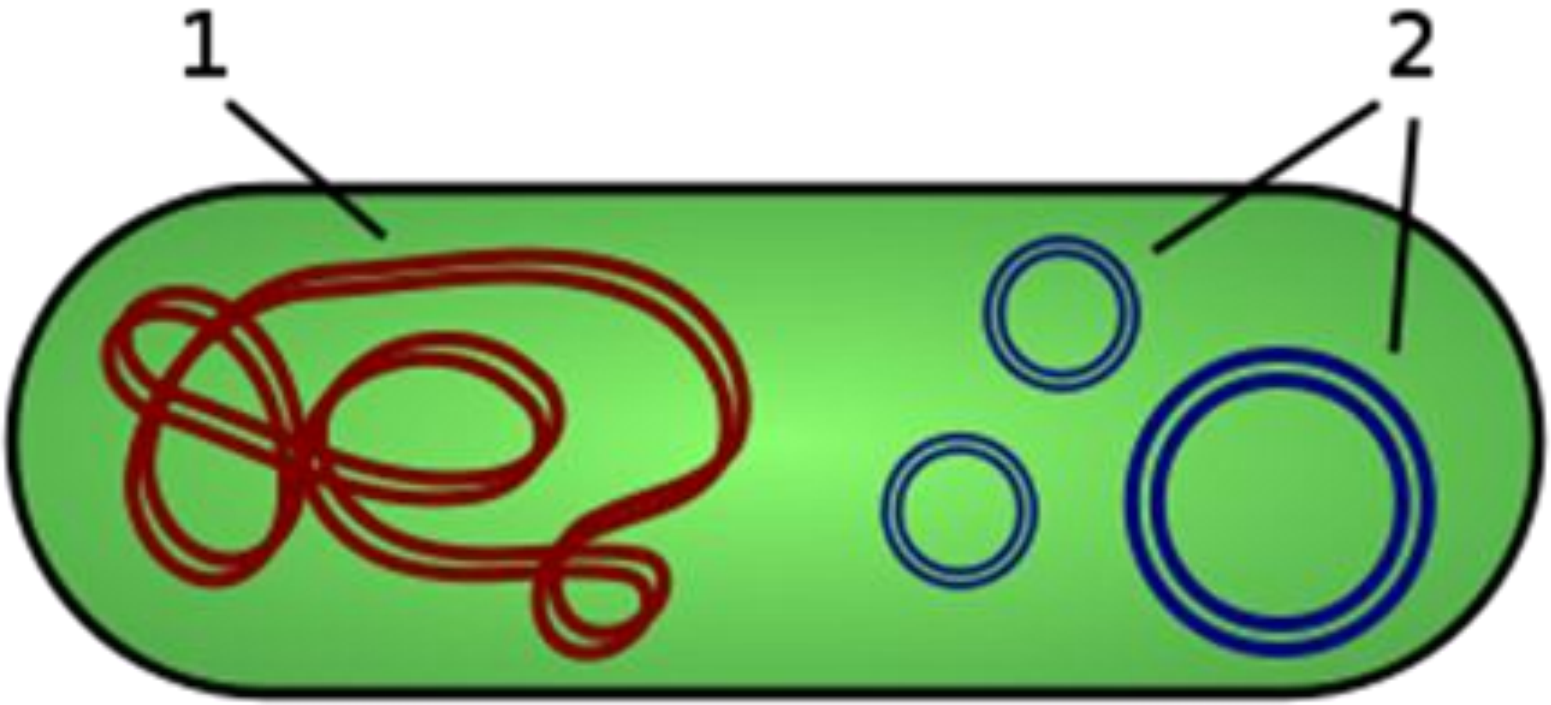
Пример. Хромосома E. Coli (двуспиральная кольцевая молекула ДНК) включает $5 \cdot 10^6$ пар оснований, молекулярной массой $3 \cdot 10^9$ Д.

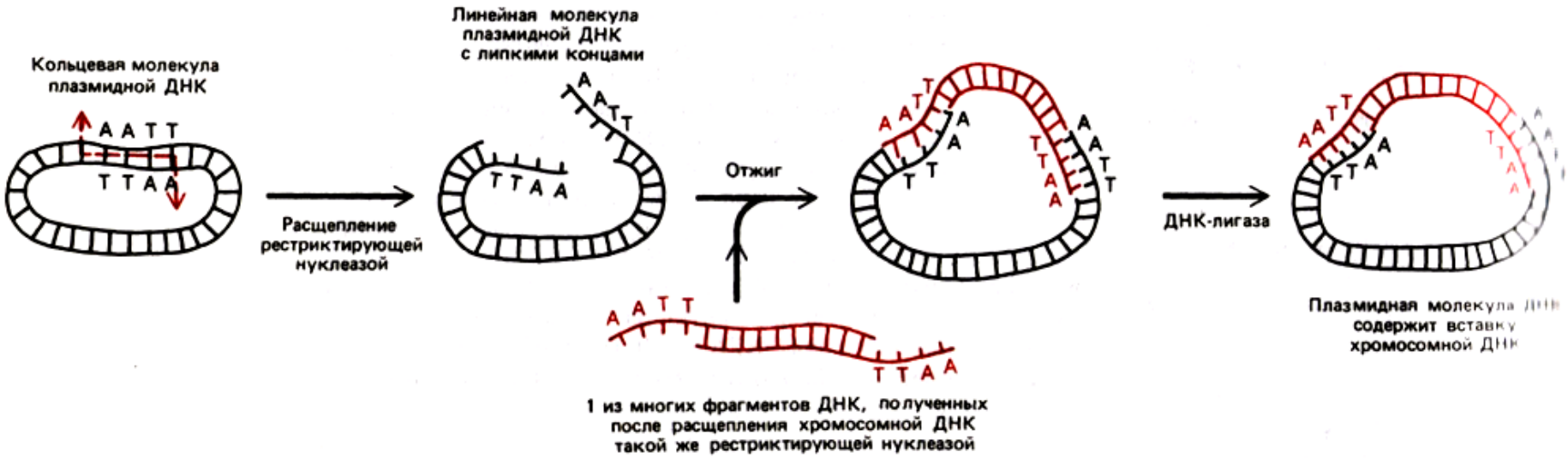
В процессе выделения происходит около 100 разрывов хромосомы и очищенные фрагменты ДНК имеют массу $30 – 50 \cdot 10^6$ Д.

Геном человека и животных содержит в тысячи раз большее количество ДНК, которая распределена в десятках хромосом.

- **До появления методов генетической инженерии ДНК разделяли посредством многократного пропускания раствора через иглу шприца.**
- **Получали фрагменты величиной в $1–5 \cdot 10^6$ Д, т.е. размером со средний ген.**
- **Разрывы ДНК происходили в различных местах и образовывалось большое количество не одинаковых фрагментов. Очень редко удавалось встроить их в векторы.**

- **В настоящее время ДНК обрабатывают рестриктазами и получают фрагменты с выступающими концами.**
- **Их встраивают в плазмиды, которые переводят в линейную форму с помощью того же фермента.**
- **Образуются тысячи различных рекомбинантных плазмид. Среди них лишь немногие могут содержать нужный ген.**
- **Для поиска плазмиды, несущей этот ген, разработаны специальные процедуры, называемые скринингом.**


1
2



При наличие липких концов происходит соединение двух фрагментов ДНК в результате спаривания комплементарных нуклеотидов.

Соединенные фрагменты ДНК могут быть связаны ковалентными связями под действием ДНК-лигазы.

Образующаяся гибридная молекула плазмидной ДНК будет содержать фрагмент (вставку) хромосомной ДНК.

- ***Другой способ конструирования нужных генов*** **- синтез на мРНК комплементарной ей ДНК (кДНК).**
- **Такие гены необходимы для экспрессии в бактериях и получения инсулина, гормона роста, ренина и др.**
- **Фрагменты генома человека или животных использовать нельзя, так как у них отдельные части некоторых генов разобщены.**
- **Кодирующие нуклеотидные последовательности (экзоны) чередуются с вставочными некодирующими последовательностями (интронами).**

- **Ген целиком транскибируется с образованием первичного транскрипта РНК, после чего интроны выщепляются, а нуклеотидные последовательности, соответствующие экзонам, соединяются с образованием мРНК.**
- **Этот процесс созревания матричной РНК называют *сплайсингом*.**
- **Прокариотические организмы не способны осуществлять сплайсинг.**

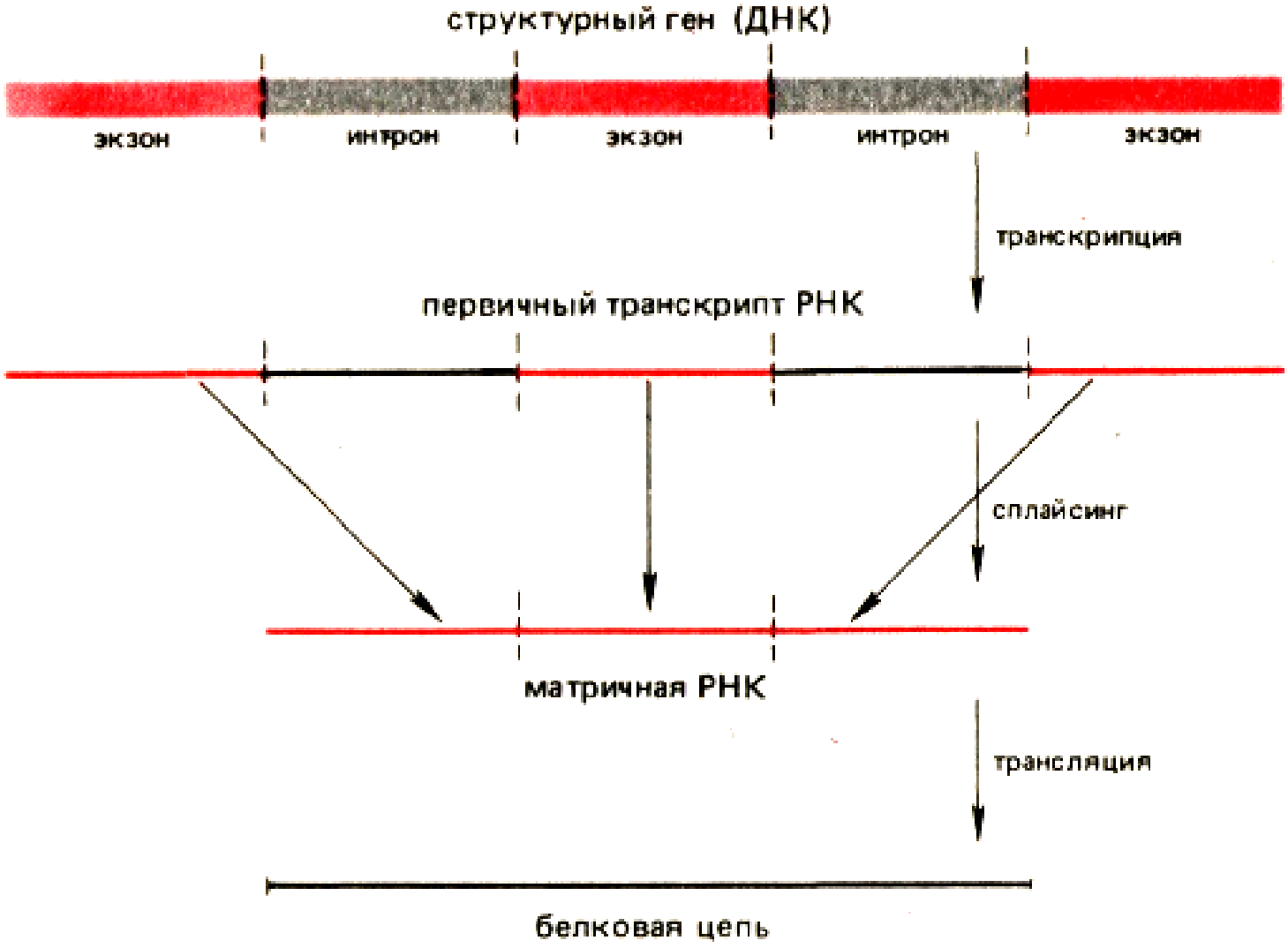


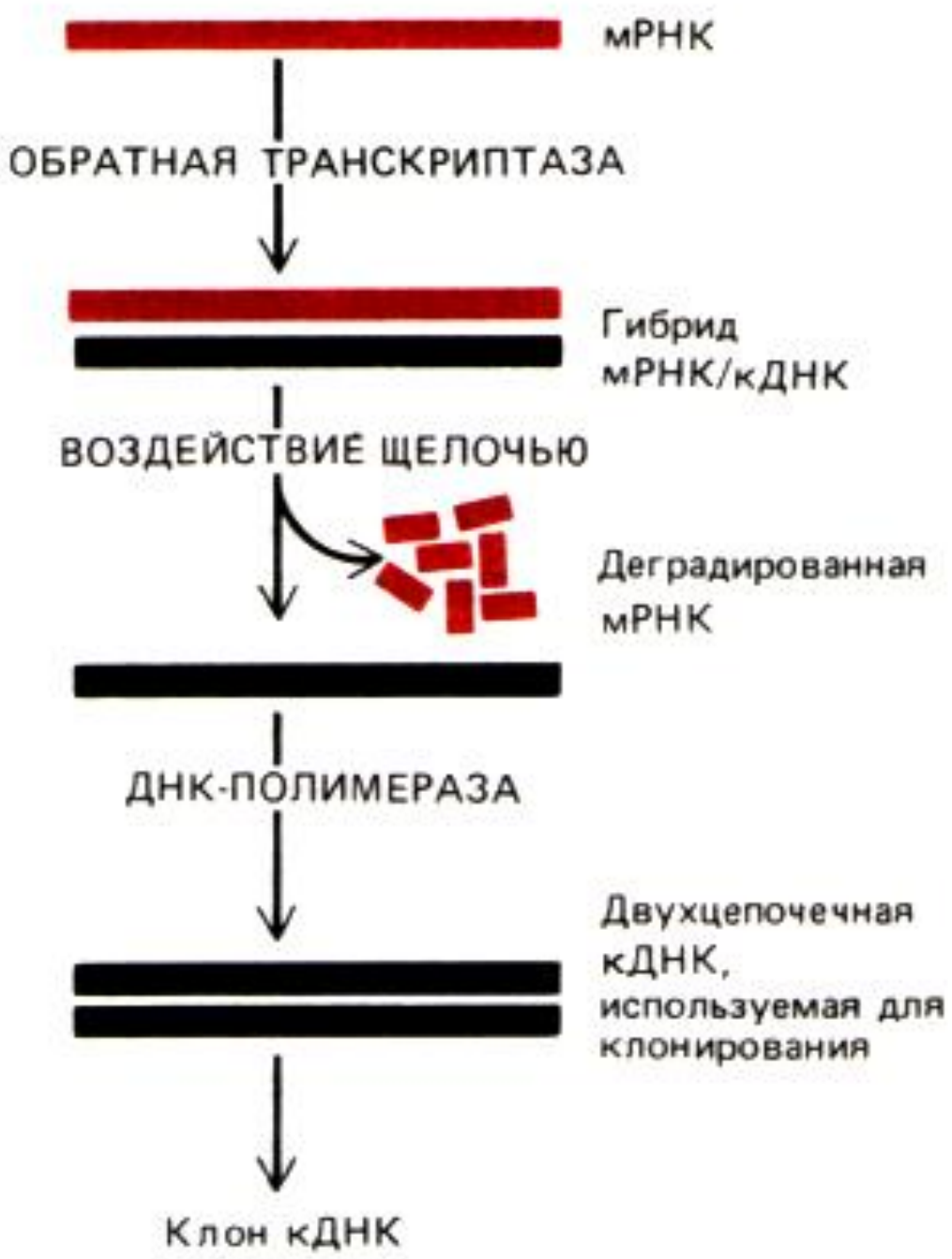
Схема экспрессии генов у эукариот

- **Большинство клеток содержит множество различных мРНК и выделить чистую мРНК, кодирующую нужный белок, трудно.**
- **Чаще используют специализированные клетки, которые вырабатывают один вид белка.**
- **Так, из незрелых красных кровяных клеток можно выделить мРНК для гемоглобина, а**
- **из клеток поджелудочной железы – мРНК для проинсулина человека.**

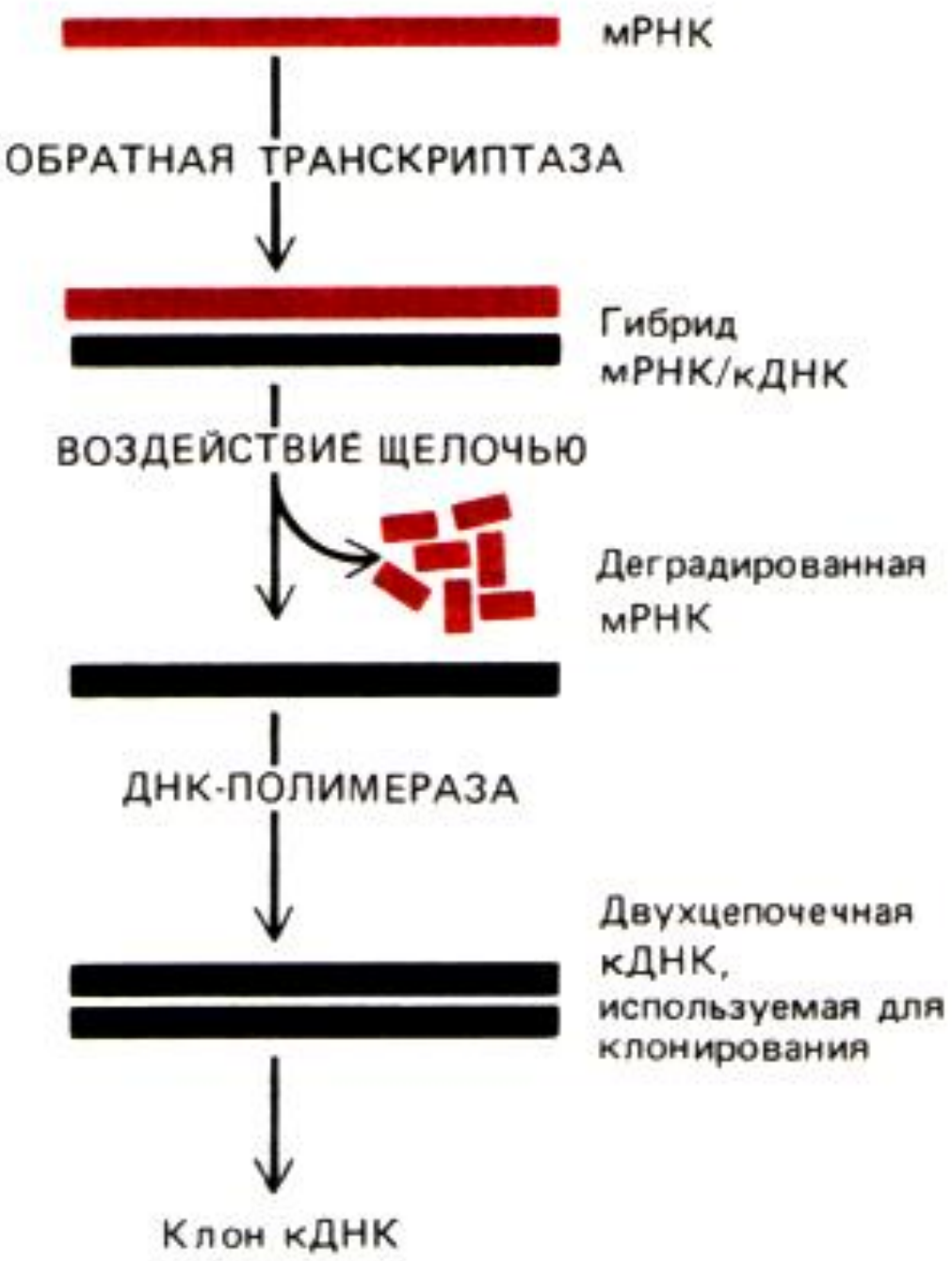
- **Для получения мРНК клетки разрушают, выделяют центрифугированием рибосомы и обрабатывают их антителами против того белка, ген которого хотят извлечь.**
- **Специфические антитела будут взаимодействовать только с полностью достроенным белком, который ещё прикреплён к рибосомам, синтезирующим его на матрице мРНК.**
- **Комплекс антител с рибосомами выпадет в осадок и из него мРНК выделяют в чистом виде путем хроматографии.**

- **На мРНК синтез кДНК происходит с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы).**
- **На 3′-конце мРНК находится полиаденилова последовательность.**
- **Для начала функционирования обратной транскриптазы мРНК отжигается с олиго-dT, который служит затравкой при копировании нити кДНК.**
- **После этого из смеси нуклеотидов на матрице мРНК начинается синтез кДНК.**
- **Из гибрида мРНК – кДНК удаляют мРНК гидролизом (щелочью).**
- **На 3'-конце кДНК остается шпилечная структура, которую используют как затравку при построении второй нити ДНК.**

Для построения второй нити ДНК на однацепочечной кДНК используют фрагмент Кленова ДНК–полимеразы I E. Coli. У этого фрагмента отсутствует 5′ ---3′-экзонуклеазная активность. В результате образуется двухцепочечная кДНК, содержащая «шпильку».



После расщепления шпильки остается синтетическая двухцепочечная кДНК, соответствующая белку, кодируемому нужный для нас геном.



- **Синтезированная кДНК кодирует аминокислотную последовательность белка.**
- **Эта кДНК не идентична природному гену белка, так как получали ее с эукариотической мРНК;**
- **она не содержит интронов (вставочных последовательностей) и стартовых и терминальных сигналов.**
- **Чтобы упростить способ, кДНК обычно синтезируют из нуклеотидов, содержащих ^{32}P.**
- **Для удаления олиго-dT и однонитевой петли используют SI-нуклеазу, расщепляющую однонитевую ДНК.**
- **При соблюдении условий синтеза можно получать полноразмерные копии мРНК, включающие несколько тысяч пар оснований.**

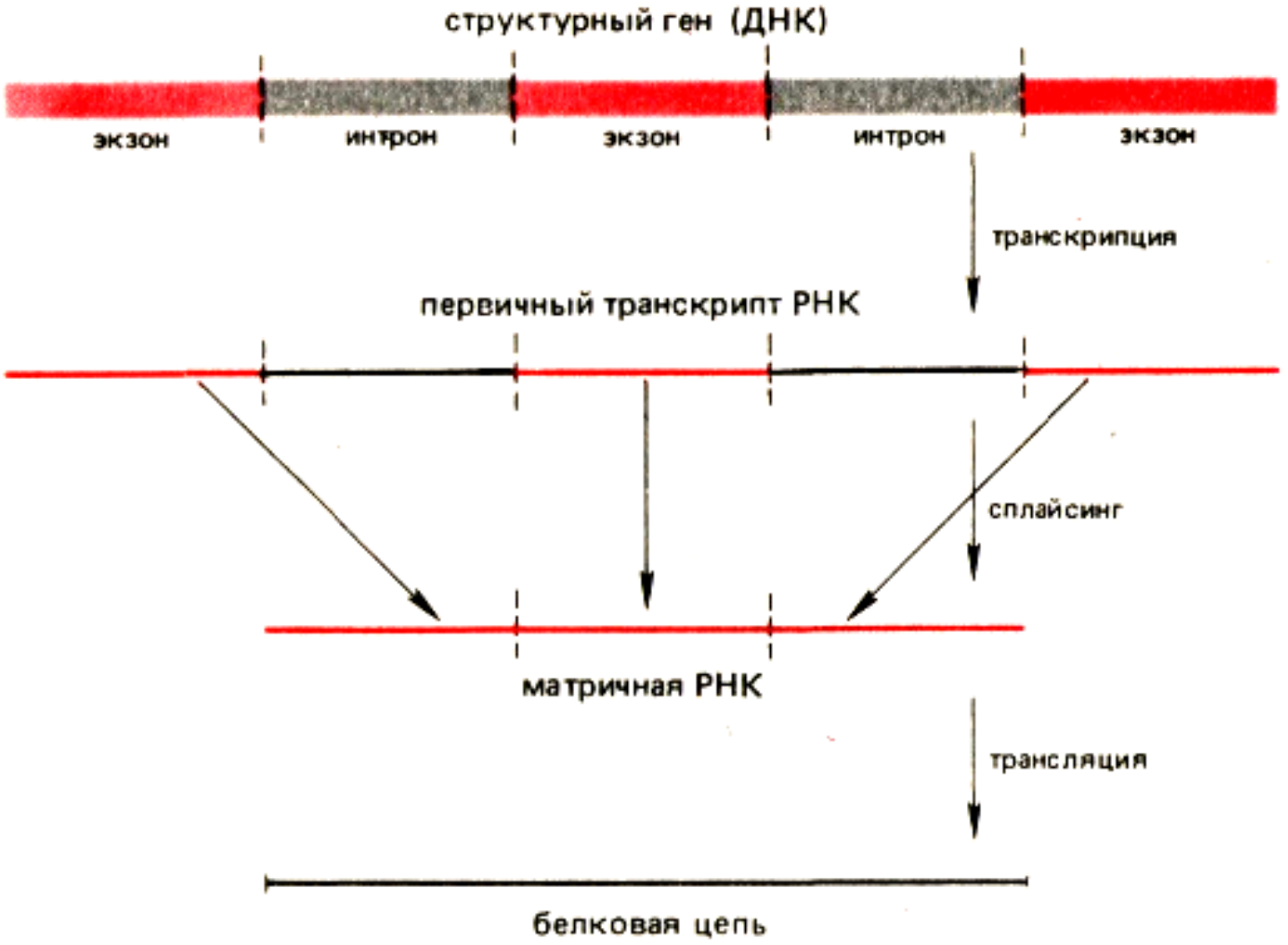


Схема экспрессии генов у эукариот

Химико-ферментативный синтез генов

Чтобы синтезировать ген, нужна

- **информация о нуклеотидных последовательностях его, или**
- **об аминокислотных последовательностях в соответствующем белке.**

Определение нуклеотидных последовательностей требует клонирования исходных фрагментов ДНК.

После расшифровки нуклеотидной последовательности и получения нужных фрагментов ДНК необходимо их соединить воедино.

Так осуществлен синтез гена лейкоцитарного интерферона человека (более 600 п. о.).

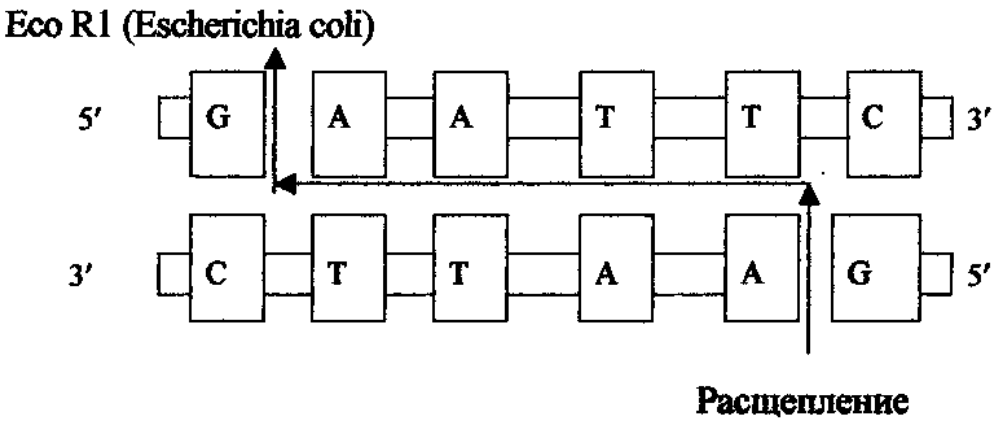
Простой метод соединения фрагментов ДНК

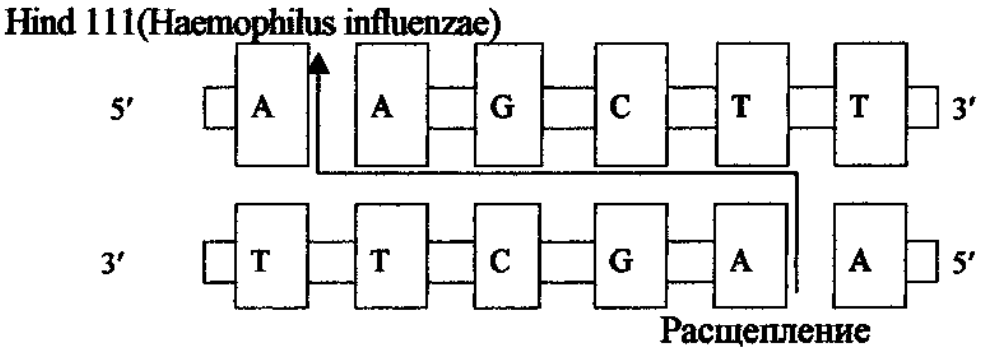
отжиг фрагментов, полученных после обработки ДНК рестриктазой, образующей «липкие» комплементарные однонитевые концы,

с последующей обработкой ДНК-лигазой.

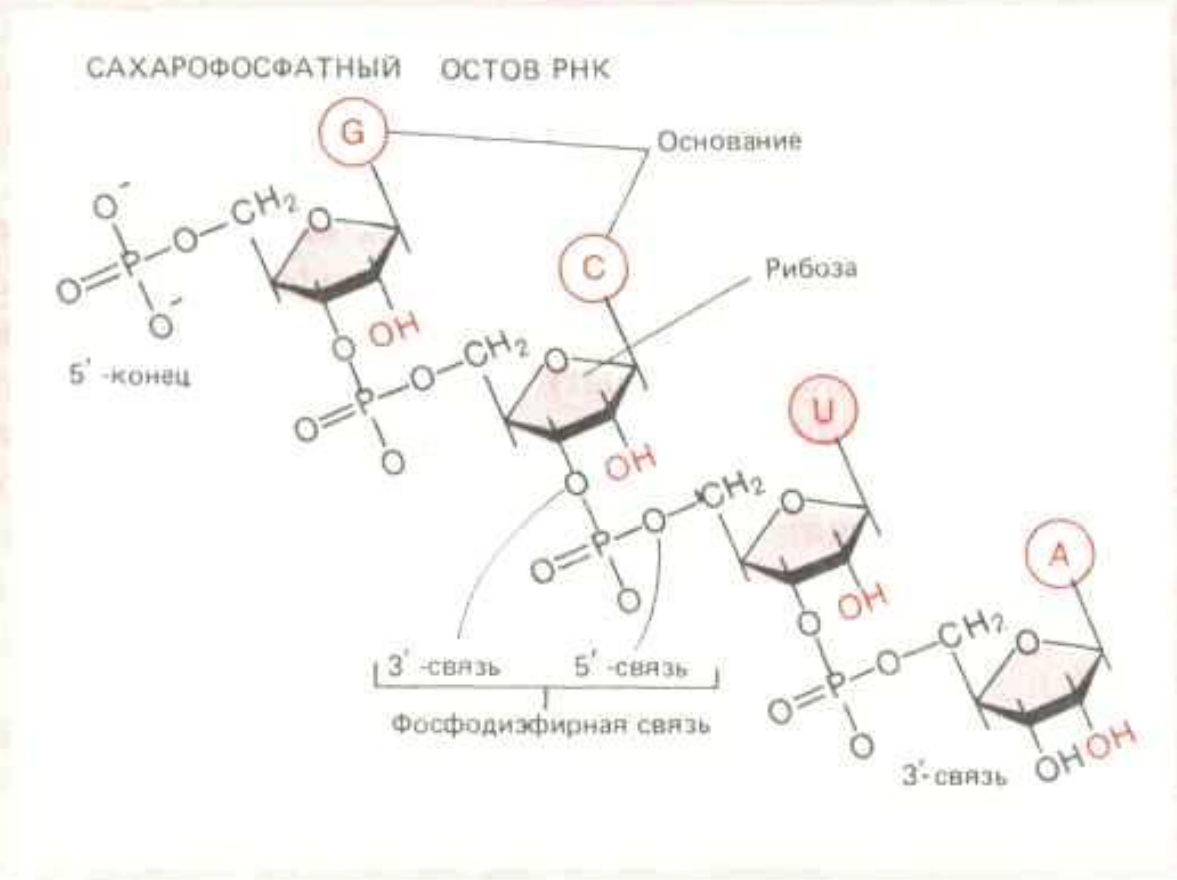
Лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами, т. е. восстанавливает непрерывность цепей ДНК.

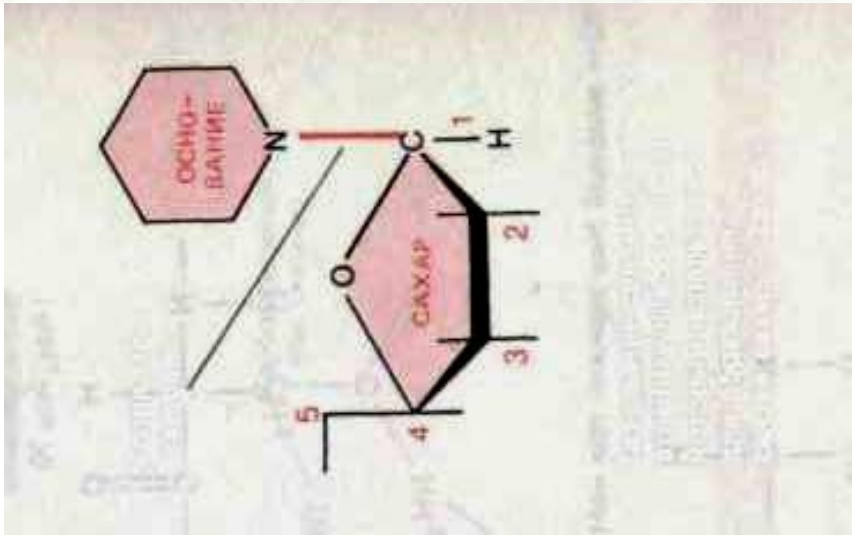
Две цепи ДНК разрезаются не прямо напротив друг друга, а наискосок, образуя липкие концы. Места расщепления ДНК, указанные стрелками, лежат вне оси симметрии. В результате несовпадения разрывов образуются одноцепочечные концы из четырех пар оснований.

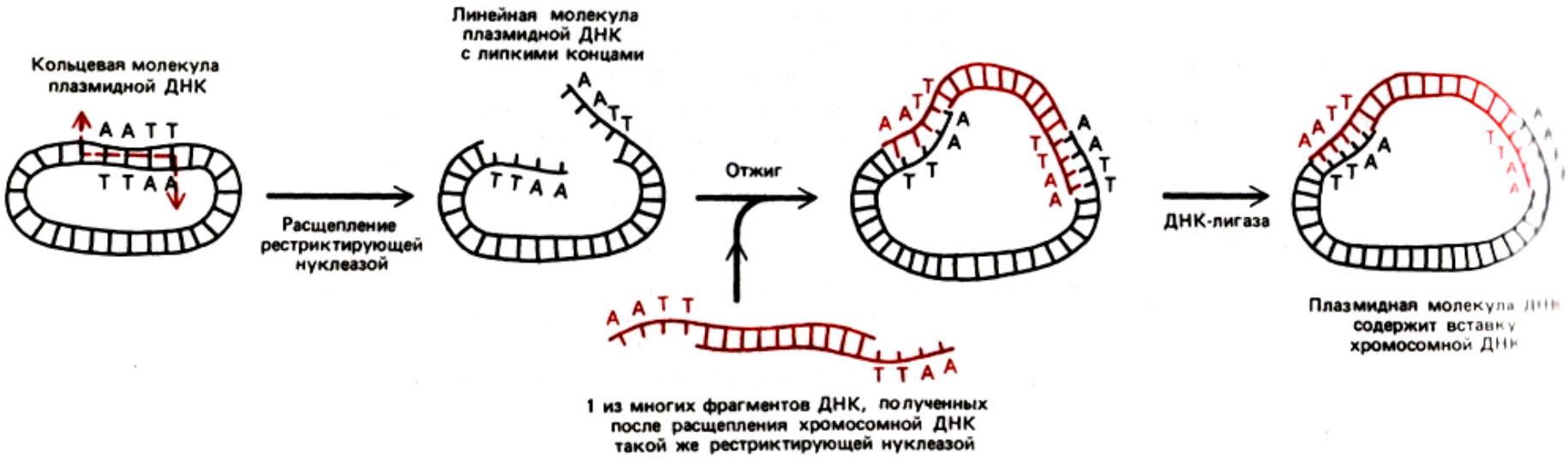




- **Нуклеотиды связаны между собой ковалентными фосфодиэфирными связями, соединяющими 5´-атом углерода одного остатка рибозы (дезоксирибозы) с 3´-атомом углерода следующего остатка. Четыре основания присоединены к этой монотонной сахаро-фосфатной цепи наподобие 4-х разных типов бусинок, нанизанных на одну нить.**







При наличие липких концов происходит соединение двух фрагментов ДНК в результате спаривания комплементарных нуклеотидов.

Соединенные фрагменты ДНК могут быть связаны ковалентными связями под действием ДНК-лигазы.

Образующаяся гибридная молекула плазмидной ДНК будет содержать фрагмент (вставку) хромосомной ДНК.

Коннекторный метод

соединения фрагментов ДНК основан на свойстве фермента – терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы – пристраивать нуклеотидные последовательности к 3'-ОН-концам фрагментов ДНК.

3'-OH-TATGGCAGCTGAACTACGTGC **1.**
ATACCGTCGACTTGATGCACG-3'-OH

AAAATATGGCAGCTGAACTACGTGC
ATACCGTCGACTTGATGCACG-3'-OH

3'-OH-CATGACAGTTGAGCTACGTGT **2.**
GTACTGTCAACTCGATGCACA-3'-OH

3'-OH-TATGGCAGCTGAACTACGTGT
ATACCGTCGACTTGATGCACATTTT

К концам одного фрагмента ДНК присоединяется однонитевой полинуклеотид (например поли dA), а к другому — комплементарный ему, поли dT).

Достроенные фрагменты смешивают и отжигают для образования кольцевых структур.

Возможные бреши ликвидируют обработкой экзонуклеазой III, ДНК-полимеразой и лигазой, в результате чего получают ковалентно замкнутые кольцевые молекулы.

Основными достоинствами коннекторного метода являются возможность его применения независимо от природы и способа получения фрагментов ДНК и высокий выход рекомбинантных молекул.

Важно, что при таком способе воссоединения фрагментов ДНК не могут образоваться исходные кольцевые векторные молекулы.

К недостаткам метода следует отнести трудности, которые возникают при точном вырезании клонированных фрагментов.

Кроме того, протяженные гомополимерные участки могут отрицательно влиять на стабильность плазмид из-за внутримолекулярной рекомбинации, а также

на экспрессию генов, если она контролируется промотором вектора.

После разделения генома различными рестриктазами появляются различной величины фрагменты ДНК с различной нуклеотидной последовательностью.

Сравнением размеров таких фрагментов можно построить рестрикционную карту. Она будет отражать характерную последовательность нуклеотидов в данном участке.

Используя такие карты можно оценить степень гомологии между отдельными участками (генами) без определения их нуклеотидной последовательности.

Рестрикционные карты необходимы для изучения эволюции и филогенеза организмов, клонирования ДНК.

Многоплодие

Для кобыл и коров характерна одноплодная беременность, но и у них возможно многоплодие.

- **У коров двойни встречаются в 0,5–4,0%, однако в отдельных стадах частота их может достигать 8–10%.**
- **У коров мясных пород естественная двойневость составляет 2,8%, но около половины двоен размещается в одном роге матки и животные их не вынашивают.**
- **У коров молочных пород двойни встречаются в 1–4% случаев:**

  у животных джерсейской породы – 1 %,

  айрширской – 2,8 %,

  голштинской – 3 %,

  швицкой – 2,7–8,8 %.
- **Рождение трех или более плодов регистрируется редко; тройни – одна на 7500–37000 родов, четверни – 1:310000**

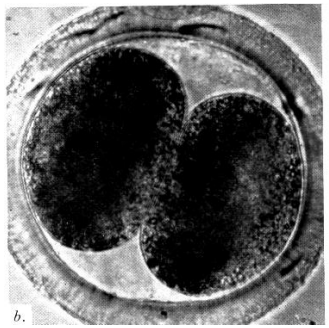
- **Отдельные животные проявляют чрезвычайно высокую плодовитость. Корова Марта (Перьмская область) черно-пестрой породы три года подряд приносила двоен, а затем 5 телят (двух бычков и трех телочек). Описан случай, когда корова за 8 беременностей принесла 25 телят (1, 2, 2, 3, 3, 4, 4 и 6).**
- **У кобыл двойни встречаются в 0,8–3% случаев; возможно рождение и 3–4 близнецов.**

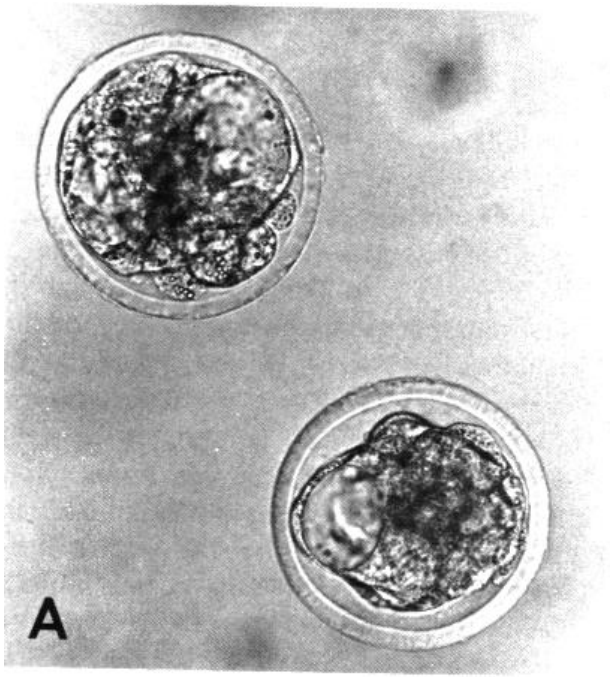
Многоплодная беременность у крупных животных может быть результатом созревания и овуляции нескольких фолликулов или же одного.

В случае одиночной овуляции после образования зиготы и первого деления ее бластомеры обосабливаются и продолжают развиваться самостоятельно в отдельные плоды;

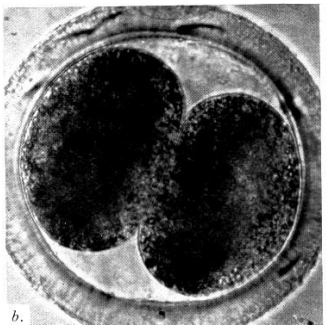
это возможно и в результате формирования на противоположных полюсах бластоцисты двух клеточных масс (эмбриобластов).

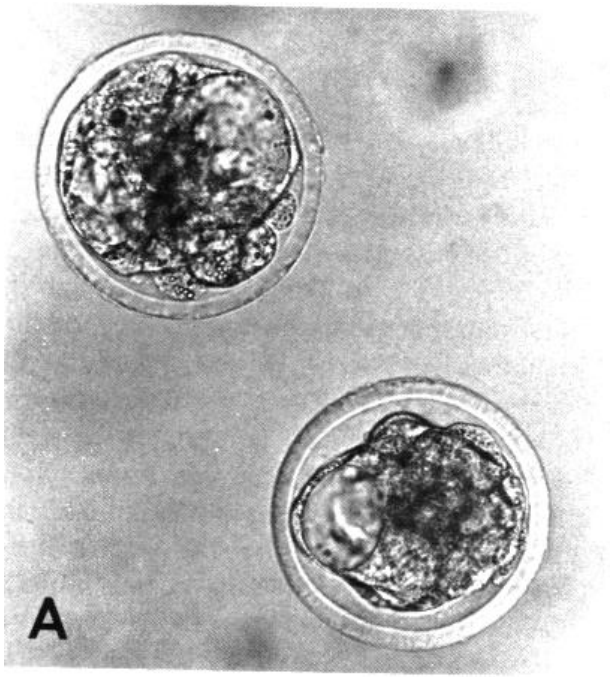
В итоге появляются монозиготные (однояйцевые) близнецы. Они одного пола, генетически и фенотипически очень схожи (идентичны).





У крупного рогатого скота рождение таких близнецов установлено в 10% случаев однополых двоен. Дизиготные (разнояйцевые) близнецы могут иметь как одинаковый, так и различный пол.





Если расхождение двух частей зиготы неполное, то рождаются сросшиеся в различной степени близнецы ("сиамские"). Описаны случаи сиамских близнецов у фризского скота, свиней и у других видов животных. Другие нарушения развития зиготы могут приводить к образованию двухголовых плодов, появлению дополнительно двух передних конечностей и т.д.

При множественных овуляциях из каждой оплодотворенной яйцеклетки формируется плод, рождаются дизиготные близнецы. У кобыл частота множественных овуляций достигает 25%, однако многие яйцеклетки не оплодотворяются; нередко один или оба зародыша погибают до фиксации к стенке матки; возможен выкидыш обоих близнецов или гибель только одного плода.

У мелких животных беременность, как правило, многоплодная. Многоплодие у них обусловлено созреванием о овуляцией одновременно большого числа фолликулов.

- **У коз одновременно может развиваться от одного до шести плодов, причем более четверти их приносят одинцов, около 60% – двоен, в остальных случаях – трех или более плодов. Первородящие козы чаще приносят одинцов. У ангорских коз двоен обычно не более 10%.**
- **У овец плодовитость примерно такая же, как и у коз. Но каракульские и курдючные овцы чаще родят одинцов (в 85–90% случаев). Романовские овцы, наоборот, чаще приносят 2–3-х ягнят, а в отдельных случаях до 8–9. Известен случай получения от овцы за 12 ягнений 64 ягнят. У тонкорунных овец двойни наблюдаются в 50–80% случаев.**

- **Взрослые свиноматки при благоприятных условиях приносят за один опорос 10-12 поросят. Свиновматка Сказка (Саратовский СХИ) родила 28 живых поросят (всего 32). Известен случай рождения за опорос 34 поросят.**
- **У сук крупных пород число щенят в помете чаще составляет 7-10, иногда 13-23; у самок пород средней величины – 6-8, а у карликовых - 2-4. У кошек рождается 2-5 плодов.**

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

- **Трансгенные животные – определение**
- **Схема получения трансгенных животных**
- **Получение трансгенных сельскохозяйственных животных**

1. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учебник / Ю. А. Горбунов, Г. Ф. Медведев, Н. Г. Минина [и др.]; под ред. Ю.А. Горбунова. — Минск: ИВЦ Минфи-на, 2016 – 244 с.
2. Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных. – М.: ВО Агропромиздат, 1989.
3. Валюшкин К.Д., Медведев Г.Ф. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: Учебник, 2-е изд., перераб. и допол. Мн.: Ураджай, 2001. – 869 с.: ил.

Трансгенные животные – определение

Метод рекомбинантных ДНК широко используется:

- **для выделения генов высших организмов,**
- **встраивания их в бактериальные плазмиды (и другие векторы) и клонирования в бактериях.**

  После выяснения нуклеотидной последовательности

- **осуществляется интеграция рекомбинантной ДНК в животную клетку и экспрессия чужеродных генов.**

- **Перенос генетической информации с последующей ее экспрессией возможен не только в культуре клеток, но и непосредственно в целый организм.**
- **Перенос может быть осуществлен прямой инъекцией чужеродной ДНК (обычно в составе бактериальных плазмид) в яйцеклетку в период оплодотворения ее или даже в ранний эмбрион.**

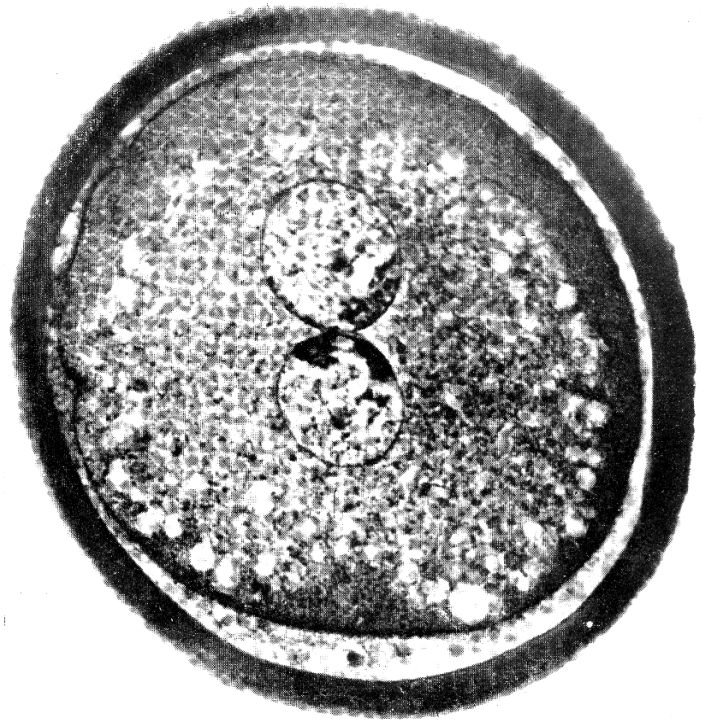
Животных, в геном которых интегрируют чужеродные гены, называют трансгенными.

