

**Е.В. Четвертакова**

# ***БИОТЕХНОЛОГИЯ***

**КУРС ЛЕКЦИЙ**

**Красноярск 2010**

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Красноярский государственный аграрный университет

**Е.В. Четвертакова**

**Биотехнология**  
**Курс лекций**

**Красноярск 2010**

Рецензент

*О.В. Злотникова, канд. биол. наук, доц. КрасГАУ*

*Четвертакова, Е.В.* Биотехнология: курс лекций/ Е.В. Четвертакова; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2010. – 90 с.

В данном курсе изложены традиционные и новейшие технологии, которые основаны на достижениях генетической и клеточной инженерии. Рассмотрены такие методы биотехнологии, как получение рекомбинантных ДНК, трансгенных животных и растений. Рассмотрены вопросы использования биотехнологических процессов в решении экологических, сельскохозяйственных, сырьевых проблем.

Предназначено для студентов очной и заочной форм обучения Института ПБиВМ по специальности 36.03.01 – «Зоотехния».

Печатается по решению редакционно-издательского совета  
Красноярского государственного аграрного университета

© Четвертакова Е.В., 2010

© Красноярский государственный  
аграрный университет, 2010

## ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология как наука может рассматриваться в двух измерениях – современном и традиционном классическом. Новейшая биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных мембранах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Современная биотехнология оказывает огромное влияние на все аспекты практической деятельности человека. С ее помощью в настоящее время получают десятки дорогостоящих биологически активных веществ (гормоны, ферменты, витамины, антибиотики, стероиды, некоторые лекарства). В медицине, благодаря применению генной инженерии, удастся нарабатывать такие биопрепараты, как человеческий инсулин, соматотропин, интерфероны, моноклональные антитела, диагностикумы. Важное значение имеет биотехнология в экологии промышленных производств на основе создания безотходных процессов (очистка воды и воздуха, подавление вредителей сельскохозяйственных культур, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем, производство бактериальных удобрений). Биотехнологические процессы являются базой для получения кормового и пищевого белка, возобновляемых источников энергии. Будущее связывается с развитием белковой инженерии, биоэлектроники (биосенсоры, биоэлементы для ЭВМ), с получением новых стимуляторов роста растений, высокоэффективных лекарственных препаратов.

Лишь в недавнее время стали использовать для практических целей растительные клетки, а животные клетки, вследствие дороговизны их культивирования, нашли лишь ограниченное применение (например, получение моноклональных антител). Уже используются в биологической промышленности разнообразные биомолекулы, особенно ферменты, из них в первую очередь амилазы и протеазы, которые применяются в пивоварении и производстве моющих веществ. Крупным успехом стало создание технологии иммобилизованных ферментов и клеток. И все же первое место в современной биотехнологии принадлежит, конечно, генетической инженерии (технологии рекомбинантных молекул ДНК). Она предоставила исследователям новую, исключительно ценную возможность изменять генетическую программу бактериальных, растительных и животных клеток.

Биотехнология многолика и по своим историческим корням, и по

своей современной структуре, объединяющей элементы фундаментальных наук и таких прикладных отраслей, как химическая технология, машиностроение и сельское хозяйство.

Современный специалист, работающий в агропромышленном производстве, должен овладеть методами биотехнологии, уметь использовать их для улучшения производства продукции сельского хозяйства, улучшения ее качества и экологической чистоты, защиты природы от загрязнения.

## ТЕМА: БИОТЕХНОЛОГИЯ: ПРИНЦИПЫ, ПРИМЕНЕНИЕ

Целью данной темы является: ознакомление с историей развития биотехнологии и становлением ее как науки; изучение приемов и методов, используемых в биотехнологии; рассмотрение возможностей использования биотехнологии в разных отраслях народного хозяйства.

### Вопросы

1. История биотехнологии и современное состояние.
2. Биосистемы, объекты и методы в биотехнологии.
3. Современная биотехнология в животноводстве.
4. Биотехнология и растениеводство.
5. Биотехнология и ветеринария.
6. Биотехнология и медицина.

### 1. История биотехнологии и современное состояние

Название науки «Биотехнология» происходит от греческих слов «bios» – жизнь, «teken» – искусство, «logos» – слово, учение, наука.

Термин «биотехнология» вошел в широкий обиход в 70-е годы XX века, хотя многие ее методы использовались испокон веков. Определение биотехнологии в довольно полном объеме дано Европейской биотехнологической федерацией, основанной в 1978 году. По этому определению, **биотехнология** – это наука, которая на основе применения знаний в области микробиологии, биохимии, генетики, геномной инженерии, иммунологии, химической технологии, приборостроения и машиностроения использует биотехнологические объекты (микроорганизмы, клетки тканей животных и растений) или молекулы (нуклеиновые кислоты, белки, ферменты, углеводы и др.) для промышленного производства полезных для человека и животных веществ и продуктов. Возможности использования биотехнологии приведены на рисунке 1.