Включение в геном чужеродного гена может преследовать две цели:

- **генетическое улучшение животных и**
- **получение животных для производства ценных продуктов.**

В 1983 г. Дж. Гордон разработал схему получения трансгенных мышей, которая используется в современных экспериментах.

По этой схеме клонированный ген включают в плазмиду, а суспензия плазмид с помощью микроинъекции вводится в мужской пронуклеус зиготы мыши.



Слияние пронуклеусов (сингамия) – конечная стадия оплодотвлоения яйцеклетки коровы.

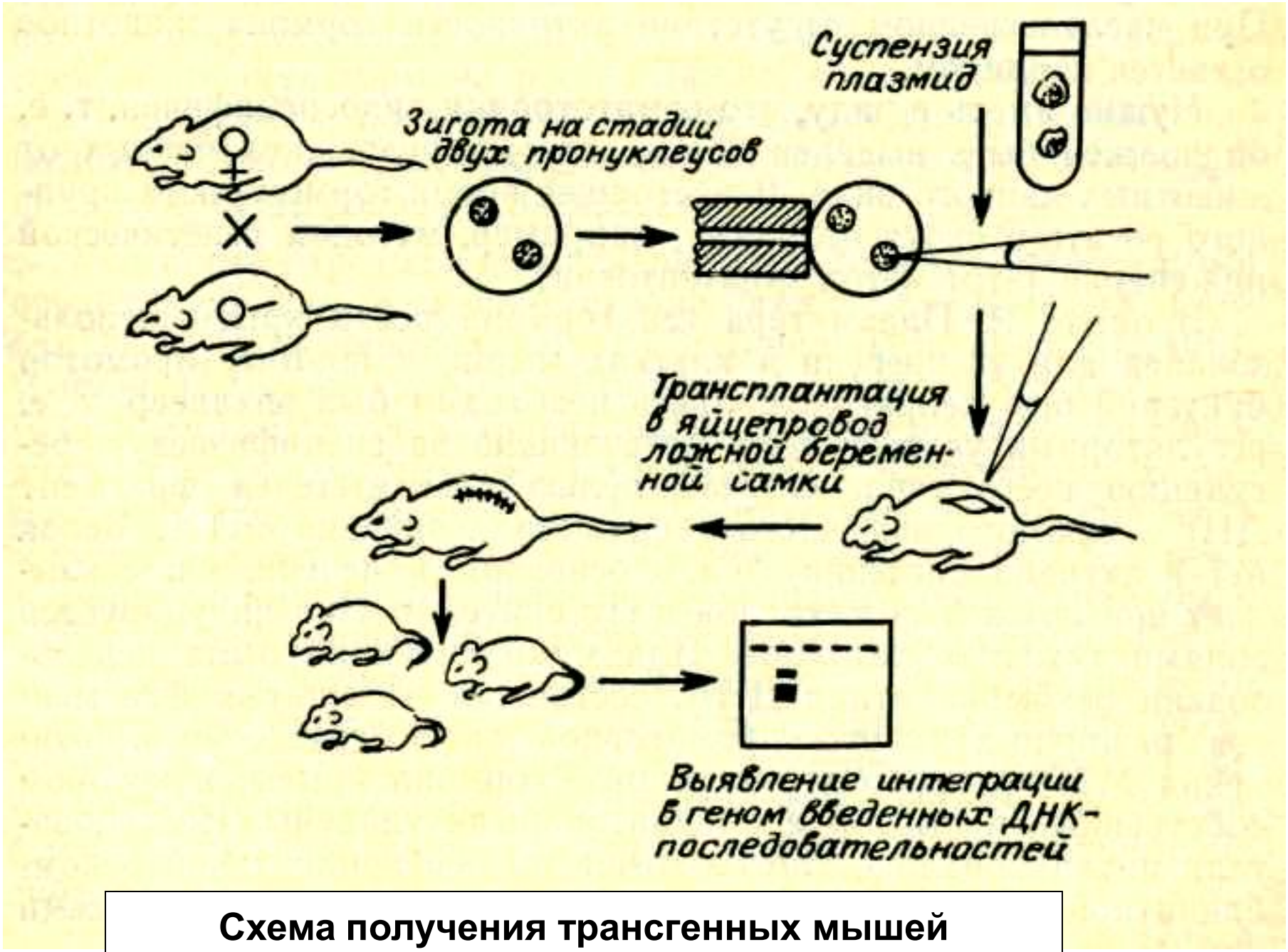


Схема получения трансгенных мышей

Получение трансгенных животных

- **Получение и клонирование гена**
- **Получение зигот и выявление пронуклеусов**
- **Микроинъекция копий генов в пронуклеус**
- **Трансплантация зиготы в половые органы подготовленной самки**

Оценка родившихся животных по генотипу и фенотипу

- **Выявление интеграции и экспрессии чужеродной ДНК включает:**
- **обнаружение продукта гена (например, гормона роста) и выяснение влияния на признак (интенсивность роста)**
- **Установление наследования гена**

Получение трансгенных овец

- **В оплодотворенных яйцеклетках овец, свиней и коров пронуклеусы трудно увидеть, так как в них много жиров и пигментов.**
- **Для лучшего выявления пронуклеусов используют контрастный микроскоп, центрифугирование или флуоресцентную окраску.**
- **Под контрастным микроскопом у овец пронуклеусы можно обнаружить только в 80 % случаев.**

- **Р. Хаммер с сотрудниками для повышения видимости пронуклеусов у овец применяли IC-микроскоп. Они использовали рекоминантный ген, состоящий из мышиного металлотионеина 1-го промотора, слитого со структурным геном человеческого соматотропина.**
- **Микроинъекция такой рекомбинантной ДНК была осуществлена в пронуклеусы или в ядра 641 зиготы, в 375 двухклеточных и 16 четырехклеточных эмбрионов.**
- **После пересадки зигот или ранних зародышей было получено 73 эмбриона и новорожденных ягненка.**
- **При анализе был обнаружен лишь один трансгенный ягненок, у которого в геноме произошла интеграция инъецированного чужеродного гена MT-1-GH.**

- **Наиболее эффективным оказался метод микроинъекций гена в зиготу. Астралийские ученые впервые в мире создали трансгенных овец (Scott T., 1986).**
- **Через 5 недель после рождения трансгенным овцам ввели небольшую дозу цинка, который включил в работу ген, активирующий регуляторную последовательность оснований ДНК, т. е. промоторную часть гена.**
- **Этот прием привел к более интенсивному синтезу гормона роста. Через 2—4 года трансгенные овцы в 1,5 раза превосходили по массе сверстников той же породы.**
- **Возможно введение овцам и других генов, которые могут привести к ускорению роста шерсти, усилению резистентности к болезням.**





- **После более трех лет совместной работы белорусских и российских ученых и сотни операций по вживлению человеческого гена в ДНК коз достигнут успех.**
- **Двое трансгенных козлят появились на свет на ферме Научно-практического центра по животноводству НАН Беларуси (Жодино).**
- **Потомство этих животных стало «биореактором» по производству лактоферрина – ценного белка, который может применяться в фармацевтике, косметологии и сам по себе является мощным иммуномодулирующим средством.**

Получение трансгенных свиней. Трансгенные свиньи впервые были получены в лабораториях Р. Хаммера (Hammer R. et al., 1985, 1986) и Г. Брэма (Brem G. et al., 1986). Пронуклеусы зигот свиней даже под контрастным микроскопом не просматриваются. Для выявления их использовали центрифугирование. После центрифугирования была проведена микроинъекция чужеродного гена в пронуклеусы зигот. Чужеродный ген состоял из промоторной части гена МТ-1 и структурной части гена гормона роста человека.

В эксперименте Р. Хаммера с сотрудниками было трансплантировано реципиентам 316 зигот и 1719 двухклеточных эмбрионов. В результате трансплантации и имплантации было получено 192 эмбриона и новорожденных поросенка, из которых 20, или 10,4%, были определены как трансгенные, а в 11 из них, т. е. 55% обнаружилась экспрессия чужеродного гена МТ-GH. У некоторых трансгенных свиней в плазме крови отмечался высокий уровень гормона роста человека.

В опыте Г. Брэма с сотрудниками после проведения микроинъекции в пронуклеусы аналогичного гена 268 зигот были пересажены реципиентам. В результате нормальной супоросности, наступившей у 3 из 10 свиноматок, было получено 15 поросят. Один поросенок из 7 анализируемых оказался трансгенным. Следовательно частота появления трансгенных свиней составляет 10—14%.

В результате совместных исследований специалистов ГДР и СССР в 1987 г. получены трансгенные свиньи на основе инъекции в зиготы гена гормона роста крупного рогатого скота.

В США, Австралии, Японии получены трансгенные

- **коровы, свиньи и козы, которые продуцируют вещества против**
- **инфекционных заболеваний,**
- **тромбоза (антитромбин),**
- **гемофилии, малярии, диабета (белок С, урокиназа, химозин, антигемофильный фактор IX, лактоферин, сывороточный альбумин человека, интерлейкин и другие вещества).**
- **В Аргентине ученые впервые в мире вывели породу коровы, молоко которой будет содержать инсулин.**
- **Предполагалось, что полученный на основе коровьего молока препарат будет на 80% дешевле ныне существующего.**

Получение трансгенных мышей

Мышь – самый популярный объект генетической инженерии. У мышей хорошо изучены биология размножения и наследственность. У них выделено около 700 генетических локусов. Для большинства локусов установлено точное местонахождение в хромосомах. Все это позволило создать ряд генетических линий, на которых можно провести и воспроизвести эксперименты.

Во многих лабораториях создаются банки генов мыши. На мышах отработана микрохирургия зигот и ранних зародышей, методы культивирования ооцитов и эмбрионов in vitro.

Пересадка реципиентам эмбрионов, развитие которых проходило in vitro, приводит к высокому проценту их имплантации и рождению полноценных потомков.

Во многих экспериментах было установлено, что мыши, развивающиеся из зиготы, в которую вводили чужеродную ДНК, содержали в геноме фрагменты этой ДНК, а иногда у них проявлялась экспрессия чужеродных генов.

С помощью генетических маркеров можно точно идентифицировать таких животные как трансгенных.

Техника микроинъекции ДНК следующая.

В оплодотворенную яйцеклетку вводят ген с помощью микропипетки с заостренным кончиком, диаметр которого составляет около 1 мкм.

Такие яйцеклетки хранятся около 1 ч. Полноценные зиготы с чужеродной ДНК трансплантируют в ампулу яйцевода гормонально подготовленной самки-реципиента другой генетической линии.

Первые опыты по микроинъекции ДНК вируса SV40 в бластоцисты мышей проведены в 1974 г. R. Jaemisch, B. Mintz; R. Jaemisch. Введенная в бластоцисту ДНК вируса была обнаружена в тканях взрослых особей. Однако интеграции этой ДНК в геном мыши не произошло.

Трансгенные мыши, содержащие в своем геноме чужеродные гены, были получены Р. Янишем в 1976 г. В своих экспериментах он использовал провирусную ДНК вируса лейкемии Молонии. Эта ДНК была обнаружены в гаметах трансгенных мышей и наследовалась как простой менделевский признак.

Экспрессия введенных вирусных генов зависела от места их интеграции и локализации в клеточных хромосомах. У одних линий трансгенных мышей экспрессия гена начиналась в клетках печени эмбрионов, у других линий – в клетках селезенки новорожденных, а у отдельных линий продукция вируса вообще отсутствовала, хотя провирус в клетках был обнаружен.

Дж. Гордон с сотрудниками (Gordon J. et al., 1980) впервые показал возможность трансформации мыши путем введения плазмид, содержащих ген тимидинкиназы (ген Тк) вируса герпеса, в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки.

Успешнее были микроинъекции рекомбинантной ДНК в более крупный мужской пронуклеус, который расположен ближе к поверхности зиготы. В настоящее время этот метод введения чужеродной ДНК применяется при работе со всеми сельскохозяйственными животными.

В этих же опытах проводилась микроинъекция рекомбинантной ДНК плазмиды, содержащей ген β-глобина человека. У двух из 78 полученных новорожденных мышей была обнаружена ДНК в несколько модифицированном виде. У одной мыши произошла интеграция рекомбинантной ДНК в геном мыши.

Эксперименты продемонстрировали, что интеграция чужеродной ДНК в хромосомы животных и их наследственная передача принципиально возможны. В то же время отмечена непредсказуемость характера экспрессии чужеродных генов и их перестройки.

В 1983 г. Дж. Гордон разработал принципиальную схему получения трансгенных мышей, которая используется в современных экспериментах. По этой схеме клонированный ген включают в плазмиду, а суспензия плазмид с помощью микроинъекции вводится в мужской пронуклеус зиготы мыши.

В последующем были проведены многочисленные исследования, в результате которых был не только осуществлен перенос в геном мыши ряда различных эукариотических генов, но и были созданы новые инбредные линии трансгенных мышей, различающиеся между собой структурой чужеродной ДНК. Так, были введены: ген тимидинкиназы (Wagner E. et al., 1981; Вайсман Б. Л. и др., 1983, 1984), ген гемоглобина кролика (Wagner E. et al., 1981; Laci E. et al., 1983); ген β-глобина человека (Wagner E. et al., 1981; Stewartet T. et al., 1982), ген лейкоцитарного интерферона человека (Gordon J., Ruddle F., 1981; Gorden J., 1983), ген гормона роста крысы (Palmiter R. D. et al., 1982) и человека (Palmiter R. D. et al., 1983; Wagner E. et al, 1983; Дыбан А. П., Городецкий С. И., 1983; Вайсман Б. Л. и др., 1984).

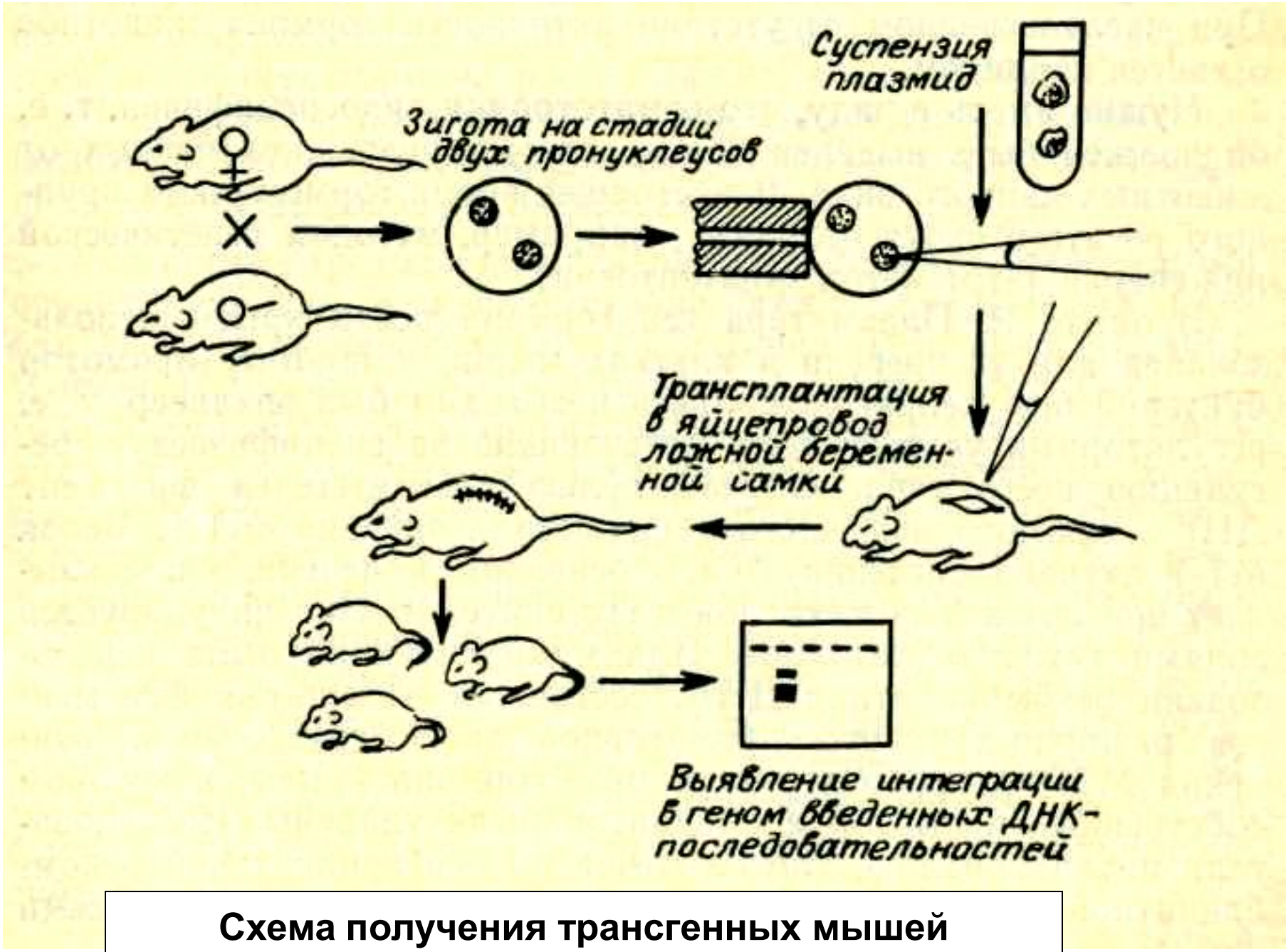


Схема получения трансгенных мышей

Проведенные в различных лабораториях эксперименты показали, что чужеродные ДНК, инъецированные в зиготу, в большинстве случаев сохраняются в геноме мыши, реплицируясь вместе с собственной ДНК и передаваясь клеткам, органам и тканям. Введенная в зиготу чужеродная ДНК с высокой частотой попадает в половые клетки.

В этих и других исследованиях для обнаружения пронуклеуса в зиготе мыши был использован контрастный микроскоп. В 1986 г. в 8 различных зарубежных исследовательских группах было получено около 100 трансгенных потомков (Kraemer D. S. et al., 1986).

Особый интерес вызывает опыт, в котором впервые удалось успешно интегрировать в геноме мыши ген гормона роста крысы, который существенно увеличивал рост мышей (Palmiter R. D. et al., 1982). Продукт гена роста – соматотропин стимулирует рост. Этот гормон синтезируется в передней доле гипофиза и является одним из главных регуляторов роста мышечных тканей.

Гигантизм или карликовость связаны с избыточностью или недостаточностью этого гормона в организме. Действуя на клетки, гормон роста повышает в них синтез белка. При наследственном отсутствии активности гормона животное остается карликом.

Соматотропин видоспецифичен, т. е. он должен быть выделен только из гипофизов, полученных от животных данного вида. В настоящее время гормон роста крупного рогатого скота получают методом генетической инженерии.

В опыте ген гормона роста крысы использовался для экспрессии в клетках мыши, и поэтому промотор бактерий был непригоден. Необходим был энхансер, т. е. регуляторный участок гена, отвечающий за специфическую регуляцию всего гена. С этой целью был выделен фрагмент ДНК – промоторная часть гена металлотинеина МТ-1.

Белок МТ-1 активно синтезируется в печени. Он связывает ионы тяжелых металлов и его синтез in vivo индуцируется солями тяжелых металлов. Для микроинъекции была использована рекомбинантная ДНК, состоящая из сшитых фрагментов различных генов – промоторной части гена – металлотинеина МТ-1 мыши и структурной – гормона крысы, в котором собственный промотор и инициатор были удалены. В зиготы мыши инъецировали по 600 копий такой рекомбинантной ДНК. Всего был получен 21 потомок мышей. У 7 мышей был обнаружен чужеродный ген – гормон роста крысы, который был интегрирован в хромосомы мыши. Родившимся трансгенным мышам в корм добавляли соли цинка $ZnSO_4$, которые индуцировали и активировали синтез эндогенного металлотинеина МТ-1. Это и привело к включению в геном мыши гормона роста крысы.

Анализ крови трансгенных мышей показал, что концентрация гормона роста у них была в 100–800 раз больше нормы. Избыточное количество этого гормона способствовало интенсивному росту – живая масса трансгенных мышат была в 1,8 раза больше, чем контрольных. Таких трансгенных животных назвали супермышами. Синтез гормона у них происходил не в аденогипофизе, а в печени. Очевидно это связано с тем, что функцию гена соматропина контролировал ген металлотинеина, который проявляет свое действие только в печени. В то же время ген гормона роста крысы, по-видимому, экспрессировался во всех клетках трансгенных мышей.

Окончательное подтверждение экспрессии чужеродного гормона роста сделано в 1983 г. Р. Пальмитером с сотрудниками. Они инъецировали в мужской пронуклеус зиготы рекомбинантную ДНК, состоящую из промоторной части металлотинеина (активатор) и структурной части гена соматотропного гормона человека. Были получены трансгенные мыши с точно зафиксированной экспрессией соматотропина человека. У половины потомков I поколения, полученных от скрещивания трансгенных животных, в геноме тоже сохранился ген человеческого соматотропина.

Успешный перенос в геном мыши гена гормона человека был осуществлен как в бывшем СССР, так и за рубежом (Дыбан А. П., Городецкий С. И., 1983; Вайсман Б. Л. и др., 1984; Wagner E. E. et al., 1985; Brunster R., 1985; Brem G. et al., 1986 и Др.).

В этих и других работах исследователи подтвердили результаты опыта Р. Пальмитера. У полученных трансгенных мышей обнаружена фенотипическая экспрессия гена гормона человека (LGH). В опыте немецкого ученого Г. Брэма с сотрудниками (1986) после проведения микроинъекции было получено 527 трансгенных зигот, беременность наступила у 12 из 70 мышей и было получено 27 мышат. Специальным методом дот гибридизации был проведен анализ 15 мышат, 5 из которых оказались трансгенными. Трансгенные мыши и их потомки, полученные от скрещивания трансгенных животных, были в 1,52—2,36 раза тяжелее их нормальных однопометных сибсов.

Анализ результатов проведенных экспериментов по получению трансгенных мышей позволил выделить основные факторы, влияющие на эффективность интеграции чужеродных генов. К этим факторам относятся: концентрация чужеродной ДНК, состав буферного раствора, место микроинъекции чужеродной ДНК, формы или вида плазмид и использованные в эксперименте генетические линии.

Критически рассматривая генетико-инженерные опыты по получению трансгенных мышей, необходимо отметить и некоторые неожиданные факты, которые требуют научного объяснения.

Во всех проведенных опытах только часть потомков от трансгенных родителей наследовала чужеродные гены. Интеграция чужеродных генов в геноме трансгенных мышей может составлять от одной до сотен копий на клетку. В среднем у трансгенных мышей интегрируется 25—30 % копий введенной ДНК. Частота интеграции чужеродной ДНК отчетливо снижается. При инъекции в цитоплазму она составляет у эмбрионов 0,9 %. Интеграция линейной молекулы у эмбрионов 0,9%. Интеграция линейной молекулы ДНК в 5 раз выше, чем кольцевой.

Получение трансгенных сельскохозяйственных животных. При получении трансгенных сельскохозяйственных животных по существу использована та же схема, что была разработана для мышей.

Схема получения трансгенных животных состоит из таких последовательных этапов:

- **выбор, изготовление и клонирование чужеродного гена;**
- **получение зигот и выявление пронуклеусов;**
- **микроинъекция определенного числа копий генов в видимый пронуклеус;**
- **трансплантация зиготы в половые пути гормонально подготовленной самки;**
- **оценка родившихся животных по генотипу и фенотипу — интеграция чужеродной ДНК, экспрессия ДНК, обнаружение продукта гена (например гормона роста человека) и влияние на признак (например высокая интенсивность роста). Установление наследования гена.**

Получение трансгенных кроликов. Микроинъекция чужеродной ДНК в пронуклеус зиготы облегчается тем, что они видимы в фазовоконтрастном микроскопе.

В первых опытах по получению трансгенных кроликов (Hammer R. et al., 1985) после проведения микроинъекций гена MT-h-GH и пересадки зигот реципиентам из 218 эмбрионов и новорожденных кроликов у 28 (12,8%) была установлена интеграция гена.

У 4 из 16 обследованных кроликов (25%) обнаружена экспрессия чужеродного гена.

Получены трансгенные животные, которым вводилась рекомбинантная ДНК, включающая промоторную часть металлотинеина плюс структурный ген соматотропина человека.

В других исследованиях (Brem G. et al., 1986) гибридный клон ДНК также получали путем слияния линейного фрагмента ДНК, содержащего промоторную часть мышиного металлотионеина со структурным геном гормона роста человека и последующего клонирования в гибридном векторе BPV/pBR327. Этот фрагмент рекомбинантной ДНК EcoRI/EcoRI инъецировали в пронуклеусы кроликов. После микроинъекций 316 зигот были трансплантированы реципиентам. Беременность наступила у 5 из 15 крольчих. Было получено 30 крольчат, у 16 из которых был проведен анализ на трансгенность. В результате установили, что 3 кролика (19%) оказались трансгенными. Следовательно, частота получения трансгенных кроликов составляет 19—25 %.

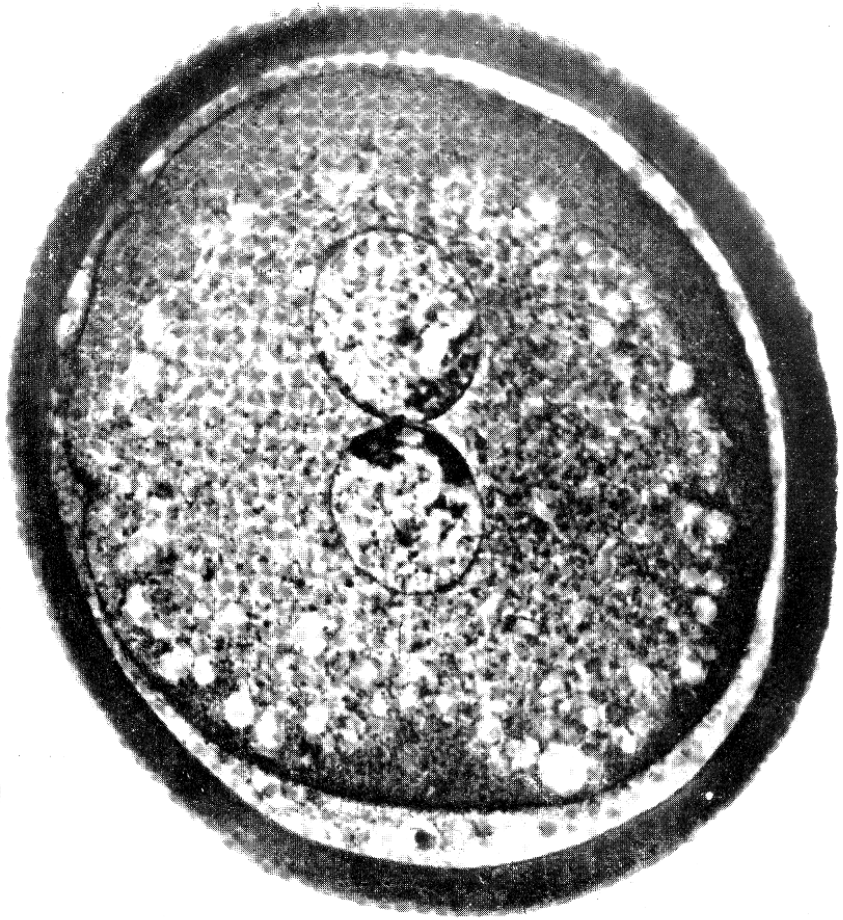




- **После более трех лет совместной работы белорусских и российских ученых и сотни операций по вживлению человеческого гена в ДНК коз достигнут успех.**
- **Двое трансгенных козлят появились на свет на ферме Научно-практического центра по животноводству НАН Беларуси.**
- **Потомство этих животных стало «биореактором» по производству лактоферрина – ценного белка, который может применяться в фармацевтике, косметологии и сам по себе является мощным иммуномодулирующим средством.**

- **Получение трансгенного крупного рогатого скота.** У крупного рогатого скота пронуклеусы или ядра двухклеточных эмбрионов под контрастным микроскопом не выявляются. Для обнаружения применялись ДНК-специфические флуоресцентные окраски и центрифугирование зигот.
- Особый интерес вызывает работа, в которой в пронуклеус зиготы коровы вводили путем микроинъекции чужеродную ДНК, состоящую из гена МТ-1 мыши и гена тимидин-киназы вируса герпеса Тк (Lohse J. et al., 1986). После 24 ч культивирования у 30 % зигот был обнаружен высокий уровень активности гена Тк. В лаборатории Д. Краемера после микроинъекции чужеродабго гена в пронуклеусы оплодотворенной яйцеклетки коровы или в ядра двухклеточного эмбриона и их трансплантации реципиентам было получено 5 потомков (Kraemer D. et al., 1986). Однако ни у одного из телят не было установлено инкорпорации инъецированного гена в геном.

Слияние пронуклеусов (сингамия) – конечная стадия оплодотвлоения.



- В рамках Комплексной программы научно-технического прогресса стран СЭВ учеными СССР и ГДР проводилась совместная работа по переносу генов гормона роста крупного рогатого скота в зиготы коров. В декабре 1987 г. родился первый трансгенный теленок молочно-мясного типа. Всего было 10 стельностей коров трансгенными эмбрионами.

- Трудности получения трансгенных животных крупного рогатого скота связаны с биологическими и экономическими причинами. В отличие от многоплодных животных у крупного рогатого скота до сих пор не разрешена проблема получения достаточного количества биологически полноценных яйцеклеток и зигот. Важной стороной этой проблемы является и то обстоятельство, что взятие оплодотворенных яйцеклеток от генетически ценных коров-доноров сопряжено с нарушением их воспроизводительной функции. В связи с этим необходимо совершенствовать лапароскопическую технику, получать ооциты с помощью лапароскопии из стимулированных яичников коров и оплодотворять их in vitro. Это позволит получать оплодотворенную яйцеклетку в нужной стадии ее развития. Новые возможности открывает способ культивирования ооцитов до полного созревания и оплодотворения in vitro.

- В перспективе для получения трансгенных животных будут создаваться трансформированные клеточные линии из зародышевых клеток и осуществляться их пересадка в энуклеированные яйцеклетки или бластомеры (Robl J., First N., 1985).
- В заключение необходимо отметить, что генетическая программа млекопитающих – чрезвычайно сложная и комплексная проблема, и наши знания в этой области все еще весьма скудны. Особенно это касается генетики хозяйственно важных признаков, которые, по мнению большинства ученых, поли-генны. Наука еще не располагает сведениями о том, какие гены определяют тот или иной признак, как их идентифицировать. По-видимому, дальнейшее совершенствование методов генетической инженерии может привести к решению этой проблемы. В настоящее время в генетической инженерии развивается перспективное направление, связанное с разработкой принципиально новых методов изучения полиморфизма, длины фрагментов рестрикции – ПДФР. При работе с ДНК такой метод получил название блотинга по Саузерну. Суть этого метода заключается в следующем. В пробах крови изолируют лейкоциты, из которых выделяют ДНК. Молекулы ДНК разрезают рестриказами и образовавшиеся фрагменты разделяют электрофорезом по их молекулярной массе. В таком порядке переносят фрагменты рестрикции на фильтровальные мембраны, где проводят гибридизацию с радиоактивным маркированным фрагментом ДНК с гомологичной последовательностью (радиоактивный зонд). Каждая комплементарная последовательность будет проявляться в виде радиоактивной полосы. Так определяют рестрикты, комплементарные радиоактивному зонду.

- M. Soller и Bechmann (1983) теоретически исследовали возможность использования ПДФР в селекции быков. Авторы исходили из того, что геном быка может быть разложен на гены, которые можно выделить блотингом. Они пришли к выводу, что нужно выделить 75 фрагментов ДНК, чтобы охарактеризовать геном по признаку молочной продуктивности.
- Теоретические расчеты показали, что генетический прогресс по молочной продуктивности может быть увеличен на 20%, а после аккумуляции генов в течение нескольких поколений — на 100%. По сравнению с маркерами белкового полиморфизма, применяемыми в селекции, метод ПДФР имеет преимущество. Он вскрывает большую часть генетической изменчивости и оце-нивает не только структурную часть генов, но и последователь-ность генетической регуляции.

- Проведенные исследования на разных породах крупного рогатого скота выявили широкий индивидуальный и породный полиморфизм длины фрагментов рестрикции. С помощью такого маркера можно выявить также дефектные гены, обусловливающие наследственные болезни. Конечной целью этого направления исследования является картирование генома сельскохозяйственных животных (рестрикционные карты) и выяснение генетической природы изменчивости количественных признаков.
- Важной проблемой в опытах по переносу генов в организмы животных оказались регуляция и экспрессия внесенных генов. Лишь несколько промоторов из многих исследованных способны активировать присоединенные к ним гены.

- **При генетическом совершенствовании животных в его традиционном понимании должны использоваться гены, улучшающие основные хозяйственно важные признаки и свойства сельскохозяйственных животных. В настоящее время в экспериментах по генетической инженерии используются гены, ответственные за синтез гормона роста, или соматотропина. В селекции крупного рогатого скота перенос гена соматотропина позволит, по оценке ученых, увеличить молочную продуктивность и живую массу животных, а также повысить содержание белка в молоке и мясе. Научный интерес к действию соматотропина на лактацию млекопитающих проявляется уже более 50 лет.**

- **Первые работы по влиянию соматотропина на молочную продуктивность коров были осуществлены в нашей стране в 1937 г. (Азимов Г., 1937). В этих исследованиях впервые было показано, что введение неочищенного экстракта из гипофиза приводит к повышению молочной продуктивности лактирующих коров. Однако сложность очистки этого гормона и весьма ограниченные возможности его производства не позволяли провести широкие исследования по изучению механизмов его действия на молочную продуктивность. И только позднее в экспериментах с использованием соматотропина крупного рогатого скота тонкой очистки было установлено, что ежедневное введение экзогенного гормона приводило к повышению надоев молока на 10 –40% (Banman D., Mc-Cutehon S., 1985). Однако в этих опытах увеличение надоев молока отмечалось лишь в первые 4 – 6 дней.**

- Известно, что гормон роста, действуя на поверхностные рецепторы клетки, повышает в них синтез белка. Опыты по использованию соматотропина на молочных коровах показали, что, очевидно, имеется тесная связь между действием гена этого гормона и продуктивностью. Фирма «Монсанто», которая разработала генно-инженерный способ синтеза гормона роста крупного рогатого скота, проводила производственную проверку его эффективности в ряде стран, в том числе в бывшем СССР.
- Американский специалист S. Lewellyn (1987) указывал, что в США самый большой вклад в увеличение молочной продуктивности может дать использование гормона роста. Предполагается, что в США к 1998 г. этот гормон будут получать 100 % коров. Наряду с усовершенствованными технологиями применение гормона позволит повысить средний удой молока на корову к 2000 г. до 9281 кг и сократить число коров на 30 %.

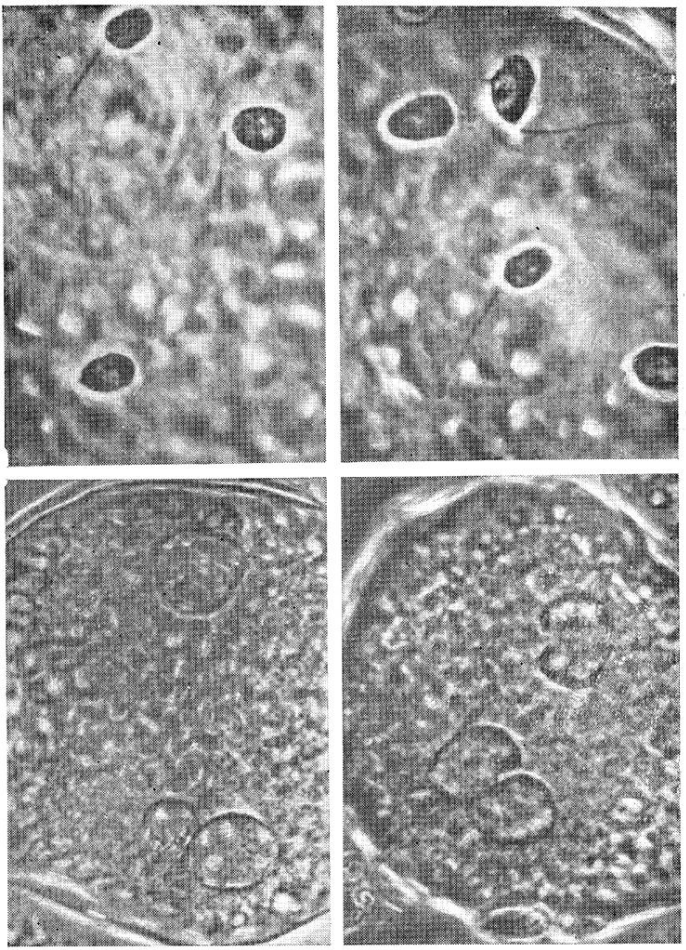
- В более отдаленной перспективе ожидается разработка на основе генетической инженерии специфической биотехнологии получения трансгенных животных для производства новых продуктов. Здесь речь идет о введении крупным животным генов белков, которые могут быть произведены в промышленном масштабе или будут полезными с медицинской точки зрения (Brinster R., Palmiter R., 1982). Такие гены в отличие от генов хозяйственно важных признаков Р. Пальмитером были названы «Gene farming». Для этого будет использоваться рекомбинантная ДНК, с помощью которой от трансгенных животных будут получать новые продукты. Например, из коровьего молока, крови или печени можно будет извлекать такие белки, как инсулин человека, интерферон, факторы свертывания крови и гормоны.

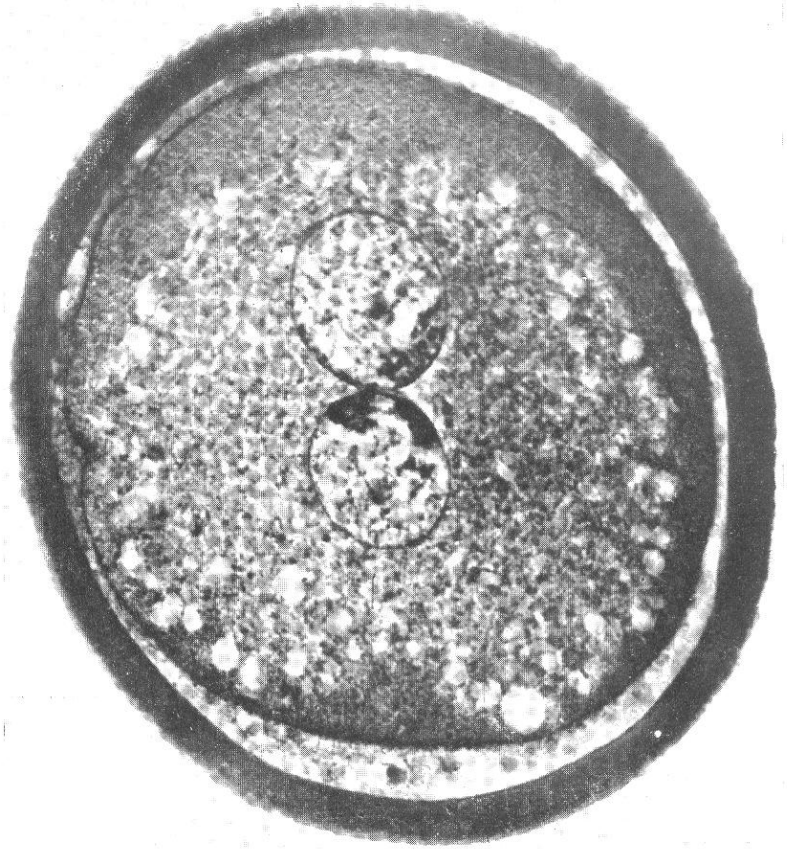
- Методы генетической инженерии уже позволили осуществить путем трансформации генов бактерий синтез ценных белков в промышленных количествах. В качестве примера можно указать на производство с использованием методов генетической инженерии физиологически активных белков – инсулина, интерферона и гормона роста – соматотропина. Список этих ценных препаратов сейчас расширяется. Синтез физиологически активных белков в микроорганизмах обходится еще дорого, а промышленная технология еще до конца не разработана. К тому же способности бактерий к синтезу белковых соединений ограничены. Например, бактерии не способны синтезировать комплексные соединения, в которых молекулы полипептидов связаны с молекулами сахаров.

- Биологическая функция многих белков зависит от правильной переработки первичного продукта гена внутри клетки. Такая переработка охватывает, например, протеолитическое расщепление первичных продуктов генов или их гликолизирование. Преимущество сельскохозяйственных животных по сравнению с бактериями или дрожжами заключается в способности их клеток правильно перерабатывать желаемый продукт. Известно, что в наивысшую стадию лактации от высокопродуктивной коровы можно ежедневно получать около 1 кг протеина. Теоретически возможно промотор коровьего белка особенно казеина соединить со структурной частью желаемого гена ценного белка, например, инсулина или интерферона, а затем инъецировать рекомбинантную ДНК в зиготу или двухклеточный эмбрион. От трансгенных коров можно было бы получать в большом количестве ценные белки и это откроет принципиально новое направление в селекции животных.

- Для практического осуществления исследований, направленных на получение специфических трансгенных животных, прежде всего необходимо идентифицировать нужные последовательности ДНК и сконструировать соответствующие рекомбинантные ДНК.
- Таким образом, генетическая инженерия представляет перспективное направление современной биотехнологии, имеющей целью создание животных с реконструированными генотипами. Генетическая инженерия как отрасль молекулярной генетики достигла заметных успехов в решении ряда теоретических и экспериментальных проблем. Это касается прежде всего изучения организации генома, строения и функции генов, разработки методов манипуляций с ДНК и создания на этой основе рекомбинантных (гибридных) ДНК.

- **В США, Австралии, Японии получены трансгенные**
- **коровы,**
- **свиньи и**
- **козы,**
- **которые продуцируют вещества против инфекционных заболеваний, тромбоза (антитромбин), гемофилии, малярии, диабета (белок С, урокиназа, химозин, антигемофильный фактор IX, лактоферин, сывороточный альбумин человека, интерлейкин и другие вещества).**
- **В Аргентине ученые впервые в мире вывели породу коровы, молоко которой будет содержать инсулин. Полученный на основе коровьего молока препарат будет на 80% дешевле ныне существующего.**





Технология рекомбинантных ДНК включает ряд методов. Наиболее важные следующие.

- **Специфическое расщепление ДНК рестриктирующими нуклеазами.**

  Позволяет быстро выделять различные гены и манипулировать ими.

- **Быстрое определение последовательности (секвенирование) всех нуклеотидов в очищенных фрагментах ДНК.**

  Таким путем можно определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида.

- **Гибридизация нуклеиновых кислот.**

  Дает возможность выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания.

- **Клонирование ДНК.**

  Введение фрагмента ДНК в самореплицирующийся генетический аппарат (в плазмиду, вирус), который можно использовать для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий.

- **Генетическая инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.**

Специфическое расщепление ДНК рестриктирующими нуклеазами

- **В 1962 г. Арбер обнаружил существование ферментов (рестриктирующих нуклеаз), которые способны разрезать ДНК.**
- **Натанс и Смит выделили в чистом виде эти ферменты и использовали их для определения нуклеотидной последовательности ДНК.**

- ***Рестрикционные эндонуклеазы*** **(рестриктазы) разделяют обе цепи молекулы ДНК в специфических местах, содержащих определенные нуклеотидные последовательности с образованием выступающих или тупых концов.**

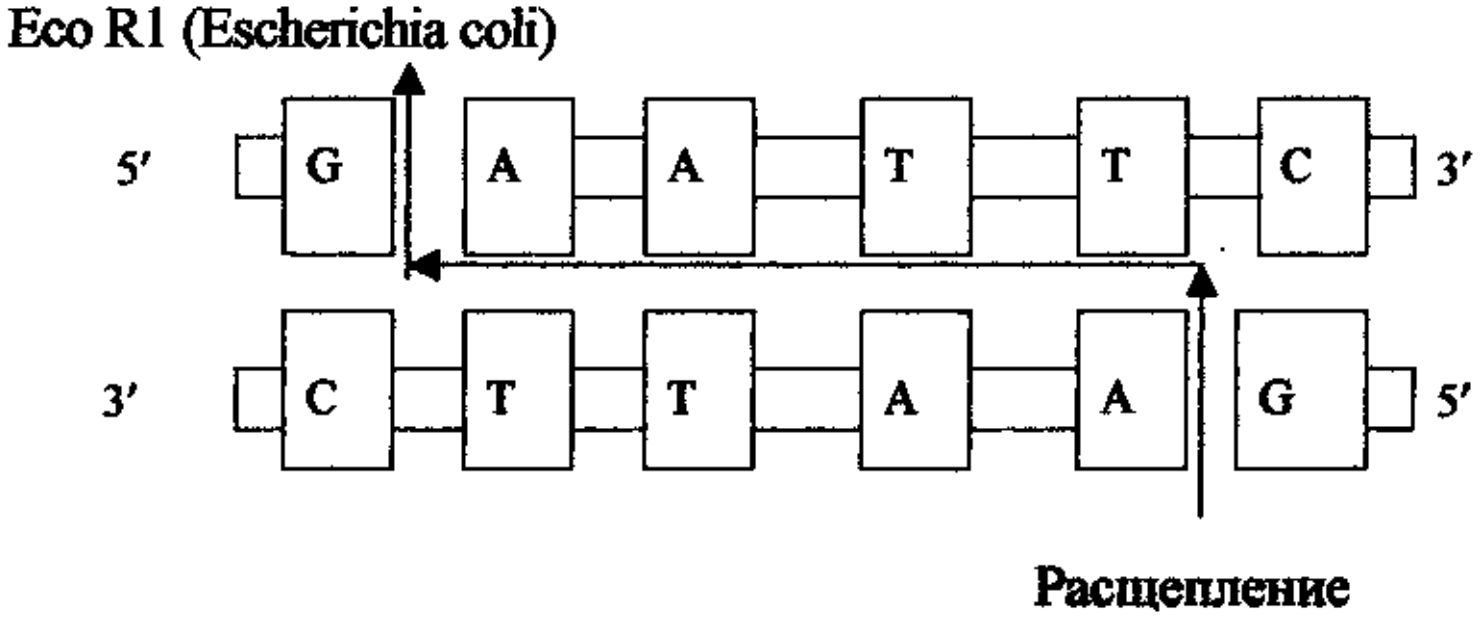
- **Рестриктазы узнают строго определенные нуклеотидные последовательности на двуспиральной ДНК.**

- **Одни ферменты расщепляют ДНК в любых местах, где имеется для них специфическая последовательность нуклеотидов. Это ферменты класса 1.**

К ним относится рестрикционная эндонуклеаза из бактериофага Р1.

- **Ферменты класса 2 разрывают цепи ДНК только в определенных точках.**
- **Это приводит к образованию совершенно определенных фрагментов ДНК.**
- **Рестрикционные эндонуклеазы класса 2 используются при молекулярном клонировании.**

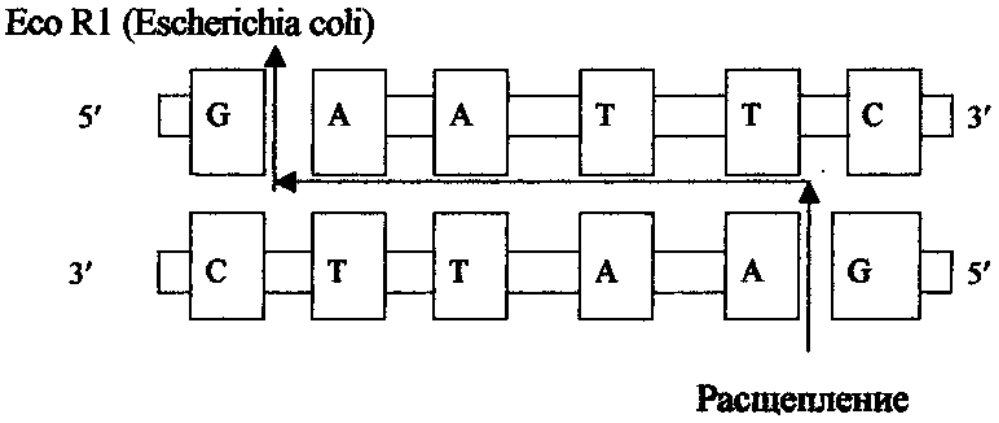
EcoR1 – рестриктаза класса 2. Последовательность, распознаваемая этим ферментом, состоит из 6 пар оснований, образующих *палиндром* (в двух цепях одинаковые последовательности идут в противоположных направлениях). Фермент расщепляет ДНК только в тех местах, где имеется GAATTC – последовательность нуклеотидов.