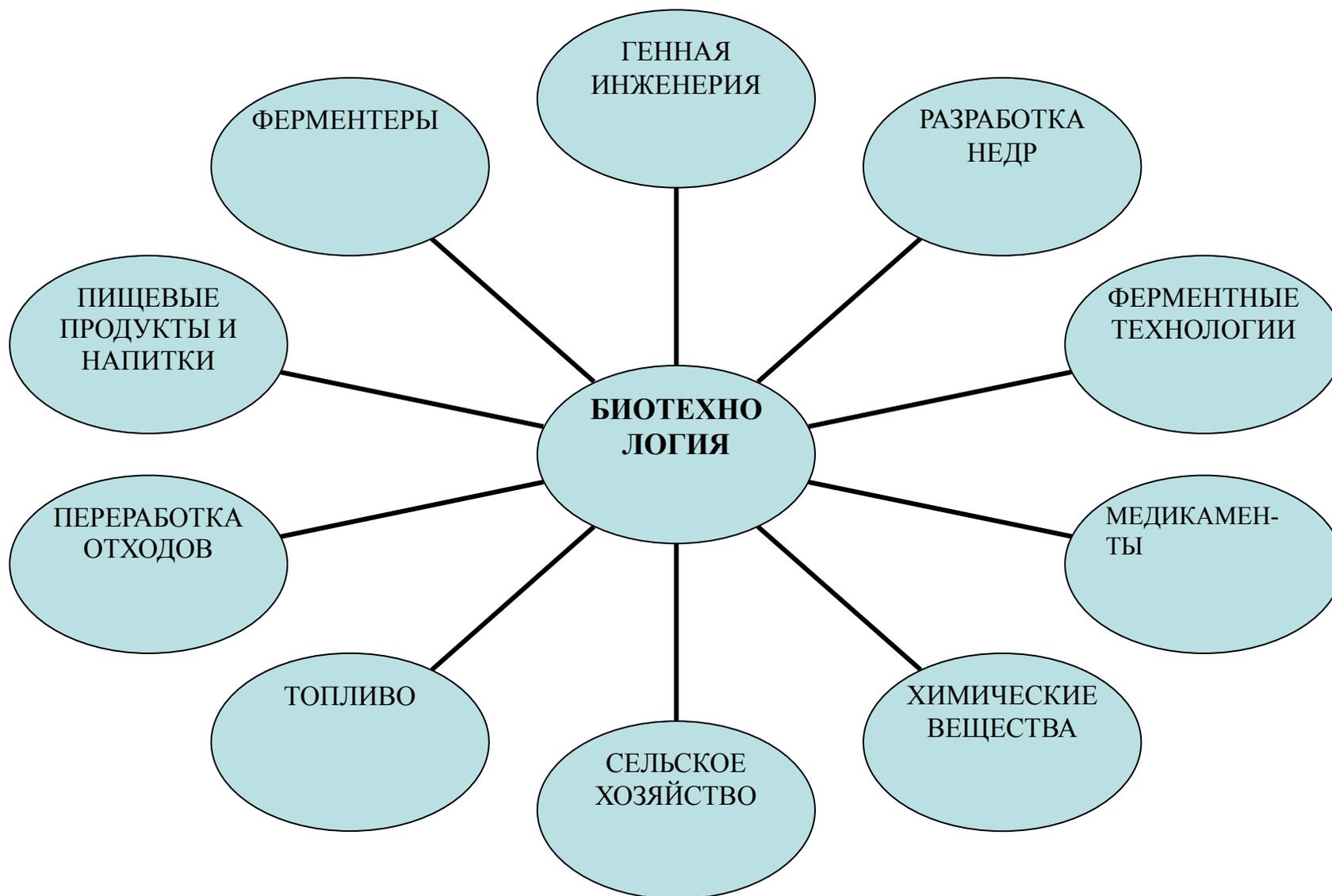


Рисунок 1 – Возможности использования биотехнологии (представленная классификация условна, различные направления могут перекрываться)

На III съезде Европейской ассоциации биотехнологов (Мюнхен, 1984 год) голландский ученый Е. Хаувинк разделил историю биотехнологии на 5 эр.

**I. Допаастеровская эра** (до 1865 года) – использование спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, сыра, хлеба. Получение ферментированных продуктов и уксуса.

**II. Послепаастеровская эра** (1866–1940 годы) – производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, органических кислот, вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей из углеводов.

**III. Эра антибиотиков** (1941–1960 годы) – производство пенициллина и других антибиотиков путем глубоинной ферментации. Культивирование растительных клеток и вирусных вакцин.

**IV. Эра управляемого биосинтеза** (1961–1975 годы) – производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение чистых ферментов. Анаэробная очистка сточных вод.

**V. Эра новой биотехнологии** (после 1975 год) – использование генной и клеточной инженерии в целях получения агентов биосинтеза, получение гибридов, моноклональных антител, трансплантация эмбрионов.

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

**1. Промышленность** (пищевой, фармацевтической, химической, нефтегазовой) – использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами.

**2. Экология** – повышение эффективности защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем.

**3. Энергетика** – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза, биоконверсии биомассы в биогаз.

**4. Сельское хозяйство** – разработка трансгенных агрокультур, получение трансгенных животных, разработка бактериальных удобрений, биологических средств защиты растений, создание кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельскохозяйственного производства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

**5. Медицина** – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностинумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии.

В обозримом будущем будут определены новые краеугольные камни биотехнологии и нас ждут новые открытия и достижения.

## **2. Биосистемы, объекты и методы в биотехнологии**

Одним из терминов в биотехнологии является понятие «биосистемы». Обобщенные характеристики биологической (живой) системы могут быть сведены к трем присущим им основным признакам:

1. Живые системы являются гетерогенными открытыми системами, обменивающиеся с окружающей средой веществами и энергией.

2. Эти системы являются самоуправляемыми, саморегулирующимися, и активными, т. е. способными к обмену информацией с окружающей средой для поддержания своей структуры и управления процессами метаболизма.

3. Живые системы являются самовоспроизводящимися (клетки, организмы).

По структуре биосистемы делятся на элементы (подсистемы), связанные между собой, и характеризуются сложной организацией (атомы, молекулы, органеллы, клетки, организмы, популяции, сообщества).

В качестве биологических объектов, или систем, которые использует биотехнология, прежде всего, необходимо назвать одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор этих объектов обусловлен следующими моментами:

1. Клетки являются своего рода «биофабриками», вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты: белки, жиры, углеводы, витамины, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр. Многие из этих продуктов, необходимые в жизни человека, пока недоступны для получения «небиотехнологическими» способами из-за дефицитности, высокой стоимости сырья или же сложности технологических процессов;

2. Клетки быстро воспроизводятся;

3. Биосинтез сложных веществ, таких, как белки, антибиотики, антигены, антитела и др. значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез. При этом исходное сырье для

биосинтеза, как правило, проще и доступнее, чем сырье для других видов синтеза;

4 Возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т. е. наличие соответствующего технологического оборудования, доступность сырья, технологии переработки и т. д.