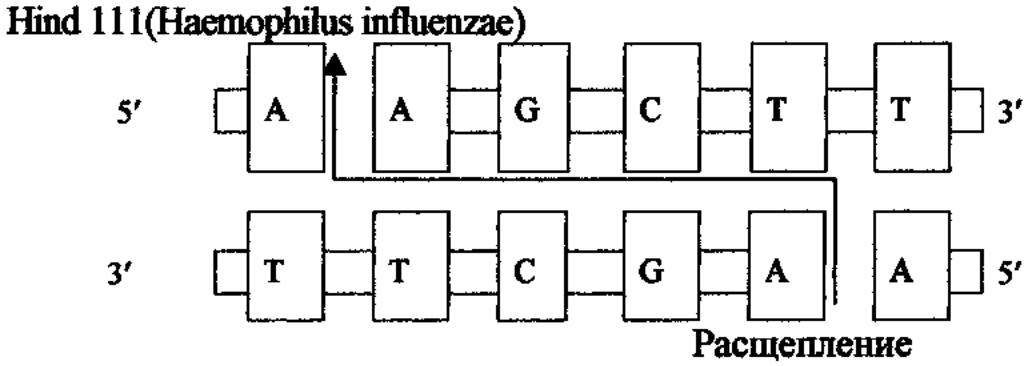


Две цепи ДНК разрезаются не прямо напротив друг друга, а наискосок, образуя липкие концы.

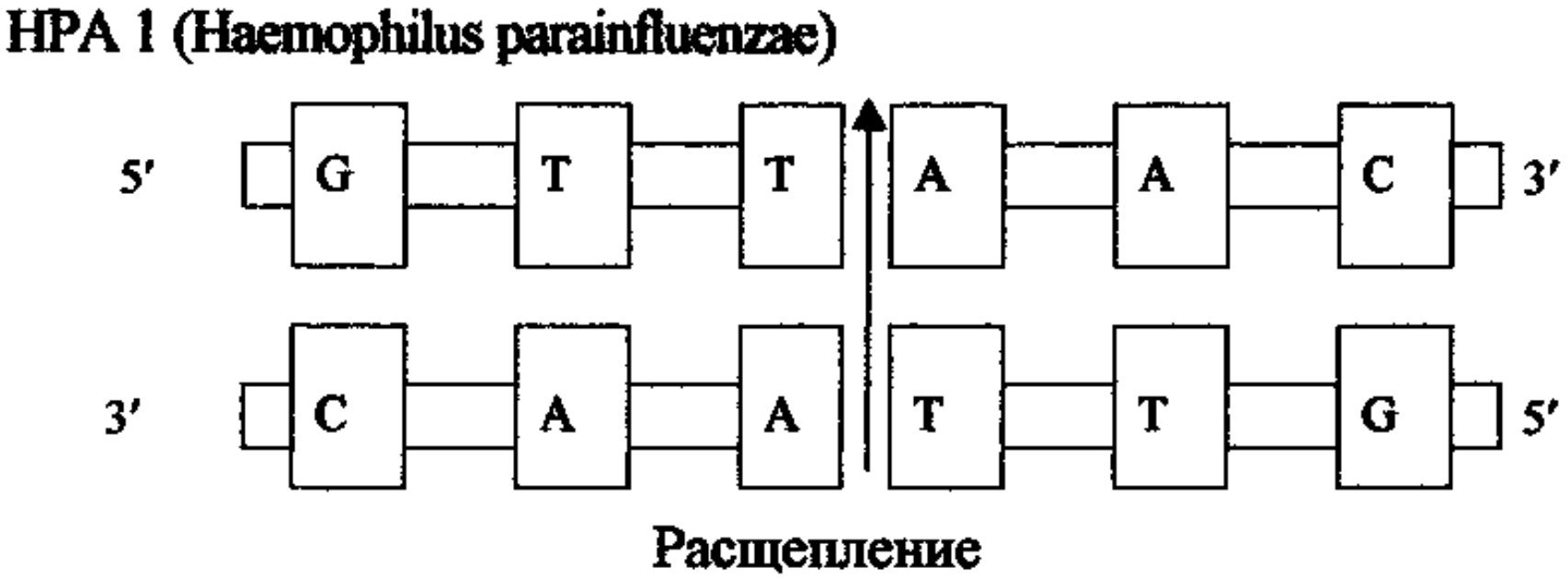
Места расщепления ДНК, указанные стрелками, лежат вне оси симметрии.

В результате несовпадения разрывов образуются одноцепочечные концы из четырех пар оснований.

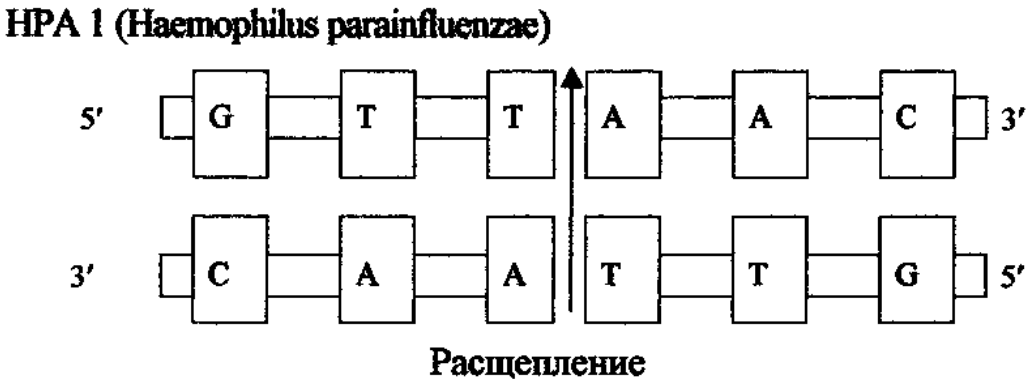


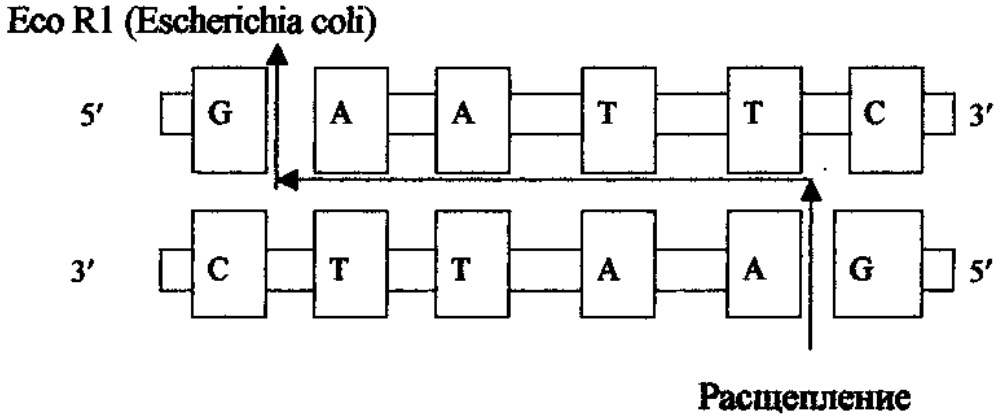


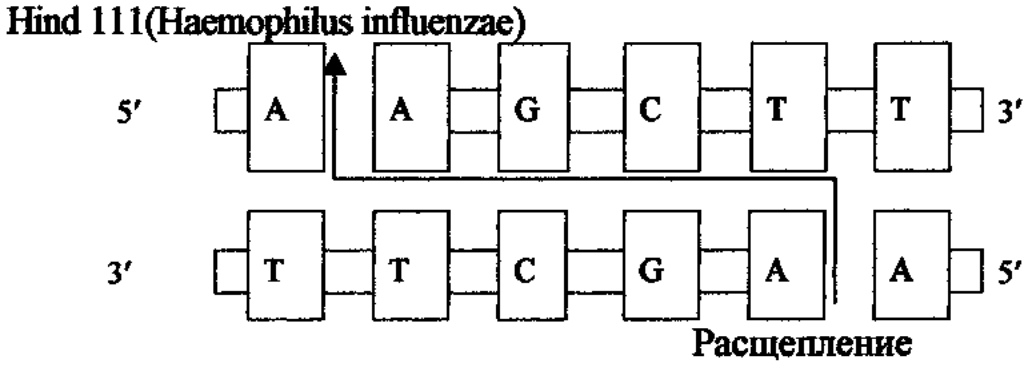
Фермент Hpa 1 (Haemophilus parainfluenzae) разрезает две цепи ДНК прямо напротив друг друга, образуя тупые концы.



Последовательности нуклеотидов, узнаваемые тремя рестриктирующими эндонуклеазами.







- **Для соединения фрагментов ДНК из разных организмов необходимо каждый из них в отдельности обработать одной и той же рестриктазой.**
- **В месте разрывов ДНК образуются выступающие концы. Они комплементарны концам каждого фрагмента ДНК, полученного с помощью одной рестриктазы, и такие концы называются «липкими».**
- **Если смешать эти фрагменты ДНК, нагреть и медленно охладить, то их выступающие концы могут образовать комплементарные пары оснований, в результате чего возникнет новая рекомбинантная ДНК.**

- **Метод специфического расщепления ДНК рестриктазами основан на явлении *рестрикции и модификации*.**
- **Они отражают характер взаимоотношений бактериофагов и бактерий.**
- **Бактериофаги обычно инфицируют один штамм бактерий или небольшое число других родственных организмов.**
- **Это обусловлено рецепторными свойствами поверхности бактериальных клеток и системой *рестрикции*.**

Если бактериофаг “А”, вырастить на штамме “А” *E. coli* и затем инфицировать полученным лизатом другой штамм “В”, то в культурах штамма “В” фаг будет расти значительно хуже, чем на штамме “А”.

Если же единичные фаговые частицы, образовавшиеся на штамме “В”, использовать для заражения другой культуры штамма “В”, то размножение фага вновь будет нормальным.

Но если перед этим фаг снова провести через исходный штамм “А”, то на штамме “В” он опять будет расти очень плохо.

- **Рестрикция (ограничение репродукции фага). Зависит от того хозяина, в котором данный фаг выращивали предыдущий раз.**

Обусловлена расщеплением инфицирующей фаговой ДНК ферментом, специфичным для штамма–хозяина.

Это и есть фермент *рестрикционная эндонуклеаза.*

Своим действием такие ферменты препятствуют проникновению чужеродной ДНК в бактериальную клетку.

- **Для защиты своей ДНК от рестрикционной эндонуклеазы в бактериальной клетке происходит изменение (метилирование или глюкозилирование) оснований ДНК (обычно A или C).**

Этот процесс называют *модификацией*.

Из него извлекают пользу и фаги, размножающиеся в клетках определенного штамма бактерий. На фаговую ДНК при ее синтезе в клетках данного типа накладывается тот же «отпечаток», что и на ДНК самой клетки: в присутствии модифицирующего фермента фаговая ДНК видоизменяется как и ДНК хозяина.

Она так же метилируется и приобретает свойства, защищающие ее от рестрикционных ферментов данного штамма бактерий.

В генной инженерии применяется около 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК в 120 различных местах.

С помощью рестриктаз получают фрагменты ДНК *(рестрикционные карты).*

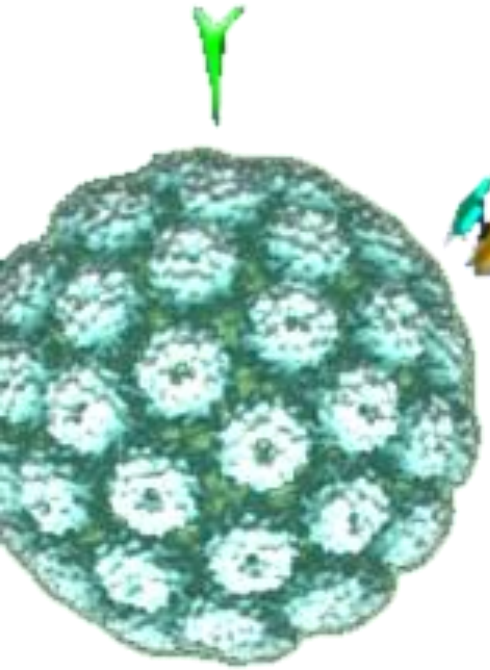
На этих картах

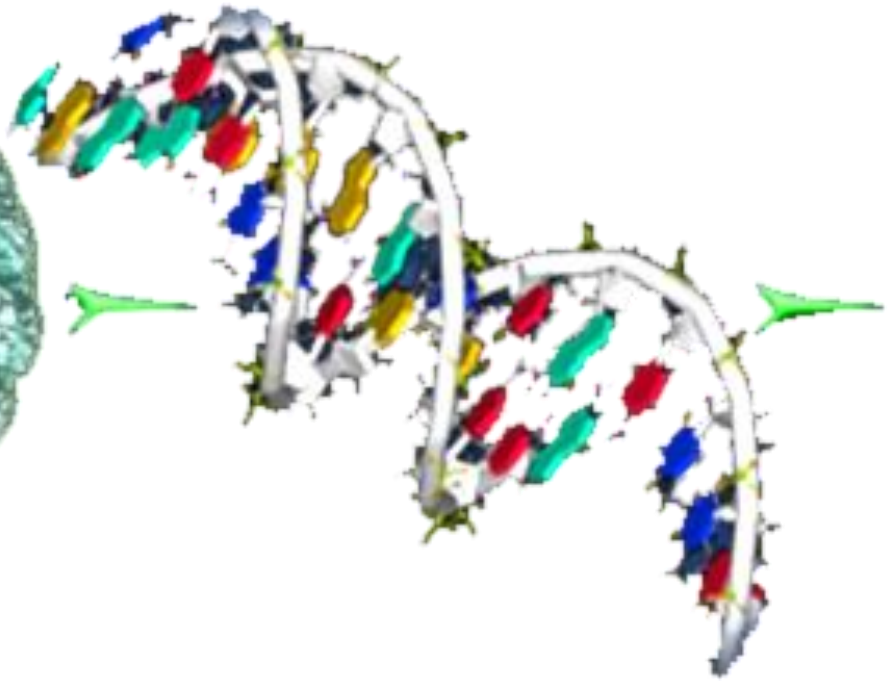
представлена последовательность всех нуклеотидов, входящих в этот фрагмент ДНК, а также

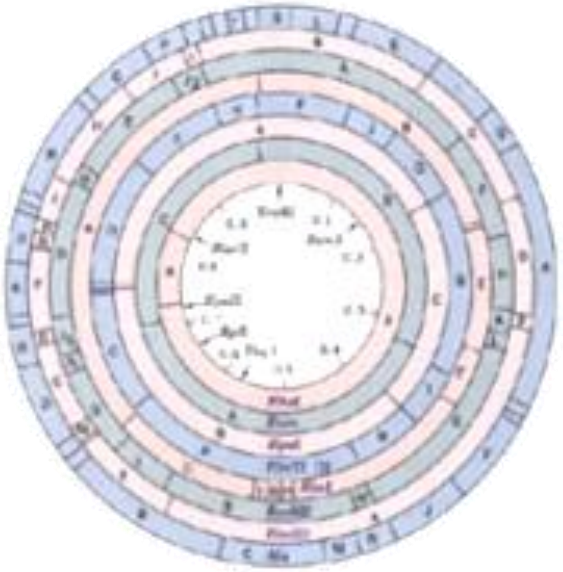
отмечены сайты (места) действия *рестриктаз.*

Первая такая карта была получена для вируса SW 40 (обезьяний вирус, вызывающий злокачественную трансформацию), содержащего 5423 пары оснований.









Определение последовательности (секвенирование) нуклеотидов в очищенных фрагментах ДНК

В геноме млекопитающих до 50–100 тысяч генов и каждый ген сформирован из многих нуклеотидов.

В молекуле ДНК вируса обезьян SV40 5 генов, в которых 5243 пары азотистых оснований.

После определения последовательности их выяснили и последовательность аминокислот в молекулах белков, кодируемых генами.

Найдены и участки, которые не кодируют белки, а участвуют в регуляции экспрессии генов и репликации ДНК.

Два метода секвенирования ДНК:

химический и

ферментативный.

Химический метод

- **Фрагмент ДНК метят по 5′-концу радиоактивным фосфором (^{32}P), а затем расщепляют по определенному нуклеотиду.**
- **Обе цепи ДНК разрываются в местах, где имеется такой нуклеотид.**
- **Образуются различной длины радиоактивные фрагменты.**
- **При электрофорезе в геле они разделяются по величине.**

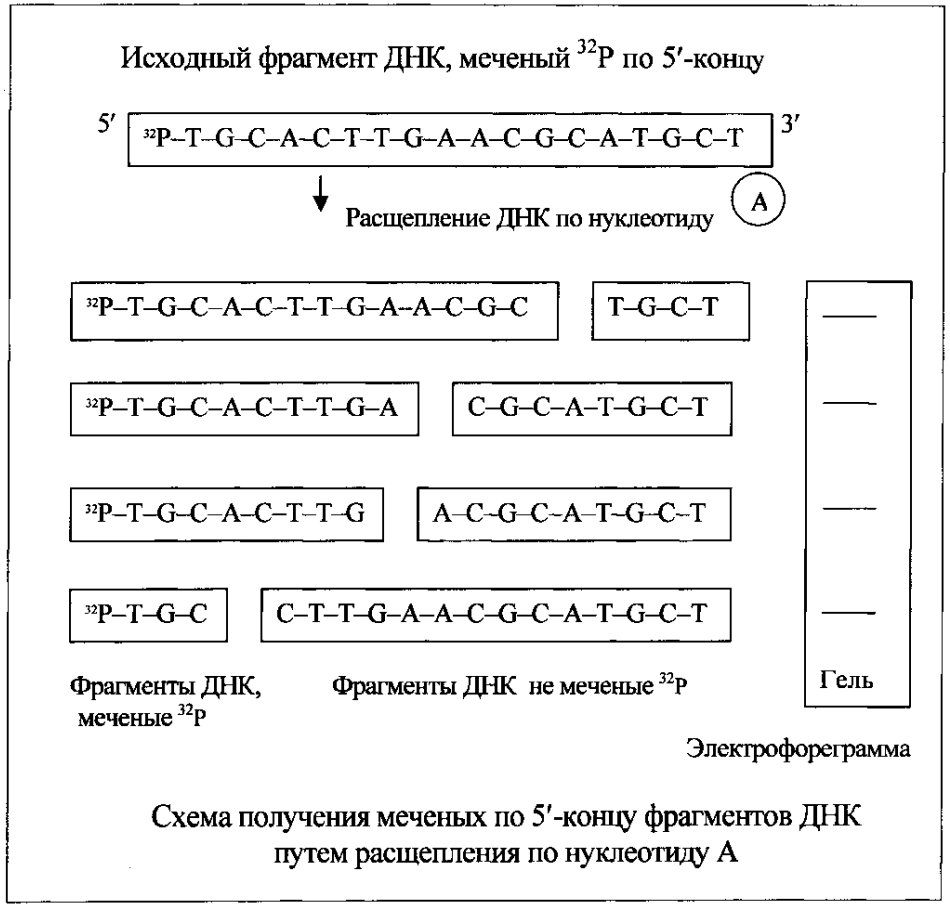
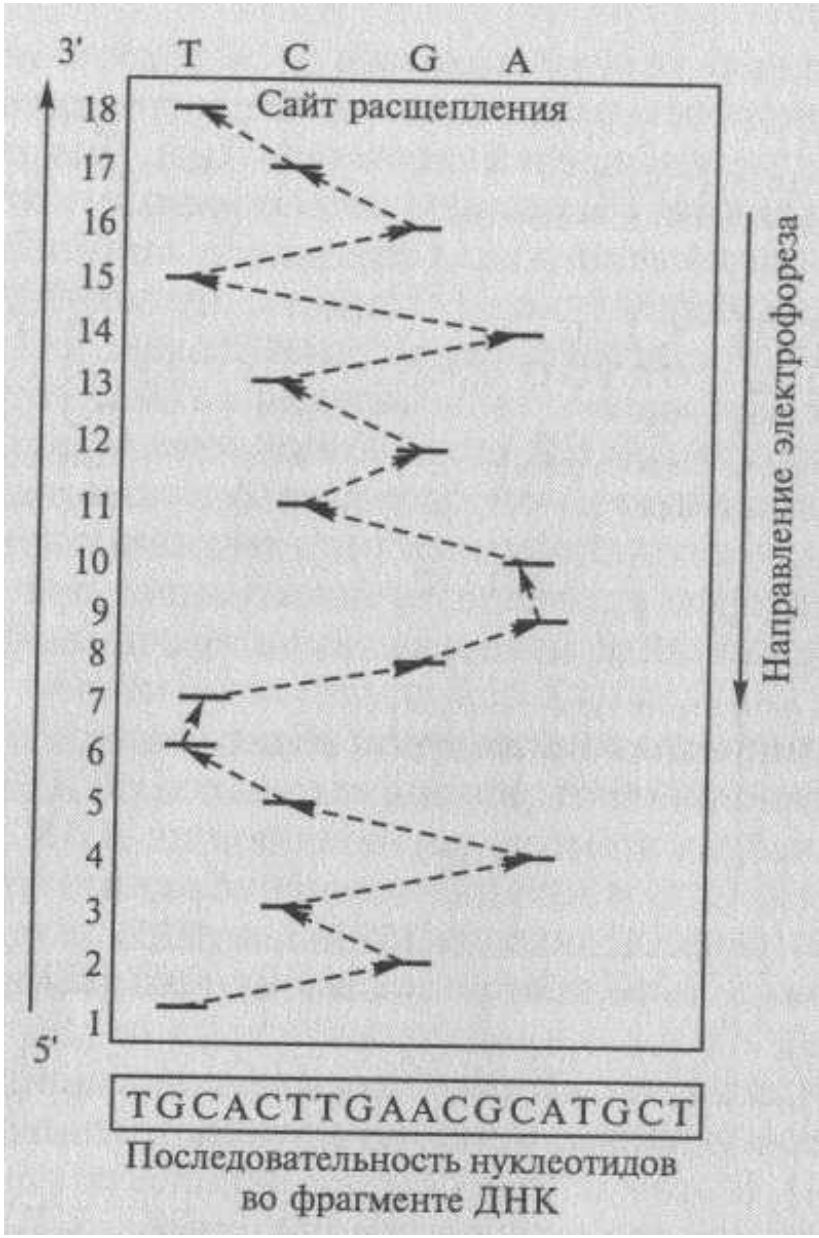


Схема получения меченых по 5′-концу фрагментов ДНК путем расщепления по нуклеотиду А

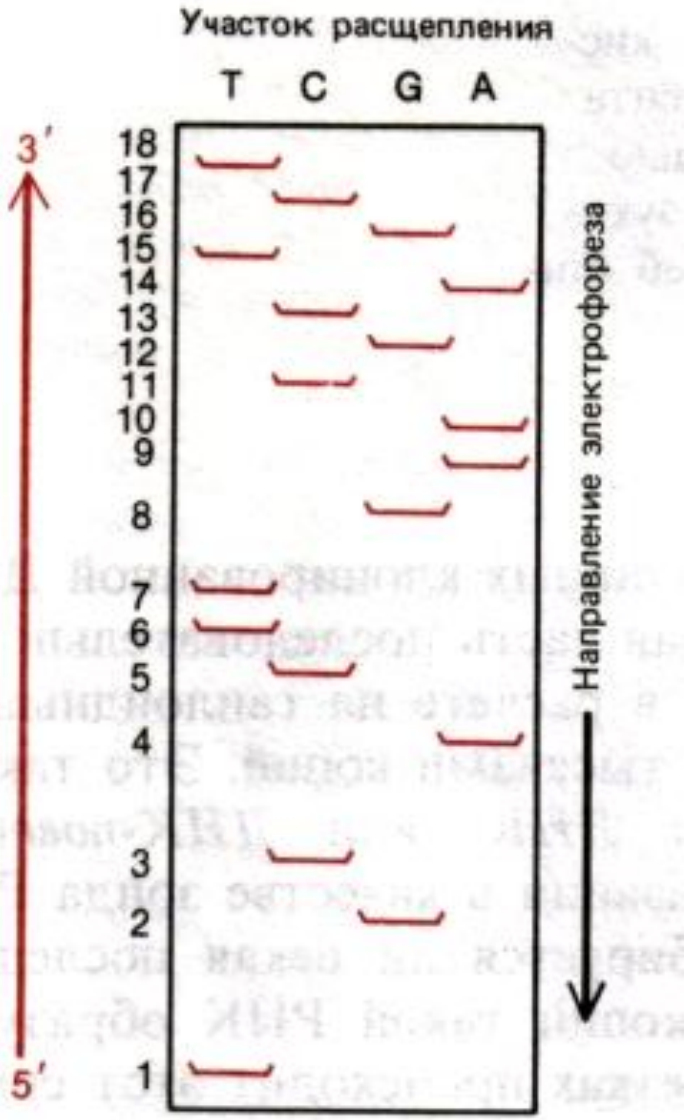
- **Одинаковые фрагменты ДНК одновременно обрабатывают различными химическими веществами. Они разрывают цепи ДНК по различным нуклеотидам.**
- **Затем проводится одновременно электрофорез в агаровом геле на 4-х дорожках. На каждой из них будут фрагменты, соответствующие определенному нуклеотиду.**
- **Для определения полной нуклеотидной последовательности проводят послойно анализ всех дорожек геля.**
- **На электрофореграммах выявляются радиоактивные фрагменты, по которым и определяют нуклеотидную последовательность ДНК.**

- В ДНК выщепляли цитозин (С) и при сканировании дорожки гелевой пластины радиоактивность выявлялась в фрагментах длиной 2 и 4 нуклеотида,

  следовательно цитозин находился в позициях 3 и 5 соответственно.
- В другом образце этой ДНК выщепляли гуанин (G) и после электрофореза выявлялись радиоактивные фрагменты с 1 и 7 нуклеотидами.
- Это указывало, что гуанин располагался в положениях 2 и 8.



- **Разделяя на одной гелевой пластине фрагменты ДНК по величине после специфического выщепления каждого из 4 нуклеотидов (A, G, C и T),**
- **можно «читать» нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК на электрофореграмме.**



- ***Ферментативный метод*** **разработан Сангером и Коулсоном в 1975 г.**
- **В основе метода – синтез с помощью ДНК-полимеразы комплементарной цепи ДНК изучаемому фрагменту ДНК, который используют в качестве матрицы.**

Метод называли «плюс–минус-метод», поскольку реакцию полимеризации проводили:

- **либо в отсутствии какого-либо одного нуклеотида («минус»–система),**
- **либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»–система).**

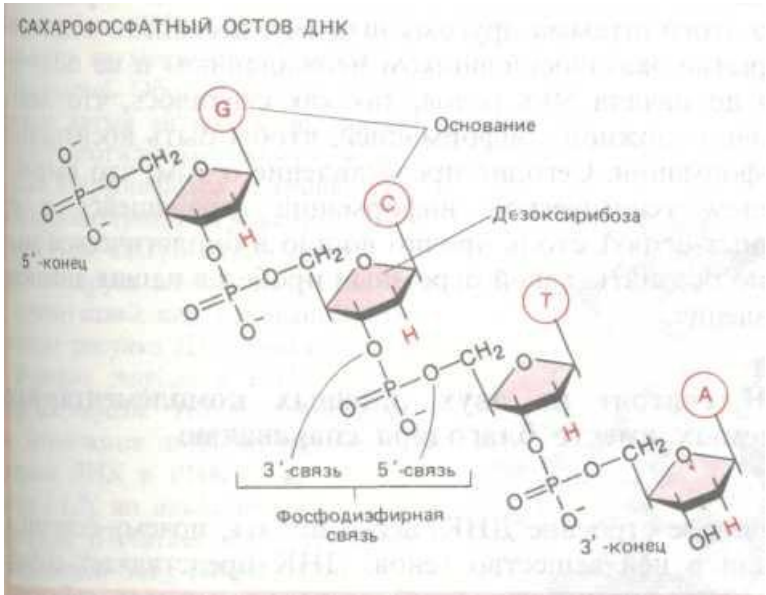
В обоих случаях ограничивалась возможность наращивания цепи из-за недостатка соответствующего нуклеотида.

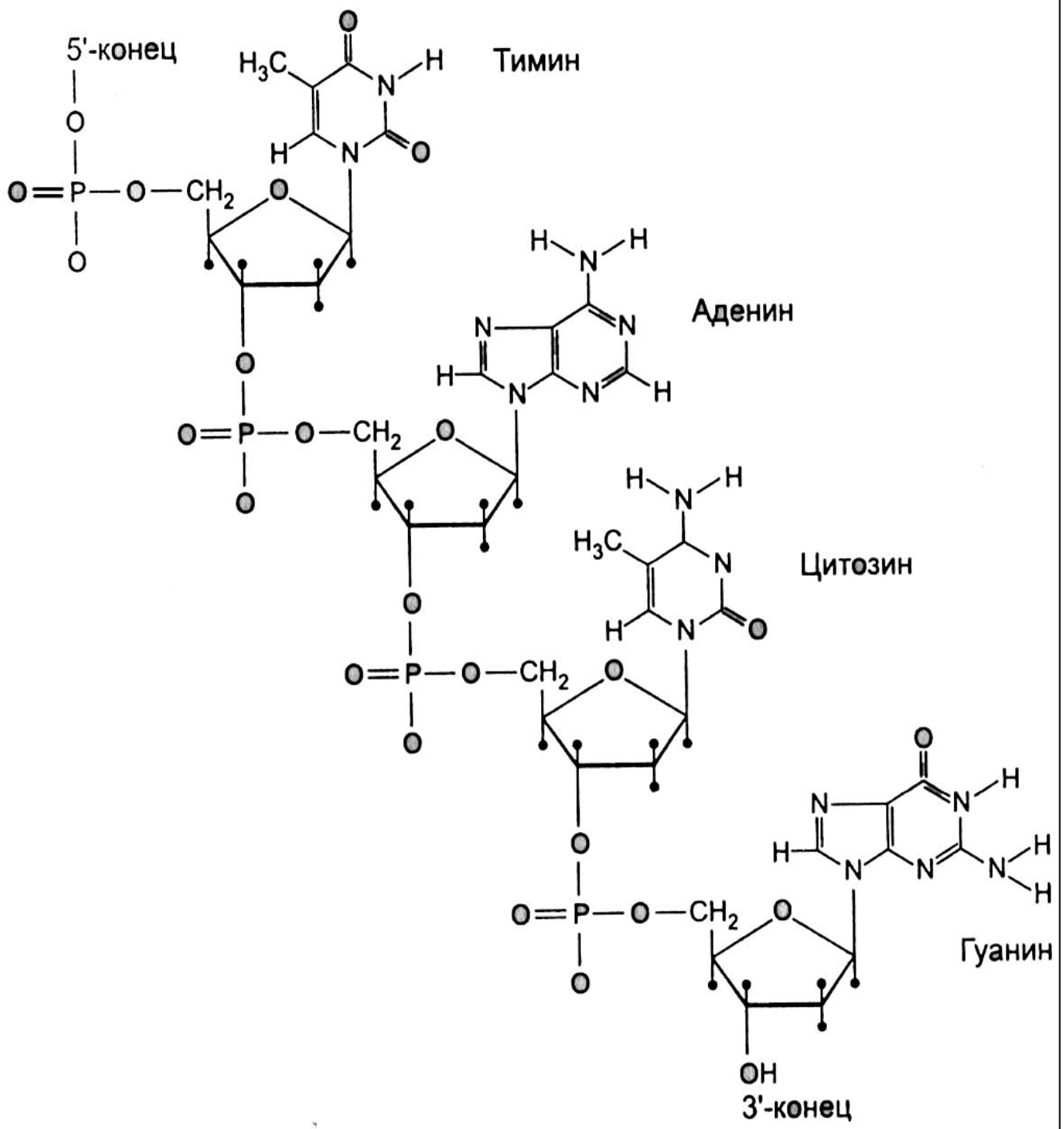
Для остановки синтеза обычно используют молекулы-терминаторы, обрывающие полинуклеотидную цепь.

В качестве таких молекул применили ди/дезоксирибо/нуклеозид/три/фосфаты (ddНТФ).

В них отсутствует дезоксирибоза -3′-ОН, входящая в состав нормальных нуклеотидов.

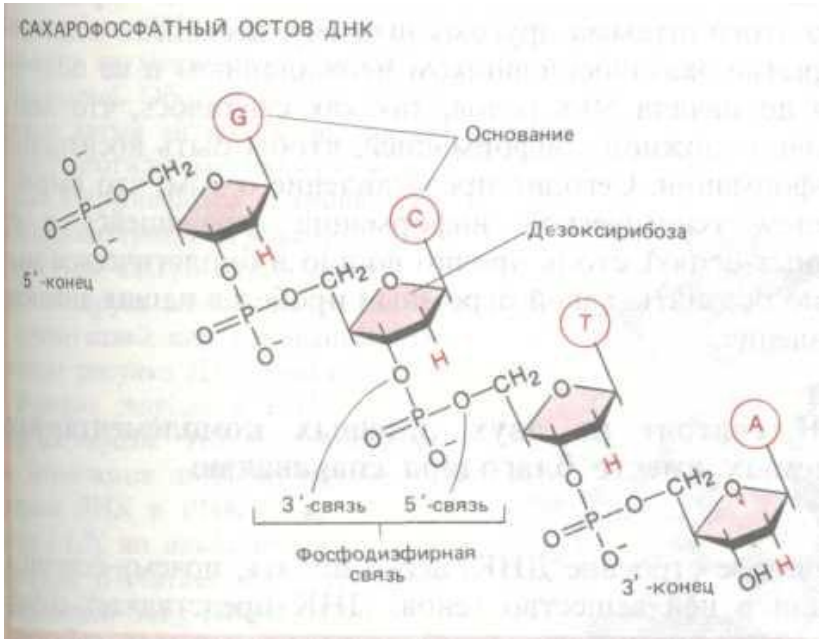
Такой измененный нуклеотид после внедрения в цепь ДНК блокирует присоединение следующего нуклеотида.




5'-конец
Тимин
Аденин
Цитозин
Гуанин
OH
3'-конец

Для секвенирования используют одноцепочечную ДНК, а также короткий олигодезоксинуклеотидный праймер (затравку), комплементарный небольшому участку анализируемой ДНК.

Одноцепочечная ДНК служит матрицей для ДНК-полимеразы, а новая (комплементарная) цепь наращивается начиная с 3'-ОН группы праймера путем присоединения соответствующих дезоксирибонуклеозидфосфатов (dНТФ).



Проводят одновременно четыре разных реакции копирования.

Для этого 4 одинаковых комплекса «матрица–праймер» инкубируют в присутствии всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов

(dATP, dGTP» dCTP и dTTP) и одного определенного ddНТФ,

который и служит терминатором синтеза после своего встраивания в растущую цепь ДНК.

Прекращение синтеза происходит в разных местах. Образуется набор фрагментов ДНК различной длины (в виде «лесенки»), начиная с 3'-конца праймера до места расположения соответствующего присоединенного ddНТФ.

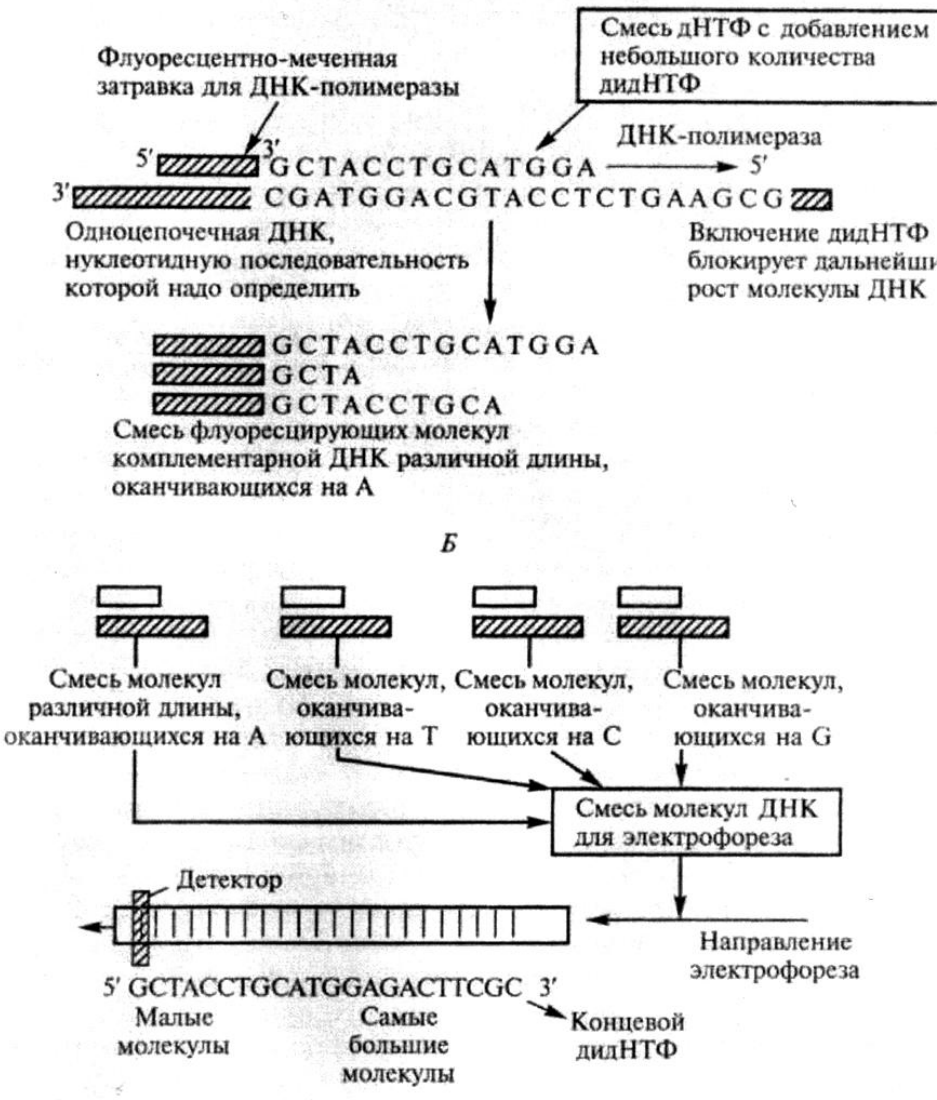
Синтезированные фрагменты являются радиоактивно меченными, так как для их синтеза используют меченый ddНТФ.

Метка вводится в праймер или по α-фосфатной группе дезоксинуклеозидтрифосфата, используемого для наращивания цепи ДНК.

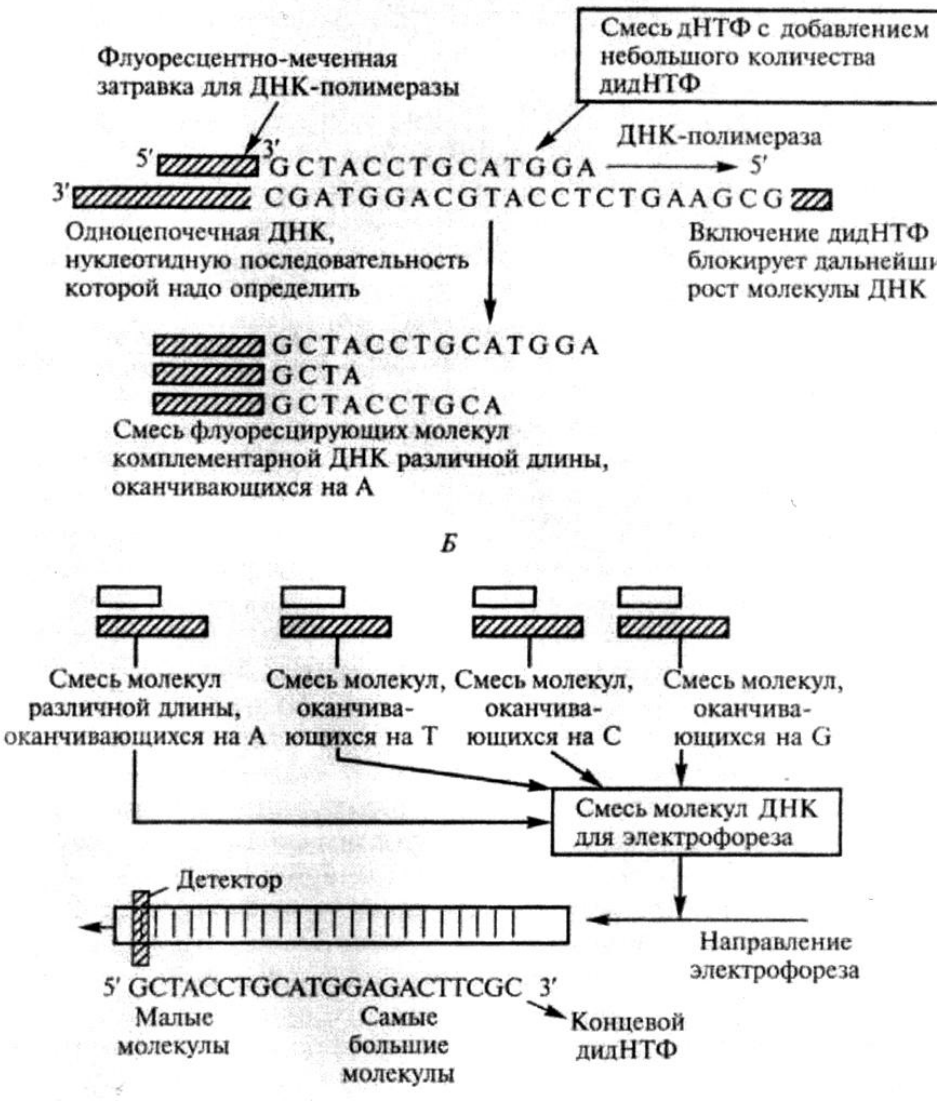
Используют атом фосфора ^{32}P или атом серы ^{35}S, заменяющий атом кислорода в фосфорном остатке нуклеотида.

Продукты четырех реакций анализируют методом электрофореза, и секвенируемую последовательность считывают с радиоавтографа как при анализе химического секвенирования.

Длина выявленного при электрофорезе радиоактивного фрагмента указывает место расположения комплементарного нуклеотида в анализируемом фрагменте ДНК.



Если при анализе на радиоавтографе пробы, полученной путем копирования в присутствии ddCTP, выявлены фрагменты длиной 3 и 4 нуклеотида, это значит, что в анализируемом фрагменте ДНК в соответствующих позициях расположен гуанин.



Для секвенирования ДНК методом Сангера созданы универсальные конструкции (векторы) на основе генома фага М13, в которые встраивают изучаемый фрагмент ДНК.

В такой конструкции встроенный фрагмент всегда будет ограничен (фланкирован) одними и теми же нуклеотидными последовательностями фаговой ДНК, что позволяет использовать универсальный праймер.

Комбинируя клонирование разных фрагментов ДНК и их секвенирование с помощью дидезокситерминатора, были определены последовательности митохондриальной ДНК человека (16569 н.п.) и ДНК фага λ (48 502 н. п.).

При секвестровании проводят одновременно четыре разных реакции копирования.

Для этого 4 одинаковых комплекса «матрица–праймер»

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

ACGAAAAGGTACTTAGCGGCGT

TTTT

инкубируют в присутствии всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP и dTTP)

Определение нуклеотидных последовательностей крупных геномов, состоящих из миллионов и более нуклеотидов, проводится с использованием компьютерных программ, которые позволяют находить перекрывающиеся последовательности в анализируемых фрагментах и затем составить полную карту генома.

Геном человека состоит из 6 млрд. нуклеотидов.

Методы Максама–Гилберта и Сангера–Коулсона полностью автоматизированы.

В методе Сангера в 5'-конец праймера вводят флуоресцентные метки.

Для каждого из 4 нуклеотидов используют метки с различными спектральными характеристиками.

После электрофореза гель сканируют при различных длинах волн, и полученная информация обрабатывается на компьютере.

Все биохимические операции также проводятся роботом, и скорость секвенирования превышает 100 000 нуклеотидов в сутки.

Гибридизация нуклеиновых кислот

- **При нагревании ДНК до 100 ºС в сильно щелочной среде ослабевают водородные связи между комплементарными парами оснований, они разобщаются и ДНК разделяется на две цепи.**
- **Этот процесс называют *денатурацией* («плавлением»).**
- **Если выдержать комплементарные цепи при температуре 65 ºС, то произойдет их соединение и двойная структура ДНК восстановится.**
- **Это – ренатурация (гибридизация, «отжиг»).**

Гибридизация позволяет выявлять специфические нуклеотидные последовательности.

CCGCTATTAGCGTAAC

CCATACGGCGATAATCGCATTGATTC

Скорость ренатурации двойной спирали зависит от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей и их концентрации в растворе.

Это может быть использовано для определения концентрации любых последовательностей РНК или ДНК в смеси, содержащей и другие фрагменты нуклеиновых кислот.

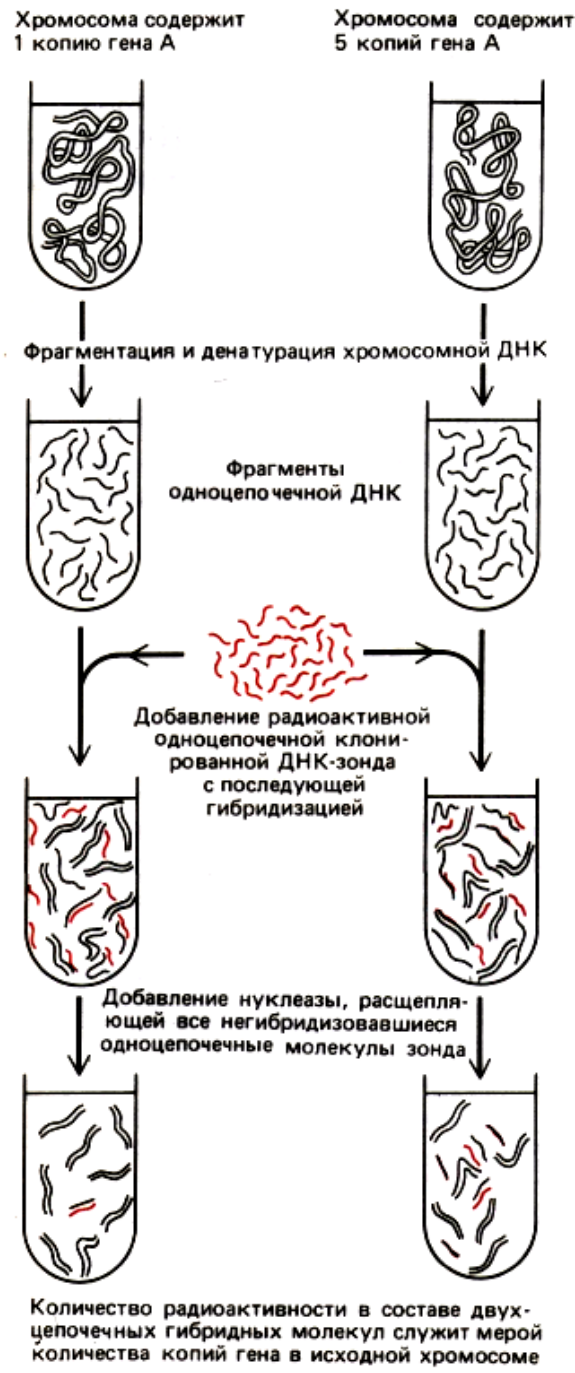
Для проведения реакции необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить.

Обычно фрагмент ДНК, полученный клонированием либо химическим путем, метят по ^{32}P в целях прослеживания включения фрагмента в состав дуплексов при гибридизации.

Одноцепочечную молекулу ДНК, используемую в данном методе в качестве меченого индикатора, называют ДНК-зондом.

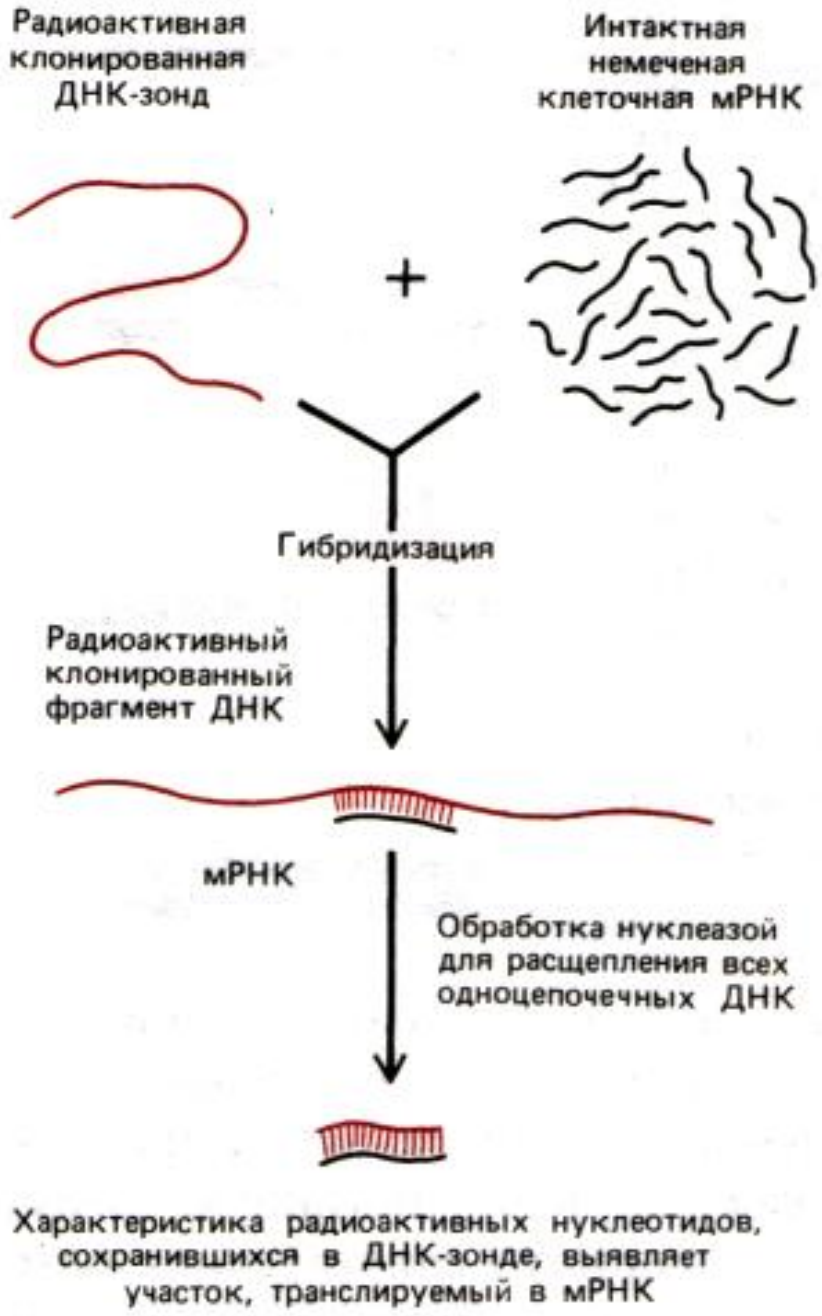
Размеры его варьируют от нескольких десятков до нескольких сотен и тысяч нуклеотидов.

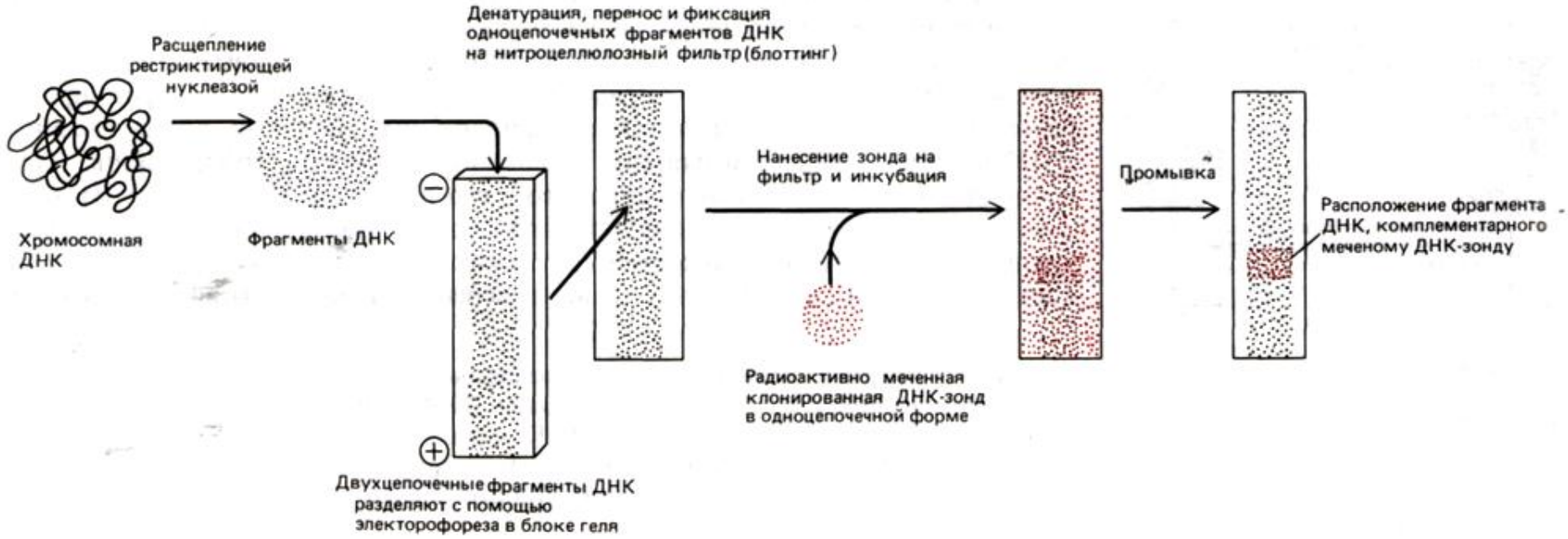
- **Измерение количества копий специфического гена в образце ДНК с помощью гибридизации ДНК.**
- **Одноцепочечный радиоактивный фрагмент ДНК, используемый в таких экспериментах, называют *ДНК-зондом:* хромосомная ДНК в данном случае не содержит радиоактивных атомов.**



Использование гибридизации нуклеиновых кислот для определения участка клонированного фрагмента ДНК, который транскрибируется в мРНК.

С помощью этого метода было открыто существование в генах эукариот вставочных (некодирующих) последовательностей (интронов).





После расщепления образца ДНК рестриктирующей нуклеазой и электрофоретического разделения множества полученных фрагментов ДНК переносят с помощью «блоттинга» на нитроцел-люлозный фильтр и затем гибридизуют с радиоактивной ДНК-зондом в течение длительного времени в условиях отжига. Затем фильтр тщательно промывают, чтобы радиоактивно меченными остались только те фрагменты, которые гибридизируются с ДНК-зондом. На радиоавтографе, полученном с листа нитроцеллюлозы, эти фрагменты выявляются в виде полос.

Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов позволяет:

выявить нуклеотидные последовательности в очень низкой концентрации и

определять, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки.

ДНК-зонды применяют:

для поиска родственных генов;

в реакциях гибридизации с РНК – для выявления экспрессии данного гена в различных клетках.

Для выявления молекул нуклеиновых кислот, комплементарных всему зонду (или его участку), ДНК-зонды часто сочетают с методом гель-электрофореза, что позволяет получать информацию о размерах гибридизируемых молекул ДНК.

Эффективное использование современных приборов, способных автоматически синтезировать любые нуклеотидные последовательности за короткий промежуток времени, дало возможность перестраивать гены, что представляет собой один из важных аспектов генной инженерии.

Выделение генов и получение комплементарной ДНК (кДНК)

Источники и способы получения генов различные. Чаще разделяют ДНК на фрагменты.

***Этот способ называется shotgun – дробовик*.**

Строение и размер геномов различных видов сильно различаются.

Пример. Хромосома E. Coli (двуспиральная кольцевая молекула ДНК) включает $5 \cdot 10^6$ пар оснований, молекулярной массой $3 \cdot 10^9$ Д.

В процессе выделения происходит около 100 разрывов хромосомы и очищенные фрагменты ДНК имеют массу $30 – 50 \cdot 10^6$ Д.

Геном человека и животных содержит в тысячи раз большее количество ДНК, которая распределена в десятках хромосом.

- **До появления методов генетической инженерии ДНК разделяли посредством многократного пропускания раствора через иглу шприца.**
- **Получали фрагменты величиной в $1–5 \cdot 10^6$ Д, т.е. размером со средний ген.**
- **Разрывы ДНК происходили в различных местах и образовывалось большое количество не одинаковых фрагментов. Очень редко удавалось встроить их в векторы.**
- **В настоящее время ДНК обрабатывают рестриктазами и получают фрагменты с выступающими концами.**

- **В настоящее время ДНК обрабатывают рестриктазами и получают фрагменты с выступающими концами.**
- **Их встраивают в плазмиды, которые переводят в линейную форму с помощью того же фермента.**
- **Образуются тысячи различных рекомбинантных плазмид. Среди них лишь немногие могут содержать нужный ген.**
- **Для поиска плазмиды, несущей этот ген, разработаны специальные процедуры, называемые скринингом.**

- ***Другой способ конструирования нужных генов*** **- синтез на мРНК комплементарной ей ДНК (кДНК).**
- **Такие гены необходимы для экспрессии в бактериях и получения инсулина, гормона роста, ренина и др.**
- **Фрагменты генома человека или животных использовать нельзя, так как у них отдельные части некоторых генов разобщены.**
- **Кодирующие нуклеотидные последовательности (экзоны) чередуются с вставочными некодирующими последовательностями (интронами).**

- **Ген целиком транскибируется с образованием первичного транскрипта РНК, после чего интроны выщепляются, а нуклеотидные последовательности, соответствующие экзонам, соединяются с образованием мРНК.**
- **Этот процесс созревания матричной РНК называют *сплайсингом*.**
- **Прокариотические организмы не способны осуществлять сплайсинг.**

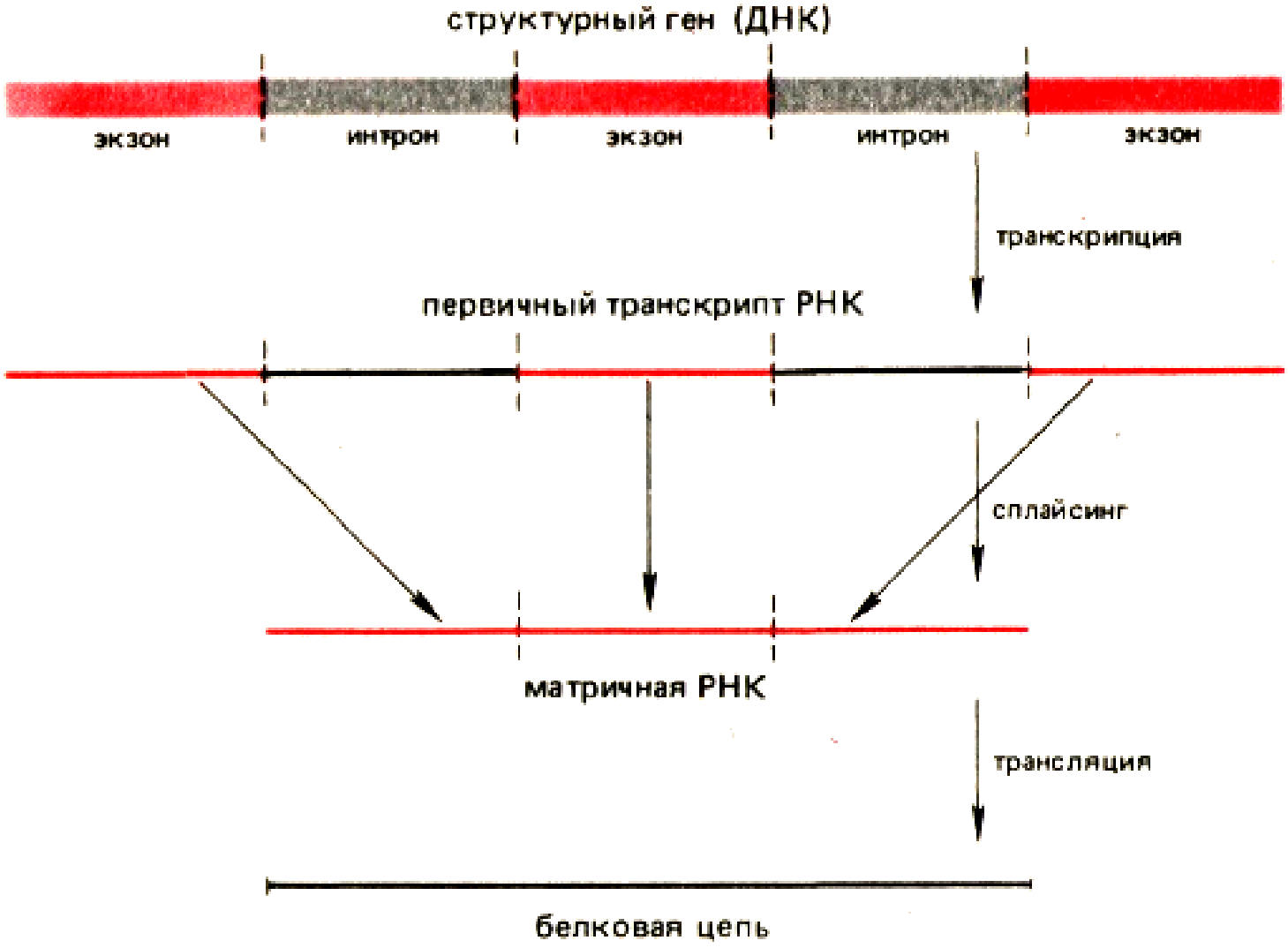


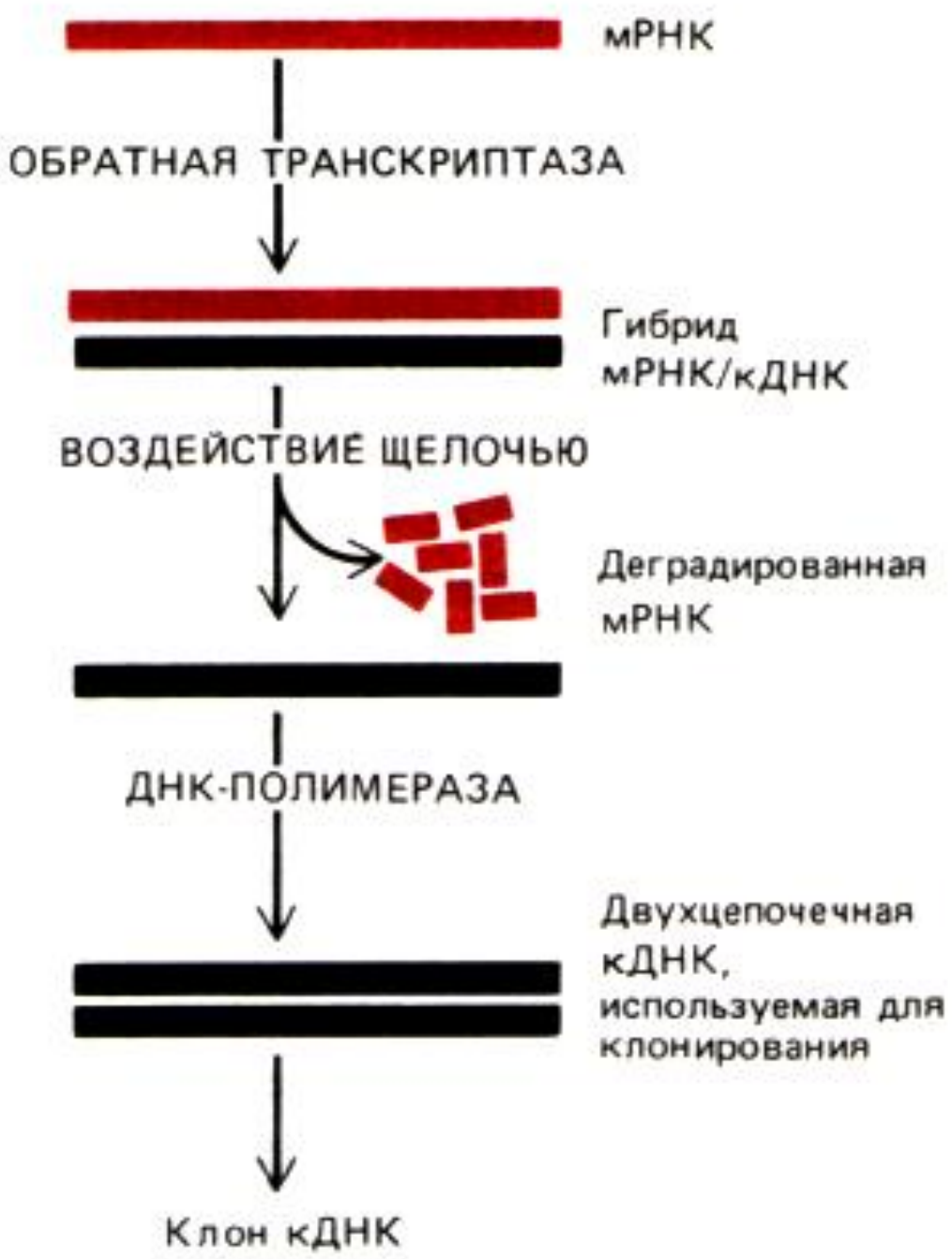
Схема экспрессии генов у эукариот

- **Большинство клеток содержит множество различных мРНК и выделить чистую мРНК, кодирующую нужный белок, трудно.**
- **Чаще используют специализированные клетки, которые вырабатывают один вид белка.**
- **Так, из незрелых красных кровяных клеток можно выделить мРНК для гемоглобина, а**
- **из клеток поджелудочной железы – мРНК для проинсулина человека.**

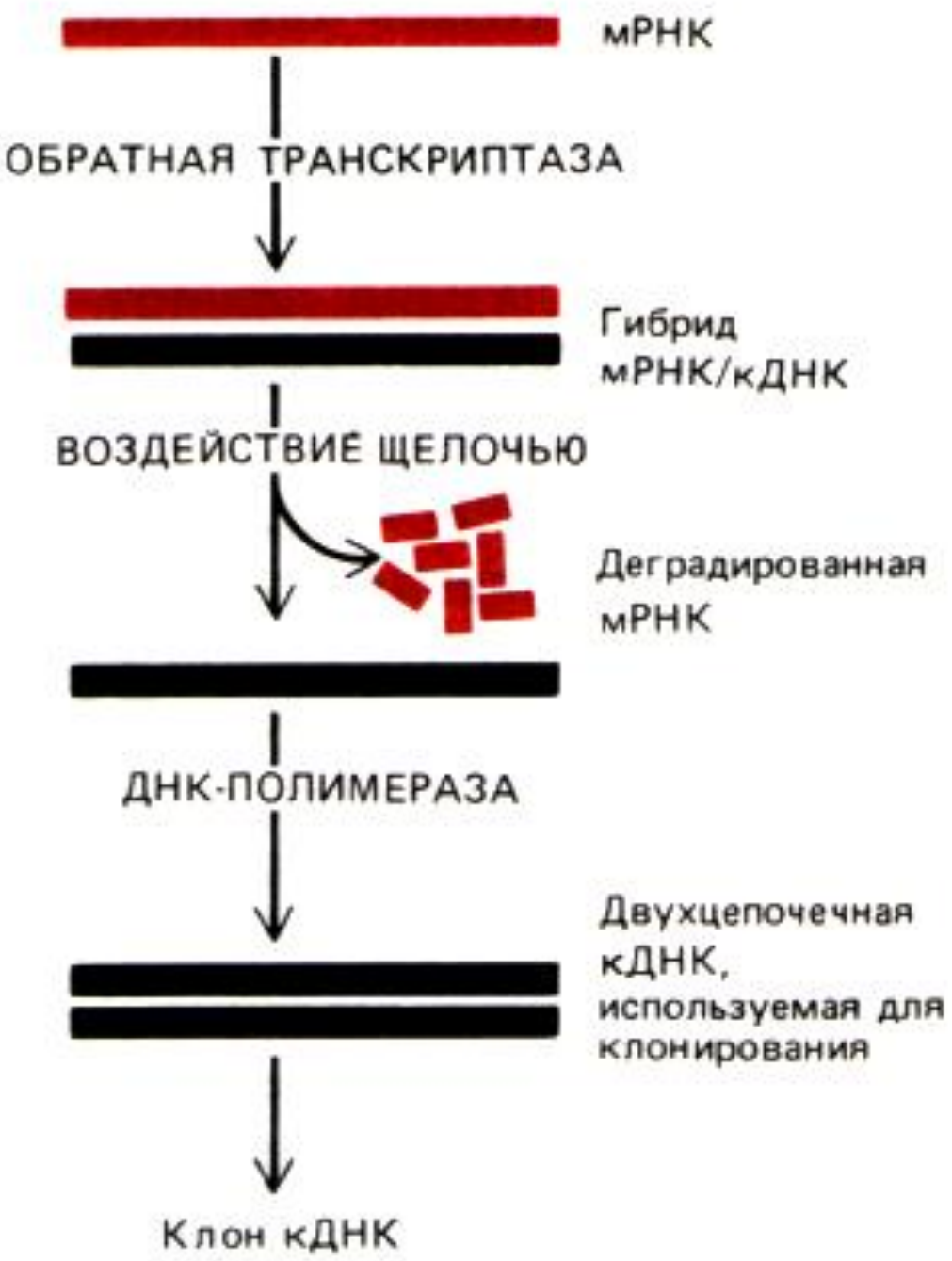
- **Для получения мРНК клетки разрушают, выделяют центрифугированием рибосомы и обрабатывают их антителами против того белка, ген которого хотят извлечь.**
- **Специфические антитела будут взаимодействовать только с полностью достроенным белком, который ещё прикреплён к рибосомам, синтезирующим его на матрице мРНК.**
- **Комплекс антител с рибосомами выпадет в осадок и из него мРНК выделяют в чистом виде путем хроматографии.**

- **На мРНК синтез кДНК происходит с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы).**
- **На 3′-конце мРНК находится полиаденилова последовательность.**
- **Для начала функционирования обратной транскриптазы мРНК отжигается с олиго-dT, который служит затравкой при копировании нити кДНК.**
- **После этого из смеси нуклеотидов на матрице мРНК начинается синтез кДНК.**
- **Из гибрида мРНК – кДНК удаляют мРНК гидролизом (щелочью).**
- **На 3'-конце кДНК остается шпилечная структура, которую используют как затравку при построении второй нити ДНК.**

Для построения второй нити ДНК на однацепочечной кДНК используют фрагмент Кленова ДНК–полимеразы I E. Coli. У этого фрагмента отсутствует 5′ ---3′-экзонуклеазная активность. В результате образуется двухцепочечная кДНК, содержащая «шпильку».



После расщепления шпильки остается синтетическая двухцепочечная кДНК, соответствующая белку, кодируемому нужный для нас геном.



- **Синтезированная кДНК кодирует аминокислотную последовательность белка.**
- **Эта кДНК не идентична природному гену белка, так как получали ее с эукариотической мРНК;**
- **она не содержит интронов (вставочных последовательностей) и стартовых и терминальных сигналов.**
- **Чтобы упростить способ, кДНК обычно синтезируют из нуклеотидов, содержащих ^{32}P.**
- **Для удаления олиго-dT и однонитевой петли используют SI-нуклеазу, расщепляющую однонитевую ДНК.**
- **При соблюдении условий синтеза можно получать полноразмерные копии мРНК, включающие несколько тысяч пар оснований.**

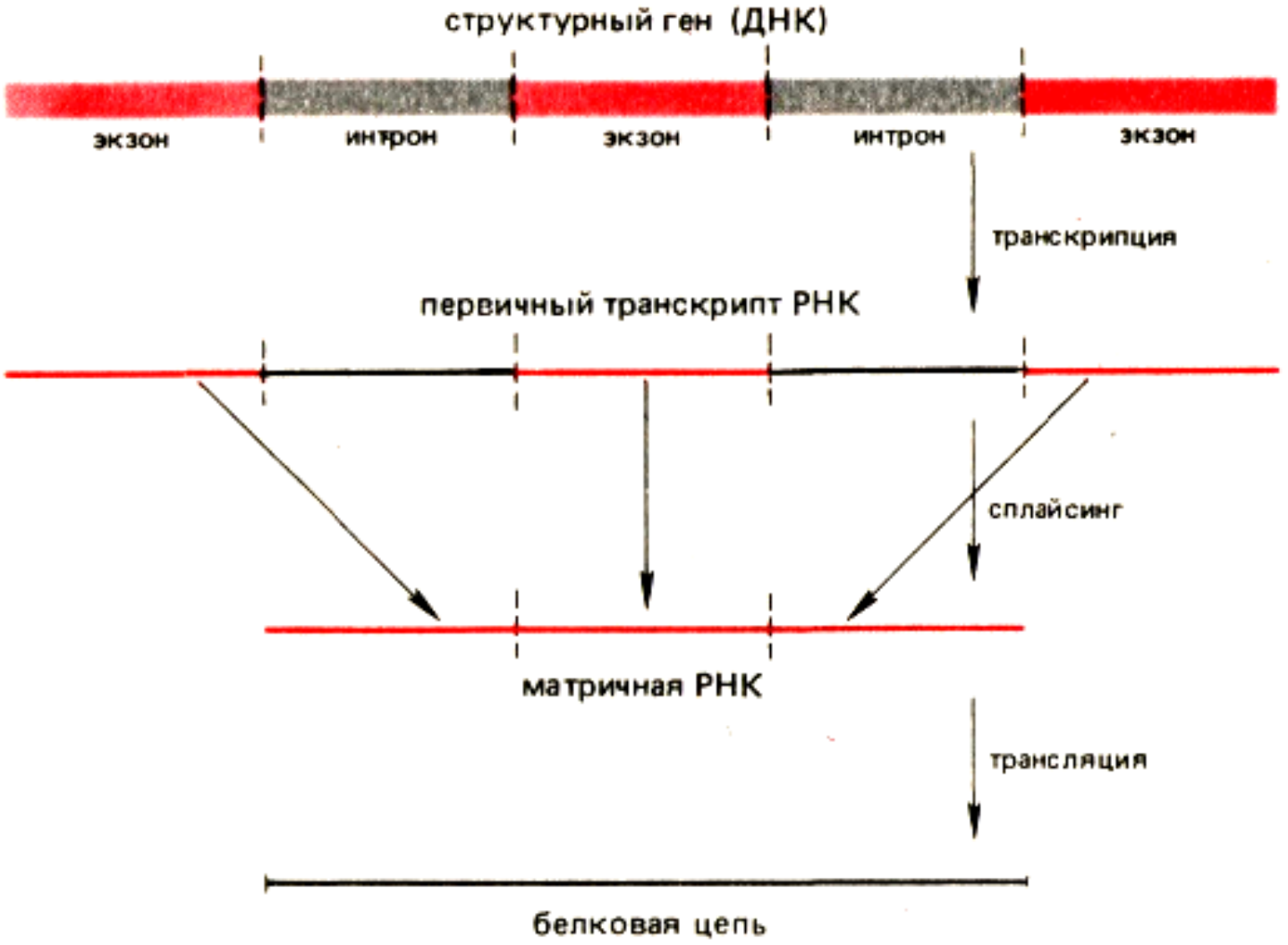


Схема экспрессии генов у эукариот

Химико-ферментативный синтез генов

Чтобы синтезировать ген, нужна

- **информация о нуклеотидных последовательностях его, или**
- **об аминокислотных последовательностях в соответствующем белке.**

Определение нуклеотидных последовательностей требует клонирования исходных фрагментов ДНК.

После расшифровки нуклеотидной последовательности и получения нужных фрагментов ДНК необходимо их соединить воедино.

Так осуществлен синтез гена лейкоцитарного интерферона человека (более 600 п. о.).

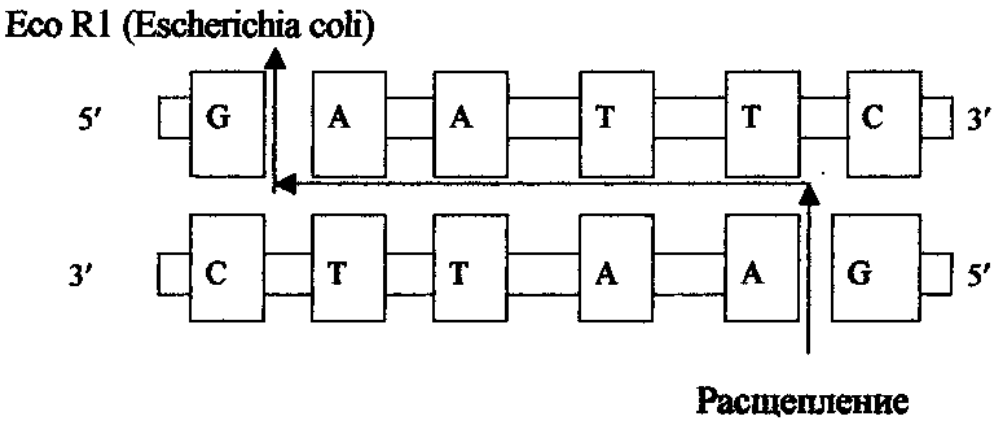
Простой метод соединения фрагментов ДНК

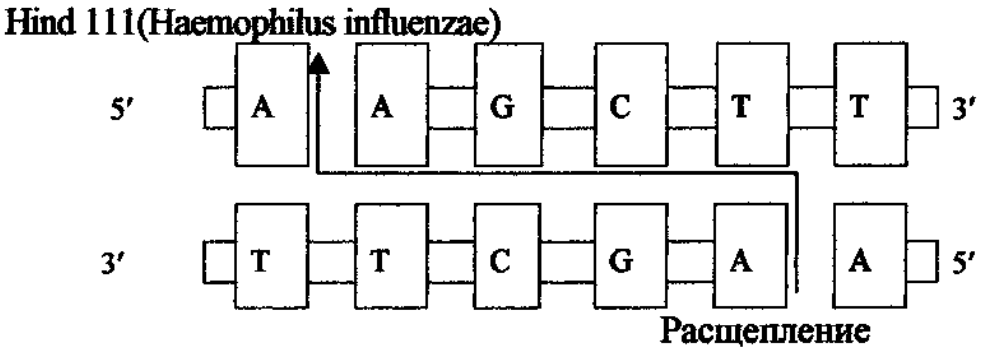
отжиг фрагментов, полученных после обработки ДНК рестриктазой, образующей «липкие» комплементарные однонитевые концы,

с последующей обработкой ДНК-лигазой.

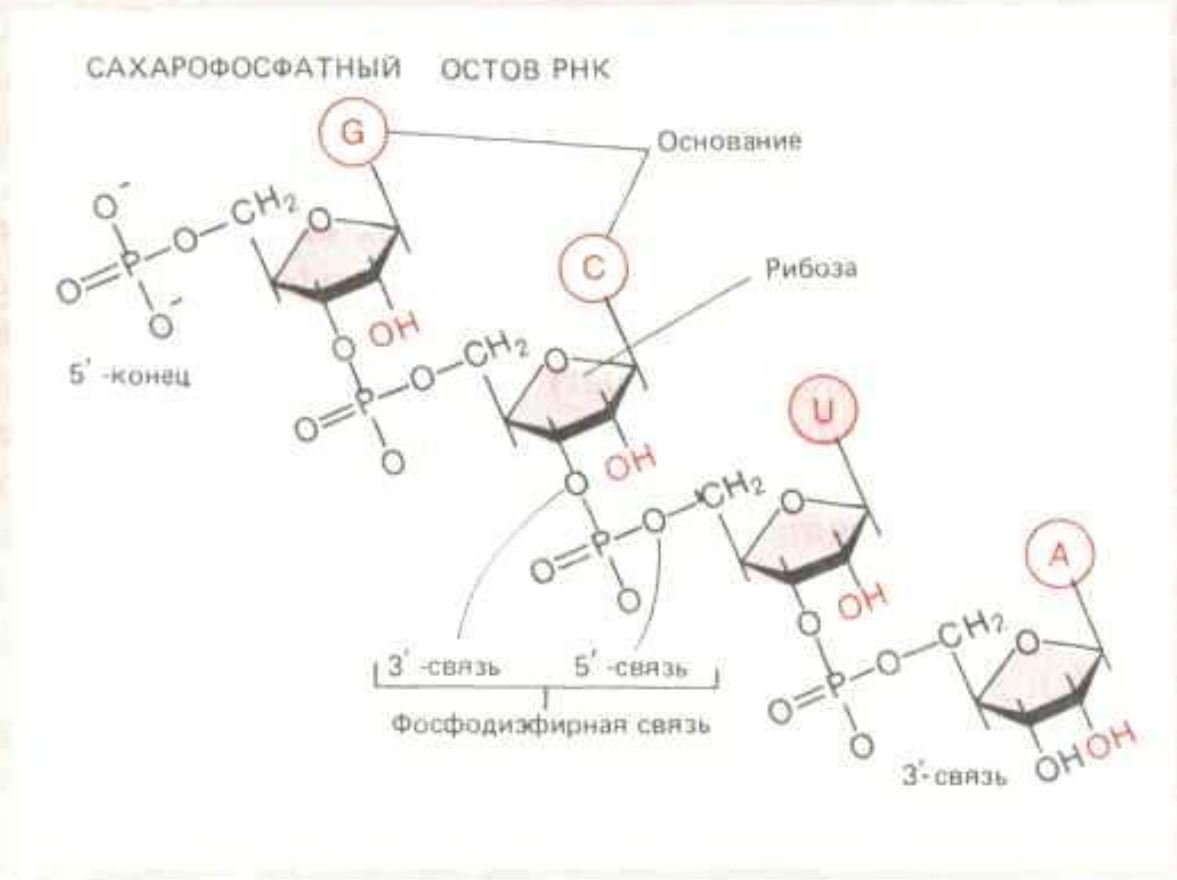
Лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами, т. е. восстанавливает непрерывность цепей ДНК.

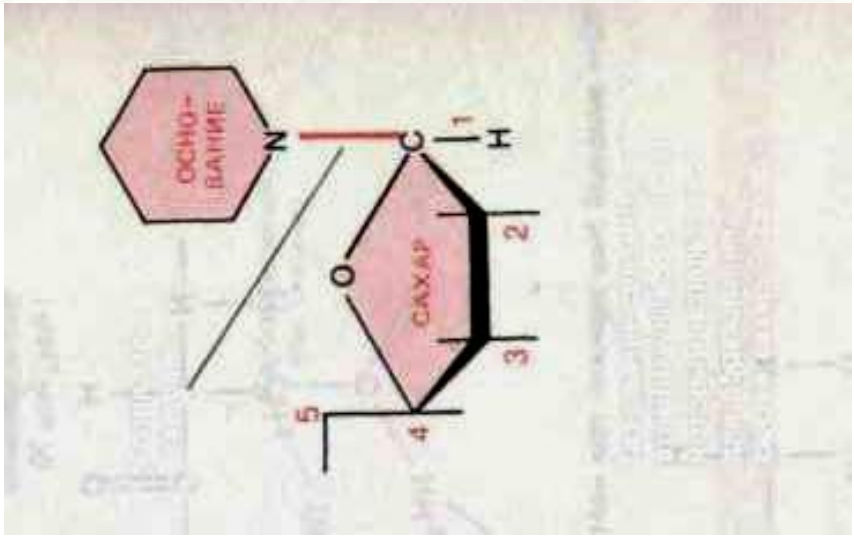
Две цепи ДНК разрезаются не прямо напротив друг друга, а наискосок, образуя липкие концы. Места расщепления ДНК, указанные стрелками, лежат вне оси симметрии. В результате несовпадения разрывов образуются одноцепочечные концы из четырех пар оснований.

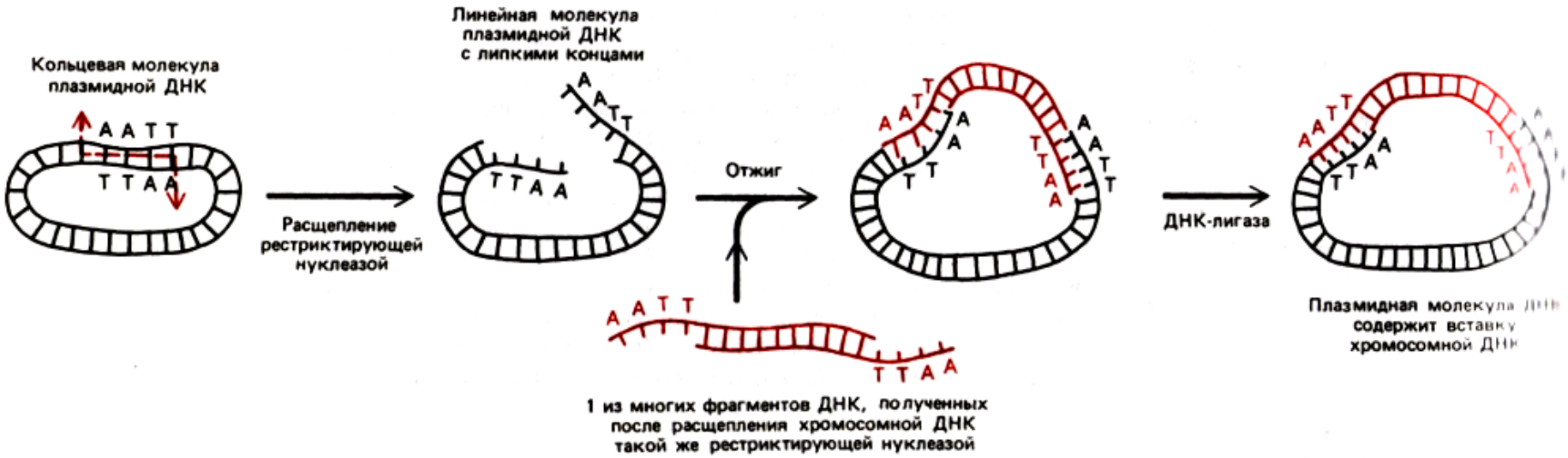




- **Нуклеотиды связаны между собой ковалентными фосфодиэфирными связями, соединяющими 5´-атом углерода одного остатка рибозы (дезоксирибозы) с 3´-атомом углерода следующего остатка. Четыре основания присоединены к этой монотонной сахаро-фосфатной цепи наподобие 4-х разных типов бусинок, нанизанных на одну нить.**







При наличие липких концов происходит соединение двух фрагментов ДНК в результате спаривания комплементарных нуклеотидов.

Соединенные фрагменты ДНК могут быть связаны ковалентными связями под действием ДНК-лигазы.

Образующаяся гибридная молекула плазмидной ДНК будет содержать фрагмент (вставку) хромосомной ДНК.

Коннекторный метод

соединения фрагментов ДНК основан на свойстве фермента – терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы – пристраивать нуклеотидные последовательности к 3'-ОН-концам фрагментов ДНК.

3'-OH-TATGGCAGCTGAACTACGTGC **1.**
ATACCGTCGACTTGATGCACG-3'-OH

AAAATATGGCAGCTGAACTACGTGC
ATACCGTCGACTTGATGCACG-3'-OH

3'-OH-CATGACAGTTGAGCTACGTGT **2.**
GTACTGTCAACTCGATGCACA-3'-OH

3'-OH-TATGGCAGCTGAACTACGTGT
ATACCGTCGACTTGATGCACATTTT

К концам одного фрагмента ДНК присоединяется однонитевой полинуклеотид (например поли dA), а к другому — комплементарный ему, поли dT).

Достроенные фрагменты смешивают и отжигают для образования кольцевых структур.

Возможные бреши ликвидируют обработкой экзонуклеазой III, ДНК-полимеразой и лигазой, в результате чего получают ковалентно замкнутые кольцевые молекулы.

Основными достоинствами коннекторного метода являются возможность его применения независимо от природы и способа получения фрагментов ДНК и высокий выход рекомбинантных молекул.

Важно, что при таком способе воссоединения фрагментов ДНК не могут образоваться исходные кольцевые векторные молекулы.

К недостаткам метода следует отнести трудности, которые возникают при точном вырезании клонированных фрагментов.

Кроме того, протяженные гомополимерные участки могут отрицательно влиять на стабильность плазмид из-за внутримолекулярной рекомбинации, а также

на экспрессию генов, если она контролируется промотором вектора.

После разделения генома различными рестриктазами появляются различной величины фрагменты ДНК с различной нуклеотидной последовательностью.

Сравнением размеров таких фрагментов можно построить рестрикционную карту. Она будет отражать характерную последовательность нуклеотидов в данном участке.

Используя такие карты можно оценить степень гомологии между отдельными участками (генами) без определения их нуклеотидной последовательности.

Рестрикционные карты необходимы для изучения эволюции и филогенеза организмов, клонирования ДНК.

Синтез белка растительными и животными организмами

- ***Белок одноклеточных организмов***
- ***Белковые продукты, получаемые путем ферментации***
- ***Сырье для производства кормовой биомассы***

Белок одноклеточных организмов (БОО)

Микроорганизмы в производстве белковых продуктов используются давно. Сначала при изготовлении продукта питательной основой для микроорганизмов служил белок. В результате глубоких изменений сырья (молоко, соевая мука) получали продукты, которые дольше хранились (сыр), их удобнее было употреблять (соевый творог).

Значительная часть сухой массы (биомассы) микроорганизмов – то же белки. Их можно использовать в качестве кормовой добавки животным и даже для получения продуктов питания.

Микроорганизмы растут быстрее, чем растения или животные и более эффективно превращают субстрат в белок. Причем для них белок не является обязательным компонентом питательной среды, в то время как корма для животных должны содержать 15–20 % белка.

Получают микробный белок (*БОО*) путем ферментации. В качестве субстрата используется различное сырье: низкокачественные бросовые продукты, легкодоступные углеводы или углеводороды, иногда барда и др.

При промышленном производстве *БОО* обычно используют методы:

*** глубинного одноэтапного или**

*** непрерывного культивирования в жидких средах.**

При одноэтапном культивировании **продолжительность рабочего цикла (для дрожжей) около 20 ч.**

В процессе культивирования в ферментере постоянно перемешивается суспензия микробных клеток в жидкой питательной среде, которая снабжается кислородом воздуха, поддерживается температурный режим.

После окончания цикла культуральная жидкость с клетками дрожжей удаляется из ферментера, а в него вновь подается питательная среда и культура дрожжевых клеток для выращивания.

Непрерывное культивирование **сложнее, но экономичнее. Оно требует:**

равномерной скорости роста микроорганизмов в в питательной среде,

ограничения роста микроорганизмов путем лимитирования одного из субстратов (источника углерода);

соблюдения стерильности, чтобы не допустить загрязнения посторонней микрофлорой;

постоянства температуры, а также pH среды.

В процессе культивирования периодически удаляется часть культуральной жидкости и добавляется свежая питательная среда. Объем жидкости в ферментере не изменяется.

Все это обеспечивает непрерывность работы установки в течение нескольких дней, недель или даже месяцев.

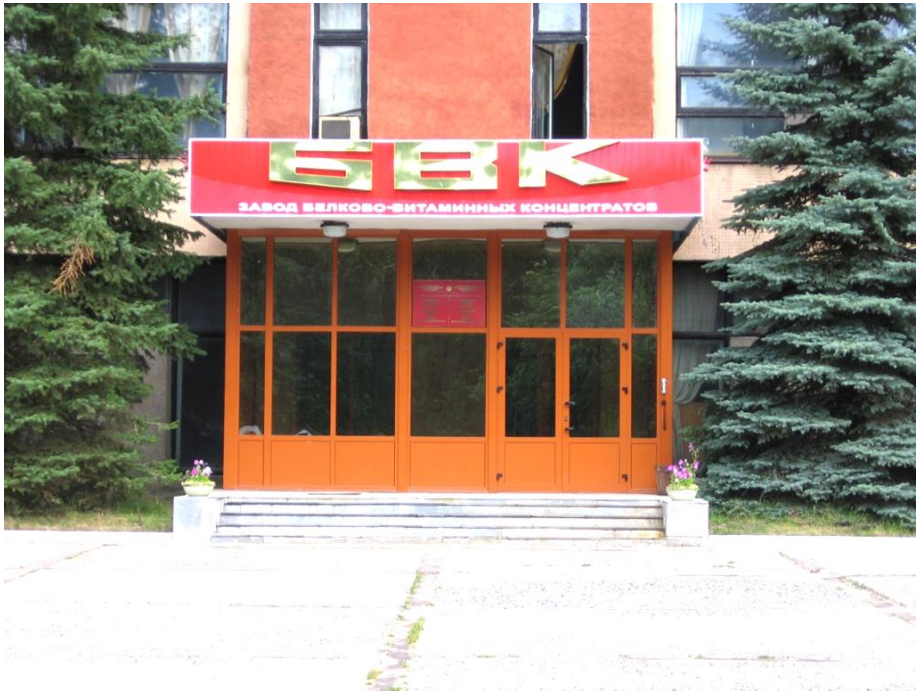
В извлеченной из ферментера порции содержимого на флотационной установке отделяют биомассу дрожжей от культуральной жидкости.

В процессе флотации происходит вспенивание суспензии, в результате чего микробные клетки всплывают на поверхность вместе с пеной, которая отделяется от жидкой фазы. После отстаивания дрожжевая масса концентрируется с помощью сепаратора.

В последующем микробные клетки подвергаются механической, ультразвуковой, термической или ферментативной обработке с целью разрушения их клеточной оболочки и лучшей переваримости в организме животных.

В сухой дрожжевой массе содержится 40–60% сырого белка, 25–30% усвояемых углеводов, 3–5% сырого жира, 6–7% клетчатки и зольных веществ, значительные количества витаминов (до 50 мг/%). При обработке дрожжей ультрафиолетовыми лучами из эргостерина образуется витамин $Д_2$.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОВИТА











САЛЕЙКО В.А.,
главный технолог
РУП «Новополоцкий
завод белково-
витаминных
концентратов»

РУП “Новополоцкий завод белково-витаминных концентратов” единственный в республике и на территории стран СНГ производитель кормового микробиологического белка (провита).

До начала 1992 г. предприятие в качестве сырья использовало парафин, который выделялся из нефти поступающей на «Нафтан». Продукт – паприн. Завод стабильно работал с высоким уровнем рентабельности.

Начиная с января 1992 г. объем производства начал резко падать, экономическое положение завода катастрофически ухудшалось, появилась необходимость перепрофилирования.

- **В феврале 1995 г. производство белково-витаминного концентрата из парафинов нефти (паприна) было прекращено и начаты работы по созданию опытно-промышленной линии по производству кормового микробиологического белка из зерна и отходов переработки зерна.**
- **В настоящее время завершается реконструкция завода, которая позволит увеличить долю сухих веществ в продукте с 10 до 17% и снизить потребление энергоресурсов не менее чем на 20%.**

- **Провит:**

Обладает высокой питательной ценностью благодаря наличию в нем всех незаменимых аминокислот, витаминов группы В, микро- и макроэлементов.

Повышает усвояемость корма до 87% и снижает потребление кормов.

Стимулирует иммунную систему и может адсорбировать и выводить из организма токсины.

Благодаря этим свойствам нормализует обмен веществ, обеспечивает высокие темпы роста и развития, увеличивает продуктивность и сохранность животных, птиц, рыб и пушных зверей.

Улучшает вкусовые качества мяса и яиц, придает меху пушных зверей блеск и шелковистость.

Выпускается провит в виде порошка и гранул.





Провит

Рыночная стоимость провита

№ n/n	Форма выпуска провита	Отпускная цена без учета НДС, за 1 т.
1	Порошок	1165900
2	гранулированный в мешках	1142650
3	гранулированный (насыпью)	1142650

Технологический процесс получения провита включает несколько стадий:

1. Прием, хранение и подготовку зерносырья
2. Прием солей и приготовление раствора питательной соли
3. Гидролиз зерносырья
4. Выращивание биомассы
5. Стадия сгущения суспензии биомассы
6. Термообработка суспензии биомассы
7. Сушка суспензии биомассы
8. Очистка газовоздушных выбросов ферментеров
9. Расфасовка и упаковка провитамина.

1. **Прием, хранение и подготовка зерносырья (рожь, пшеница, тритикале, отруби пшеничные и отруби ржаные, дерть):**

   размол зерна на центробежных и молотковых дробилках, приготовление зернопродукта из отрубей и дерти в соотношении 70 : 30,

   очистка запыленного воздуха от транспортеров и бункеров аспирационными системами АС-1,2,3.

1. Прием, хранение и подготовка зерносырья (рожь, пшеница, тритикале, отруби пшеничные и отруби ржаные, дерть):





2. Прием солей и приготовление раствора питательной соли:

Сухие соли из механизированного склада мокрого хранения по трубам с отверстиями из зоны растворения поступают в зону отстоя. Процесс приготовления раствора осуществляют в нестерильных условиях.

Борьбу с инфекцией ведут путем очистки и мойки технологического оборудования.





3. Гидролиз зерносырья

В основе производства провита лежит микробиологический синтез белка из углеводов зерносырья.

Полисахариды (крахмал, пентозы, клетчатка, геми-целлюлозы) дрожжами не усваиваются, и поэтому должны быть превращены в простые сахара.





3. Гидролиз зерносырья:

Гидролиз зерносырья происходит под воздействием собственных ферментов зерна и протекает в сборниках по схеме: полисахарид → олигосахариды → дисахариды → моно-сахариды.

Для более полного расщепления полисахаридов в процессе гидролиза используются ферментные препараты.

4. Выращивание биомассы:

Для получения биомассы используют производственные штаммы Saccharomyces cerevisiae (diastaticus) ВКПМ - *y* - 1218 и Trichosporon cutaheum БИМ Y - 210 Д, не обладающие токсичностью и патогенностью.

Технологическая характеристика Saccharomyces cerevisiae (diastaticus): оптимальная температура выращивания 30-32°С, pH 4,2–5,0, удельная скорость роста 0,2–0,34 ч-1, способен накапливать биомассу с содержанием сырого протеина до 40–45%. Ассимилирует глюкозу, галактозу, сахарозу, сорбозу и другие сахара, крахмал, способен накапливать биомассу на отходах зернопроизводства.

Технологическая характеристика Trichosporon cutaheum: оптимальная температура роста 30°С, pH 5,0, скорость роста 0,20–0,25 ч-1, содержание белка в биомассе 50–53%. Ассимилирует глюкозу, галактозу, сахарозу, фруктозу, и другие сахара, расщепляет крахмал, целлюлозу.