Таким образом, природа дала в руки исследователям живую систему, содержащую и синтезирующую уникальные компоненты и, в первую очередь, нуклеиновые кислоты, с открытием которых и начали бурно развиваться биотехнология и мировая наука в целом.

**Объектами биотехнологии** являются вирусы, бактерии, грибы, протозойные организмы, клетки (ткани) растений, животных и человека, вещества биологического происхождения (например, ферменты, простагландины, лектины, нуклеиновые кислоты), молекулы.

**Методы, применяемые в биотехнологии**, определяются двумя уровнями: *клеточным* и *молекулярным*.

**В первом случае** дело имеют с бактериальными клетками (для получения вакцинных препаратов), актиномицетами (при получении антибиотиков), микромицетами (при получении лимонной кислоты), животными клетками (при изготовлении противовирусных вакцин), клеток человека (при изготовлении интерферона) и др.

**Во втором случае** дело имеют с молекулами, например, с нуклеиновыми кислотами. Однако в конечной стадии молекулярный уровень трансформируется в клеточный.

Все микрообъекты, используемые в биотехнологии, относят к акариотам, про- или эукариотам. Из группы акариот, например, оперируют вирусами, прокариот – клетками сине-зеленых водорослей и бактерий, эукариот – клетками простейших, водорослей и грибов.

Биообъекты из микромира варьируют в размерах от нанометров (вирусы, бактериофаги) до миллиметров и сантиметров (гигантские водоросли) и характеризуются относительно быстрым темпом размножения.

В результате фундаментальных биологических исследований углубляются и расширяются знания о природе и тем самым о возможностях прикладного использования той или иной биологической системы в качестве активного начала биотехнологического процесса.

### 3. Современная биотехнология в животноводстве

Генетическое совершенствование популяций сельскохозяйственных животных было и остается ключевой проблемой животноводства, от решения которой зависят уровень его интенсификации, увеличение производства высококачественных продуктов питания. В основе системы крупномасштабной селекции животных, которая определяла и определяет темпы генетического улучшения мирового животноводства, лежат принципы популяционной генетики, система ускорения репродукции животных с использованием методов искусственного осеменения и консервации гамет.

Вместе с тем достижения и огромный объем исследований в области молекулярной биологии открыли новые перспективы в совершенствовании животноводства. Возникла новая отрасль биологии — биотехнология. Главными направлениями биотехнологии является клеточная и генетическая инженерия.

К успехам клеточной инженерии в животноводстве следует отнести разработку метода трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных, прежде всего крупного рогатого скота. В настоящее время этот метод широко используется в практике животноводства.

С развитием искусственного осеменения была решена проблема ускорения распространения генетического потенциала мужских особей, что позволило на порядок повысить темпы селекции.

Была поставлена и решена проблема созревания ооцитов, оплодотворения и раннего эмбрионального развития сельскохозяйственных животных *in vitro*. Это позволило использовать значительное число женских генеративных клеток от животных с ценным генотипом уже после того, когда данные особи закончили жизненный цикл.

Кроме того, реализация данного метода способствовала получению идентичных по генотипу пар животных, которые широко используются в исследованиях влияния факторов внешней среды на животный организм. Являясь идеальными аналогами, эти особи позволяют повысить и достоверность исследований при меньшем числе животных в группах.

Микроманипуляции с эмбрионами, их разделение и агрегация позволяют получить химерных сельскохозяйственных животных. Они не представляют интереса для селекционеров, но являются объектами для изучения взаимодействий фенотипа и генотипа.

Одним из направлений по клонированию животных является применение метода введения ядра соматической клетки в энуклеированную зиготу. С применением этой методики стало возможным создание стада стандартизированных высокопродуктивных животных.

Важнейшим аспектом исследований в области клеточной инженерии являются работы по созданию линий стволовых тотипотентных клеток сельскохозяйственных животных.

Существенным достижением биотехнологии в животноводстве является использование стимуляторов, полученных трансгенными микробами-продуцентами. Примером может служить технология производства бычьего и свиного соматотропинов.

Важнейшим направлением биотехнологии в сельском хозяйстве являются конструирование генов и интеграция их в геном.

Одним из направлений исследований является получение трансгенных животных.

Получены *трансгенные мыши*, которые могут служить модельными системами для изучения болезней человека и тест-системами для исследования возможности синтеза продуктов, представляющих интерес для медицины. Используя целых животных, можно моделировать и возникновение патологии, ее развитие.

Трансгенных мышей использовали в качестве модельных систем для изучения экспрессии генов, кодирующих трансгенные продукты, которые секретируются в молоко.

Получен *трансгенный крупный рогатый скот*. Одна из целей трансгеноза крупного рогатого скота – изменение содержания в молоке различных компонентов. Другая важная задача – создание устойчивых к заболеваниям животных.

Опыты по *трансгенозу овец и коз* в основном направлены на превращение молочных желез этих животных в своеобразные биореакторы для получения белковых продуктов, используемых в медицине. Созданы трансгенные овцы и козы, в молоко которых секретировались белки человека. Были созданы трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти.

Положительные результаты были получены в ходе экспериментов с *трансгенными свиньями*. Например, созданы трансгенные свиньи, в геноме которых присутствовала следующая генетическая конструкция: регуляторная область гена  $\beta$ -глобина человека, два гена  $\alpha_1$ -глобина человека и один ген  $\beta^A$ -глобина человека. В результате ее экспрессии в клетках крови свиней синтезировался человеческий ге-

моглобин. Человеческий гемоглобин, продуцируемый трансгенными свиньями, обладал такими же химическими свойствами, что и природный человеческий. Его можно очистить от гемоглобина свиней обычной хроматографией.

Получены *трансгенные цыплята*, которых можно использовать для улучшения генотипа уже существующих пород – для придания им устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызываемым кокцидиями, повышения эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в яйцах, повышения качества мяса.

По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рыбы в искусственных условиях. Основная цель исследований в этой области – создание рекомбинантных рыб путем трансгеноза. Получены *трансгенные виды рыб* – карпа, лосося, зубатки, форели и т. д. Трансгенные лососи крупнее и быстрее прибавляют в весе. Но оказалось, что этот лосось может вытеснить обычную рыбу. Самцы нормального лосося перестали обращать внимание на более мелких «натуральных» самок. К тому же мясо модифицированного лосося имеет не слишком приятный цвет и вкус.

Нельзя до конца опытов и тестов выпускать трансгенные образцы на свободу, так как последствия могут быть непредсказуемыми.

#### 4 Биотехнология и растениеводство

Культурные растения страдают от сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Перечисленные факторы наряду с почвенной эрозией и градом значительно снижают урожайность сельскохозяйственных растений. Поэтому основной целью биотехнологических экспериментов на растениях является создание новых сортов культурных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды, насекомым-вредителям, гербицидам, вирусам и бактериям.

Биотехнологические пути защиты растений от вредоносных агентов включают:

- 1) выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам;
- 2) химические средства борьбы с сорняками, грызунами, нематодами, бактериями и вирусами;
- 3) биологические средства борьбы с вредителями, использова-

ние их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой ценности, задача создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах.

Разработки нацелены на повышение энергетической эффективности различных процессов в растительных тканях, начиная от поглощения кванта света и кончая ассимиляцией  $\text{CO}_2$  и водно-солевым обменом.

Для достижения этих целей применяют методы генетической инженерии.

Гены устойчивости к некоторым гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, были успешно перенесены в растения табака (1986). Разведение устойчивых к гербицидам растений открывает возможность их применения для уничтожения сорняков непосредственно на угодьях, занятых сельскохозяйственными культурами.

Важное место в выведении новых сортов растений занимает метод культивирования *in vitro*. Регенерируемая из таких клеток «молодая поросль» состоит из идентичных по генофонду экземпляров, сохраняющих ценные качества избранного клеточного клона. Например, в Австралии из культивируемых *in vitro* клеточных клонов выращивают красные камедные деревья (австралийские эвкалипты), отличающиеся способностью расти на засоленных почвах. Предполагается, что корни этих растений будут выкачивать воду из таких почв и тем самым понижать уровень грунтовых вод. Это приведет к снижению засоленных слоев почвы в результате переноса минеральных солей в более глубокие слои с потоками дождевой воды.

В Малайзии из клеточного клона получена масличная пальма с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и увеличенной способностью к образованию масла (прирост на 20–30%).

Клонирование клеток с последующим их скринингом и регенерацией растений из отобранных клонов рассматривают как важный метод сохранения и улучшения древесных пород умеренных широт, в частности, хвойных деревьев. Растения-регенеранты, выращенные из клеток или тканей меристемы, используют для разведения спаржи, земляники, брюссельской и цветной капусты, гвоздик, папоротников, персиков, ананасов, бананов.

С клонированием клеток связаны надежды на устранение вирус-

ных заболеваний растений. Разработаны методы, позволяющие получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений. В дальнейшем среди регенерированных растений проводят отбор особей, выращенных из незараженных клеток, и выбраковку больных растений.

Клонирование клеток является перспективным методом получения не только новых сортов растений, но и промышленно важных продуктов. При правильном подборе условий культивирования изолированные клетки более продуктивны, чем целые растения. Иммунизация растительных клеток или протопластов нередко ведет к повышению их синтетической активности.

## **5 Биотехнология и ветеринария**

Генетическая и клеточная инженерия оказала большое влияние и на развитие современной ветеринарной науки, в частности в направлении создания нового поколения биологических препаратов, разработки методов диагностики и средств специфической профилактики инфекционных болезней животных. При этом на первый план выдвигается разработка высокочувствительных и высокоспецифичных методов диагностики, в том числе экспресс-методов на основе достижений в физико-химической биологии, технологии рекомбинантных ДНК, гибридной технологии.

В последнее время широкое распространение получил иммуноферментный метод индикации различных веществ. На его основе разрабатываются высокочувствительные диагностикумы для ряда инфекционных и инвазионных болезней животных. Так, в настоящее время освоено производство иммуноферментного диагностикума вирусного энтерита телят, изготовлены опытно-промышленные партии компонентов для иммуноферментной диагностики ряда других заболеваний.

На основе созданной рекомбинантной плазмиды разработан и испытан в России и Венгрии на большом клиническом материале гибридационный зонд для идентификации возбудителя микоплазмоза свиней. Получена рекомбинантная плазида, разработан и испытан гибридационный зонд для идентификации возбудителей туберкулеза паравирусной инфекции свиней, герпесвируса, а также для идентификации микоплазменной контаминации клеточных культур.

Метод цепной полимеризации (ПЦР) позволяет амплифициро-

вать любую нуклеотидную последовательность. Он высокочувствителен и специфичен, может широко использоваться как исследовательский тест для идентификации различных агентов. В том числе для выявления ретровирусов.

С помощью гибридной технологии получены гибридные культуры, продуцирующие моноклональные антитела к вирусам ящура, лейкоза крупного рогатого скота, ринопневмонии лошадей, классической и африканской чумы свиней, бруцеллам, микобактериям, листериям, антигенам эхинококка и т. д. На их основе разработаны различные диагностические тест-системы.

Применение биотехнологических методов позволяет получать вакцины, которые не могли быть созданы с помощью традиционных методов, против гельминтозов, болезней, вызываемых простейшими, риккетсиями, некоторыми бактериями и вирусами. Наиболее значительным достижением в этой области является производство нерепликативных вакцин, в которых используется лишь фрагмент вируса, имитирующий его иммуногенный участок.

Большое внимание уделяется исследованиям, в которых генам чужого вектора вводится ген, кодирующий иммуногенную фракцию паразита, бактерии или вируса. Такие вакцины предусматриваются для вакцинации против гельминтов (шистозомы), протозойных (бабезнозы), вирусных (бешенство, чума крупного рогатого скота) болезней.

## **6 Биотехнология и медицина**

Нет такого экспериментального подхода или исследовательского направления в биотехнологии, которые бы ни получили применения в медицине. Вот почему столь многообразны связи между биотехнологией и самой гуманной из всех наук – медициной.