Технологический процесс выращивания биомассы осуществляют в три стадии:

Первая стадия. Выращивание культур микроорганизмов в лабора-торных условиях (в пробирках на скошенной среде, выращивание засевного материала в качалочных колбах, выращивание инокулята в лабораторном ферментере).



Лабораторный ферментер



Выращивание посевного материала

Лаборатория микробиологии









Первая стадия. **Выращивание культур микроорганизмов в лабораторных условиях (в пробирках на скошенной среде, выращивание засевного материала в качалочных колбах, выращивание инокулята в лабораторном ферментере).**

- ***Вторая стадия:*** **Выращивание чистой культуры – проводят в два этапа: выращивание засевного материала в ферментере объемом 3,2 м3 и выращивание чистой культуры в ферментере объемом 50 м3. Чистой культурой микроорганизмов считают биомассу, в которой количество клеток посторонних культур не превышает 5%. Чистую культуру микроорганизмов используют для засева ромышленных ферментеров.**

Вторая стадия:

Выращивание чистой культуры – проводят в два этапа: выращивание засевного материала в ферментере объемом 3,2 м3 и выращивание чистой культуры в ферментере объемом 50 м3. Чистой культурой микроорганизмов считают биомассу, в которой количество клеток посторонних культур не превышает 5%. Чистую куль-туру микроорганизмов используют для засева промышленных фер-ментеров.



Ферментеры

Третья стадия:

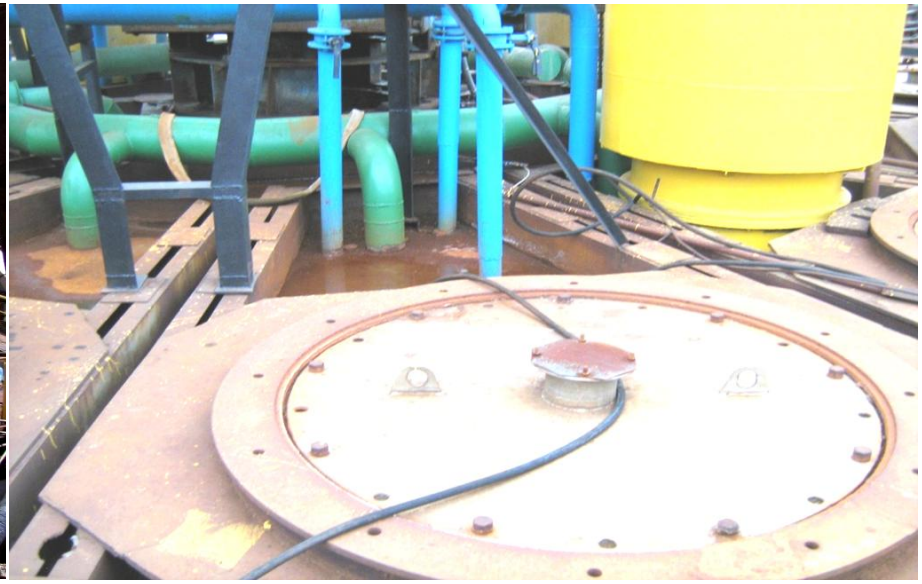
Производственная ферментация – выращивание биомассы – осуществляется в промышленных ферментерах АДР-900-76 поз. ФО-4/10,14. Процесс выращивания провита протекает в нестерильных условиях. Борьбу с посторонней микрофлорой ведут путем мойки, дезинфекции и стерилизации.



Промыш-
ленный
ферментер

Промышленный ферментер









5. Стадия сгущения суспензии биомассы проходит в две ступени:

отделение частиц зерносырья от биомассы на центрифугах;

сгущение суспензии биомассы на сепараторах.





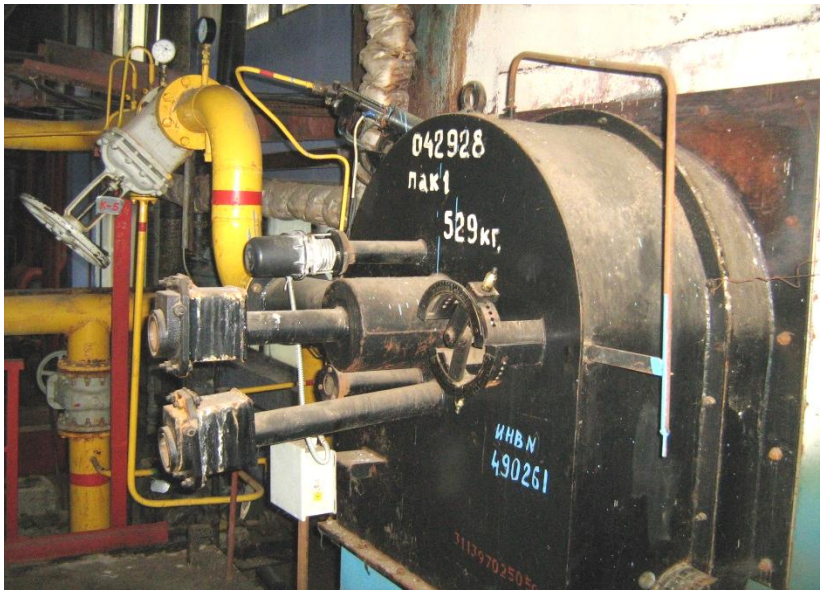
6. Термообработка суспензии биомассы:

Концентрат с содержанием сухих веществ 15,0–28,0% самотеком поступает в сборник на стадию термообработки.



Бакпечка

7. Сушка суспензии биомассы:









8. Очистка газовоздушных выбросов ферментеров:

Для предотвращения попадания клеток микроорганизмов в атмосферу с воздушными выбросами ферментеров узла чистой культуры используется установка мокрой очистки газов (МОГ).



9. Расфасовка и упаковка провитамина







Белковые продукты, получаемые путем ферментации

Грибной белок (микопротеин). **Микопротеин – это пищевой продукт, который состоит в основном из мицелия гриба. Производят его методом непрерывного выращивания штамма Fusarium graminearum, который выделен из почвы.**

В качестве субстрата для его выращивания используется глюкоза, получаемая из кукурузного крахмала, и другие питательные вещества, а также аммиак и аммонийные соли, как источники азота.

После завершения ферментации культуру подвергают термообработке для уменьшения содержания РНК и посредством вакуумного фильтрования отделяют мицелий.

Используется микопротеин при производстве колбас для замены основного сырья.

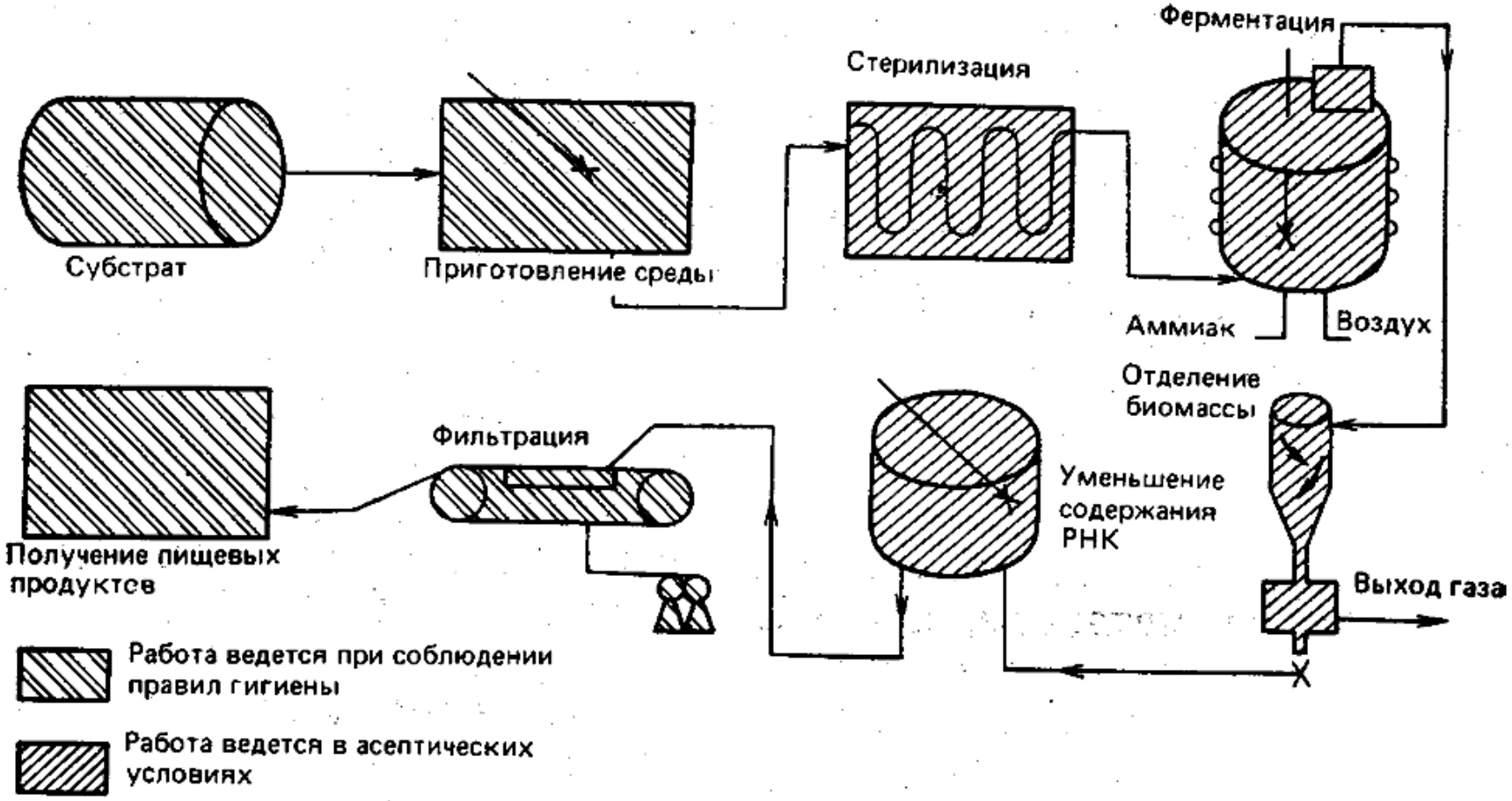


Рис. 3.4. Схематическое изображение производства микопротеина.

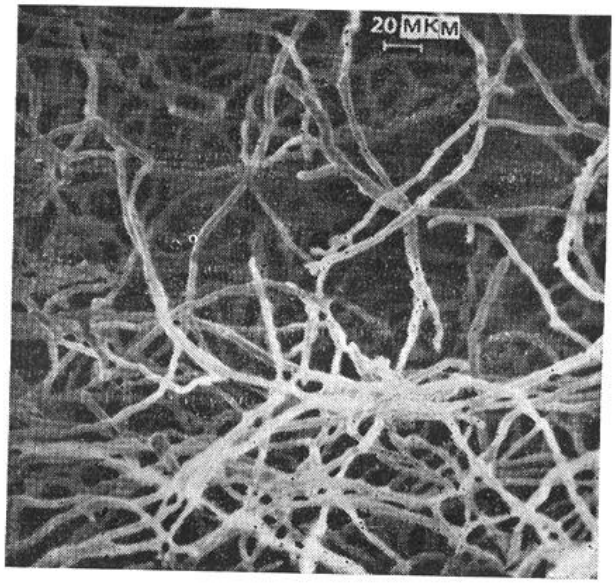


Рис. 3.5. Строение гиф *Fusarium graminearum*. Микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа.

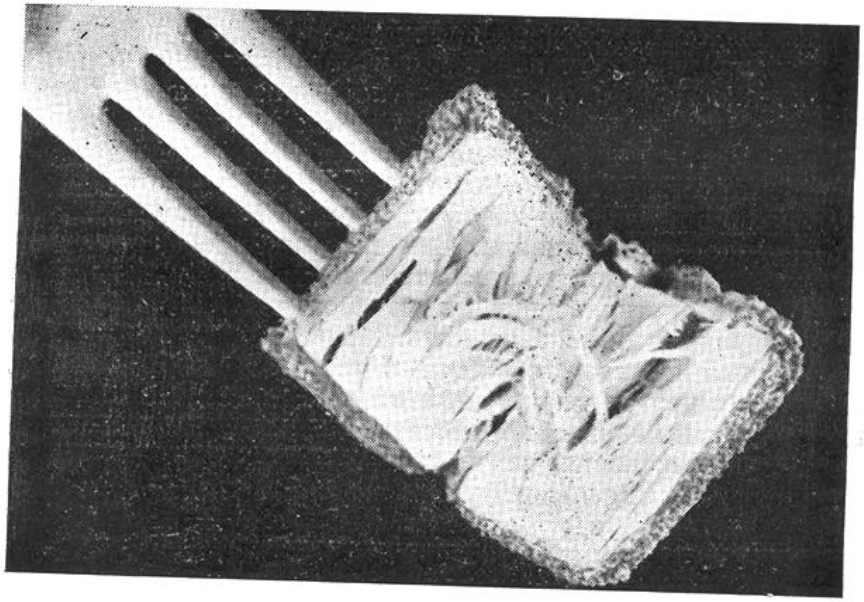


Рис. 3.6. Так выглядит искусственная пища из грибного белка микопротеина.

Фирма Hoechst выпускает продукт, произведенный на основе бактерий, растущих на метаноле. Однако, только грибной белок (микопротеин) официально разрешен в пищу людям.

Подходящий субстрат для дрожжей – молочная сыворотка. Одна тонна ее содержит около 10 кг белка и 50 кг лактозы. Белки отделяют и используют для приготовления обезжиренного сухого молока, а жидкие отходы сыворотки можно перерабатывать в обогащенные белками кормовые продукты. Дрожжевой белок повышает питательную и витаминную ценность пищевых продуктов, улучшает их вкус и аромат.

Дрожжи рода Candida хорошо утилизируют молочную сыворотку и их используют для получения биомассы, богатой витаминами и белком.

В США производятся сухие дрожжи Candida utilis – *торутеин* в качестве добавок в продукты питания.

Другими фирмами выпускаются диетические продукты, обогащенные дрожжевым белком “Provtsten T”.

Дрожжи Rhodotorula glutimis вырабатывают каротиноиды и используются для производства пищевых красителей.

Полезным продуктами являются ацидофильно-дрожжевое молоко и творог, сделанный из него. В цельное молоко (2% сахара) вносят 3% суточной культуры дрожжей и выдерживают при 32–33°С в течение 14–17 ч. Полученную закваску добавляют в молоко и выдерживают до свертывания при 33°С еще 5–6 ч. Такой творог богат витаминами B_1, B_2, С и др.

Дрожжевой экстракт (гидролизат пекарских дрожжей) используется в небольшом количестве как вкусовая и витаминная приправа.

Во время второй мировой войны в Германии в пищевых целях выращивали дрожжи Candida, но это производство в дальнейшем не расширялось.

Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности, входят в состав конечного продукта.

БОО почти целиком состоит из микробной биомассы и может содержать микроорганизмы, которые в пище не использовались ранее. Для широкого применения такого белка в пищу сначала необходимо провести дорогостоящие испытания продукта. Это сдерживает широкое их применение непосредственно в пищу людям.

В Германии во время первой мировой войны использовали дрожжи как источник белка для человека и животных. Была разработана промышленная технология культивирования пивных дрожжей Saccharomyces cerevisiae.

- **Сырье для производства кормовой биомассы**

Развитие производства БОО для выработки кормов для животных обусловлен тем, что недостаток белка сдерживает реализацию генетического потенциала современных пород сельскохозяйственных животных и птицы. В то же время, сбалансированное кормление по белку и аминокислотам в комплексе с селекционной работой позволяют достигнуть высоких показателей в птицеводстве.

В возрасте 42-х дней бройлеры лучших кроссов достигали живой массы не менее 1,5 кг при затратах кормов на 1 кг прироста 1,8–1,9 кг. Решается задача в течение 35 дней откорма обеспечить достижение живой массы 1,8–2 кг при затратах корма 1,4–1,7 кг на 1 кг прироста.

Использование углеводородного сырья для производства кормовой биомассы

Важным источником углерода при получении кормовой биомассы являются очищенные *н*-парафины и нефтяные дистилляты.

***Очищенные жидкие н-парафины* с длиной углеродной цепи С10-С20 с температурами кипения 200-340°С могут использоваться бактериальными и дрожжевыми культурами. Для промышленных целей чаще используются дрожжи Candida guilliermondii, C. maltosa, C. Sake. Они хорошо усваивают *н*-алканы, накапливают до 60 % белка.**

В *н*-парафинах почти не содержится макро- и микроэлементов, в среду необходимо вносить соли: аммоний сульфат, суперфосфат или аммофос, хлорид калия, а также комплекс микроэлементов. Усваиваются субстраты дрожжами только в аэробных условиях. Это требует при ферментации хорошей аэрации системы отвода тепла.

Особенность процесса получения БВК на *н*-парафинах – его крупнотоннажность.

При использовании *нефтяных дистиллятов* **получают одновременно кормовую биомассу, низко застывающее дизельное топливо и биожир.**

В 60-е годы была разработана технология выращивания биомассы дрожжей Candida lipolytika. Эти дрожжи имеют сходство с пищевыми дрожжами Candida utilis, но обладают способностью метаболизировать алканы. Первый в мире завод кормовых дрожжей был построен в СССР в 1971 году. Он работал на *н*-алканах нефти и в год производил 70 тыс. т биомассы. Всего в СССР в 80-е годы работало 86 установок, производящих белок одноклеточных организмов, и 12 из них в качестве источника энергии и углерода использовали углеводородное сырье.

Процесс выращивания микробной биомассы непрерывный: в ферментер подаются органические вещества и минеральные соли, аммиак и воздух; производится отбор клеточной суспензии, которую сепарируют, высушивают и выпускают в форме гранул или пылевидной массы. В биомассе содержится 50-66 % белка. Лизина, количеством которого определяется полноценность белка, содержится около 10 % (в расчете на белок).

В странах СНГ из н-парафинов нефти производится свыше 1 млн т кормовых дрожжей. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК) для кормления животных.

В Беларуси в Новополоцке завод белково-витаминных концентратов запустили в 1978 г. На предприятии работало около 2 тыс. человек. Использовалось 11 ферментеров. В качестве сырья служили неочищенные парафины нефти. Получали кормовой белок *паприн*. Предприятие поставляло на рынок 170 тыс. тонн продукции. В 90-х годах производство было остановлено.

В настоящее время на предприятии используется только один ферментер на растительном сырье (зерно). В 2000 г. получили первый *провит*. В 2004 г. Получено 20 тыс. тонн продукции. Ее рекомендуется добавлять в количестве 2,5 % (до 5 %). Рекомендуется к провиту добавлять минеральную добавку и получать *сапровит*.

Получение микробного белка на низших спиртах

В качестве субстрата для культивирования дрожжей или бактерий могут использоваться спирты: *метанол* или *этанол*.

Метанол хорошо растворим в воде, легко удаляется из готового продукта вследствие высокой летучести. Биомасса, полученная на метаноле, не содержит нежелательных примесей. В молекуле метанола содержится кислород, что снижает тепловыделение при ферментации, уменьшаются затраты на охлаждение.

В Великобритании (компания "ICI") построен ферментер емкостью 5600 $м^3$, в котором выращивают бактерии Methylophilus methylotrophus, используя в качестве сырья метанол. Это самая крупная установка в мире. Получают в год до 75 тыс. т бактериального белка. Бактериальная масса – прутин выпускается в фороме гранул светло-коричневого цвета.

Бактерии используют метанол с большим выходом биомассы по сравнению с дрожжами. Однако дрожжи имеют ряд технологических преимуществ перед бактериями. Поэтому предлагается объединить достоинство обоих микроорганизмов в одной клетке с помощью биотехнологии рекомбинантных ДНК путем переноса гена, катализирующего первичное окисление метанола, из бактерий в дрожжевую клетку и создания условий для его экспрессии.

Использование углеводного сырья для получения биомассы

Гидролизаты растительных отходов, пергидролизаты и сульфитный щелок **– отходы целлюлозно-бумажной промышленности – используются в качестве источника энергии и углерода для производства дрожжей, или же для превращения этих моносахаридов в этанол с последующей трансформацией его в дрожжевую биомассу. Основное достоинство этих технологий – наличие возобновляемого источника сырья, а также возможность создания безотходной технологии переработки растительных продуктов. Недостаток – значительные затраты на проведение гидролиза.**

Гидролизаты состоят из смеси пентоз и гексоз. В сульфитных щелоках имеются в небольших количествах все необходимые для роста дрожжей минеральные вещества. Содержатся и органические кислоты: уксусная и муравьиная. Недостающие количества азота, фосфора и калия вводятся в виде раствора солей аммофоса, хлорида калия и сульфата аммония.

В бывшем СССР первый завод по производству кормовых дрожжей был пущен в 1935 г. Дрожжи выращивали на гидролизатах из отходов древесины и другого целлюлозосодержащего растительного сырья (солома, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности, пивная дробина, виноградные выжимки, малоразложившийся торф). В результате гидролиза этого сырья образуются легкоусвояемые для микроорганизмов формы углеводов.

В настоящее время биотехнологической промышленностью России на основе гидролиза растительного сырья производится 600 тыс. т. сухой массы кормовых дрожжей для сельского хозяйства.

При повышенном давлении и температуре в результате кислотного гидролиза 60–65% полисахаридов (клетчатка, гемицеллюлоза, пентозаны) превращается в моносахариды. Полученный гидролизат отделяют от лигнина, а избыток кислоты нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов. Такая питательная среда используется для выращивания кормовых дрожжей в специальных ферментерах.

На таком сырье культивируют промышленные штаммы-продуценты дрожжей Candida utilis, C. Scottii, C. Tropicalis. Дрожжи утилизируют уксусную кислоту совместно с сахарами в такой последовательности: глюкоза>уксусная кислота>манноза>ксилоза>галактоза>арабиноза. Ферментацию осуществляю в эрлифтных апаратах объемом 320 и 600 м3.

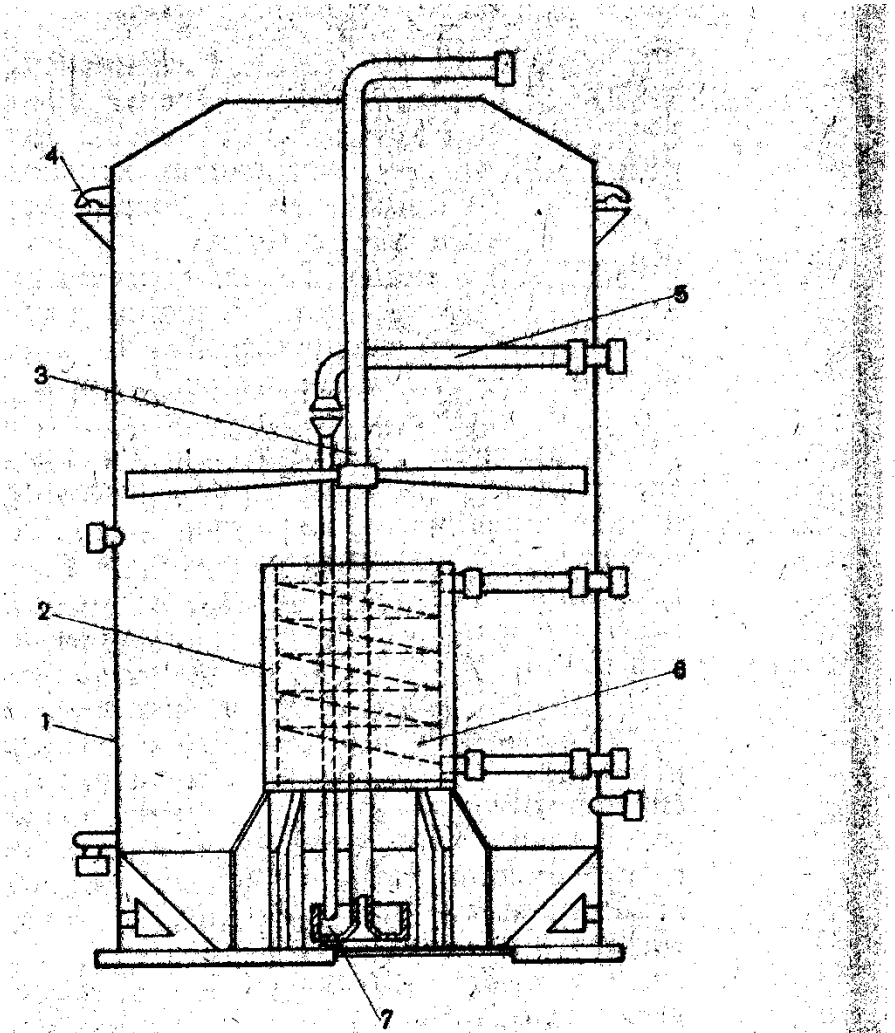


Рис. 25. Схема эрлифтного ферментера объемом 600 м³ (по И. И. Бортникову, А. М. Босенко, 1982)

***Культивирование микроорганизмов на гидролизатах торфа*. Гидролизаты торфа содержат большое количество легкоусвояемых моносахаров (пентоз) и органических кислот. Гидролизат торфа разбавляется отработанной культуральной жидкостью, и в эту смесь дополнительно вводятся небольшие количества суперфосфата и хлорида калия; источником азота служит аммиачная вода. На такой культуральной жидкости культивируются дрожжи Candida tropicalis. Процесс культивирования проводят в двух последовательно соединенных ферментерах по схеме, аналогичной и для гидролизатов растительного сырья.**

- ***Зерно-картофельная и мелассная барда также может быть использована для получения кормовой биомассы. В барде содержится до 12 % сухих веществ, из которых значительную часть составляют карбоновые кислоты, редуцирующие вещества, аминокислоты, глицерин и другие спирты. В барду добавляют свекло-сахарную мелассу, кукурузный экстракт и другие углеродсодержащие корма. Культивируют C. Guilliermondii.***

Очистка получаемых продуктов

Продукты микробиологического синтеза (клетки, споры или метаболиты) поступают из биореактора в виде водных суспензий или растворов. В них невысокое содержание основного компонента и много различных примесей. В большинстве промышленных производств, использующих клетки микроорганизмов без их предварительной иммобилизации, в качестве первого этапа переработки культуральной жидкости производят отделение биомассы продуцента от жидкой фазы, которая затем также подвергается переработке, если она содержит нужные метаболиты.

В тех производствах, где целевым продуктом являются клетки как источник белка, культуральная жидкость (бесклеточная) не перерабатывается, а подвергается очистке, позволяющей использовать водную фазу многократно и снизить образование сточных вод.

Технологические приемы, используемые для отделения клеток от среды, в сильной степени зависят от свойств продуцента и определяются конечной целью производства.

Так, при получении пищевой или кормовой биомассы интерес представляют лишь сами клетки, все остальное можно рассматривать как отход. Поэтому на стадии выделения ставится задача возможно более полного отделения клеток от жидкой фазы. Однако и в этом случае технология получения хлебопекаренных дрожжей — сахаромицетов или кормовых дрожжей на основе углеводов и углеводородов — сильно различается.

Способность сахаромицетов флотироваться и относительно большие размеры их клеток позволяют после сгущения биомассы флотацией отделить клетки фильтрованием на обычных барабанных вакуум-фильтрах. В дальнейшем биомассу, снятую с фильтра, подвергают прессованию и получают продукт с высоким содержанием живых клеток, имеющих хорошую хлебопекаренную активность («подъемную силу»).

Несмотря на близость по целому ряду признаков к сахаромицетам дрожжи рода *Candida,* служащие источником кормового белка, плохо флотируются и фильтруются; это заставляет резко изменить методы выделения биомассы. Если для так называемых гидролизных дрожжей, выращенных на гидролизатах древесины, можно использовать флотацию в качестве первой стадии выделения, то для дрожжей, растущих на углеводородах, а также для бактерий-продуцентов белка на основе метана или метана или метанола первым этапом сгущения культуральной жидкости служит сепарация. Это объясняется тем, что очень небольшая разность плотностей биомассы и водного раствора питательных веществ и метаболитов может быть эффективно использована для разделения только в поле центробежных сил. Однако и после нескольких, обычно двух-трех, ступеней сепарации удается довести концентрацию клеток до 75 — 80 г АСВ/л, т. е. отделить 80 - 100% имеющейся воды.

Трудность дальнейшего сгущения биомассы дрожжей и бактерий заставляет обычно отказаться от получения их в чистом виде и удалять остальную воду путем выпаривания, оставляя все компоненты жидкой фазы в конечном продукте. Эта цель достигается последовательным применением операций выпарки, как правило, вакуумной и многокорпусной для экономии энергии, а далее сушки, чаще всего распылительной. Белковый продукт называют белково-витаминным концентратом, однако его получение становится следствием не столько экономической или кормовой целесообразности, сколько трудностей, возникающих при разработке технологии отделения клеток от водной фазы и учета того обстоятельства, что биомасса перед ее использованием в качестве источника белка во всех случаях не должна содержать живых клеток.

В последнее время существенный прогресс в выделении продуктов метаболизма из культуральных жидкостей достигнут благодаря применению мембранной технологии, прежде всего процессов микрофильтрации и ультрафильтрации через полимерные мембраны со специально подобранным размером пор. Таким способом удается полностью удалить клетки из культуральных жидкостей, концентрируя их микрофильтрацией и получая фильтрат, составляющий 90% и более (по объему) от исходной жидкости и абсолютно не загрязненный клетками. При использовании ультрафильтрации бесклеточная жидкость может быть отделена от крупных, например белковых, молекул, не проникающих через мембрану с диаметром пор 5—45 нм. Таким методом в производстве аминокислот удается добиться значительного осветления раствора, поскольку окрашенные примеси оказываются в концентрате и не мешают выделению аминокислоты из пермеата.

- К аналогичному приему приходится прибегать и в производстве бактериальных энтомопатогенных препаратов и удобрений. Конечный продукт— споры и токсины или живые бактерии – удается получить в активной форме, лишь в принципе отказавшись от выделения их из культуральной жидкости: содержимое биореактора после соответствующей подготовки выпаривают и далее сушат в условиях, обеспечивающих жизнеспособность конечного продукта. Таким образом, кроме основных целевых компонентов в сухом продукте оказываются и все нелетучие ингредиенты культуральной жидкости, в том числе и неутилизированный субстрат, что может отразиться на слеживаемости и способности продукта к хранению.

- **Особенно сложные проблемы решаются технологами при выделении и очистке какого-либо из целевых метаболитов, например аминокислоты, фермента, антибиотика. Кроме отделения биомассы продуцента приходится использовать часто очень сложный и, как правило, не типовой, а индивидуальный (для данного конкретного продукта) набор стадий, позволяющих выделить вещество достаточной степени чистоты из культуральной жидкости. Обычно в этих случаях принимается решение пожертвовать биомассой продуцента, накопившейся к концу ферментации, если биомасса не содержит заметных количеств целевого вещества.**
- **В большинстве конкретных процессов биомассу отделяют осаждением, добавляя известь или другие твердые компоненты, осадком которых увлекаются клетки или мицеллий.**

- Полученная бесклеточная культуральная жидкость перерабатывается одним из подходящих способов. Например, в производстве ферментных препаратов — это чаще всего экстракция, осаждение из растворов органическим растворителем (спиртом и т. п.). или высаливание добавкой сульфата натрия и других солей с высокой растворимостью в воде. Последующая очистка ферментов может быть осуществлена повторными операциями осаждения или даже перекристаллизацией, хотя последняя в этих производствах применяется относительно редко.
- При промышленном биосинтезе аминокислот, напротив, индивидуальный продукт можно получить только путем кристаллизации из растворов, однако сами растворы получаются, как правило, лишь с помощью ионного обмена. Комбинируя стадии пропускания бесклеточной культуральной жидкости, иногда после предварительного обесцвечивания, например, активными углями, через колонны, заполненные катионитом и анионитом с соответствующим подбором pH среды, добиваются осаждения

- аминокислоты обычно на анионите и далее элюируют ее крепким раствором аммиака. Из полученного элюата после подготов* in «шрмилние, иногда дополнительное обесцвечивание) произв(/мм кристаллизацию целевой аминокислоты, возвращая маточн*
- м рецикл.
- Получение антибиотиков не отличается принципиально с туч описанных примеров, однако в этом случае часто прихс л in ги использовать еще более широкий набор приемов, вклк ч,нощи и и экстракцию, и ионный обмен, и кристаллизацию.
- В последнее время существенный прогресс в выделении продуктов метаболизма из культуральных жидкостей достигну благодаря применению мембранной технологии, прежде всего процессов микрофильтрации и ультрафильтрации через полимерные мембраны со специально подобранным размером пор. Таким способом удается полностью удалить клетки из культуральных жидкостей, концентрируя их микрофильтрацией и получая фильтрат, составляющий 90% и более (по объему) от исходной жид ног in и абсолютно не загрязненный клетками. При использб и.'мши ультрафильтрации бесклеточная жидкость может быт] о»/мл/юна от крупных, например белковых, молекул, не проникаю hi и ч через мембрану с диаметром пор 5—45 нм. Таким методол и производстве аминокислот удается добиться значительного освет и шш раствора, поскольку окрашенные примеси оказываются *i* мммимгграте и не мешают выделению аминокислоты из пер-
- Мг,Ц«'|. ^

Новые исключительно интересные возможности открываются при совместном применении растворимых полимеров с функцио-м,-|.'||.иыми группами и ультрафильтрационных мембран. Правиль: ими выбор химической природы растворимого полимера позволя-«| эффективно и обычно обратимо связывать низкомолекуляр-нме компоненты раствора (аминокислоты, антибиотики) с поли-мером. Полученный комплекс легко концентрируется и далее о|мывается от всех несвязанных примесей ультрафильтрацией, «- 'in молекулярная масса полимера подобрана так, чтобы он и проходил через мембрану. При необходимости комплекс ц иле концентрирования и промывки может быть разложен

- ютветствующим реагентом и полимер возвращен на комплек-
- юбразование. В ряде случаев оказывается выгодным исполь-» тать непосредственно комплекс, если входящий в него поли-iv ер относительно недорог и неядовит, как это характерно, и.ч пример, для карбоксиметилцеллюлозы.
- В последние годы своеобразная техническая задача возникла в связи с необходимостью выделения и глубокой очистки про-дуктов,, находящихся внутри клеток продуцента, полученного методами генетической инженерии. Примером могут служить процессы получения интерферонов, гормона роста и т. д. В тако-ю рода производствах вводится стадия разрушения клеточных оболочек '(дезинтеграции биомассы), поскольку целевые веще-• гва не секретируются в культуральную жидкость; обычно для

ИНТЕРФЕРОНЫ, ВАКЦИНЫ И ГИПЕРИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ

Цитокины. Интерфероны

Вакцины и сыворотки

Молекулярный уровень
Цитокины

цитокины – это белковые молекулы (протеины и пептиды, в т.ч. гликозилированные), с помощью которых клетки иммунной системы могут обмениваться друг с другом информацией и осуществлять координацию действий.

Открыты более 200 разнообразных цитокинов:

- *интерфероны*
- *интерлейкины*
- *хемокины*
- *колониестимулирующие факторы*
- *факторы некроза опухолей*
- *трансформирующие факторы роста и др.*

Интерфероны

Классификация и эффекты интерферонов (ИФН)

ИФН I типа: *-альфа(α), -бета(β), -дельта(δ), -эпсилон(ε), -каппа(к), -омега(ω), -тау(т), -зета(ζ), и др.*

ИФН II типа: *-гамма(γ)*

ИФН III типа: *-лямбда(λ)*

Основные эффекты ИФН

- *Антивирусный*
- *Иммуномодулирующий*
- *Антипролиферативный*

***Лейкоцитарные интерфероны – α-INF*.** **Представлены 20 рекомбинантными вариантами, которые отличаются последовательностью и числом аминокислот в полипептидной цепи (α_1-INF зрелый содержит 166 аминокислотных остатков, а α_2- или αA-INF – 165 остатков).**

***Интерферон, синтезируемый фибробластами соединительных тканей - β-INF*, также содержит 166 аминокислот.**

***Иммунный или γ-INF* – синтезируется в сенсибилизированных Т-лимфоцитах при повторном контакте с митогенами, бактериальными и вирусными антигенами, антисыворотками против поверхностных детерминант лимфоцитов. Содержит 146 аминокислотных остатков.**

Интерфероны **– фактор устойчивости к вирусной инфекции.**

Интерфероны (ИФН, IFN) – группа протеинов или гликопротеинов, которые вырабатываются зараженными вирусами клетками. Молекулярная масса их колеблется от 20–30 до 45–80 кДа.

Сначала эти вещества получали из донорской крови. Это исключало широкое применение их в медицинской практике.

Интерфероны обладают высокой эффективностью против вирусных инфекций, стимулируя как местные, так и системные противовирусные реакции.

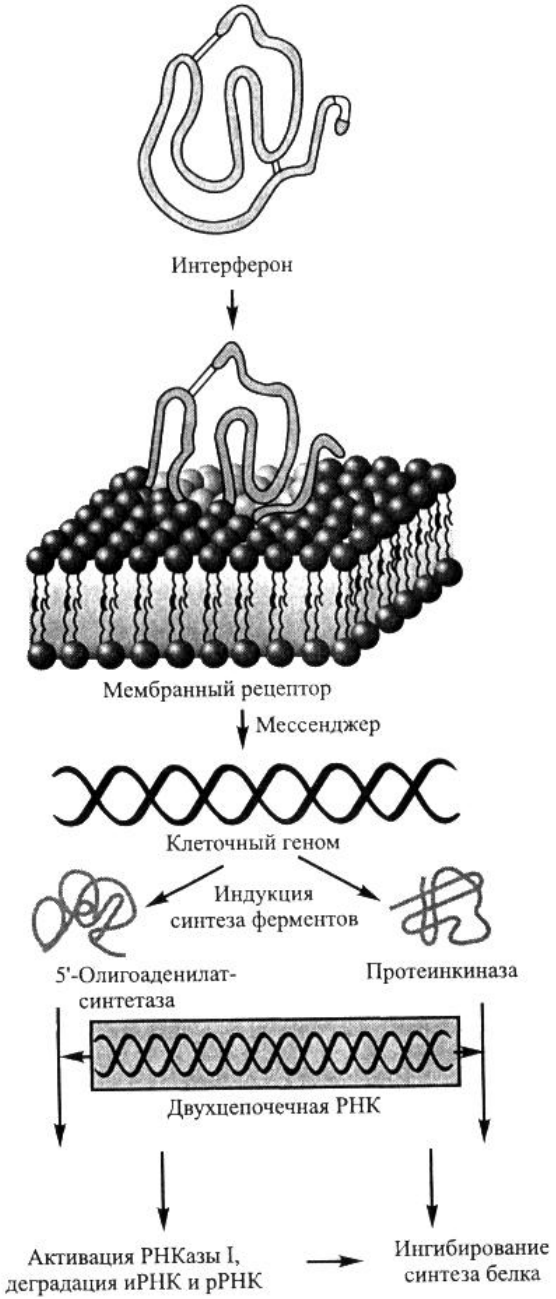
В частности, они оказывают стимулирующее влияние на фагоцитоз, естественные киллерные клетки и макрофаги и неспецифическую резистентность клеток.

Общая иммунологическая реактивность организма адекватна уровню образования интерферонов.

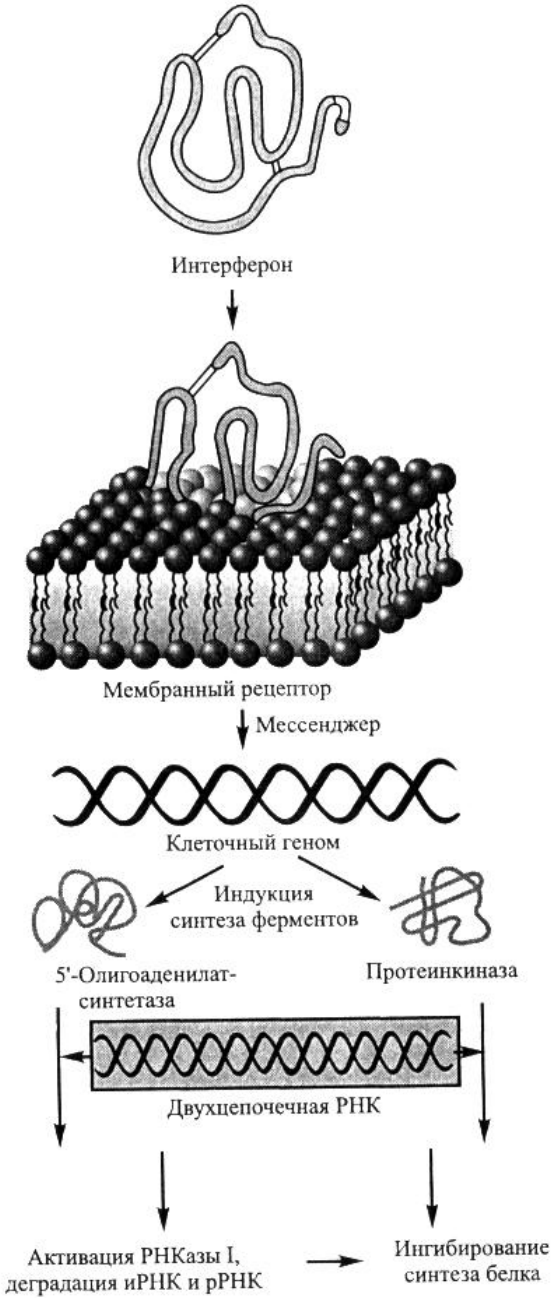
Под влиянием интерферонов повышается цитотоксичность киллерных клеток и увеличивается их количество в ответ на появление клеток с измененной антигенной организацией (инфицирование вирусом, бластоматозная трансформация). Связано это с формированием на поверхности киллерных клеток рецепторов, благодаря чему обеспечивается более плотное прилипание киллеров к клеткам-мишеням.

Связываясь с мембраной здоровых клеток, интерфероны инициируют транскрипцию двух генов и образование двух специфических ферментов.

Ферменты проявляют активность в присутствии двухцепочечной РНК вирионов или РНК, образовавшейся в результате репликации вирусов.



Фермент 2',5' - олигоаденилатсинтетаза катализирует синтез 2',5'-олигоаденилатов (из АТР), которые активизируют клеточную рибонуклеазу I. Протеинкиназа активирует фактор инициации трансляции IF_2. Разрушается вирусная мРНК и инактивируется фактор инициации белкового синтеза в рибосомах, что препятствует экспрессии вирусных генов в клетке-хозяине и размножение вируса.



- **Связываясь с клеточными рецепторами, интерфероны индуцируют синтез двух ферментов - 2',5'-олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы, оба образующихся фермента проявляют свою активность в присутствии двухцепочечных РНК.**
- **Конечным результатом этих процессов является ингибирование биосинтеза белка и размножения вируса в инфицированной клетке, а затем ее лизис.**
- **Доказано, что существуют и альтернативные механизмы действия интерферонов (инактивация тРНК, вмешательство в процессы метилирования и т. п.).**

Перспективы применения интерферонов очень велики. И в медицине и ветеринарной медицине вирусная патология составляет до 90–95% всех инфекционных заболеваний. Однако эффективных э средств, действующих на этиологический фактор, недостаточно.

Интерфероны обладают и другими важными свойствами:

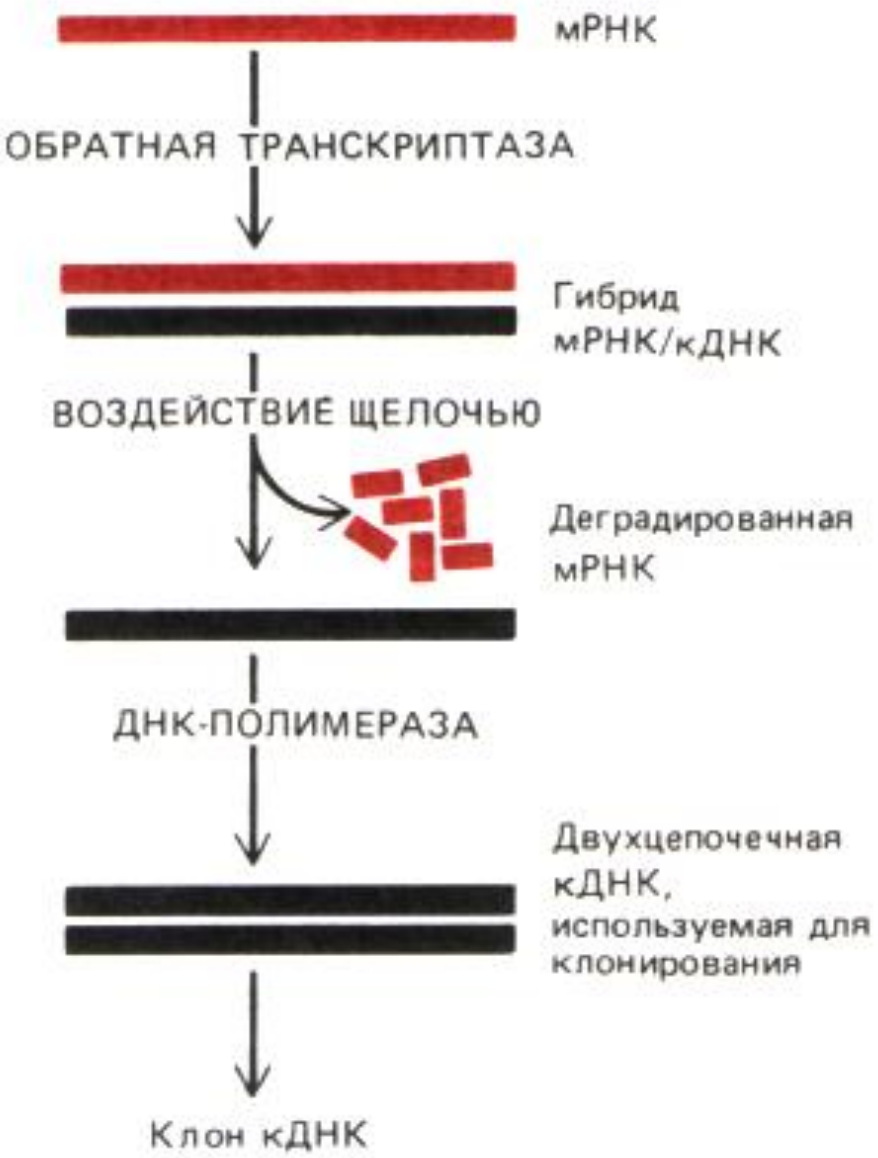
- подавляют пролиферацию клеток и могут быть использованы как противоопухолевые средства;

- модулируют иммунную систему, выступая в качестве регуляторов ее;

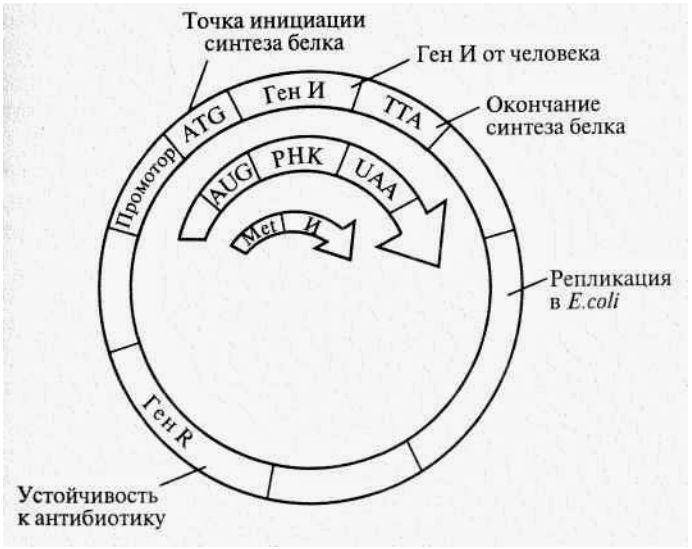
- проявляют антимикробную активность и радиозащитное действие и относительно безвредны для клеток животных в тех концентрациях, которые обеспечивают лечебный эффект.

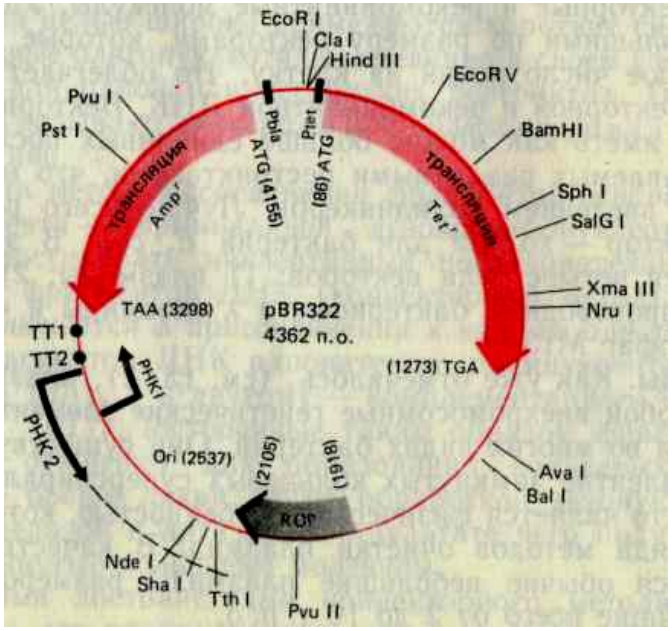
Клонирование генов интерферона

Опыты по переносу генов интерферона человека в бактериальные клетки начаты были в 1977–78 гг. в Германии, Японии и США. В лабораториях этих стран для клонирования использован метод обратной транскрипции мРНК интерферона.