С помощью биотехнологии получены антибиотики, гормоны, интерфероны, интерлейкины, моноклональные антитела и ДНК или РНК-пробы, рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены, ферменты медицинского назначения.

Итак, потенциал биотехнологии велик. Все направления биотехнологии должны служить человечеству. В современных условиях открываются широкие перспективы и возможности для использования новых научных исследований и разработок на благо человека и общества. Таким образом, мы ознакомились с этапами развития биотехно-

логии, методами и приемами, рассмотрели перспективы использования биотехнологии в народном хозяйстве.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Дайте определение термину «Биотехнология».
- 2 Назвать возможности использования биотехнологии.
- 3 Кем и когда история развития биотехнологии была поделена на пять периодов?
- 4 Охарактеризуйте допастеровскую эру развития биотехнологии.
- 5 Какие приемы использовались в этот период?
- 6 Охарактеризуйте послепастеровскую эру. Производство каких веществ было налажено с помощью биотехнологических методов и приемов?
- 7 Охарактеризуйте эру антибиотиков. Какими еще достижениями биотехнологии отмечен этот период?
- 8 Охарактеризуйте эру управляемого биосинтеза.
- 9 Охарактеризуйте эру новой биотехнологии.
- 10 Дайте определение понятию «биосистемы». Назовите обобщенные характеристики биологической (живой) системы.
- 11 На какие иерархические уровни можно подразделить все биосистемы?
- 12 Назовите объекты и методы биотехнологии.
- 13 Поясните, что означает термин «первичные метаболиты» и «вторичные метаболиты» (идиолиты). Какие вещества к ним относят?
- 14 Расскажите о достижении современной биотехнологии в животноводстве и растениеводстве.
- 15 Расскажите о достижении биотехнологии в ветеринарии и медицине.

### **Рекомендуемая литература**

1. Тихонов, И.В. Биотехнология / И.В. Тихонов [и др.]. – СПб.: ГНОРД, 2005.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак . – М.: Мир, 2002.
3. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова [и др.]. – М.: Академия, 2003.

## ТЕМА: ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Цель изучения данной темы состоит: в освоении приёмов и методов генетической инженерии; рассмотрении перспектив использования в народном хозяйстве.

### Вопросы

- 1 История развития генетической инженерии.
- 2 Биотехнология рекомбинантных ДНК.
- 3 Конструирование рекомбинантных ДНК.
- 4 Экспрессия чужеродных генов.
- 5 Использование генетической инженерии в животноводстве.

### 1 История развития генетической инженерии

**Генетическая инженерия** – ветвь молекулярной генетики, исследующая возможности и способы создания лабораторным путем генетических структур и наследственно измененных организмов, т. е. создания искусственных генетических программ, с помощью которых направленно конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм.

Обычно употребляют два названия данного научного направления: **генетическая инженерия** и **генная инженерия**, являющиеся как бы синонимами. Однако их смысловое содержание неодинаково: генетическую инженерию связывают с генетикой, а генная инженерия имеет отношение только к генам. Кроме того, генетическая инженерия точнее раскрывает содержание дисциплины – создание генетических программ, основная задача которых создание *in vitro* молекул ДНК посредством соединения фрагментов ДНК, которые в естественных условиях чаще не сочетаются благодаря межвидовым барьерам (рекомбинантные ДНК).

Согласно определению национальных институтов здоровья США, «рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке».

Генетическая инженерия возникла на стыке многих биологических дисциплин: молекулярной генетики, энзимологии, биохимии

нуклеиновых кислот и др. Первая рекомбинантная ДНК получена в 1972 году (П. Бергом с сотр.) и была составлена из фрагмента ДНК обезьяньего вируса ОВ40 и бактериофага  $\lambda$  dvgal с галактозным опероном *E. coli*. Формально 1972 год следует считать датой рождения генетической инженерии. Генетическая инженерия имеет яркую историю благодаря тому общественному резонансу, который она вызвала с самых первых своих шагов. Начало этим событиям положило послание участников Гордоновской конференции (1973) президиуму АН США, в котором говорилось о возможной опасности технологий рекомбинантных ДНК для здоровья человека. Возможные блага генетической инженерии признавались с самого начала, но разногласия по данной проблеме не затихли и сейчас. В таблице 1 перечислены основные этапы становления и развития генетической инженерии.

Таблица 1 – Основные этапы развития генетической инженерии

Год	Автор	Содержание открытия
1	2	3
1869	Ф. Мишер	Выделена ДНК из ядер клеток гноя
1953	Д. Уотсон, Ф. Крик	Сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК
1961	А. Мармур П. Доти	Открыто явление ренатурации ДНК и установлены точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот
1962	В. Арбер	Впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК
1966	М. Ниренберг, С. Очоа, Г. Корана	Расшифрован генетический код
1967	М. Геллерт	Открыта ДНК-лигаза
1968	М. Мезельсон и Е. Юань	Выделена первая рестриктаза
1972–1973	Г. Бойер, С. Козн, П. Берг (Стэндфордский университет и Калифорнийский университет в Сан-Франциско)	Разработана технология клонирования ДНК
1975–1977	Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт	Разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности

1	2	3
1979	Г. Корана	Синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК
1981– 1982	Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг, Г. Рубин	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные экземпляры дрозофилы
1993	Л.К. Эрнст, Г. Брем, И.В. Прокофьев	Получены трансгенные овцы с геном химозина

## 2 Биотехнология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК включает набор как новых методов, так и заимствованных из других дисциплин, в частности из генетики микроорганизмов. Используя технологию рекомбинантных ДНК можно получить минорные клеточные белки в больших количествах и проводить тонкие биохимические исследования структуры и функций белков, а также осуществлять детальный химический анализ генетического материала. К наиболее важным методам биотехнологии рекомбинантных ДНК следует отнести следующие:

- 1 Специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами.
- 2 Быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК.
- 3 Гибридизация нуклеиновых кислот.
- 4 Клонирование ДНК.
- 5 Генетическая инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя решать такие задачи, как определение строения и функций не только белков, но и индивидуальных доменов, а также расшифровывать механизмы регуляции экспрессии генов, получать многие белки, участвующие в регуляции обменных процессов, клеточной пролиферации и развитии организма.

**Расщепление ДНК в специфических участках** нуклеотидных последовательностей осуществляется особыми ферментами рестрикции-

рующими нуклеазами, способными разрушить чужеродную ДНК. Все ферменты условно можно разделить на следующие группы:

- 1) используемые для получения фрагментов ДНК;
- 2) синтезирующие фрагменты ДНК на матрице РНК;
- 3) соединяющие фрагменты ДНК;
- 4) позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК;
- 5) применяемые для приготовления гибридизационных проб.

Каждый фермент, способный разрушить чужеродную ДНК, опознает в ней специфическую последовательность из 4–6 нуклеотидов. Соответствующие последовательности в геноме бактерий замаскированы метилированием остатков с помощью метилаз.

Согласно номенклатуре, предложенной Х. Смитом и Д. Натансоном, название рестриктазы складывается из трех букв: первая обозначает родовое название, две последующие – первые буквы вида. Например, фермент из *E. coli* обозначают как Eco и т. д. Типовая, или штаммовая, идентификация следует за родовидовой, например, EcoRI.

В настоящее время различные фирмы выпускают более 100 разнообразных ферментов, опознающих различные последовательности нуклеотидов.

Многие рестриктазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов и образованием на концах фрагментов коротких одноцепочечных участков. Они способны образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента (липкие концы). Липкие концы позволяют легко соединить любые два фрагмента ДНК в одно целое. Полученный фрагмент ДНК (любого происхождения) можно встроить в очищенную ДНК плазмиды или бактериального вируса.

Сравнение размеров фрагментов ДНК после обработки соответствующего участка генома набором рестриктаз позволяет построить рестрикционную карту.

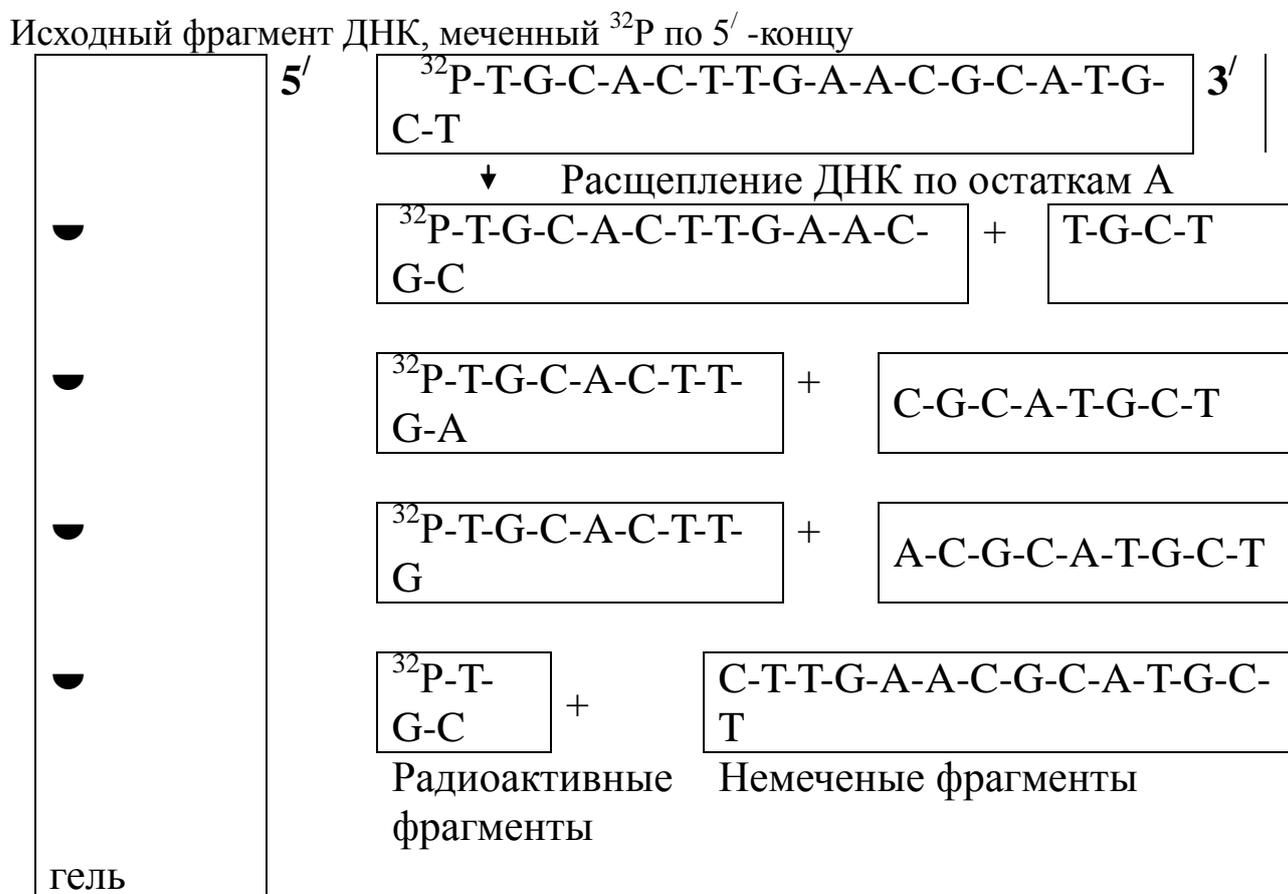
Для успешного решения задач генетической инженерии очень важно быстро **секвенировать** (определить последовательность нуклеотидов) любые очищенные фрагменты ДНК.

В биотехнологии рекомбинантных ДНК обычно использует два различных метода секвенирования ДНК: **химический и ферментативный**. Оба метода чрезвычайно надежны, быстры в исполнении и

результативны. Результаты секвенирования позволяют также на основе генетического кода определить аминокислотную последовательность белка в соответствии с нуклеотидной последовательностью в соответствующем гене.