Сначала был клонирован ген фибробластного интерферона (*β-INF*) в составе гибридной плазмиды в клетках E. Coli. Плазмида содержала полный структурный ген β-INF. Нуклеотидная последовательность вставки кодировала полипептид величиной в 187 аминокислот. Это преинтерферон. В процессе секреции его из клетки отщепляется сигнальный пептид в 21 аминокислоту. Зрелый интерферон содержит 166 аминокислот.





Ген α-INF не содержит интронов и его можно извлечь из генома человека. Для клонирования его была использована поли(А)-мРНК – информационная аденилированная РНК, полученная из клеток лейкоцитов, индуцированных вирусом Сендай.

Полученная двуспиральная ДНК была снабжена олиго-dG-концами и отожжена с ДНК плазмиды pBR322, расщепленной рестриктазой Pst1 и содержащей олиго-dC-концы. Плазмида несет в составе гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину. Вставка инактивировала ген устойчивости к ампициллину. Поэтому отбор гибридных плазмид осуществлялся по признаку устойчивости к тетрациклину.

Синтезируется интерферон в виде предшественника и при созревании и секреции из клеток отщепляет сигнальную последовательность в 23 аминокислоты. Зрелый α-интерферон содержит 166 аминокислотных остатков.

Ген иммунного или γ-INF клонирован E. Coli также методом обратной транскрипции. Зрелый γ-интерферон содержит 146 аминокислотных остатков и синтезируется в клетке в виде полипептида из 166 аминокислот с гидрофобной сигнальной последовательностью в 20 аминокислот, которая отщепляется при секреции его из клетки.

В настоящее время налажено промышленное получение интерферонов человека с помощью генов интерферона, клонированных в клетках E. Coli. В качестве хозяина для экспрессии синтетических генов интерферона могут быть использованы кроме E. Coli грамотрицательные бактерии, бациллы, дрожжи.

В США для синтеза *α-INF* человека были использованы генетически измененные клетки дрожжей Saccharomyces cerevisae. Использование вместо бактерий клеток дрожжей позволило увеличить производство интерферона в 10 раз.

Различные стрессовые ситуации вызывают нарушения гомеостаза



MILKFERMER.RU

Зарегистрированные препараты

Препараты цитокинов

-БИФЕРОН-Б (ТУ BY 691457701.018-2015)
-СУБМАСТИН-КРС (ТУ BY 691457701.032-2015)
-БИФЕРОН-С (ТУ BY 691457701.024-2015)
-ЛОФЕРОН (ТУ BY 691457701.012-2014)
-ФАННИФЕРОН (ТУ BY 691457701.010-2014)

Цитокины + антибиотики

-ЭНРОФЛОКСАВЕТФЕРОН-Б (ТУ BY 691457701.009-2014)
-гентаБИФЕРОН-Б (ТУ BY 691457701.031-2015)
-гентаБИФЕРОН-С (ТУ BY 691457701.030-2015)
-ЦИПРОФАН (ТУ BY 691457701.011-2014)

Вакцины и разбавители

-СУХАЯ ЖИВАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ КРС «ТРИХОФИТ ПЛЮС» (ТУ BY 691457701.022-2015)
-РАЗБАВИТЕЛЬ-АДЬЮВАНТ ДЛЯ СУХИХ ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ КРС (ТУ BY 691457701.013-2014)

Препараты для КРС: Энрофлоксаветферон-Б

- ***Смесь бычьего цитокина I типа и антибиотика энрофлоксацина***
- ***Цитокин - мощный антивирусный фактор***
- ***Энрофлоксацин – антибиотик, активный против большого числа грам+ и грам- бактерий***

Преимущества:

- **Одновременная противомикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активности**
- **Лечение смешанных бактериально-вирусных инфекций**
- **Пролонгированный способ действия**
- **Усиленное суммарное действие цитокина и антибиотика**
- **Цитокин нейтрализует отрицательные эффекты антибиотика**
- **Эффективен в лечении нодулярного дерматита!**
- **Профилактика возможных вторичных вирусных инфекций – нет рецидивов!**

Препараты для КРС: Энрофлоксаветферон-Б

- ***Смесь бычьего цитокина I типа и антибиотика энрофлоксацина***
- ***Цитокин - мощный антивирусный фактор***
- ***Энрофлоксацин – антибиотик, активный против большого числа грам+ и грам- бактерий***

Преимущества:

- **Одновременная противомикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активности**
- **Лечение смешанных бактериально-вирусных инфекций**
- **Пролонгированный способ действия**
- **Усиленное суммарное действие цитокина и антибиотика**
- **Цитокин нейтрализует отрицательные эффекты антибиотика**
- **Эффективен в лечении нодулярного дерматита!**
- **Профилактика возможных вторичных вирусных инфекций – нет рецидивов!**

Препараты для КРС: Энрофлоксаветферон-Б

- ***Смесь бычьего цитокина I типа и антибиотика энрофлоксацина***
- ***Цитокин - мощный антивирусный фактор***
- ***Энрофлоксацин – антибиотик, активный против большого числа грам+ и грам- бактерий***

Преимущества:

- **Одновременная противомикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активности**
- **Лечение смешанных бактериально-вирусных инфекций**
- **Пролонгированный способ действия**
- **Усиленное суммарное действие цитокина и антибиотика**
- **Цитокин нейтрализует отрицательные эффекты антибиотика**
- **Эффективен в лечении нодулярного дерматита!**
- **Профилактика возможных вторичных вирусных инфекций – нет рецидивов!**

Препараты для КРС: Энрофлоксаветферон-Б

- ***Смесь бычьего цитокина I типа и антибиотика энрофлоксацина***
- ***Цитокин - мощный антивирусный фактор***
- ***Энрофлоксацин – антибиотик, активный против большого числа грам+ и грам- бактерий***

Преимущества:

- **Одновременная противомикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активности**
- **Лечение смешанных бактериально-вирусных инфекций**
- **Пролонгированный способ действия**
- **Усиленное суммарное действие цитокина и антибиотика**
- **Цитокин нейтрализует отрицательные эффекты антибиотика**
- **Эффективен в лечении нодулярного дерматита!**
- **Профилактика возможных вторичных вирусных инфекций – нет рецидивов!**

Препараты для КРС:
Биферон-Б

- ***Смесь бычьих цитокинов I и II типа в пролонгирующей основе***

- ***Антивирусная, антибактериальная, антипаразитарная, иммуностимулирующая активности***
- ***Иммуностимуляция глубокостельных и отелившихся коров***
- ***Антивирусная санация быков и коров перед отбором спермы или покрытием***
- ***Стимуляция высокопродуктивных коров***
- ***Усиление колострального иммунитета***
- ***Усиление действия вакцин и сывороток***
- ***Без сроков выдержки по молоку и мясу!***
- ***Лечение и неспецифическая профилактика нодулярного дерматита!***

Препараты для КРС: Гентабиферон-Б

- ***Смесь бычьих цитокинов I и II типа и антибиотика гентамицина в пролонгирующей основе***
- ***Гентамицин – антибиотик, активный против большого числа грам+ и грам- бактерий***
- ***Одновременная противомикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активности***
- ***Лечение смешанных бактериально-вирусных инфекций***
- ***Пролонгированный способ действия***
- ***Усиленное суммарное действие цитокинов и антибиотика***
- ***Эффективен в лечении нодулярного дерматита!***

www.probiotex.ru

Препараты для КРС: Субмастин-КРС

- ***Смесь бычьих цитокинов I и II типа, витамина А и компонентов, составляющих ноу-хау***
- ***Снижение содержания соматических клеток в молоке, профилактика и лечение субклинического (хронического) мастита до 1 млн. ССК***
- ***2-3 внутримышечных инъекции через 24 часа***
- ***Не требует сроков выдержки по молоку и мясу!***
- ***Не содержит антибиотиков!***

Препараты для КРС: Трихофит Плюс

- высокая напряженность иммунитета создается в результате **однократного** введения вакцины
- вакцина пролонгированного способа действия
- обладает высокими терапевтическими качествами
- не вызывает поствакцинального синдрома у телят

Препараты для КРС: Трихофит Плюс

- высокая напряженность иммунитета создается в результате **однократного** введения вакцины
- вакцина пролонгированного способа действия
- обладает высокими терапевтическими качествами
- не вызывает поствакцинального синдрома у телят

Препараты для свиней: Биферон-С

- ***Смесь свиных цитокинов I и II типа в пролонгирующей основе***
- ***Антивирусная, антибактериальная, антипаразитарная, иммуностимулирующая активности***
- ***Усиление колострального иммунитета***
- ***Усиление действия вакцин и сывороток***
- ***Без сроков выдержки по мясу!***

Препараты для свиней: Гентабиферон-С

- ***Смесь свиных цитокинов I и II типа и антибиотика гентамицина в пролонгирующей основе***
- ***Гентамицин – антибиотик, активный против большого числа грам+ и грам- бактерий***
- ***Одновременная противомикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активности***
- ***Лечение смешанных бактериально-вирусных инфекций***
- ***Пролонгированный способ действия***
- ***Усиленное суммарное действие цитокинов и антибиотика***

Препараты для лошадей: Лоферон

- ***Видоспецифический биопрепарат, созданный специально для лошадей, на основе рекомбинантного лошадиного цитокина I типа***
- ***Профилактика и лечение заболеваний вирусной и бактериально-вирусной этиологии***
- ***устранение иммунодефицитных состояний, усиление действия антибиотиков, эффекта вакцинаций и иммунных сывороток***
- ***антистрессовый фактор при перевозке, соревнованиях, проблемах кормления, содержания и др.***
- ***Не является допингом!***

Препараты для мелких домашних животных:

Фанниферон

- ***Разработан специально для профилактики и лечения заболеваний мелких домашних животных (собак, кошек) и пушных зверей (лисиц, песцов)***
- ***Действующими веществами является смесь собачьих рекомбинантных цитокинов I и II типа***
- ***Повышает устойчивость животных к возбудителям инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии, неблагоприятным факторам внешней среды, активизирует обменные процессы и клеточный иммунитет, повышает неспецифическую резистентность организма животных***
- ***Успешно зарекомендовал себя в лечении онкологических заболеваний***

Препараты для мелких домашних животных: Ципрофан

- ***Терапевтическая активность препарата определяется смесью собачьего рекомбинантного цитокина I типа и химиотерапевтического средства – ципрофлоксацина***
- ***Назначают при бактериальных и смешанных бактериально-вирусных инфекциях, воспалительных заболеваниях кожи (дерматиты и экземы) и длительно незаживающих ранах, для профилактики посттравматических и постхирургических осложнений***

Вакцины и сыворотки

Назначение и свойства иммунных препаратов

Классификация вакцин

Классические вакцины

Современные вакцины

Назначение и свойства иммунных препаратов

В медицине и ветеринарной медицине применяют иммунные препараты, приготовленные классическим путем и по современным технологиям.

Назначение препаратов – профилактика, диагностика и лечение инфекционных заболеваний. Применяют:

***для иммунопрофилактики* – вакцины и анатоксины;**

***для терапии* – вакцины из убитых микробов (анавакцины, анатоксины, антивирусы, лизаты микробных тел, автовакцины, бактериофаги и др.), а также иммунные сыворотки и сыворотки реконвалесцентов (животных, переболевших инфекционной болезнью);**

***для диагностики* – сыворотки диагностические.**

При изготовлении сывороток – непредсказуемость иммунного ответа.

Титр антител, перекрестные реакции, варьируют от животного к животному и от одной партии сыворотки к другой.

Это обусловлено тем, что используемый антиген может вызывать образование целого набора антител, так как он имеет много эпитопов (антигенных детерминант).

Иммуногенность (способность вызвать выработку антител) определяется:

наличием на поверхности белковой молекулы эпитопов (антигенных детерминант), образованных 6–10 аминокислотами, которые имеют наибольшее сродство к активному центру антитела, окруженного 5–10 аминокислотными остатками.

Эпитопы находятся на поверхности вирусной частицы или бактериальной клетки или на специально синтезированном олигопептиде.

Узнаются определенными клонами лимфоцитов, которые обеспечивают биосинтез антител против данных антигенов.

Классические вакцины – это мало контролируемые сверхкомплексные смеси с большим количеством балластных, в том числе и токсичных компонентов из микробных клеток и питательной среды или же из клеток, в которых выращиваются вирусы.

Для создания иммунитета достаточно антигена с одним – двумя эпитопами без загрязняющих иммунный препарат балластных веществ и токсических примесей.

В большинстве же случаев при вакцинации в организм вводятся сотни сложнейших комплексов, что приводит к тяжелым осложнениям (развитие аллергических реакций, поствакцинальная перестройка и др.).

Более того, изготовленные по классическому (пастеровскому) принципу ослабленные или убитые вакцины вызывают не одинаковый иммунный ответ, а при многих инфекциях такие вакцины оказываются совершенно неэффективными.

При этих инфекциях не возникает иммунитет к повторному заражению и после перенесенной болезни.

Причины отсутствия или низкого иммунного ответа на вакцинацию или на заболевание являются генетически обусловленными. Выявлены гены иммунного ответа (Ir-гены) и гены иммунной супрессии (Is-гены). При введении антигена в организм реакция Ir-генов зависит от того, гены высокого или низкого ответа присутствуют в геноме организма. В одних случаях реакция может быть хорошо выраженной, в других – слабой или же она вовсе не проявится.

В тех случаях, когда в геноме содержится Ir-ген низкого ответа и (или) Is-ген сильной супрессии, получить иммунный ответ изготовленной традиционным методом вакциной не удается.

Индуцирование процесса размножения и дифференциации В-лимфоцита в антителообразующую клетку происходит в результате его контакта с Т-лимфоцитом. Этот лимфоцит должен получить от макрофага стимулирующие сигналы, которые могут сформироваться при взаимодействии антигена и белка, являющегося продуктом Ir-гена. В-лимфоцит узнает антигены самостоятельно.

Классификация вакцин

В настоящее время для профилактики и терапии инфекционных заболеваний человека и животных выпускается сотни бактериальных и вирусных препаратов.

Классические вакцины:

- живые (спонтанно возникающие и искусственно полученные),

- инактивированные физическим или химическим путем,

- химические (из молекулярных антигенов, извлеченных из микробных клеток или их растворимых дериватов, например, токсинов) и анатоксины и токсины.

Современные вакцины:

- из искусственных антигенов,

- субклеточные (рибосомальные) ,

- субединичные и

- генно-инженерные.

Классические вакцины

В зависимости от числа содержащих антигенов, вакцины разделяются на:

- моновакцины (препараты для иммунизации против одной инфекции);
- дивакцины (для иммунизации против двух болезней);
- поливакцины (против нескольких заболеваний); поливакцины называют также комплексными (ассоциированными), если в их состав входят препараты разного типа (против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота).
- поливалентными называют вакцины, когда препарат готовят из нескольких разновидностей (сероваров) возбудителя одного инфекционного заболевания.

- **Живые вакцины изготовляют из наследственно измененных, слабовирулентных (аттенуированных) штаммов бактерий, вирусов, риккетсий – возбудителей болезней. Эти штаммы не способны вызывать у животного заболевание. Но они сохранили свойства размножаться в организме животного и вызывать формирование специфического иммунитета против данного заболевания.**

  Микробные живые вакцины изготовляют путем культивирования эталонных штаммов на твердых (сибиреязвенные и бруцеллезные) или жидких питательных средах (против рожи свиней и холеры кур). Вирусы культивируют в тканях или хорион-аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. Возможно размножение вирусов и в организме животного. Сначала получают маточную культуру, а затем идет выращивание нативной микробной взвеси.

В последние время выращивание бактерий на плотных питательных средах заменено глубинным культивированием в жидких средах. Микробную взвесь накапливают в биореакторах из нержавеющей стали при 37°С при перемешивании и аэрации. Полученную биомассу лиофилизируют.

***Живые бактерийные вакцины*: сибиреязвенная, БЦЖ, бруцеллезная накожная, туляремийная накожная, комбинированная сыпно-тифозная Б, чумная и др.**

Сибиреязвенная вакцина получена Л. Пастером в 1881 г.

В России Л.С. Ценковский в 1883 г. самостоятельно создал такую вакцину. Культура возбудителя выдерживалась в термостате при 42°С в течение 12 и 24 дней. В результате заметно снижалась вирулентность возбудителя и он утрачивал способность образовывать споры.

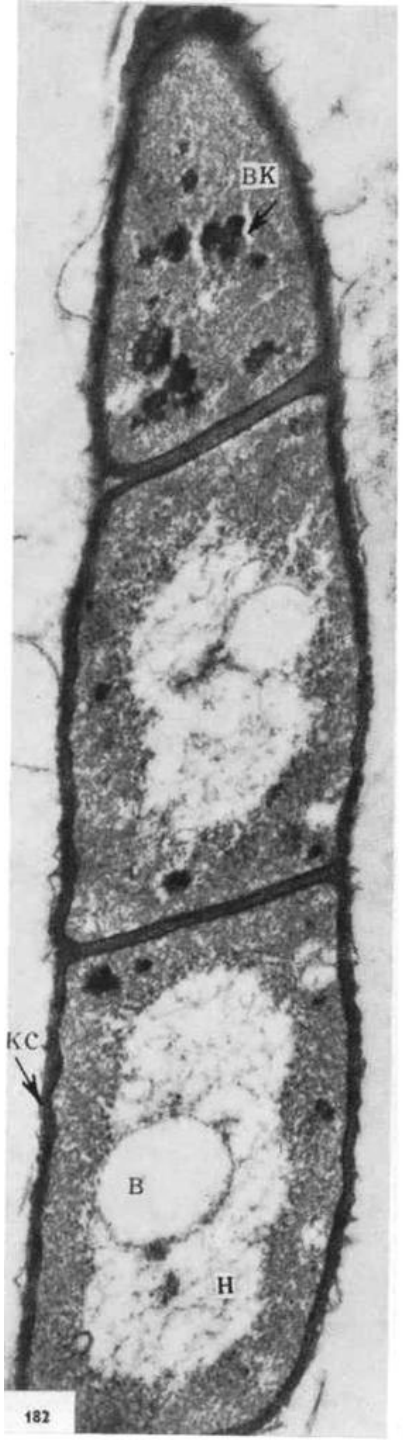
Вакцина БЦЖ (фр. BCG – Bacille Calmette Guerin) получена в 1919 г. А. Кальметом и К. Герином путем длительного пересева микобактерий бычьего типа на картофельно-глицериновой среде с добавлением желчи. В настоящее время она применяется для вакцинации новорожденных (5–7-й день) и вакцинации повторно в 7, 12 и 17 лет при отрицательных туберкулиновых пробах.

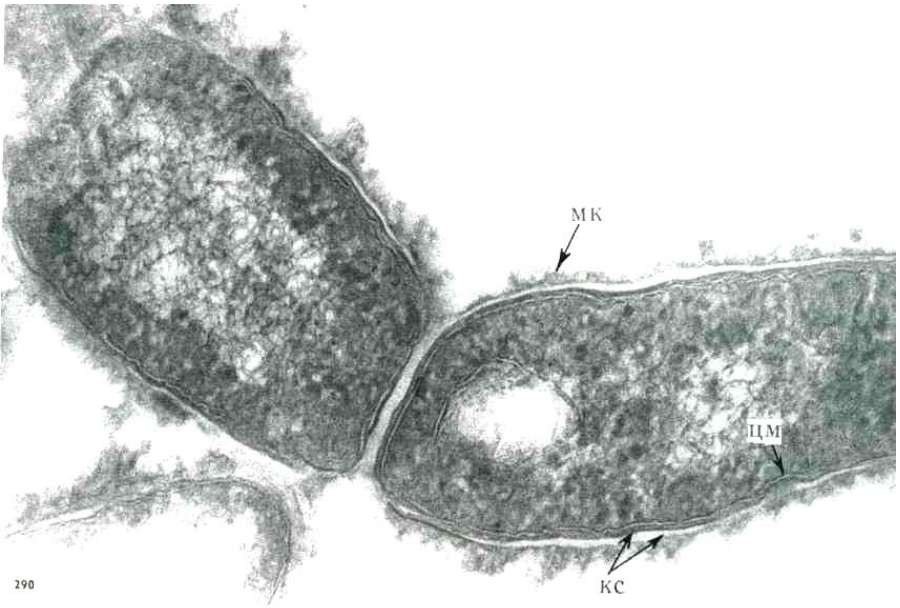
***Вирусные живые вакцины*: полиомиелитная типов I, II, III; коревая, гриппозная, антирабическая, против чумы свиней, против ящура и др.**

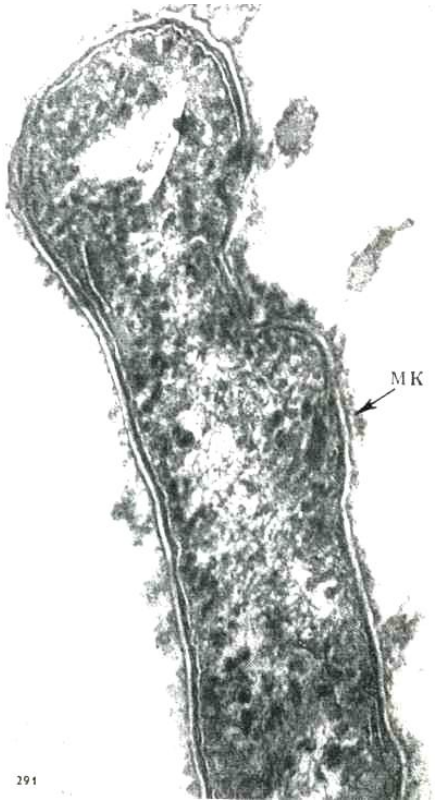
Полиомиелитная вакцина получена в 1956 г. А. Себиным. Вакцинные штаммы вируса всех типов выращиваются на первичных культурах почечных клеток африканских зеленых мартышек. Выпускаются в виде конфет-драже или жидком виде. Вакцинный штамм вируса размножается в кишечнике и может передаваться другим людям, как и при естественном заболевании, вызывая формирования и у них иммунитета.

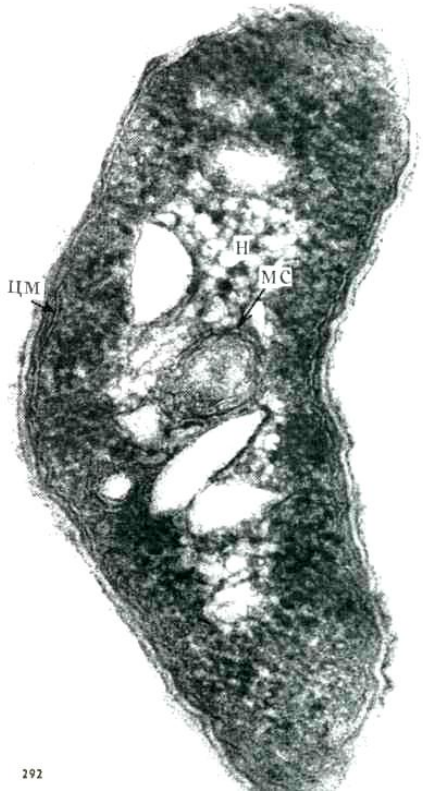
Антирабическая вакцина получена Л. Пастером в 1885 г. путем пассажа вируса бешенства на кроликах. Сейчас применяется вакцина типа Ферми. Готовят ее из суспензии мозга овец, зараженных вирусом.

Делящаяся клетка
Bacillus anthracis.
Видны клеточная стенка, включения, вакуоли, нуклеотид.
X *60 000.*









Mycobacterium tuberculosis

- **Убитые корпускулярные вакцины получают инактивированием бактерий или риккетсий физическими (температура, ультрафиолетовые лучи) или химическими (формальдегид, фенол, ацетон, спирт, тяжелые металлы) методами с сохранением их структуры, т.е. карпускулярности. В соответствии с методом получения, вакцины называют гретыми, формалиновыми, ацетоновыми, спиртовыми, фенольными и т.д.**

Для профилактики заболеваний применяются вакцины: брюшнотифозная спиртовая, коклюшная формалиновая, холерная формалиновая.

Лечебные вакцины: стафилококковая фенольная, гонококковая гретая, дизентерийная спиртовая.

Для терапии нередко применяют аутовакцины, изготовляемые из убитых бактерий или вирусов, выделенных от больного животного. При папилломатозе вымени берут 2–5 г свежей молодой ткани папилломы и тщательно растирают в ступке с таким же количеством стерильного серебристого песка. Тщательно смешивают в пробирке с 60 мл 50%-ного соле-глицеринового раствора. После отстаивания в течение 5–10 мин надосадочную жидкость со взвешенными в ней частицами сливают с помощью сифона, выдерживают при комнатной температуре 2–3 дня, а затем фильтруют через двойной слой марли. Для вакцинации телят берут 25 мл жидкости, из которых 10 мл вводят подкожно, а в случае необходимости через 14 дней остальные 15 мл.

- **Химические вакцины готовят из антигенов, извлеченных из микробной клетки каким либо способом, поэтому нередко называются молекулярными. Получают их путем биосинтеза или химического синтеза**

Химические вакцины по своим иммуногенным свойствам уступают живым вакцинам, однако имеют ряд преимуществ. Они не обладают онкогенностью и при применении их нет опасности реверсии или загрязнения другими микроорганизмами.

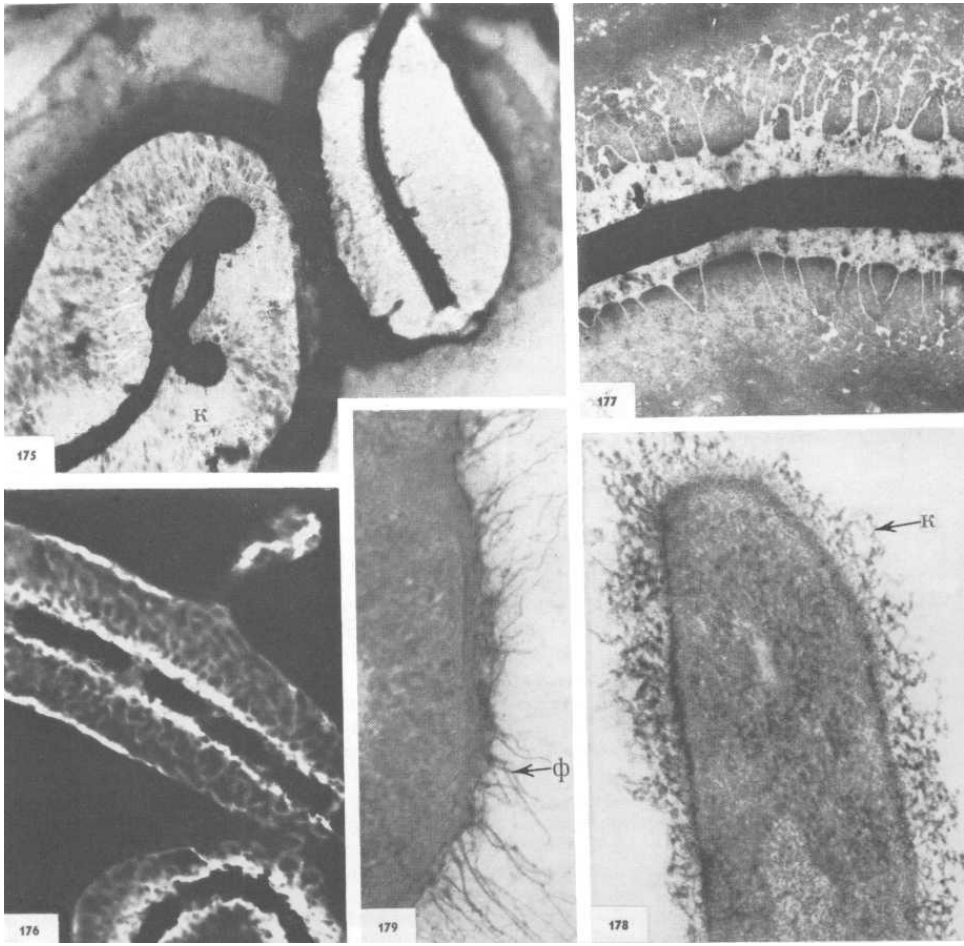
Для создания таких вакцин из микробной клетки выделяют иммунологические активные вещества – протективные антигены, которые способны при введении в организм обеспечивать формирование специфического иммунитета.

Протективные агенты могут находиться на поверхности клеток, в клеточной стенке или на клеточной мембране, или же они являются внеклеточными продуктами жизнедеятельности микробной клетки. С химической точки зрения протективные антигены – это макромолекулы. Размеры молекулы влияют на ее иммуногенность. Полимеризация антигенов может приводить к повышению его иммуногенности.

Считается, что наибольшими антигенными свойствами обладают вещества капсулы, клеточной стенки, жгутиков. Поэтому изолированные нативные микробные субстанции с сохранившейся макромолекулярной структурой обладают большей протективной активностью, чем извлеченные химическим методом комплексы. Расшифрован ряд протективных систем: капсула бактерий, М-протеин стрептококка и др.

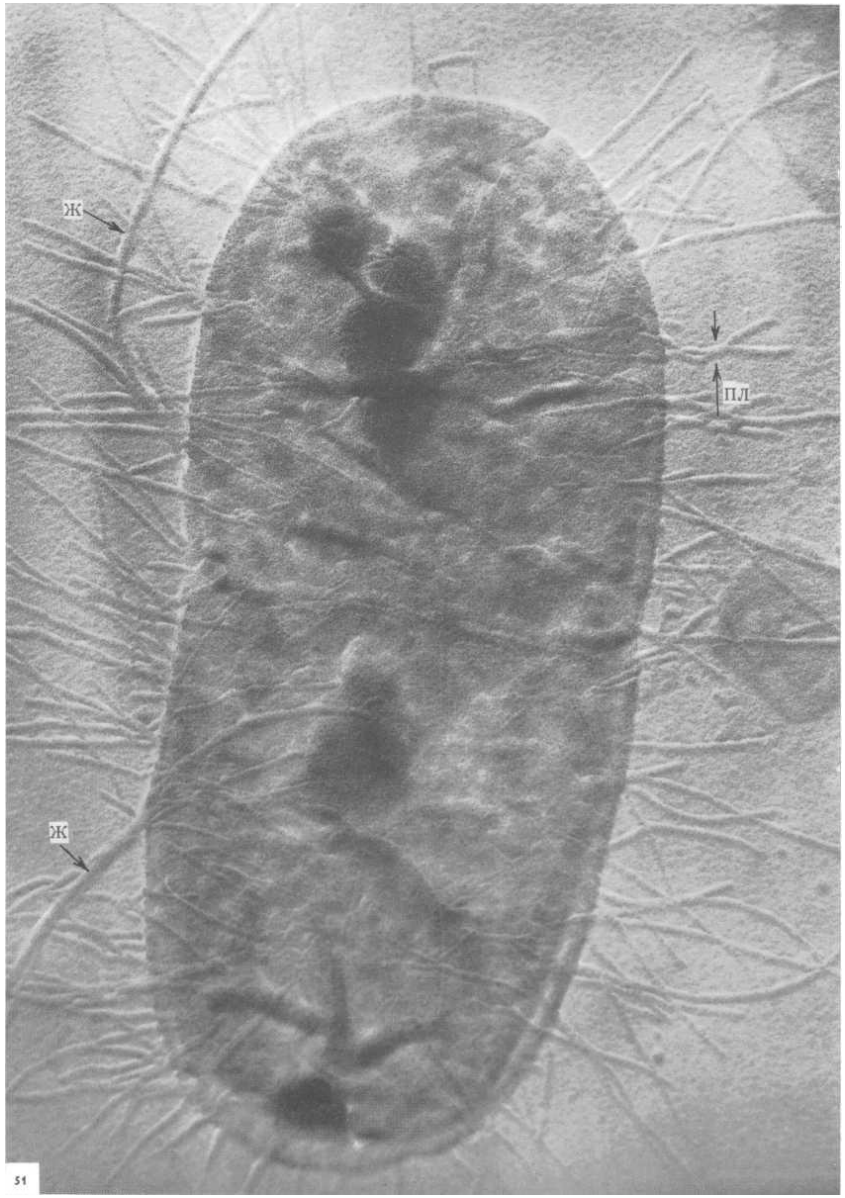
- ***Капсульные клетки Bacillus anthracis с массивной капсулой. Х10 000.***
- ***Капсула электроннoплотная. Наружная граница и внутренний слой ее проницаемы для электронов. Х10 000.***
- ***Фрагмент Bacillus anthracis. Виден внутренний слой капсулы с нитевидными отростками, уходящими в толщу капсулы. Х 15 000.***
- ***На ультратонком срезе сохранился внутренний слой капсулы, окружающий клетку. Х70 000.***
- ***На поверхности клеточной стенки видны тонкие фибриллы капсулы.***

  Х 100 000.



- *Escherichia coli. Штамм K-12 Hfr C.. По периферии бактериальной клетки видно прикрепление жгутиков и пили.*

  X 150 000.



К химическим вакцинам относят и анатоксины.

Анатоксины – безвредные дериваты токсинов, сохраняющие антигенные и иммуногенные свойства. Метод получения анатоксинов был разработан французским бактериологом G. Ramon в 1923 г. Он заключается в комбинированном воздействие на токсины формалина и тепла.

В настоящее время применяются моновакцины дифтерийный анатоксин и столбнячный анатоксин, и ботулинический полианатоксин.

Современные вакцины

Улучшение качества имеющихся высокоэффективных вакцин должно быть направлено на устранение тех отрицательных последствий, которые выявляются при их применении.

- ***Вакцины искусственных антигенов.*** **Для получения этих вакцин необходимо выделить биологически активный антиген, определить его молекулярную структуру и искусственно синтезировать химическим или генно-инженерным путем. Уже созданы вакцины против фага М-2, дифтерийного токсина, стрептококков, вируса гепатита В, вируса гриппа.**

С помощью методов генетической инженерии была создана новая высокоэффективная вакцина против ящура крупного рогатого скота, овец и свиней. Это вирусное заболевание неизлечимо, а заболевшие животные оказываются непригодными в пищу. Для получения вакцины против этого заболевания был использован клонированный белковый антиген вируса ящура.

- ***Субклеточные (рибосомальные) вакцины*. Это препараты, состоящие из рибосом возбудителя болезни. В 1965 году была экспериментально доказана иммуногенность рибосом, содержащих РНК, выделенных из микобактерий туберкулеза. Иммуногенное действие приписывается комплексу РНК-антиген, в котором иммунологическая специфичность определяется антигеном, а РНК влияет на функции клеток иммунитета**

В настоящее время применяется только одна такая вакцина – против пневмонии. Она включает рибосомальный материал четырех микроорганизмов – Str. Pneumoniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Str. Pyogenes.

- **Субъединичные вирусные вакцины изготавливают из отдельных вирусных структур. Наиболее подходящими для этой цели являются вирусы, которые имеют липопротеидную мембрану (вирус гриппа, парамиксовирусы, рабдовирусы и др.). При создании вакцины можно подобрать нужное количество и разнообразие антигенов.**

  Субединичные поливалентные вакцины содержат два гликопротеида, которые избирательно извлекаются из внешней оболочки вириона.

  Субединичная вакцина против вируса гриппа безопасна и менее токсична, чем цельновирионная. Но она слабее по иммуногенности.

В Великобритании ящура не было 34 года, но в 2001 г. болезнь появилась. Пришлось уничтожить 10 млн. голов крупного рогатого скота, чтобы предотвратить ее распространение. Применение вакцин не проводилось, так как они имели ряд недостатков. Возбудитель имеет несколько типов и необходимо было подбирать соответствующую вакцину. После вакцинации невозможно определить, животное вакцинировано, или оно было заражено.

В США, где ящура не было с 1929 года, такие вакцины не могли производиться. В настоящее время в центре PIADC разработана вакцина, которая содержит не весь геном вируса, а ту часть, которая ответственна за образование капсида. Отсутствуют нуклеиновые кислоты, ответственные за инфекционные свойства вируса. Но такая вакцина вызывает выработку иммунитета у животных против болезни. Вакцинированное животное можно определить с помощью простых диагностических тестов и отличить от зараженного животного.

- **Генно-инженерные вакцины.** **Достижения молекулярной биологии и генетической инженерии позволяют обеспечить эффективное использование и нетрадиционных подходов к конструированию новых вакцин против различных заболеваний и, главным образом, против вирусных инфекций (ящур, африканская чума свиней и др.).**

  Современный подход возможно будет строиться на использовании в составе вакцины только тех антигенных детерминант, которые вызывают образование антител. Внедрение вирусных генов, кодирующих соответствующие антигенные детерминанты, в геном бактерии или эукариотической клетки, находящейся в культуре, позволит получать вакцины требуемого состава.

Этапы изготовления современной вакцины:

- выделение возбудителя (вируса) и его размножение;

- установление структуры вируса;

- выделение специфически активной структуры, вызывающей образование антител;

синтез этого фрагмента в условиях лаборатории;

- определение генетического кода синтезированного полипептида;

- конструирование рекомбинантной ДНК и встраивание ее в бактерию.

Успешно реализуется принцип создания искусственных вакцин путем получения макромолекул, которые включают эпитопный компонент и полиионную искусственную структуру, индуцирующую иммуногенез и обеспечивающую обход Т-клеточного и Ir-генного контроля иммунного ответа. Искусственный макромолекулярный комплекс может быть использован в качестве вакцинного препарата против тех инфекций, которые до сих пор относились к категории непобежденных.

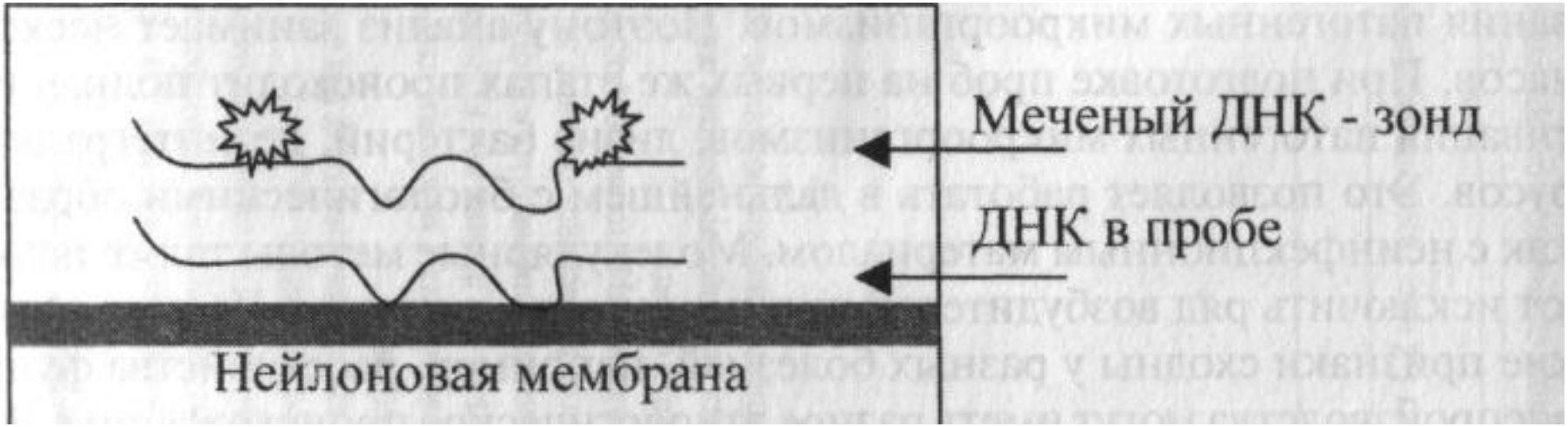
СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

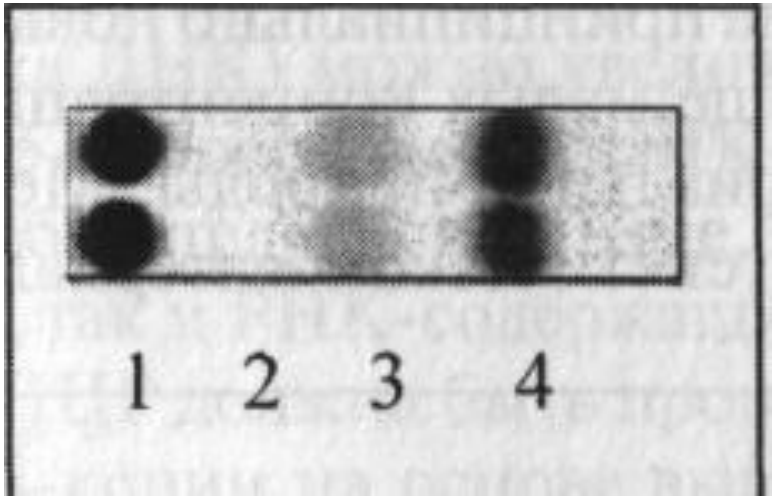
Лабораторные методы диагностики вирусных болезней животных основаны на выявлении вирусных антигенов, вирус-специфических антител или вирусных нуклеиновых кислот. Иммунохимические методы переживают новое развитие с применением высокоспецифичных компонентов - моноклональных антител и рекомбинантных антигенов, а также новых высокоэффективных красителей. Молекулярные методы основаны на поиске и анализе нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) возбудителей заболеваний в органах, тканях, секретах, смывах, взятых от больных и павших животных. Сперма также исследуется на присутствие пато-генных вирусов. Отобранные образцы, как правило, пригодны для класси-ческого вирусовыделения в культуре клеток. Безусловно, это наиболее до-казательный метод, однако он требует времени, вплоть до нескольких дней, чтобы вирус размножился и мог быть идентифицирован. То же относится и к выделению бактериальных культур из клинических образцов на питатель-ных средах. Такие микрооргаризмы как лептоспиры, микобактерии или ба-циллы сибирской язвы не относятся к простым или безопасным объектам для культивирования.

- Назовем некоторые преимущества и возможности молекулярных мето-дов диагностики, которые делают их актуальными. Для анализа берут зара-женные органы и ткани, без дополнительного лабораторного культивиро-вания патогенных микроорганизмов. Поэтому анализ занимает несколько часов. При подготовке проб на первых же этапах происходит полная инак-тивация патогенных микроорганизмов, лизис бактерий, дезинтеграция ви-русов. Это позволяет работать в дальнейшем с биологическими образцами как с неинфекционным материалом. Молекулярные методы также позволя-ют исключить ряд возбудителей при постановке диагноза. Часто клиничес-кие признаки сходны у разных болезней, например, расстройства функции воспроизводства могут иметь разное этиологическое происхождение. В этом случае одну пробу объемом 1 мл возможно одновременно проанализировать на присутствие вируса инфекционного ринотрахеита, вируса диареи КРС, бруцелл, патогенных лептоспир, других инфекционных агентов.

- Возможности молекулярной диагностики простираются дальше простого выявления инфекционных агентов в биологических образцах. Возможно их количественное выявление в органах и тканях на разных стадиях инфекцион-ного процесса, что помогает как в изучении самого процесса, так и позволяет оценить эффективность проводимых лечебных и профилактических мероп-риятий. При помощи видоспецифических ДНК-зондов или праймеров, а так-же с применением расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции возможна видовая или штаммовая дифференциация микроорганизмов одновременно с их выявлением. Наконец, анализ первичной структуры ДНК (секвенирова-ние) позволяет не только определить видовую и штаммовую принадлежность микроорганизмов, но и высчитать генетическое родство с другими штамма-ми, что позволяет зачастую проследить эволюционный путь возникновения данного штамма, историю и географию его распространения.
- Несмотря на серьезные возможности лабораторных методов диагности-ки, они суть вспомогательные средства для постановки диагноза. Для одних инфекций результаты применения этих методов могут привести к оконча-тельным выводам, а для других — лишь служить подтверждением при поста-новке диагноза. Диагноз ставит не метод, а ветеринарный специалист, раз-бирающийся во всех тонкостях инфекционнойс патологии и животновод-ства в целом.

- **Молекулярная ДНК-гибридизация**
- Гибридизация ДНК применяется для непосредственного обнаружения нуклеиновых кислот в биологических образцах. Метод основан на связыва-нии молекулой ДНК своей комплементарной цепи. ДНК-зонд представля-ет собой фрагмент, комплементарный участку генома возбудителя инфек-ционного заболевания. Зонд может быть мечен как радиоактивной меткой (например, изотопами фосфора или серы, излучающими бета - частицы), так и безопасными соединениями, например, биотипом. Метод требует подготовки проб: нуклеиновые кислоты экстрагируют из исследуемых образцов и наносят на нейлоновую или нитроцеллюлозную мембрану в денатурирующих условиях в виде парных пятен. В некоторых модификациях пробоподготовка сведена к минимуму: исследуемую суспен-зию наносят на мембрану в денатурирующих условиях без предварительной очистки нуклеиновых кислот.





- В результате ДНК-гибридизации получают разные по интенсивности сигналы: 1-положительный контроль; 2-отрицательный контроль; 3, 4 - исследуемые образцы

- Метод обладает высокой специфичностью, не боится лабораторной кон-таминации. Метод дает представление об относительных количествах выяв-ляемого микроорганизма в образцах. При использовании радиоактивной метки метод обладает и высокой чувствительностью, однако применение радиоизотопов увеличивает трудоемкость исследований и требования к их проведению. До появления полимеразной цепной реакции (ПЦР) метод гиб-ридизации был, пожалуй, единственным способом выявить специфические гены. Сегодня роль этого метода для фундаментальных исследований нис-колько не снизилась, а в диагностике его вытесняет более чувствительный метод ПЦР. Тем не менее, метод гибридизации и сегодня применяют, на-пример, для выявления вируса инфекционного ринотрахеита в сперме бы-ков-производителей. Интересно, что процесс гибридизации нуклеиновых кислот лежит в основе всех идущих на смену методов молекулярной диагно-стики: ПЦР, ПЦР в реальном времени (real-time PCR), секвенирования, молекулярных микрочипов. Об этих методах в следующих разделах.

- **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**
- ***Полимеразная цепная реакция (ПЦР) —это многократно повторяемое проведение полимеразной реакции in vitro, в пробирке, это увеличение числа копий определенного участка ДНК, контролируемое человеком.***
- Метод полимеразной цепной реакции был открыт в 1984 г. Кэри Мюллис впервые показал возможность амплификации (многократного увеличения числа копий) участков ДНК в пробирке в процессе реакции, главной особенностью которой являются повторяющиеся температурные циклы. В 1985 году были показаны практические возможности применения ПЦР: впервые амплифицировали фрагмент ДНК ф-глобиновый ген) с использованием термочувствительной ДНК-полимеразы (фрагмента Кленова). В 1987 амплифицировали участки ДНК человека. Начиная с 1988 г., ПЦР стали проводить с использованием термостабильной ДНК-полимеразы, реакция получила широкое распространение. Уже в 1989 г. журнал «Science» назвал ДНК-полимеразу молекулой года. Однако мало кто знает, что в 1980 г. термостабильная ДНК полимераза была выделена в России С. Городецким.

- Метод ПЦР позволяет определять малые и сверхмалые количества нуклеиновых кислот, следовательно, ПЦР поднимает лабораторную диагностику на принципиально новый уровень — уровень прямого обнаружения исчезающе малых концентраций инфекционного агента как вирусной, так и бактериальной природы. Методом ПЦР можно определить любое изменение в генетическом материале, даже единичную генетическую мутацию.

1980 - В России выделена термостабильная ДНК-полимераза (Городецкий)

1984 – Mullis (США) предложил принцип амплификации ДНК

1985 Saiki с соавторами (США) впервые амплифицировал фрагмент ДНК (β-глобиновый ген) с использованием термочувствительной ДНК-полимеразы

1987- Mullis и Falloona амплифицировали ДНК человека

1988 –ПЦР стали проводить с использованием термостабильной ДНК полимеразы

Внедрение метода ПЦР в лабораторную практику стало одним из наиболее важных событий в медицине и молекулярной биологии в последние 15 лет

- Ведущие фирмы мира уделяют огромное внимание развитию методов П ЦР-диагностики. В настоящее время ПЦР широко используется в различ-ных областях, таких как молекулярная биология, медицина, ветеринария, судебно-медицинская экспертиза, палеонтология, пищевая промышлен-ность, контроль состояния окружающей среды. Для диагностики инфекци-онных болезней животных важно, что этот молекулярный метод, как и ДНК-гибридизация, выявляет нуклеиновые кислоты в биологических пробах.

- **При проведении ПЦР для диагностики необходимым этапом является взятие проб для анализа. Первым шагом является выделение нуклеиновых кислот (ДНК или РНК). ДНК и РНК можно выделять из различных биоло-гических образцов (крови, мочи, мокроты, костной ткани, биопсийного материала и даже из одиночного волоса). С помощью двух специфических праймеров-зондов и фермента (термостабильной ДНК-полимеразы) количество фрагмента-мишени (выбранного участка ДНК) можно увеличить в миллионы раз. Таким образом, через выявление специфической ДНК мож-но определить присутствие инфекционного возбудителя в организме. С по-мощью метода ПЦР можно выявлять как ДНК, так и РНК-содержащие ви-русы. При детекции РНК, перед проведением ПЦР должна быть проведена реакция обратной транскрипции (синтез ДНК-копии на основе выделен-ной из исследуемого образца РНК). Последним шагом является учет про-дуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.**

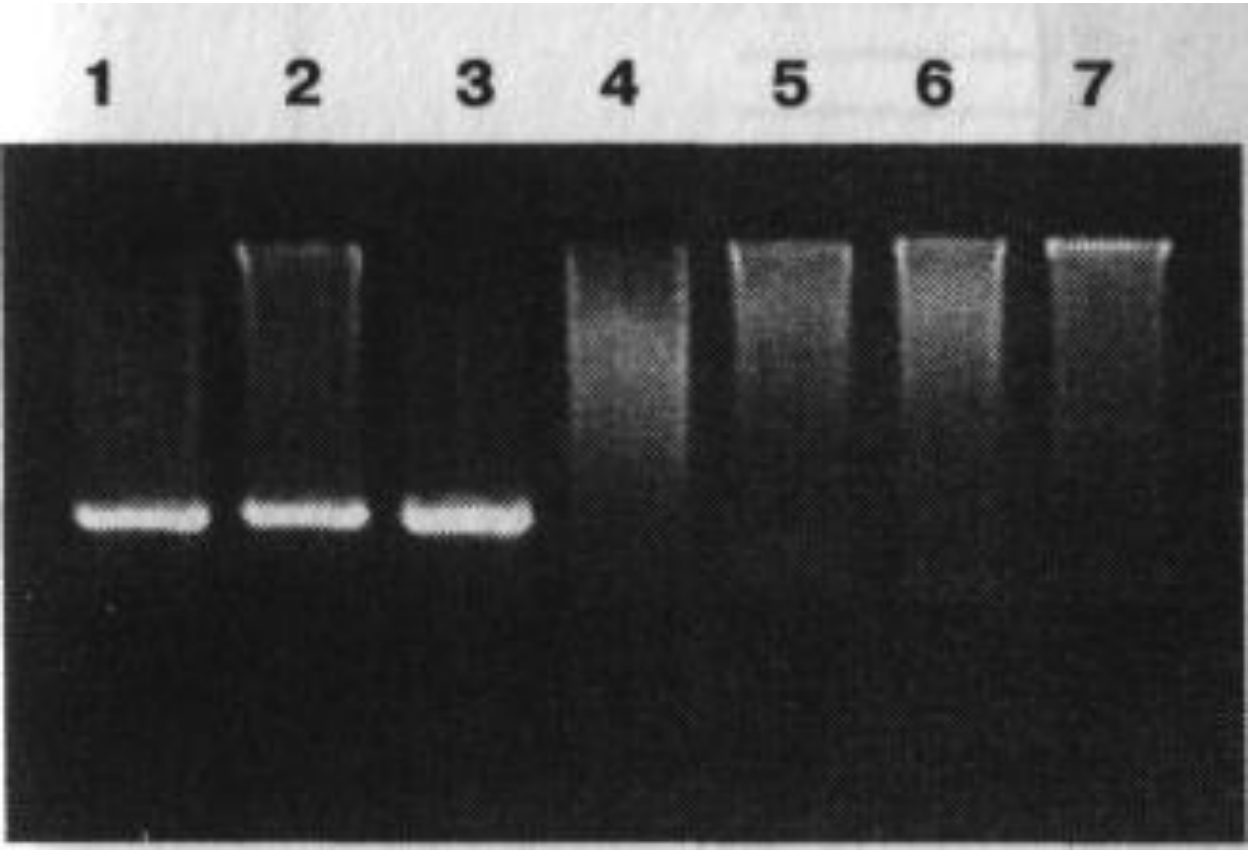
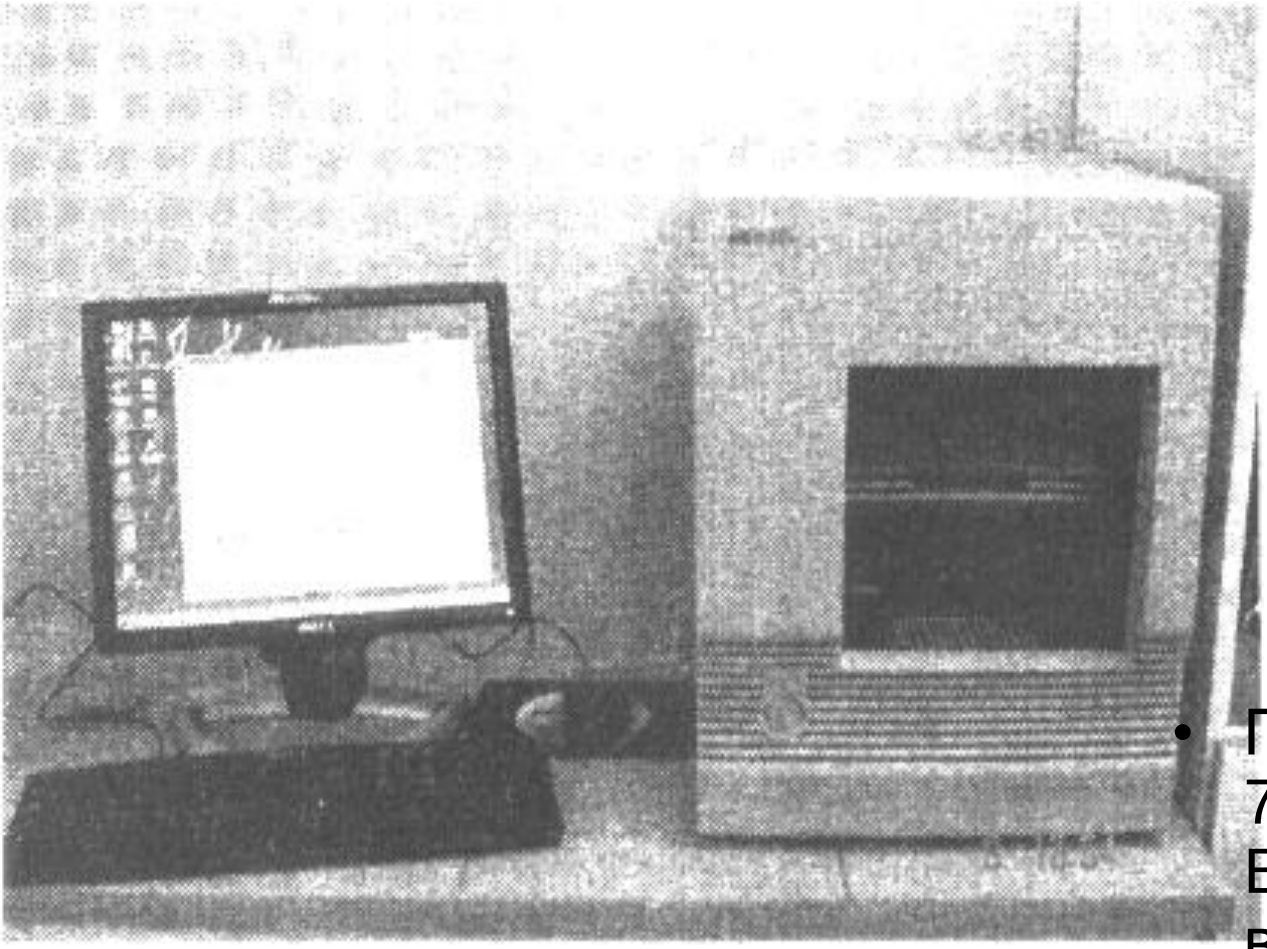


Фото агарозного геля после проведения ПЦР с целью выявления вируса диареи КРС:

- 1 - положительный контроль; 7 -отрицательный контроль; 2,3 -пробы содержат вирус; 4, 5, 6 - пробы без вируса.

- Основное преимущество данного метода — его высокая чувствительность. Она же является и недостатком. Из-за того, что метод способен выявлять единичные молекулы нуклеиновых кислот, он очень чувствителен к лабора-торной контаминации и при нарушениях правил постановки диагностичес-ких реакций может привести к ложноположительным реакциям. Сегодня этот метод надежно работает при соблюдении жестких требований к орга-низации и оснащению диагностической лаборатории, строгом выполнении лабораторных процедур.

- **ПЦР в реальном времени**
- Полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-Time PCR)— современный, быстрый, качественный метод молекулярной диагностики. Метод сочетает технологичность со всеми преимуществами точной молекуляр-ной диагностики. Данный метод принципиально не отличается от ПЦР по сфере своего применения и интерпретации результатов. У него повышена надежность и степень автоматизации. Поэтому он сочетает в себе достоин-ства ПЦР (чувствительность) и ИФА (технологичность), что позволяет применять его так, как сегодня применяют ИФА — для массового анализа проб. Какие недостатки устраняет новая модификация ПЦР? Во-первых, и это глав-ное, ПЦР в обычной постановке является только качественным методом ис-следования. Это значит, что он отвечает на вопрос: есть ли вирус или бакте-рия в исследуемом образце. Новая модификация показывает, в каком коли-честве в пробах содержится возбудитель болезни. Отсюда —возможность иссле-довать различные органы, различные стадии заболевания, а также отличить инфицированность от случайного заноса возбудителя в образцы.



- Прибор ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) для выполнения анализов методом ПЦР в реальном времени

- С другой стороны, ПЦР в традиционном виде требует ряд ручных опера-ций, включая электрофорез ДНК в агарозном геле и фотографирование ге-лей. В новой модификации процесс автоматизирован, результаты обраба-тываются компьютером. Новая модификация ПЦР может быть использова-на для массовой диагностики.
- Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный амп-лификатор (Рис. 1), отличительной особенностью которого является возмож-ность регистрировать флуоресценцию.
- Особенность полимеразной цепной реакции в реальном времени — воз-можность регистрации результата ПЦР в процессе реакции, в каждый мо-мент времени по интенсивности флуоресценции. Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют ДНК-зонды (ко-роткий одноцепочечный фрагмент ДНК размером 17-10 нуклеотидов, син-тезированный химическим путем), комплементарный внутреннему участку фрагмента (Рис.2). К зонду присоединены два химических соединения: флуоресцентная мет-ка и гаситель флуоресценции. В ходе ПЦР происходит разрушение зонда, разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к появлению свечения. Регистрируя интенсивность свечения, исследователь может узнать о ходе реакции без дополнительной стадии — электрофореза. Существен-ным преимуществом является то, что регистрация происходит в закрытой пробирке, т. е. полностью исключается контаминация.

- Интенсивность флуоресценции считывается в процессе протекания ре-акции, а результат выносится на экран монитора в виде графика зависимос-ти прироста флуоресценции от количества циклов ПЦР. Таким образом, за ходом реакции можно следить уже через несколько минут после ее начала. Преимущества новой модификации ПЦР сведены в таблице 1.

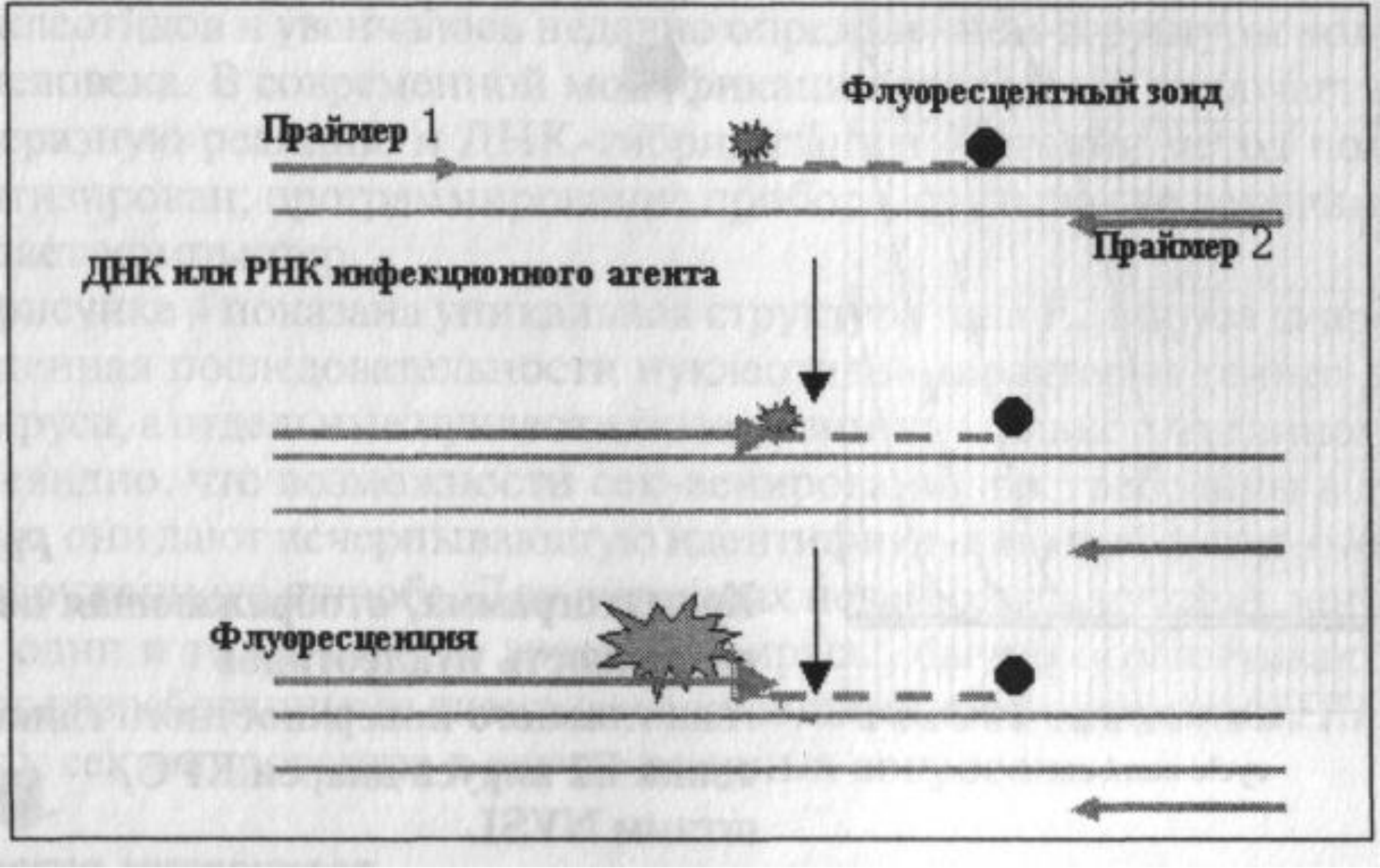
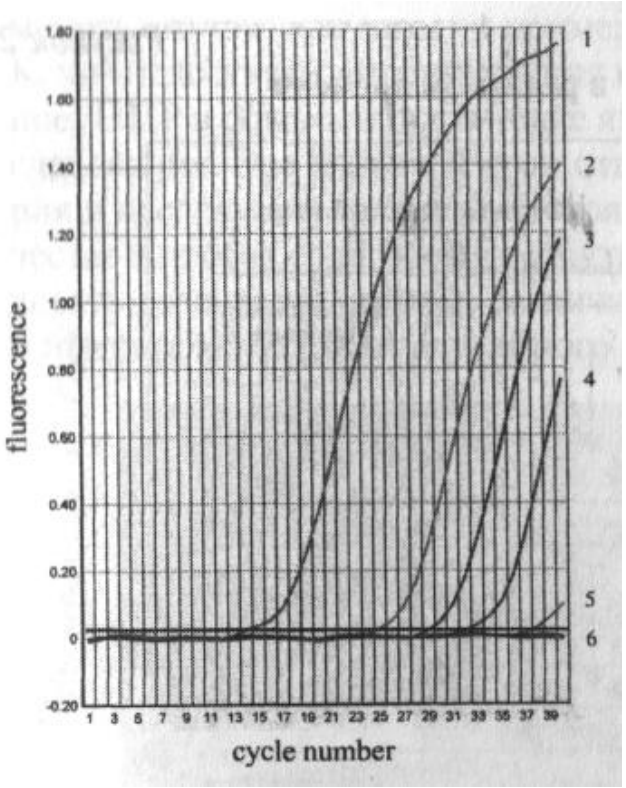


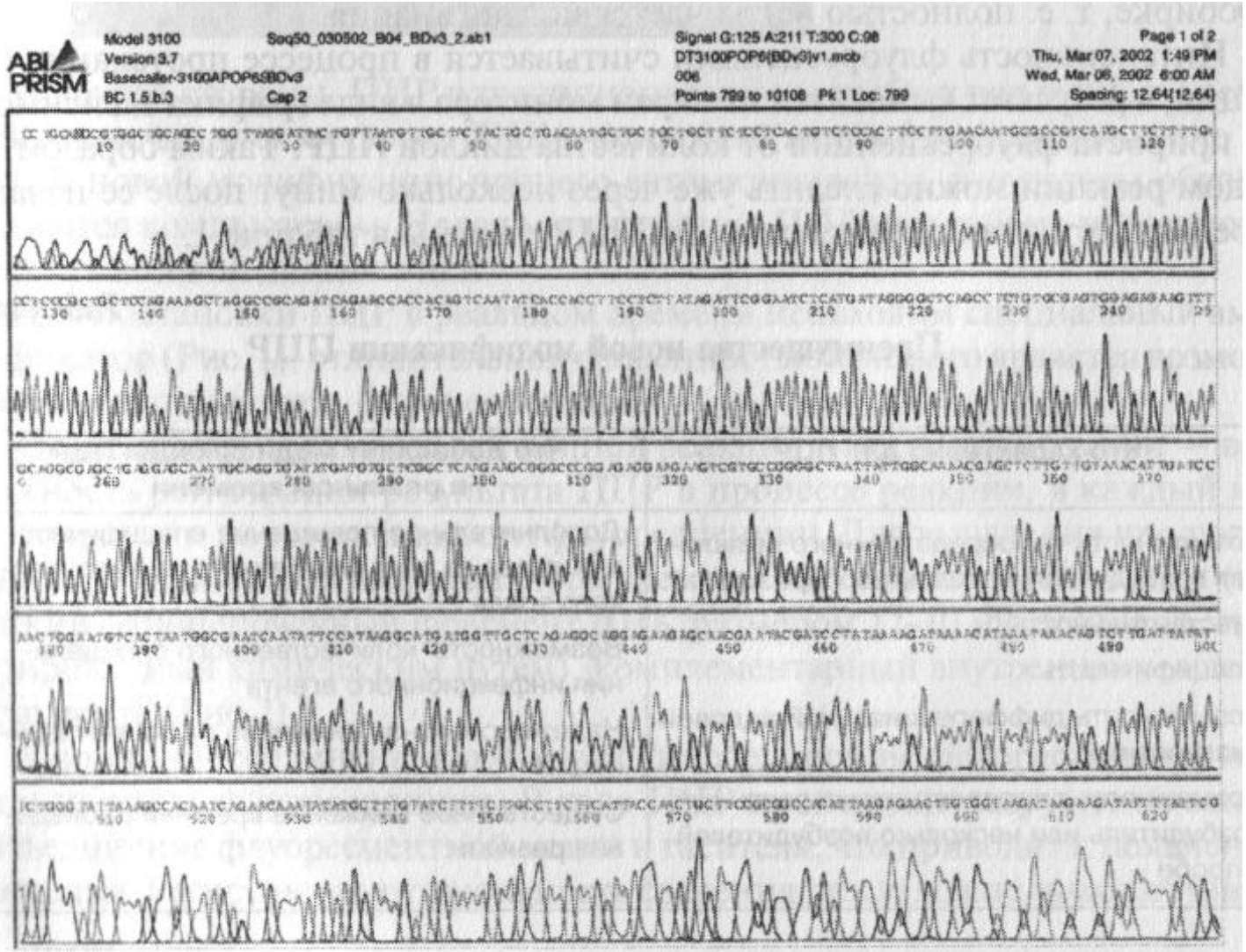
Схема проведения ПЦР в реальном времени

- **Преимущества новой модификации ПЦР**
- **Что характерно для ПЦР Что добавляет модификация ПЦР в реальном времени**
- Возможность непосредственного выявле- Дополнительное повышение специфичнос-
  ния возбудителя в различных образцах ™ мето*а за счет внутреннего специфичес-
- кого зонда Чувствительность
- Возможность количественного определе-
- Специфичность ния инфекционного агента
- Возможность дифференциальной видовой надежность из-за снижения риска контами-
  диагностики нации
- Возможность определять маскированный существенное снижение времени проведе-возбудитель или несколько возбудителей ния реакции в пробе



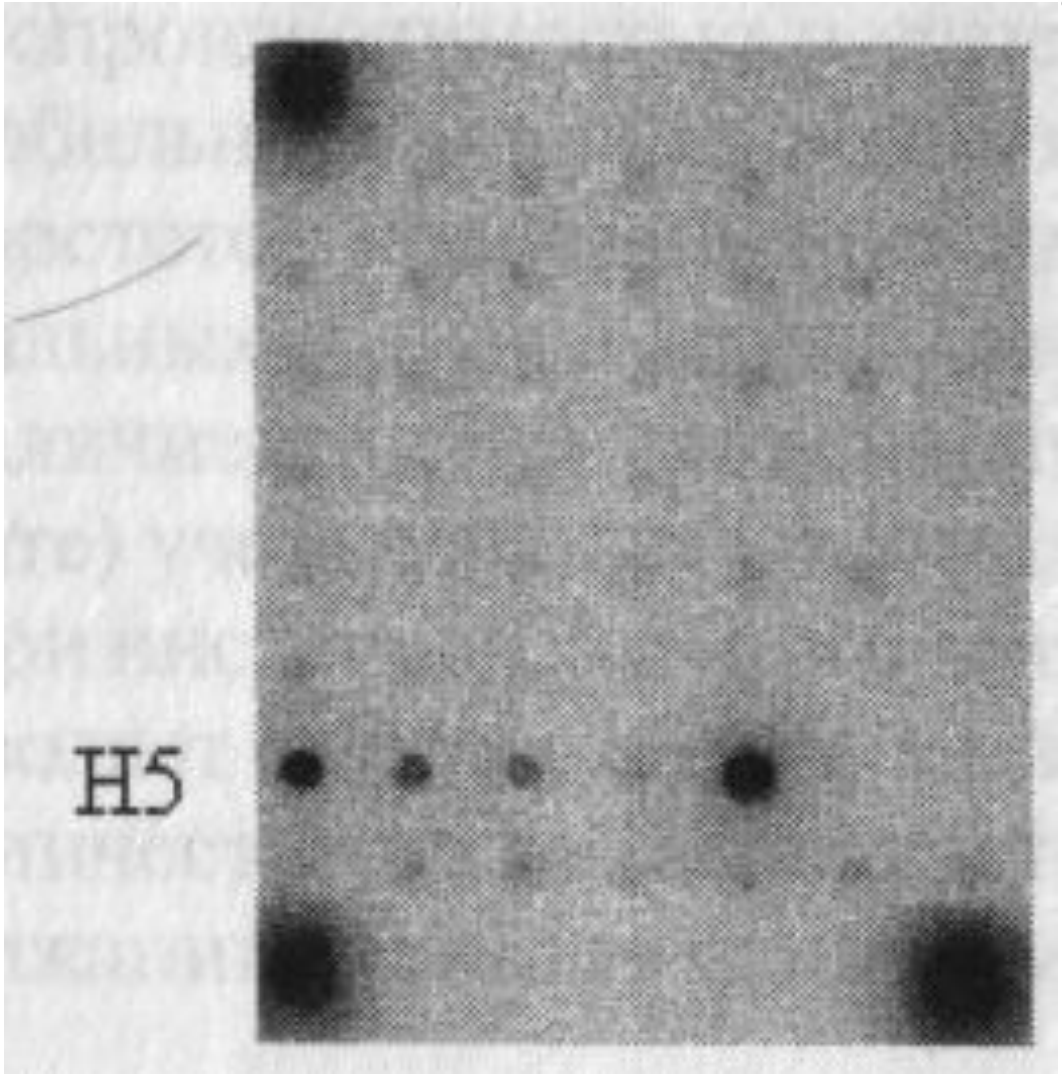
- **Количественное выявление *M.bovis* в образце патматериала**

Хроматограмма, отображающая последовательность нуклеотидов гена главного поверхностного гликопротеина Е2 вируса диареи КРС, ••штамм NVSL ^



- **Секвенирование**
- Определение первичной структуры ДНК (секвенирование) стало возможным в конце 70-х годов XX века, началось с расшифровки нескольких десятков нуклеотидов и увенчалось недавно определением структуры полного генома человека. В современной модификации этот метод включает в себя и полимеразную реакцию и ДНК-гибридизацию. Сегодня метод полностью автоматизирован, программирование прибора, считывание результатов осуществляет компьютер.
- На рисунке 4 показана уникальная структура гена E2 вируса диареи КРС. Приведенная последовательности нуклеотидов характерна только для данного вируса, а отдельные нуклеотидные позиции - только для данного штамма. Очевидно, что возможности секвенирования востребованы в диагностике, т.к. они дают исчерпывающую идентификацию инфекционного агента, обнаруженного в пробе. Для рутинных целей, когда нужно идентифицировать одни и те же хорошо известные вирусы, обычно ограничиваются специально разработанными дискриминирующими тест-системами ПЦР и прибегают к секвенированию в случае спорных вопросов.

- **Технология микрочипов**
- Микрочип (или биочип) позволяет в короткое время (несколько часов) не только определить наличие инфекционного агента, но и дифференцировать его по видовой или штаммовой принадлежности. Данный технологический прием представляет собой последовательное проведение ранее описанных методов ПЦР и ДНК-гибридизации с визуализацией результатов на микро-носителе. После проведения ПЦР с универсальными праймерами, проводит-ся гибридизации на микрочипе, который содержит набор зондов, специфич-ных к каждому из подтипов и меченых флюоресцентным красителем. Если гибридизации не произошло, цвет нанесенного зонда не меняется. Если гиб-ридизация произошла — изменяется цвет зонда. Считывание и документиро-вание происходит с использованием специального прибора, который срав-нивает каждый зонд с положительным и отрицательным контролем.



- **Результаты типирования вируса гриппа £ с использованием микрочипа. По краям микропластинки нанесены образцы положительного и отрицательного контроля. В центральной части зонды соответствующие 15 известным подтипам гемагтлютинина (Н)**

- В нашей стране данная технология активно разрабатывается в институте молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН. В частности, разработана система идентификации Bacillis anthracis и дифференциации от родствен-ных бацилл. Там же разработаны и микрочипы для выявления генов токси-нов и генов устойчивости к антибиотикам у микобактерий. Лаборатории НПО НАРВАК активно сотрудничают с данным коллективом с целью со-здания микрочипов для применения в ветеринарии. На рис. 5 приведены первые собственные результаты определения подтипа вируса гриппа А (H5N1). Данная технология будет внедряться в диагностику широкого круга болезней животных, для которых разработаны тест-системы ПЦР.
- Описанная технология использует специфические гибридизационные зонды, каждый из них разработан и тщательно проверен в лаборатории для выявления или типирования специфического патогена. Существует еще и другой подход к созданию микрочипов — с использованием огромного ко-личества случайных зондов, разрабатываемых и синтезируемых компьюте-ризированным роботом. Результаты таких анализов сродни отпечаткам паль-цев, они воспроизводимы для каждого инфекционного агента. Данные тех-нологии, как и многие другие, еще предстоит разработать и адаптировать к нуждам отечественного животноводства.

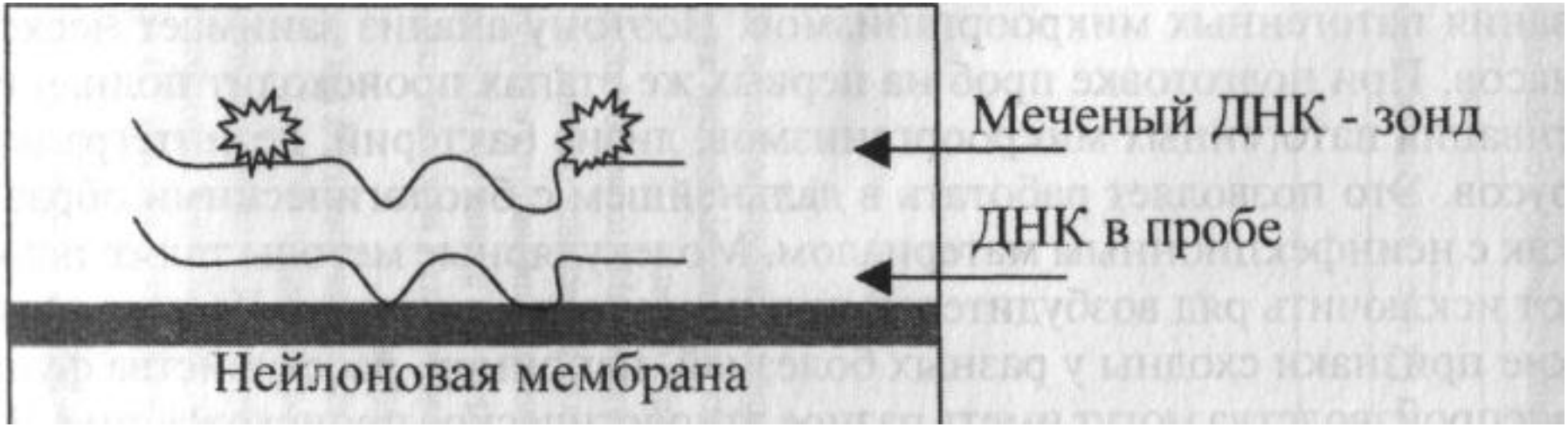
- **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**
- **КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**
- **С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**
- **(ЛЕЙКОЗ, ЯЩУР, БРУЦЕЛЛЕЗ)**Теоретические и практические достижения ветеринарной науки значи-тельно расширили арсенал методов диагностики и средств специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота. При этом развитие новых подходов к предупреждению инфекционных болезней и изу-чение механизмов иммунологической защиты животных неразрывно связа-ны с разработкой и внедрением новых методов и технологий, основанных на современных представлениях об эффекторных механизмах иммунитета, среди которых главное место занимает взаимодействие антиген-антитело.
- Иммуноферментный анализ (ИФА) к настоящему времени прошел путь от новейшей научной разработки до рутинного метода в клинической диаг-ностике. С его помощью можно проводить как массовое обследование стад, так и поставить окончательный диагноз у конкретного животного.
- По сравнению с другими методами выявления антигенов и антител про-фессионально разработанные иммуноферментные тест-системы обладают следующими преимуществами:
- высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации белка в диапазоне нг/мл, и специфичностью;
- воспроизводимостью полученных результатов;
- стабильностью при хранении всех необходимых реагентов (до года и более);
- простотой проведения реакции и возможностью использования мини-мальных объемов исследуемого материала;
- наличием инструментального (в качественном и количественном вари-анте) учета реакции и возможностью автоматизации всех ее этапов. При инструментальной оценке результат ИФА может быть качественным
- (позволяет судить о наличии или отсутствии специфических антител) и по-луколичественным (позволяет получить информацию об относительном содержании антител в испытуемых пробах). Оба варианта являются прибли-

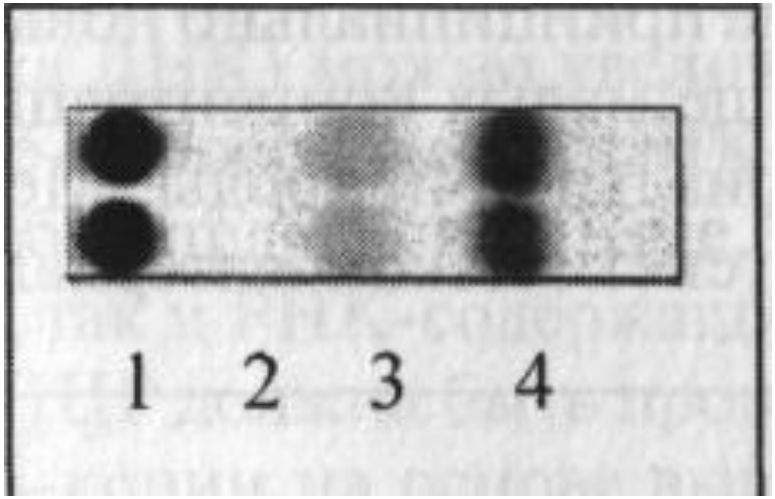
Лабораторные методы диагностики вирусных болезней животных основаны на выявлении вирусных антигенов, вирус-специфических антител или вирусных нуклеиновых кислот. Иммунохимические методы переживают новое развитие с применением высокоспецифичных компонентов - моноклональных антител и рекомбинантных антигенов, а также новых высокоэффективных красителей. Молекулярные методы находят все большее применение в диагностике. Мы остановимся на молекулярных методах как наиболее современных. Они основаны на поиске и анализе нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) возбудителей инфекционных заболеваний в биологических образцах: в органах, тканях, секретах, смывах, взятых от боль-ных и павших животных. Сперма также исследуется на присутствие пато-генных вирусов. Отобранные образцы, как правило, пригодны для класси-ческого вирусовыделения в культуре клеток. Безусловно, это наиболее до-казательный метод, однако он требует времени, вплоть до нескольких дней, чтобы вирус размножился и мог быть идентифицирован. То же относится и к выделению бактериальных культур из клинических образцов на питатель-ных средах. Такие микрооргаризмы как лептоспиры, микобактерии или ба-циллы сибирской язвы не относятся к простым или безопасным объектам для культивирования.

- Назовем некоторые преимущества и возможности молекулярных мето-дов диагностики, которые делают их актуальными. Для анализа берут зара-женные органы и ткани, без дополнительного лабораторного культивиро-вания патогенных микроорганизмов. Поэтому анализ занимает несколько часов. При подготовке проб на первых же этапах происходит полная инак-тивация патогенных микроорганизмов, лизис бактерий, дезинтеграция ви-русов. Это позволяет работать в дальнейшем с биологическими образцами как с неинфекционным материалом. Молекулярные методы также позволя-ют исключить ряд возбудителей при постановке диагноза. Часто клиничес-кие признаки сходны у разных болезней, например, расстройства функции воспроизводства могут иметь разное этиологическое происхождение. В этом случае одну пробу объемом 1 мл возможно одновременно проанализировать на присутствие вируса инфекционного ринотрахеита, вируса диареи КРС, бруцелл, патогенных лептоспир, других инфекционных агентов.

- Возможности молекулярной диагностики простираются дальше простого выявления инфекционных агентов в биологических образцах. Возможно их количественное выявление в органах и тканях на разных стадиях инфекцион-ного процесса, что помогает как в изучении самого процесса, так и позволяет оценить эффективность проводимых лечебных и профилактических мероп-риятий. При помощи видоспецифических ДНК-зондов или праймеров, а так-же с применением расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции возможна видовая или штаммовая дифференциация микроорганизмов одновременно с их выявлением. Наконец, анализ первичной структуры ДНК (секвенирова-ние) позволяет не только определить видовую и штаммовую принадлежность микроорганизмов, но и высчитать генетическое родство с другими штамма-ми, что позволяет зачастую проследить эволюционный путь возникновения данного штамма, историю и географию его распространения.
- Несмотря на серьезные возможности лабораторных методов диагности-ки, они суть вспомогательные средства для постановки диагноза. Для одних инфекций результаты применения этих методов могут привести к оконча-тельным выводам, а для других — лишь служить подтверждением при поста-новке диагноза. Диагноз ставит не метод, а ветеринарный специалист, раз-бирающийся во всех тонкостях инфекционнойс патологии и животновод-ства в целом.

- **Молекулярная ДНК-гибридизация**
- Гибридизация ДНК применяется для непосредственного обнаружения нуклеиновых кислот в биологических образцах. Метод основан на связыва-нии молекулой ДНК своей комплементарной цепи. ДНК-зонд представля-ет собой фрагмент, комплементарный участку генома возбудителя инфек-ционного заболевания. Зонд может быть мечен как радиоактивной меткой (например, изотопами фосфора или серы, излучающими бета - частицы), так и безопасными соединениями, например, биотипом. Метод требует подготовки проб: нуклеиновые кислоты экстрагируют из исследуемых образцов и наносят на нейлоновую или нитроцеллюлозную мембрану в денатурирующих условиях в виде парных пятен. В некоторых модификациях пробоподготовка сведена к минимуму: исследуемую суспен-зию наносят на мембрану в денатурирующих условиях без предварительной очистки нуклеиновых кислот.





- В результате ДНК-гибридизации получают разные по интенсивности сигналы: 1-положительный контроль; 2-отрицательный контроль; 3, 4 - исследуемые образцы

- Метод обладает высокой специфичностью, не боится лабораторной кон-таминации. Метод дает представление об относительных количествах выяв-ляемого микроорганизма в образцах. При использовании радиоактивной метки метод обладает и высокой чувствительностью, однако применение радиоизотопов увеличивает трудоемкость исследований и требования к их проведению. До появления полимеразной цепной реакции (ПЦР) метод гиб-ридизации был, пожалуй, единственным способом выявить специфические гены. Сегодня роль этого метода для фундаментальных исследований нис-колько не снизилась, а в диагностике его вытесняет более чувствительный метод ПЦР. Тем не менее, метод гибридизации и сегодня применяют, на-пример, для выявления вируса инфекционного ринотрахеита в сперме бы-ков-производителей. Интересно, что процесс гибридизации нуклеиновых кислот лежит в основе всех идущих на смену методов молекулярной диагно-стики: ПЦР, ПЦР в реальном времени (real-time PCR), секвенирования, молекулярных микрочипов. Об этих методах в следующих разделах.

- **Полинеразная цепная реакция (ПЦР)**
- ***Полимеразная цепная реакция (ПЦР) —это многократно повторяемое про-ведение полимеразной реакции in vitro, в пробирке, это увеличение числа копий определенного участка ДНК, контролируемое человеком.***
- Метод полимеразной цепной реакции был открыт в 1984 г. Кэри Мюллис впервые показал возможность амплификации (многократного увеличения числа копий) участков ДНК в пробирке в процессе реакции, главной осо-бенностью которой явсляются повторяющиеся температурные циклы. В 1985 году были показаны практические возможности применения ПЦР: впервые амплифицировали фрагмент ДНК ф-глобиновый ген) с использованием термочувствительной ДНК-полимеразы (фрагмента Кленова). В 1987 амплифицировали участки ДНК человека. Начиная с 1988 г., ПЦР стали проводить с использованием термостабильной ДНК-полимеразы, реакция полу-чила широкое распространение. Уже в 1989 г. журнал «Science» назвал ДНК-полимеразу молекулой года. Однако мало кто знает, что в 1980 г. термоёр-бильная ДНК полимераза была выделена в России С. Городецким.

- Метод ПЦР позволяет определять малые и сверхмалые количества нук-леиновых кислот, следовательно, ПЦР поднимает лабораторную диагнос-тику на принципиально новый уровень — уровень прямого обнаружения ис-чезающе малых концентраций инфекционного агента как вирусной, так и бактериальной природы. Методом ПЦР можно определить любое измене-ние в генетическом материале, даже единичную генетическую мутацию.

1980 - В России выделена термостабильная ДНК-полимераза (Городецкий)

1984 – Mullis (США) предложил принцип амплификации ДНК

1985 Saiki с соавторами (США) впервые амплифицировал фрагмент ДНК (β-глобиновый ген) с использованием термочувствительной ДНК-полимеразы

1987- Mullis и Falloona амплифицировали ДНК человека

1988 –ПЦР стали проводить с использованием термостабильной ДНК полимеразы

Внедрение метода ПЦР в лабораторную практику стало одним из наиболее важных событий в медицине и молекулярной биологии в последние 15 лет

- Ведущие фирмы мира уделяют огромное внимание развитию методов П ЦР-диагностики. В настоящее время ПЦР широко используется в различ-ных областях, таких как молекулярная биология, медицина, ветеринария, судебно-медицинская экспертиза, палеонтология, пищевая промышлен-ность, контроль состояния окружающей среды. Для диагностики инфекци-онных болезней животных важно, что этот молекулярный метод, как и ДНК-гибридизация, выявляет нуклеиновые кислоты в биологических пробах.

- При проведении ПЦР для диагностики необходимым этапом является взятие проб для анализа. Первым шагом является выделение нуклеиновых кислот (ДНК или РНК). ДНК и РНК можно выделять из различных биоло-гических образцов (крови, мочи, мокроты, костной ткани, биопсийного материала и даже из одиночного волоса). С помощью двух специфических праймеров-зондов и фермента (термостабильной ДНК-полимеразы) коли-чество фрагмента-мишени (выбранного участка ДНК) можно увеличить в миллионы раз. Таким образом, через выявление специфической ДНК мож-но определить присутствие инфекционного возбудителя в организме. С по-мощью метода ПЦР можно выявлять как ДНК, так и РНК-содержащие ви-русы. При детекции РНК, перед проведением ПЦР должна быть проведена реакция обратной транскрипции (синтез ДНК-копии на основе выделен-ной из исследуемого образца РНК). Последним шагом является учет про-дуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

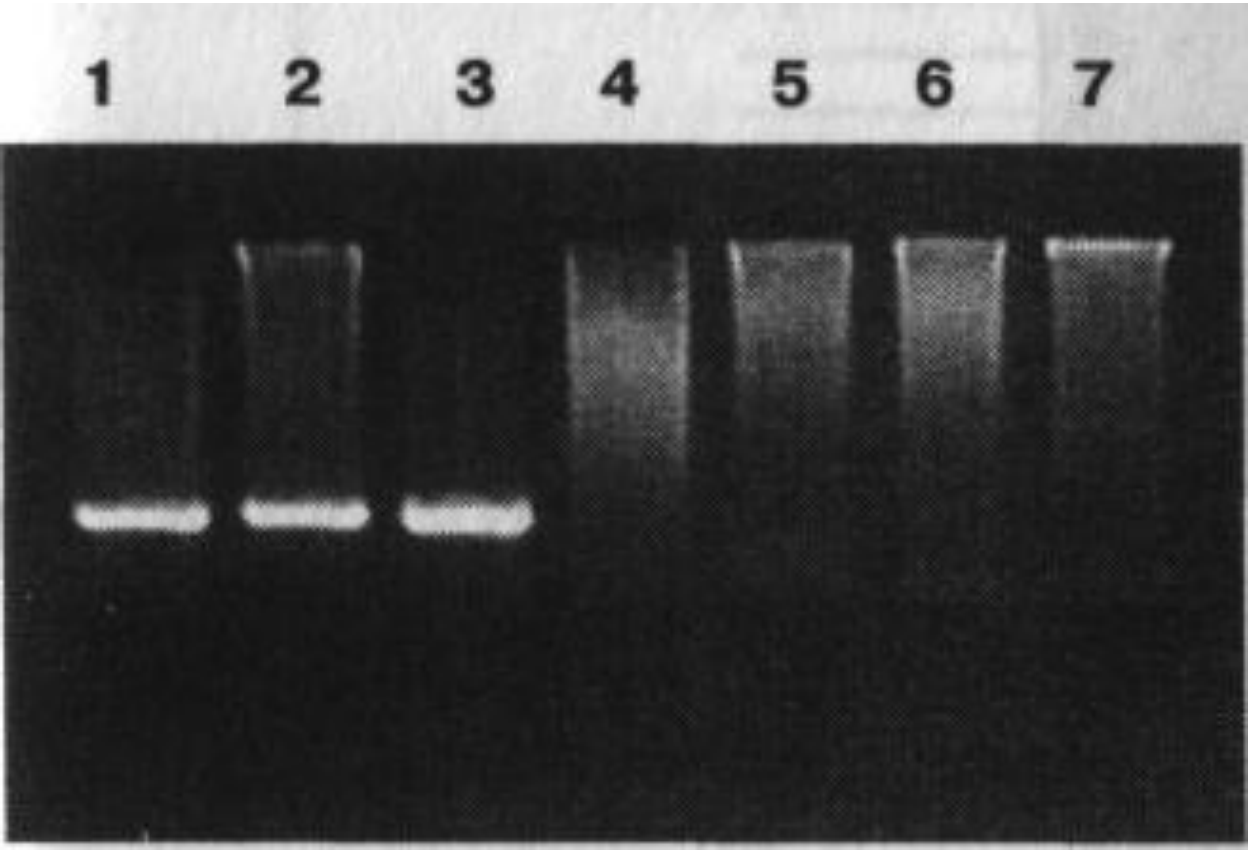
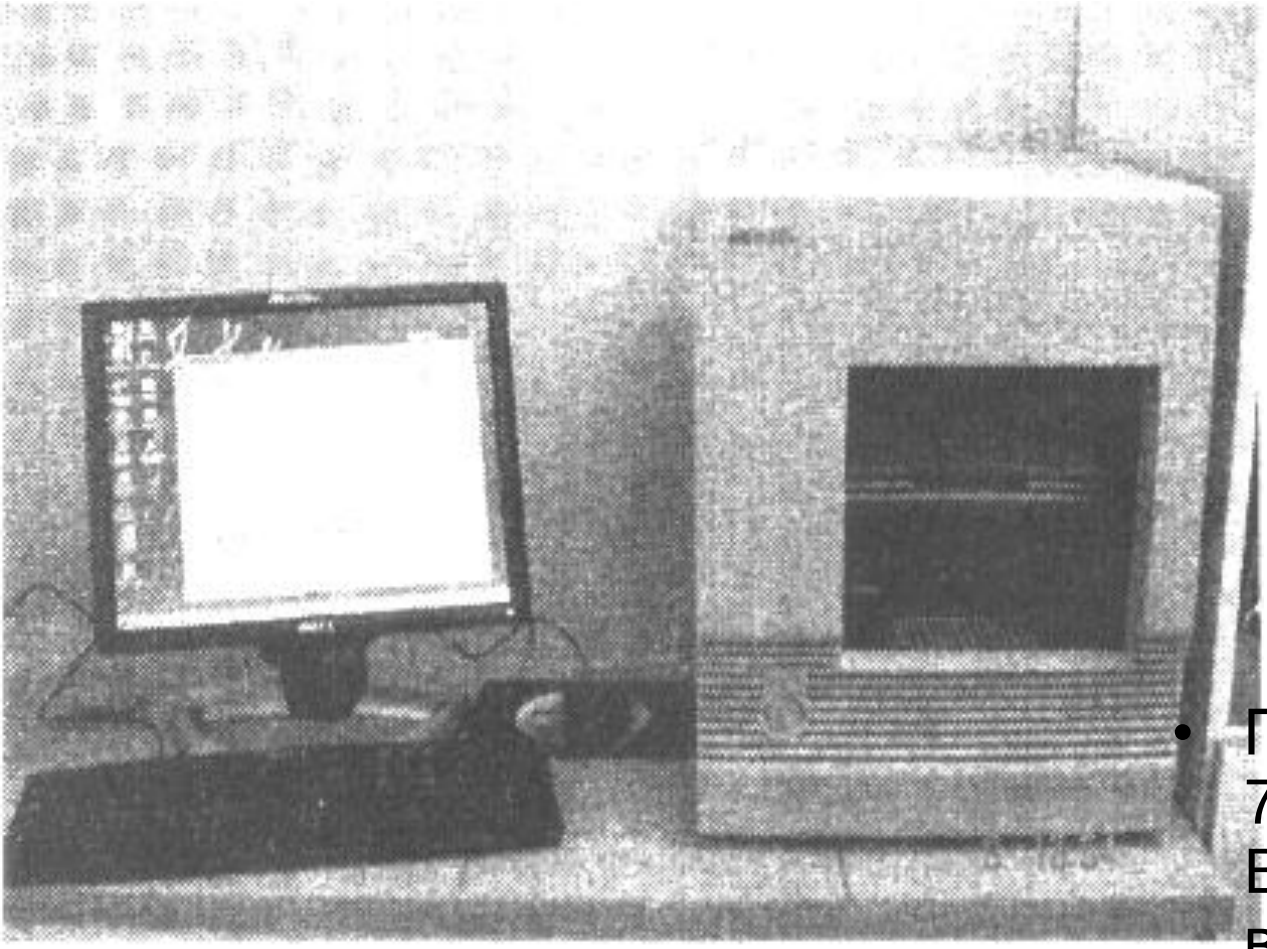


Фото агарозного геля после проведения ПЦР с целью выявления вируса диареи КРС:

- 1 - положительный контроль; 7 -отрицательный контроль; 2,3 -пробы содержат вирус; 4, 5, 6 - пробы без вируса.

- Основное преимущество данного метода — его высокая чувствительность. Она же является и недостатком. Из-за того, что метод способен выявлять единичные молекулы нуклеиновых кислот, он очень чувствителен к лабора-торной контаминации и при нарушениях правил постановки диагностичес-ких реакций может привести к ложноположительным реакциям. Сегодня этот метод надежно работает при соблюдении жестких требований к орга-низации и оснащению диагностической лаборатории, строгом выполнении лабораторных процедур.