Исходный фрагмент ДНК, меченный по 5'-концу, подвергается специфическому расщеплению по определенной нуклеотиду (например, А), в результате чего образуются радиоактивные фрагменты разной длины, которые разделяются по размерам при гелеэлектрофорезе, а радиоактивные из них выявляются с помощью радиоавтографии.

Обычно химическая процедура расщепления ДНК выполняется одновременно для четырех одинаковых проб ДНК с использованием химических агентов, расщепляющих ДНК по отдельным нуклеотидам (Т, С, G и А). Полученные образцы подвергают электрофорезу на параллельных дорожках одного геля, и по его результатам можно определить нуклеотидную последовательность ДНК.



Электрофореграмма

Рисунок 2 – Схема химического метода секвенирования ДНК

**Энзиматический метод секвенирования** основан на энзимати-

ческом введении нуклеотида, терминирующего полинуклеотидную цепь. В этом случае обычно используют дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, в которых дезоксирибоза -3'-ОН, представленная в нормальных нуклеотидах, отсутствует. Такой модифицированный нуклеотид, внедряясь в цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразы, блокирует присоединение следующего нуклеотида. Синтез *in vitro* молекулы ДНК в присутствии затравки (праймера) и небольшого количества одного из таких модифицированных нуклеотидов приводит к образованию фрагментов ДНК в виде «лесенки». Если для получения таких фрагментов применять меченую ДНК, а электрофоретический анализ проводить на четырех дорожках геля, то можно определить последовательность нуклеотидов. В настоящее время используют модифицированный метод, сводящийся к флуоресцентному анализу наборов фрагментов ДНК в процессе движения по одной дорожке геля.

Важнейший метод получения рекомбинантных ДНК основан на способности нуклеиновых кислот быстро восстанавливать свою структуру после нагревания до 100 °С в сильно щелочной среде (рН 13). При нагревании до 100 °С комплементарные пары оснований разрушаются и ДНК диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс назван денатурацией ДНК («плавлением»). Выдерживание комплементарных цепей при температуре 65 °С приводит к их спариванию и восстановлению структуры двойной спирали (гибридизация, ренатурация, или «отжиг»). Это свойство ДНК широко используют в химической систематике, а также для решения эволюционных и филогенетических проблем.

Скорость восстановления двойной спирали зависит от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей и их концентрации в растворе. Скорость реакции гибридизации можно использовать для определения концентрации любых последовательностей РНК или ДНК в смеси, содержащей и другие фрагменты нуклеиновых кислот. Для этого необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить. Обычно фрагмент ДНК, полученный клонированием либо химическим путем, метят по <sup>32</sup>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. Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов позволяет идентифицировать нуклеотидные последовательности в очень низкой концентра-

ции и тем самым определять, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки. ДНК-зонды применяют для поиска родственных генов.

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. Обмен генами, а также введение в клетку гена другого вида организма осуществляют посредством *генетической рекомбинации in vitro*. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на *E. coli*. Он основан на важном свойстве ДНК – способности к перестройкам, изменяющим комбинацию генов в геноме и их экспрессию. Такая уникальная способность ДНК позволяет приспособляться данному виду к изменяющейся среде.

Генетическую рекомбинацию подразделяют на два больших класса: **общую и сайт специфическую**.

В процессе общей рекомбинации генетический обмен в ДНК происходит между гомологичными нуклеотидными последовательностями, например, между двумя копиями одной и той же хромосомы в процессе мейоза (кроссинговера) или при скрещивании и перегруппировке генов у бактерий.

В процессе сайт специфической рекомбинации в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной и той же или обеих спиралей ДНК, распознаваемые особым сайт специфическим ферментом, что приводит к трансформации распределения нуклеотидных последовательностей в геноме. Любые комплементарные взаимодействия между двумя гомологичными спиральями ДНК возможны лишь тогда, когда в одной из двух цепей происходит разрыв. К числу факторов, вызывающих такие одноцепочечные разрывы, относят: химические агенты, некоторые виды излучения, специфические белки.

Например, у *E. coli* обнаружен белок *rec BCD*, который вызывает в молекулах ДНК одноцепочечные разрывы (рис. 3). Белок *rec BCD* представляет собой ДНК-зависимую АТФазу, которая действует как ДНК-хеликаза, перемещающаяся по спирали ДНК и вызывающая ее расплетение. Под влиянием этого белка, обладающего нуклеазной и хеликазной активностью, на двойной спирали ДНК возникает разрыв с образованием одноцепочечного участка «ус». Белок *rec BCD* присоединяется к двойной спирали ДНК с одного конца (5') и со скоро-

стью около 300 нуклеотидов в секунду движется вдоль спирали ДНК за счет гидролиза АТФ.