- **ПЦР в реальном времени**
- Полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-Time PCR)— со-временный, быстрый, качественный метод молекулярной диагностики. Ме-тод сочетает технологичность со всеми преимуществами точной молекуляр-ной диагностики. Данный метод принципиально не отличается от ПЦР по сфере своего применения и интерпретации результатов. У него повышена надежность и степень автоматизации. Поэтому он сочетает в себе достоин-ства ПЦР (чувствительность) и ИФА (технологичность), что позволяет применять его так, как сегодня применяют ИФА — для массового анализа проб. Какие недостатки устраняет новая модификация ПЦР? Во-первых, и это глав-ное, ПЦР в обычной постановке является только качественным методом ис-следования. Это значит, что он отвечает на вопрос: есть ли вирус или бакте-рия в исследуемом образце. Новая модификация показывает, в каком коли-честве в пробах содержится возбудитель болезни. Отсюда — можность иссле-довать различные органы, различные стадии заболевания, а также отличить инфицированность от случайного заноса возбудителя в образцы.



- Прибор ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) для выполнения анализов методом ПЦР в реальном времени

- С другой стороны, ПЦР в традиционном виде требует ряд ручных опера-ций, включая электрофорез ДНК в агарозном геле и фотографирование ге-лей. В новой модификации процесс автоматизирован, результаты обраба-тываются компьютером. Новая модификация ПЦР может быть использова-на для массовой диагностики.
- Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный амп-лификатор (Рис. 1), отличительной особенностью которого является возмож-ность регистрировать флуоресценцию.
- Особенность полимеразной цепной реакции в реальном времени — воз-можность регистрации результата ПЦР в процессе реакции, в каждый мо-мент времени по интенсивности флуоресценции. Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют ДНК-зонды (ко-роткий одноцепочечный фрагмент ДНК размером 17-10 нуклеотидов, син-тезированный химическим путем), комплементарный внутреннему участку фрагмента (Рис.2). К зонду присоединены два химических соединения: флуоресцентная мет-ка и гаситель флуоресценции. В ходе ПЦР происходит разрушение зонда, разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к появлению свечения. Регистрируя интенсивность свечения, исследователь может узнать о ходе реакции без дополнительной стадии — электрофореза. Существен-ным преимуществом является то, что регистрация происходит в закрытой пробирке, т. е. полностью исключается контаминация.

- Интенсивность флуоресценции считывается в процессе протекания ре-акции, а результат выносится на экран монитора в виде графика зависимос-ти прироста флуоресценции от количества циклов ПЦР. Таким образом, за ходом реакции можно следить уже через несколько минут после ее начала. Преимущества новой модификации ПЦР сведены в таблице 1.

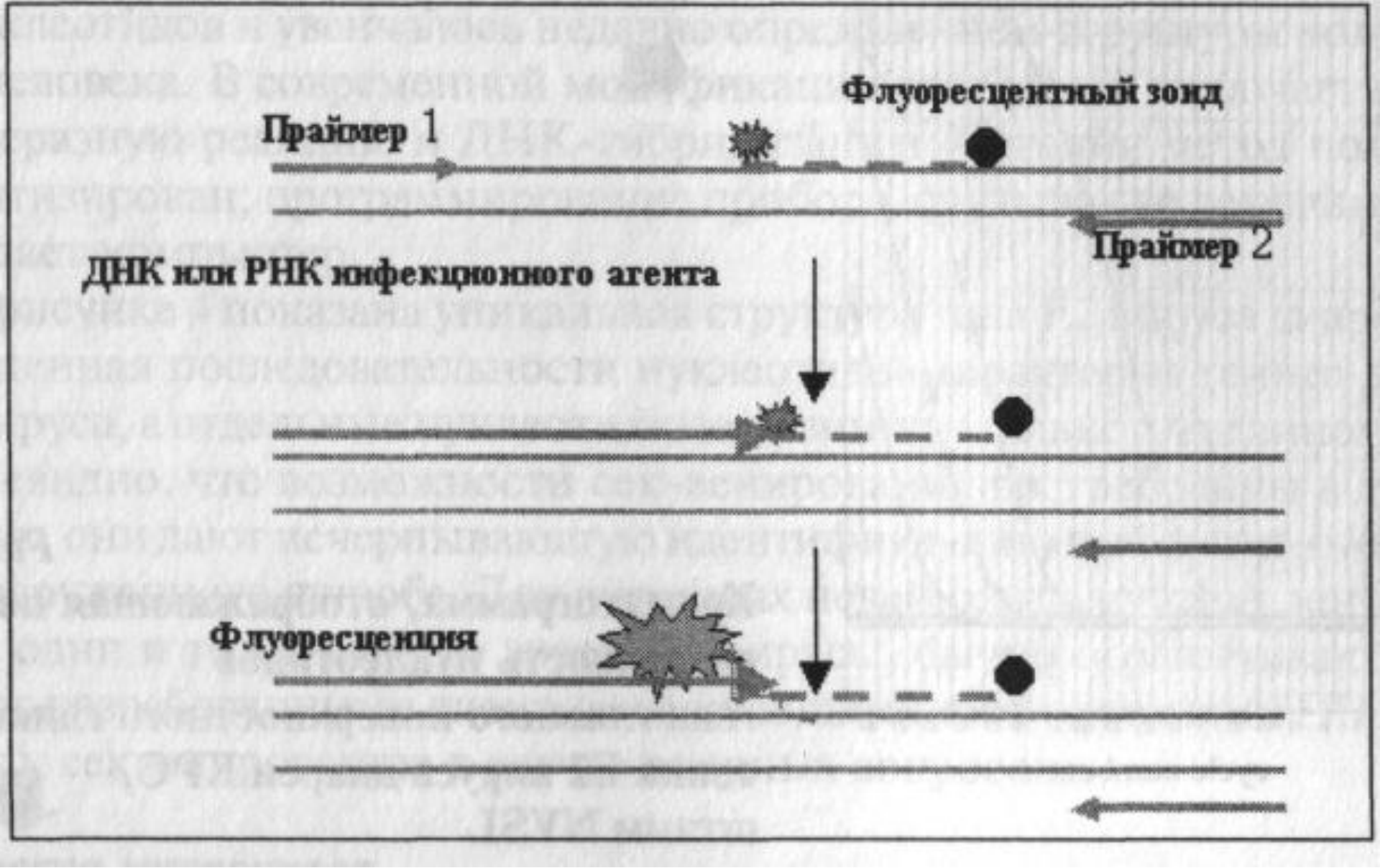
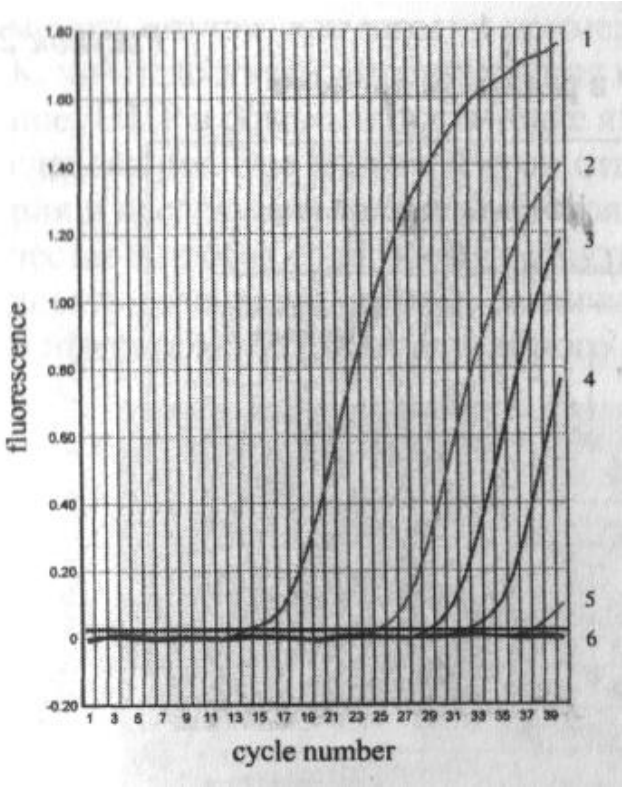


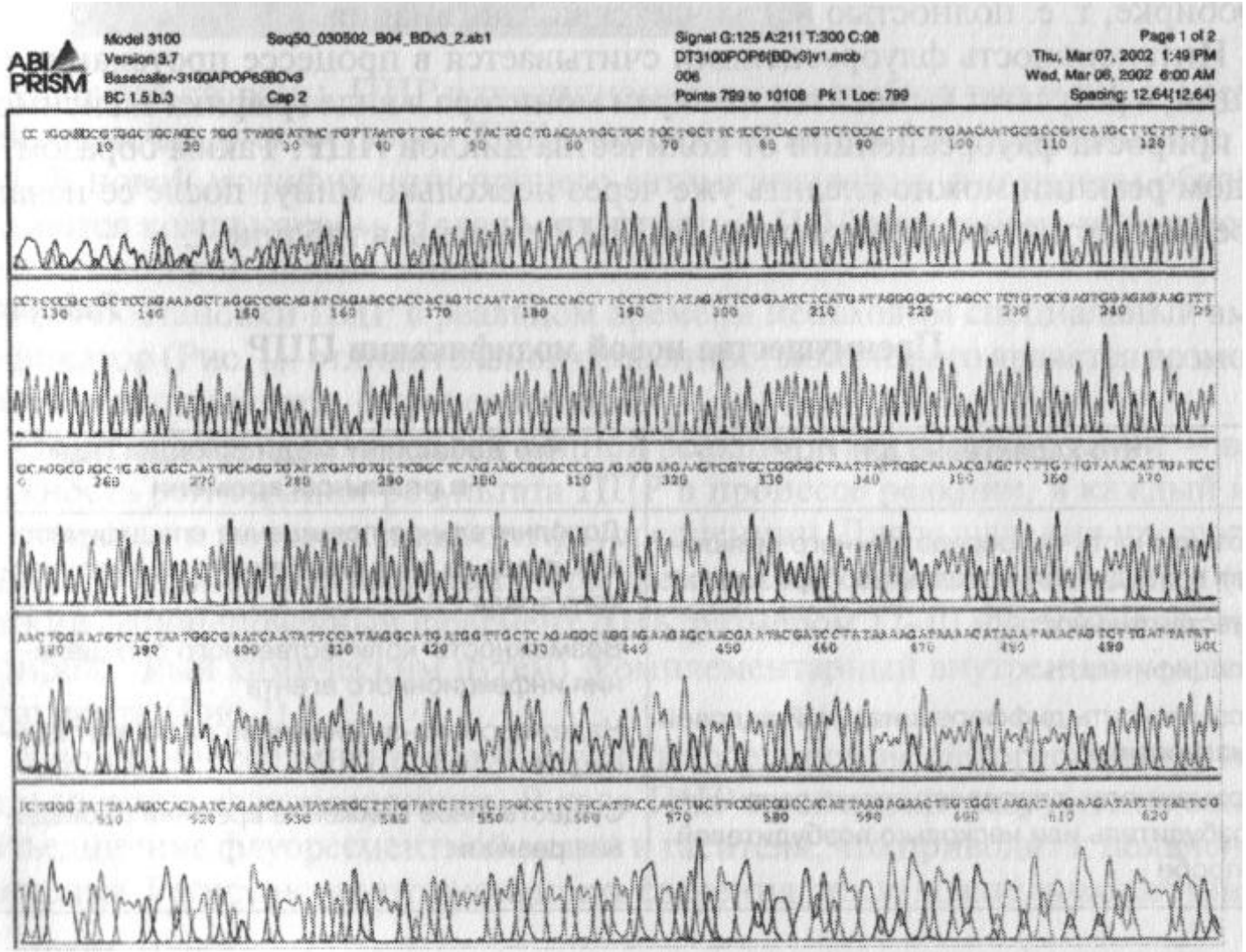
Схема проведения ПЦР в реальном времени

- **Преимущества новой модификации ПЦР**
- **Что характерно для ПЦР Что добавляет модификация ПЦР в реальном времени**
- Возможность непосредственного выявле- Дополнительное повышение специфичнос-
  ния возбудителя в различных образцах ™ мето*а за счет внутреннего специфичес-
- кого зонда Чувствительность
- Возможность количественного определе-
- Специфичность ния инфекционного агента
- Возможность дифференциальной видовой надежность из-за снижения риска контами-
  диагностики нации
- Возможность определять маскированный существенное снижение времени проведе-возбудитель или несколько возбудителей ния реакции в пробе



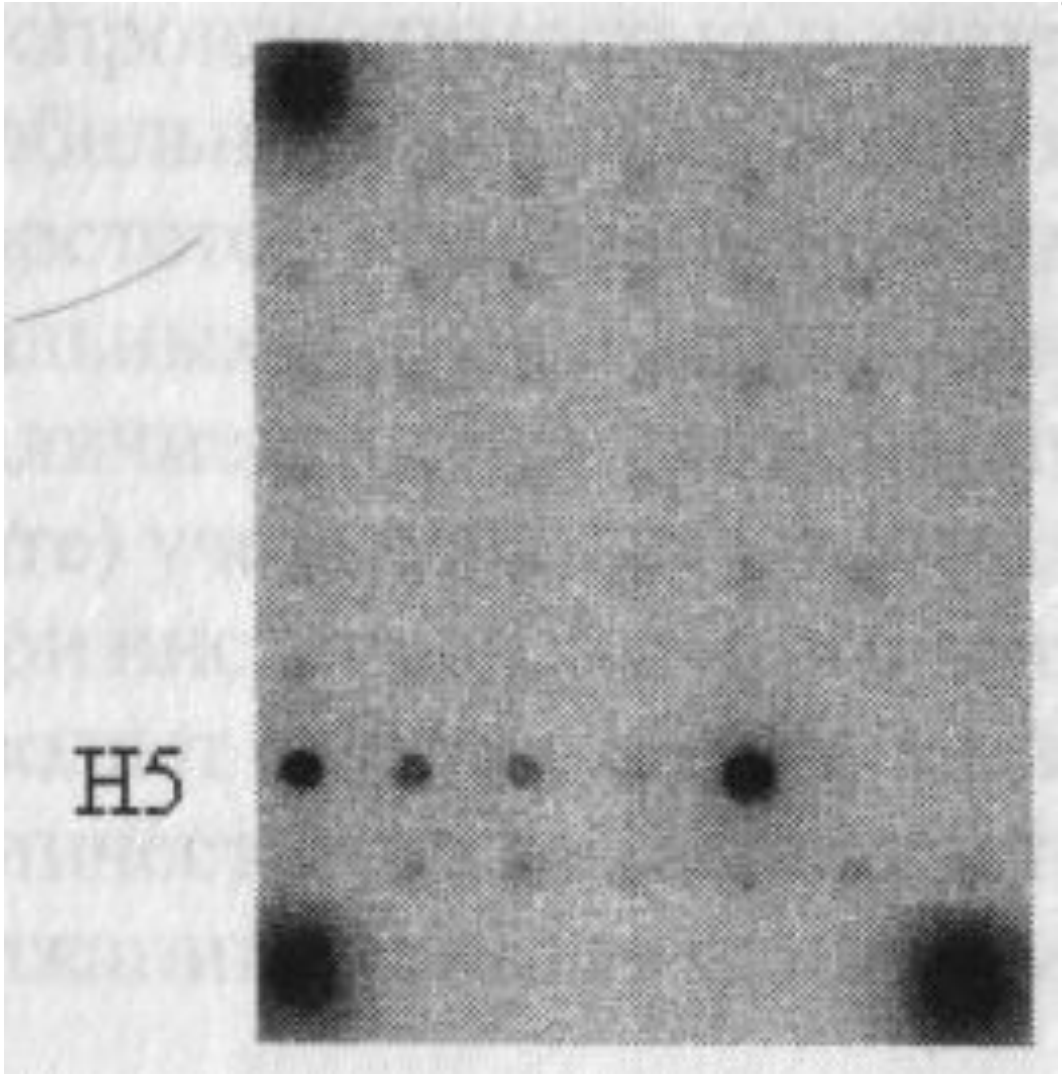
- **Количественное выявление *M.bovis* в образце патматериала**

Хроматограмма, отображающая последовательность нуклеотидов гена главного поверхностного гликопротеина Е2 вируса диареи КРС, ••штамм NVSL ^



- **Секвенирование**
- Определение первичной структуры ДНК (секвенирование) стало возможным в конце 70-х годов XX века, началось с расшифровки нескольких десятков нуклеотидов и увенчалось недавно определением структуры полного генома человека. В современной модификации этот метод включает в себя и полимеразную реакцию и ДНК-гибридизацию. Сегодня метод полностью автоматизирован, программирование прибора, считывание результатов осуществляет компьютер.
- На рисунке 4 показана уникальная структура гена E2 вируса диареи КРС. Приведенная последовательности нуклеотидов характерна только для данного вируса, а отдельные нуклеотидные позиции - только для данного штамма. Очевидно, что возможности секвенирования востребованы в диагностике, т.к. они дают исчерпывающую идентификацию инфекционного агента, обнаруженного в пробе. Для рутинных целей, когда нужно идентифицировать одни и те же хорошо известные вирусы, обычно ограничиваются специально разработанными дискриминирующими тест-системами ПЦР и прибегают к секвенированию в случае спорных вопросов.

- **Технология нинрочипов**
- Микрочип (или биочип) позволяет в короткое время (несколько часов) не только определить наличие инфекционного агента, но и дифференцировать его по видовой или штаммовой принадлежности. Данный технологический прием представляет собой последовательное проведение ранее описанных методов ПЦР и ДНК-гибридизации с визуализацией результатов на микро-носителе. После проведения ПЦР с универсальными праймерами, проводит-ся гибридизации на микрочипе, который содержит набор зондов, специфич-ных к каждому из подтипов и меченых флюоресцентным красителем. Если гибридизации не произошло, цвет нанесенного зонда не меняется. Если гиб-ридизация произошла — изменяется цвет зонда. Считывание и документиро-вание происходит с использованием специального прибора, который срав-нивает каждый зонд с положительным и отрицательным контролем.



- **Результаты типирования вируса гриппа £ с использованием микрочипа. По краям микропластинки нанесены образцы положительного и отрицательного контроля. В центральной части зонды соответствующие 15 известным подтипам гемагтлютинина (Н)**

- В нашей стране данная технология активно разрабатывается в институте молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН. В частности, разработана система идентификации Bacillis anthracis и дифференциации от родствен-ных бацилл. Там же разработаны и микрочипы для выявления генов токси-нов и генов устойчивости к антибиотикам у микобактерий. Лаборатории НПО НАРВАК активно сотрудничают с данным коллективом с целью со-здания микрочипов для применения в ветеринарии. На рис. 5 приведены первые собственные результаты определения подтипа вируса гриппа А (H5N1). Данная технология будет внедряться в диагностику широкого круга болезней животных, для которых разработаны тест-системы ПЦР.
- Описанная технология использует специфические гибридизационные зонды, каждый из них разработан и тщательно проверен в лаборатории для выявления или типирования специфического патогена. Существует еще и другой подход к созданию микрочипов — с использованием огромного ко-личества случайных зондов, разрабатываемых и синтезируемых компьюте-ризированным роботом. Результаты таких анализов сродни отпечаткам паль-цев, они воспроизводимы для каждого инфекционного агента. Данные тех-нологии, как и многие другие, еще предстоит разработать и адаптировать к нуждам отечественного животноводства.

- **Международное сотрудничество**
- Специалисты НПО НАРВАК принимают участие в ряде международных проектов. Ниже перечислены международные центры — партнеры НПО НАРВАК:
- Центральная ветеринарная лаборатория, Вейбридж, Великобритания Национальный центр болезней животных, Эймс, США Центр болезней животных на Плам Айлэнде, Нью Йорк, США Научный центр министерства сельского хозяйства США, Пульман, США Высшая ветеринарная школа, Ганновер, Германия Каролински институт, Стокгольм, Швеция

- **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**
- **КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**
- **С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**
- **(ЛЕЙКОЗ, ЯЩУР, БРУЦЕЛЛЕЗ)**
- **О. А. Верховский, И. В. Непоклонова**
- Теоретические и практические достижения ветеринарной науки значи-тельно расширили арсенал методов диагностики и средств специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота. При этом развитие новых подходов к предупреждению инфекционных болезней и изу-чение механизмов иммунологической защиты животных неразрывно связа-ны с разработкой и внедрением новых методов и технологий, основанных на современных представлениях об эффекторных механизмах иммунитета, среди которых главное место занимает взаимодействие антиген-антитело.
- Иммуноферментный анализ (ИФА) к настоящему времени прошел путь от новейшей научной разработки до рутинного метода в клинической диаг-ностике. С его помощью можно проводить как массовое обследование стад, так и поставить окончательный диагноз у конкретного животного.
- По сравнению с другими методами выявления антигенов и антител про-фессионально разработанные иммуноферментные тест-системы обладают следующими преимуществами:
- высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации белка в диапазоне нг/мл, и специфичностью;
- воспроизводимостью полученных результатов;
- стабильностью при хранении всех необходимых реагентов (до года и более);
- простотой проведения реакции и возможностью использования мини-мальных объемов исследуемого материала;
- наличием инструментального (в качественном и количественном вари-анте) учета реакции и возможностью автоматизации всех ее этапов. При инструментальной оценке результат ИФА может быть качественным
- (позволяет судить о наличии или отсутствии специфических антител) и по-луколичественным (позволяет получить информацию об относительном содержании антител в испытуемых пробах). Оба варианта являются прибли-

- **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**
- **КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**
- **С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**
- **(ЛЕЙКОЗ, ЯЩУР, БРУЦЕЛЛЕЗ)**Теоретические и практические достижения ветеринарной науки значи-тельно расширили арсенал методов диагностики и средств специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота. При этом развитие новых подходов к предупреждению инфекционных болезней и изу-чение механизмов иммунологической защиты животных неразрывно связа-ны с разработкой и внедрением новых методов и технологий, основанных на современных представлениях об эффекторных механизмах иммунитета, среди которых главное место занимает взаимодействие антиген-антитело.
- Иммуноферментный анализ (ИФА) к настоящему времени прошел путь от новейшей научной разработки до рутинного метода в клинической диаг-ностике. С его помощью можно проводить как массовое обследование стад, так и поставить окончательный диагноз у конкретного животного.
- По сравнению с другими методами выявления антигенов и антител про-фессионально разработанные иммуноферментные тест-системы обладают следующими преимуществами:
- высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации белка в диапазоне нг/мл, и специфичностью;
- воспроизводимостью полученных результатов;
- стабильностью при хранении всех необходимых реагентов (до года и более);
- простотой проведения реакции и возможностью использования мини-мальных объемов исследуемого материала;
- наличием инструментального (в качественном и количественном вари-анте) учета реакции и возможностью автоматизации всех ее этапов. При инструментальной оценке результат ИФА может быть качественным
- (позволяет судить о наличии или отсутствии специфических антител) и по-луколичественным (позволяет получить информацию об относительном содержании антител в испытуемых пробах). Оба варианта являются прибли-

Биотехнология производства моноклональных антител

ЛИТЕРАТУРА

- Биотехнология/ Под. Ред. Н.С. Егорова,

  В.Д. Самуилова. Книга 3. Клеточная инженерия/ Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин, Т.Г. Корженевская, Е.Н. Маркарова – М.: Высш. Шк., 1987. – 127 с.: ил.

2. Биотехнология: Учебник / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др.; Под. ред. академика РАСХН Е.С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение/Под ред. И.Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
4. Герасименко В.Г. Биотехнология. – К.: Выща школа, Головное изд-во, 1989. – 343 с.: 32 ил.

При изучении гормонов, маркеров клеток, биорегуляторов, крупных молекул и др. необходимы реагенты, которые бы строго специфически взаимодействовали с ними. Наиболее подходящим реагентом являются иммуноглобулины *(антитела)*.

Антитела вырабатываются в организме для защиты от инфекции.

Антитело имеет участок связывания (рецептор), предназначенный для узнавания антигенов, которые стимулировали их синтез. Такой рецептор распознает в белковой или полисахаридной молекуле антигена участок из 5–6 аминокислот или такое же количество остатков сахаров.

Форм антител огромное количество. Образуются антитела лимфоцитами. Каждый лимфоцит способен отвечать на воздействие одного эпитопа антигена (антигенной детерминанты), хотя большинство антигенов имеют множество эпитопов.

Каждый эпитоп может вызвать образование клона плазматических клеток, предшественником которых является один В-лимфоцит. Этот клон клеток будет продуцировать один вид однородных или *моноклональных антител*.

Антитело с помощью рецепторов распознает эпитопный участок молекулы антигена и прикрепляется к нему. Образуется комплекса антиген – антитело. При этом утрачивается биологическая активность антигена.

Высокая специфичность антител в отношении антигенов позволяет использовать их для выявления и выделения специфических молекул. Связанные *(«сшитые»)* антитела с инертной матрицей можно использовать для извлечения из смеси клеток, в которых антиген расположен на их поверхности.

***Чувствительность метода*, как и радиоиммунного такова, что позволяет выявить вещество в образце, в котором общее количество молекул не превышает 1 тыс.**

Получение моноклональных антител для практических целей стало возможным после разработки в 1976 г. метода, основанного на гибридизации соматических клеток.

Такая работа впервые выполнена в 1975 г. Келером и Милстейном в Кембридже.

Сущность метода заключается в слиянии В-лимфоцитов и клеток миеломы и клонировании гибридных клеток, вырабатывающих какой-либо один вид антител.

В культуре продолжительность жизни В-лимфоцита не велика. Для придания свойства размножаться бесконечно длительное время В-лимфоциты сливают с клетками миеломы.

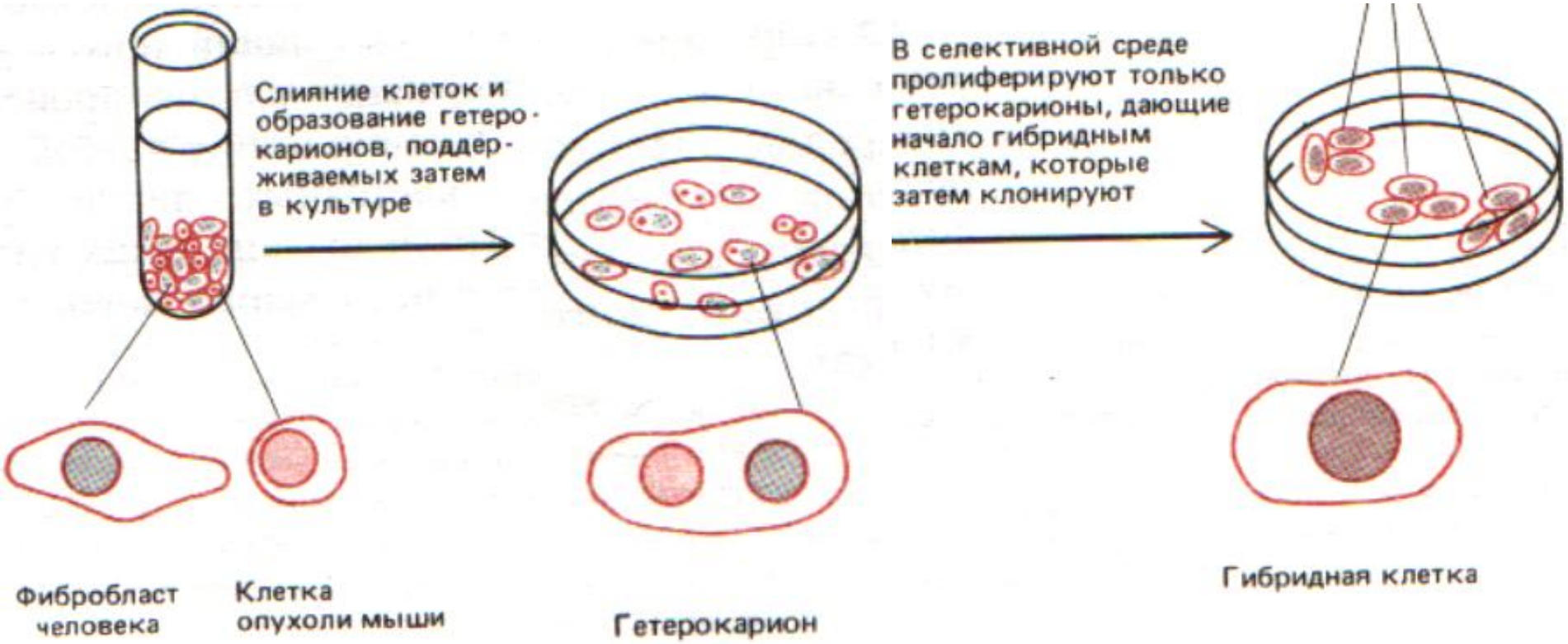
Миеломы (плазмоцитомы) – это злокачественные новообразования иммунной системы. Они развиваются в результате неконтролируемого размножения одной линии лимфоцитов, которые синтезируют только один тип белков – антител.

Миеломы являются природными продуцентами моноклональных антител.

По методу Милстейна проводят слияние нормальных лимфоцитов и клеток миеломы. Полученные гибриды синтезируют два типа антител родительских клеток, а также гибридные их формы.

В последующем в результате исчезновения отдельных хромосом образуются клетки, способные к синтезу антител лишь одного типа. Это могут быть антитела, закодированные в геноме лимфоцита, либо антитела клеток миеломы. Скрининг и обнаружение клона, синтезирующего искомое антитело, проводят при помощи биохимических и иммунохимических методов.

Гибридизация путем скрещивания



Предпосылками для получения гибридом, способных синтезировать моноклональные антитела, явились:

- **способы получения миелом и возможность культивирования клеток их вне организма (у некоторых линий мышей образование миелом можно было легко вызвать путем введения в брюшную полость минеральных масел или инертного твердого пластика);**
- **разработка метода гибридизации соматических клеток.**

Этапы получения моноклональных антител

- **Иммунизация животных.**
- **Подготовка клеток к слиянию и слияние их.**
- **Отбор продуцирующих специфические антитела клонов.**
- **Клонирование и реклонирование.**
- **Массовая наработка гибридомных клеток.**
- **Получение культуральной жидкости или асцита, содержащего антитела.**
- **Выделение антител.**

Продолжительность всех этапов 3–4 мес.

Иммунизация **проводится с целью увеличения В-лимфоцитов, секретирующих отдельные виды антител.**

В процессе иммунизации (чаще трехкратное введение антигена с интервалом в 2–3 недели) клетки селезенки приобретают способность сливаться с клетками миеломы и образовывать антителообразующие гибридные клетки. Обычно это наблюдается через 3–4 суток после последнего введения антигена. К этому времени в лимфоидных органах много активно пролиферирующих (размножающихся) клеток.

Отбирают для последующей работы только тех животных, у которых обнаруживают высокий титр антител.

- ***Подготовка суспензии клеток селезенки***

Отобранных животных убивают, помещая в камеру с кусочком твердой углекислоты на 1–2 мин, после чего окунают в 70%-ный этиловый спирт. Затем на препаровальном столике в стерильных условиях извлекают селезенку и помещают ее в чашку Петри с приготовленной средой. Слегка промывают селезенку, ножницами делают несколько надрезов и переносят в стеклянный гомогенизатор, куда добавляют 5 мл среды. Пестиком осторожно растирают селезенку.

Полученную суспензию переносят в пробирку, отстаивают 10 мин и надосадочную жидкость переносят в другую пробирку. Клетки отмывают дважды центрифугированием в среде без СПК.

В камере Горяева подсчитывают количество лимфоцитов в разбавленном осадке после второго центрифугирования. Из одной селезенки получают до 100 млн. ядерных клеток.

Подготовка клеток к слиянию и слияние их

Сначала отбирают линии миеломных клеток мыши или крысы, которые обладают способностью легко образовывать гибридомы. Их размножают в достаточном количестве и замораживают в ампулах. После размораживания используют в течение месяца. Обычно за такой период быстро падает способность к слиянию с другим видом клеток.

Для слияния берут клетки, которые в течение одной недели проявляли логарифмическую фазу роста. В культуре высокой плотности начинается массовая гибель клеток и их использовать уже нецелесообразно.

Слияние клеток

Готовят суспензию клеток селезенки и миеломы и смешивают их в пропорции 100 млн. клеток селезенки и 10 млн. клеток миеломы. Смесь помещают в пробирку емкостью 50 мл и центрифугируют при 400g 10 мин при комнатной температуре. Удаляют надосадочную жидкость. Пробирку помещают в водяную баню и затем добавляют ПЭГ. Осторожно перемешивают осадок кончиком пипетки. Два раза добавляют по 1 мл среды, а затем 7 мл без СПК. Смесь центрифугируют, осадок ресуспендируют и получают суспензию клеток. Ее переносят во флакон с 70 мл теплой среды с СПК. Засевают по 0,2 мл суспензии в лунки планшета и помещают в инкубатор. Контролируют процесс слияния и выработку антител.

Полученные гибридные клетки периодически необходимо культивировать в присутствии токсического аналога нуклеотидов (ингибитора), использованного для селекции данной линии. Иингибитор селективной среды (аминоптерин), блокирует нормальные пути биосинтеза нуклеотидов. Поэтому для синтеза нуклеиновых кислот клетки вынуждены использовать обходной путь (шунт) биосинтеза. Но именно этот шунт нарушен у мутантных клеток, используемых для слияния с нормальными В-лимфоцитами. Ни одна из используемых клеточных линий в этой среде (ГАТ: гипоксантин, аминоптерин и тимидин) размножаться не может, и в ней выживают только гибридные клетки.

- *4. Клонирование гибридомных клеток.*

  Клонирование гибридомных клеток в полужидком агаре состоит из следующих этапов:

  1. Для клонирования гибридом используют структуру, состоящую из двух слоёв. Нижний (твёрдый) слой содержит 0,5% агара в среде культивирования. Ему сразу дают затвердеть.

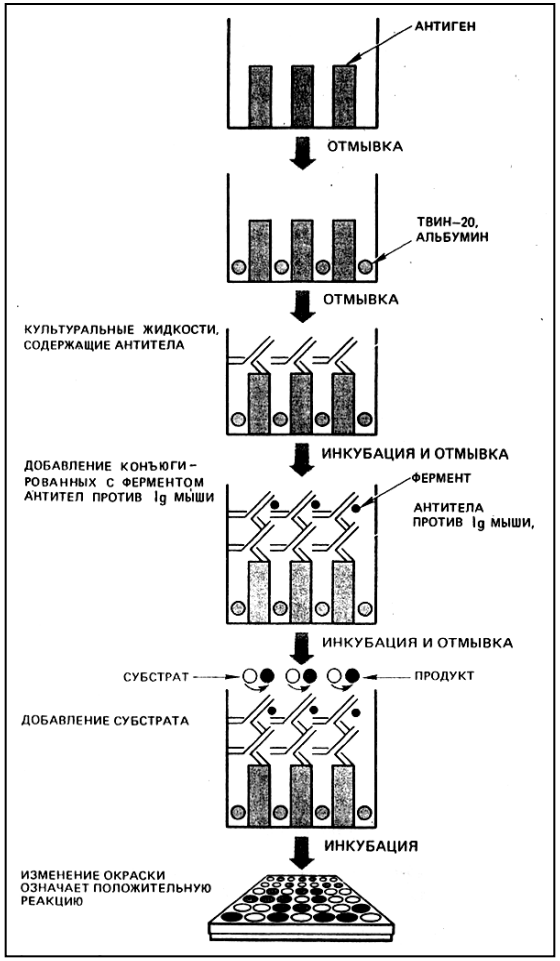
  2. Затем добавляют второй (мягкий) слой, содержащий 0,3% агара, в который помещают клонируемые клетки.

  3. После этого помещают чашку с клетками в CO_2-инкубатор. Колонии становятся видимыми через 7-14 сут.

  4. Применяют метод выявления синтеза антител *in situ* путём наслоения на поверхность агара раствора антигена, приводящего к формированию зон преципитации вокруг положительных колоний.

  5. Под микроскопом извлекают, пользуясь пастеровской пипеткой, из агара колонии положительных клеток этих клонов и переносят в жидкую культуру для замораживания в жидком азоте.

- *5. Выявления антител синтезируемых гибридомными клетками.*
- Для выявления антител, синтезируемых гибридомными клетками используют иммуноферментный метод.
- В данном методе используют антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, меченные ферментом, а о результате судят по появлению цветной реакции. Принцип метода представлен на рис. 7.12.
- ● Положительные клетки помещают в лунки 96-ти луночного планшета для микротитрования, приливают культуральную жидкость, в которой могут быть антитела;
- ● После инкубации и отмывки в лунки заливают раствор субстрата;
- ● Если в культуральной жидкости были антитела против антигена, то они адсорбируются на антигене, а на них адсорбируются конъюгированные с ферментом вторичные антитела;
- ● Под действием фермента происходит разложение субстрата и переход его в окрашенный продукт.
- ● По появлению окраски судят о присутствии в культуральной жидкости антител к иммунизирующему антигену.



- **Схема проведения основных этапов иммуноферментного метода**

- *6. Массовая наработка моноклональных антител.*
- После отбора гибридомных клеток, синтезирующих интересующие нас антитела, можно приступить к их массовому наращиванию с целью получения большого количества моноклональных антител.
- В начале культивирования гибридомные клетки будут расти медленно, если будет низкая плотность посева. Поэтому при посеве клеток их надо разводить не более, чем в 3 раза. Ускорение роста клеток также стимулируют добавлением клеток питающего слоя.
- Гибридомные клетки необходимо поддерживать в логарифмической фазе роста и избегать превышения концентрации клеток выше 0,5 млн./мл. Клетки культивируют в специальных устройствах – ферментёрах.
- Для получения максимальной продукции моноклональных антител клеткам позволяют расти до предельной плотности. В такой культуре через определённое время наблюдается гибель некоторой части гибридомных клеток. Надосадочная жидкость собирается, а клеточный осадок удаляется, т. е. не проводится дальнейшее культивирование оставшихся в живых клеток.
- При других, обычных методах культивирования концентрация антител в культуральной жидкости лежит в пределах 10-100 мкг/мл. Более высокие концентрации удаётся получить в ферментёрах при использовании сред с низким содержанием СПК и добавлением препарата *приматон RL* – до 660 мкг/мл.
- Для получения бóльшего количества антител вводят гибридомные клетки в организм животных и получают от них асцитную жидкость. Предварительно животным вводят агенты, повышающие способность гибридом расти в брюшной полости. В качестве такого агента чаще всего выступает адъювант Фрейнда – 0,5 мл за 10 суток до введения клеток. Асцитная жидкость в этом случае содержит антитела в более высокой концентрации, и её можно собирать несколько раз, начиная с 14 суток после введения адъюванда Фрейнда.
- Вводимые гибридомные клетки и организм реципиента должны быть идентичны по антигенам гистосовместимости, поэтому слияние проводят между мышиной миеломой (линия Balb/C) и клетками селезёнки мышей линии C57B1/6. При этом реципиентом должны быть гибриды этих линий (Balb/C x C57B1/6) F1.

Клонирование гибридомных клеток необходимо для получения стабильных клонов клеток.

Полученные сначала гибридомные клетки могут утрачивать хромосомы и терять способность продуцировать антитела. Они могут перерастать антителообразующие клетки.

Клонирование производят методом лимитирующих разведений, или используя полужидкий агар, или же с помощью проточного цитофлуориметра. После выделения положительных (образующих антитела) клонов, их размножают в необходимом количестве и замораживают.

Выявление антител, которые синтезируются гибридомными клетками. Используют радиоиммунный или иммуноферментный методы.

Массовая наработка **моноклональных антител**. После отбора гибридомных клеток, которые синтезируют необходимые антитела приступают к массовому наращиванию их.

Для культивирования клеток используется *полная среда* с 10% СПК. Готовится из следующих компонентов:

- **Среда RPM1 1640 или среда Игла в модификации Дюльбекко, однократной концентрации – 450 мл;**
- **5 мл 100 мМ раствора пирувата натрия;**
- **5 мл 100-кратного раствора антибиотиков;**
- **5 мл 200 мМ раствора L-глутамина;**
- **0,25 мл 0,1 М раствора 2-меркаптоэтанола;**
- **5 мл 1 М буфера HEPES;**
- **50 мл СПК.**

Эту среду используют для культивирования миеломных клеток и массового размножения гибридомных клеток. В начале культивирования гибридом и при клонировании их концентрацию СПК увеличивают до 15–20%. При использовании среды Дюльбекко в нее добавляют глюкозу до финальной концентрации 4,5 г/л.

Свойства моноклональных антител и поликлональных антисывороток

Свойство	Поликлональные антисыворотки	Моноклональные антитела
Специфичность	Потенциально ко всем антигенным детерминантам всех компонентов иммунизирующего материала	Одна антигенная детерминанта одного компонента
Воспроизводимость состава	Изменяется от животного к животному и в процессе иммунного ответа	Постоянная
Перекрестная реактивность с другими антигенами	Частичная с антигеном, несущим общие детерминанты	Обычно отсутствует, редко полная в зависимости от распределения и доступности
Классы и подклассы присутствующих иммуноглобулинов	Одновременно присутствуют все или большинство	Только один из всех возможных
Способность преципитировать антигены	Обычно есть	Обычно нет
Концентрация специфических антител	0,1–1,0 мг/мл	5–500 мг/мл (культура); 5 мг/мл (асцит)
Концентрация посторонних антител	10 мг/мл	Нет (культура); 1 мг/мл (асцит)
Физико-химические свойства	Определяются пулом антител	Крайне индивидуальны, могут быть чувствительны к внешним условиям

Область применения моноклональных антител:

использование в диагностике, в частности в повышении эффективности диагностикумов для иммуноферментного анализа, реакции пассивной гемагглютинации, иммунофлуоресцентного метода;

для быстрого и точного типирования тканей и органов, предназначенных для пересадки;

при очистке белков и других биологических соединений методом иммуноадсорбции (инсулина, соматотропина, интерферона).

Моноклональные антитела, полученные к эпитопам мембранных белков спермиев и помеченные флуоресцирующими веществами, используют для разделения спермиев на две группы, определяющие пол приплода.

В области ветеринарной медицины наиболее существенно применение моноклональных антител при создании диагностикумов и диагностических препаратов на основе иммуноферментного анализа. Сущность метода иммуноферментного ананлиза (ИФА) – образование конъюгата известного антитела и фермента и последующего присоединения полученного комплексного соединения к антигену. Для проведения ИФА необходима иммобилизация антитела или антигена на твердом носителе (подложке) посредством гидрофобного, электростатического взаимодействия или за счет образования ковалентной связи между антителом или антигеном и подложкой.

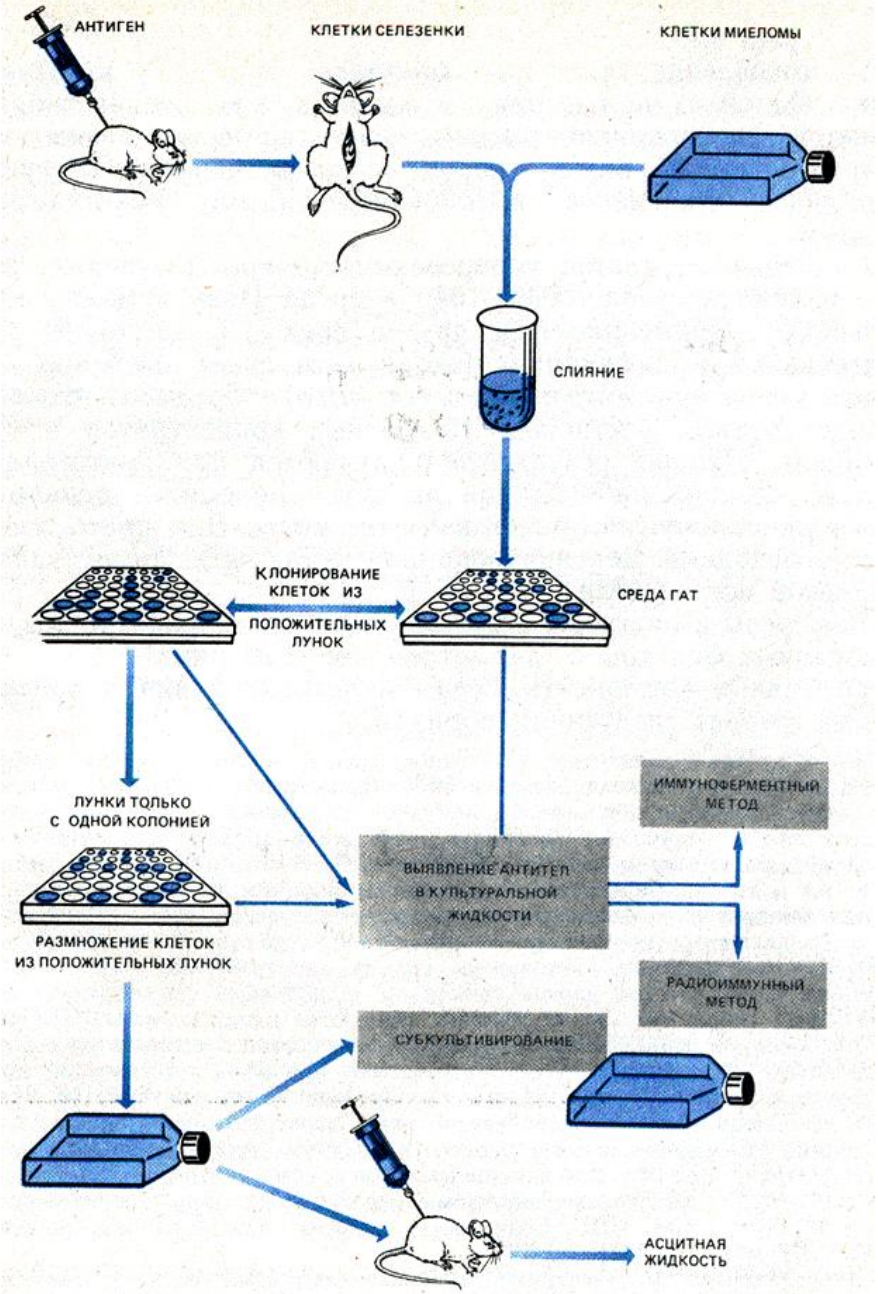


Рис. 43. Основные этапы получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела

В наибольшем количестве вырабатываются глутамат натрия, лизин и метионин.

- **Глутамат натрия служит усилителем вкуса. Ежегодное производство L-глутаминовой кислоты 1300 тыс. т.**
- **Лизин используется как пищевая добавка. Производство L- лизина 1750 тыс. тон.**
- **Производство D,L- метионина > 2 млн. т,**
- **L-треонина 40000 т,**
- **глицина 16000 т и др.**

Наибольшую часть этих веществ поставляют японские фирмы.

В последнее время производство аминокислот почти удваивается каждые 10 лет.

- **Белорусская национальная биотехнологическая корпорация (Пуховичский район)**

Одна из 4-х стран, которая обладает таким производством: 14 современных самостоятельных заводов и производств.

Основные производственные объекты:

- **зернохранилище мощностью 450 тысяч тонн зерна;**
- **завод по производству комбикормов для КРС и птицы – 60 тонн в час;**
- **завод по производству комбикормов для свиней – 40 тонн в час;**
- **завод по производству премиксов – 20 тонн в час.**

- **Глубокая переработка зерна по современным методам биотехнологии с получением незаменимых аминокислот и высокопродуктивных сбалансированных комбикормов и премиксов для всех видов животных**

Мощности биотехнологического производства (в год):

- **L-лизин сульфат – 37000 т,**

  L-лизин моногидрохлорид – 40000 т,
- **L-треонин – 8000 т,**
- **L-триптофан – 1600 т,**
- **глютен – 25000 т.**

L-лизин сульфат – стартовая цена 2,5 тыс. $ за тонну, поднимается до 4 тыс.

- **Особая ветвь биотехнологии – *биотехнология воспроизведения* человека и животных. Предметом исследований и практического использования этого направления являются репродуктивная система и половые клетки.**
- **Искусственное осеменение и**
- **трансплантация зародышей – методы воспроизведения животных и человека – по сути своей биотехнологические.**
- **Благодаря этим методам оказалось возможным использование достижений в области клеточной и генетической инженерии (получение трансгенных животных, клонирование животных)**

В Республике Беларусь биотехнология отнесена к приоритетным направлениям новых и высоких технологий. Создан биотехнологический центр. Важными задачами биотехнологии является *создание и освоение*:

- **новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины и ветеринарной медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека и животных, пролактина, моноклональных антител и др.), которые необходимы для профилактики и лечения злокачественных опухолей, заболеваний сердечно-сосудистой системы, инфекционных и наследственных;**

- **новых популяций животных, обладающих высокой продуктивностью, устойчивостью к заболеваниям и другими ценными свойствами;**
- **клонирование животных и получение трансгенных животных;**
- **ценных кормовых добавок (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов) для повышения продуктивности животных;**
- **технологий глубокой переработки пищевых, сельскохозяйственных и бытовых отходов для получения этилового спирта, биогаза и высокоценных удобрений;**
- **ветеринарных биологических препаратов (современных вакцин);**
- **эффективных методов повышения плодовитости животных и получения клоновых организмов.**