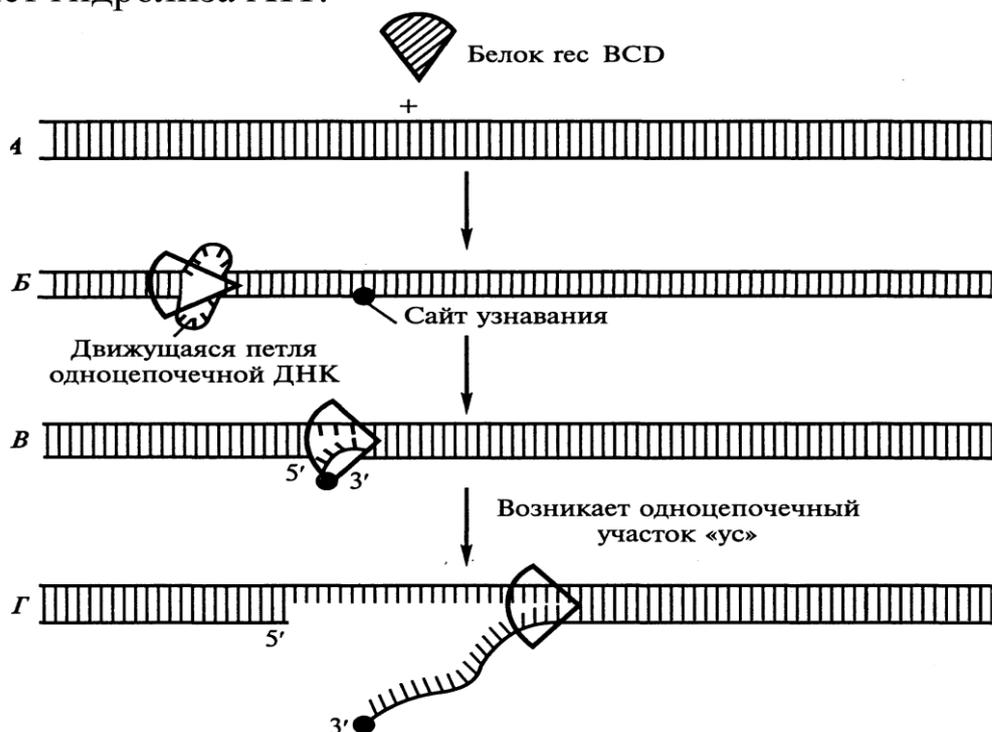


Рисунок 3 – Схема процесса общей рекомбинации с участием белка гес BCD у *E. coli*: А – двойная спираль ДНК; Б – присоединение к двойной спирали белка гес BCD с последующим его перемещением; В – возникновение разрыва в сайте узнавания; Г – образование одноцепочечного участка «ус»

Одновременно с белком движется и возникшая петля ДНК. Когда петля на спирали достигает участка, называемого сайтом узнавания, одна из цепей разрывается с освобождением небольшого одноцепочечного участка «ус». Возникший «ус» инициирует дальнейшую генетическую рекомбинацию.

### 3 Конструирование рекомбинантных ДНК

Сущность генетической инженерии сводится к целенаправленному конструированию генетических систем вне организма с последующим введением и в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся частью реципиентного организма, кроме того, они привносят в него новые генетические и физиолого-биохимические свойства, к числу таких свойств можно отнести синтез аминокислот, белков, гормонов, ферментов, витаминов и др.

Один из важных этапов конструирования молекулы ДНК – лиги-



В этом случае реакция лигирования имеет биохимические особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по «липким» концам.

После того как рекомбинантная ДНК сшита, ее вводят в живые клетки. Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться (интегрироваться) в ее геном и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации. Молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться, называются **векторными молекулами**. К числу векторов относят плазмиды, бактериофаги, вирусы животных.

Векторы должны обладать следующими особенностями:

1 Иметь субстратные участки для определенных эндонуклеаз рестрикции.

2 Иметь свойства репликона.

3 Содержать один или несколько маркерных генов, которые после проникновения вектора в клетку придают ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора.

В частности, для бактериальных векторов в качестве маркерных генов чаще всего используются гены, вызывающие устойчивость клеток к некоторым антибиотикам.

Таким образом, все векторы обеспечивают репликацию встроенных генов, их экспрессию, интеграцию в хромосому клетки и т. д. Чаще других в генетической инженерии в качестве векторов используют плазмиды. **Плазмидами** называют бактериальные репликоны (внехромосомные элементы наследственности), стабильно наследуемые. Они представляют собой двуцепочечные кольцевые молекулы ДНК с переменными молекулярными массами. По размеру они соответствуют 1–3% генома бактериальной клетки.

Плазмиды разделяют на **конъюгативные**, способные сами перенестись в реципиентные клетки с помощью конъюгации, и **неконъюгативные**, не обладающие этим свойством.

Они детерминируют разные свойства: резистентность к антибиотикам (R-плазмиды); биодegradацию (D-плазмиды) и др. Например, плазмиды стафилококков несут гены устойчивости к пенициллину, соединениям ртути и др. Гены устойчивости к тяжелым металлам обнаружены также в составе R-плазмид *E. coli*. Количество плазмид в клетке может колебаться от одной до более ста. В целом, чем крупнее плазида, тем меньше количество ее копий в клетке.

Первый плазмидный вектор был получен С. Коэном (1973). Его источником была плазида *E. coli* R<sub>6-5</sub> с Мг 65 кДа. Плазида стала родоначальником серии векторов и других структур.

Плазмидные векторы в настоящее время чрезвычайно разнообразны за счет следующих свойств:

1) уменьшения размеров плазмиды вследствие изъятия участков, не обязательных для репликации (чем больше плазида содержит уникальных участков узнавания для рестриктаз, тем она универсальнее);

2) гибридизации векторов одного рода с другими векторами или природными плазмидами;

3) использования новых плазмид;

4) применения транспозонов;

5) создания векторов с генетическими маркерами, позволяющими вести отбор рекомбинантных клонов.

**Экариотические вирусы** до сих пор нашли более скромное применение в качестве векторов. Практически используются только онкогенный вирус SV 40 и его производные. Все эти векторы – дефектные вирусы, не способные давать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина. Анализируемую ДНК можно вводить и в другие репликоны, способные размножаться в клетках, например, бактериофаги. Чаще всего из известных фагов в качестве векторов применяют сконструированные производные фага  $\lambda$  и фагов M13 и fd.

#### 4 Экспрессия чужеродных генов

Эффективность функционирования бактериальных генов не одинакова, что обуславливает варибельность концентрации отдельных белков в зависимости от их функций. Такие вариации белков, например, у *E. coli*, обусловлены системой контроля генной экспрессии, осуществляемой в основном на уровне транскрипции ДНК, и зависят от количества синтезируемой на данном гене мРНК и активности фермента РНК-полимеразы. Порядок в чередовании нуклеотидных последовательностей в промоторном участке структурного гена определяет степень активности РНК-полимеразы и инициацию процесса транскрипции.

Бактериальные гены, включенные в геном, как правило, экспрессируются достаточно легко, давая мРНК и белок в силу того, что в сигнальных последовательностях, управляющих процессами транс-

крипции и трансляции, у различных прокариотических организмов много общих черт. Экспрессия генов эукариот в бактериях происходит редко, поскольку регуляторные участки эукариот отличны от таковых у бактерий.

Регуляторные (сигнальные) участки не узнаются бактериальными РНК-полимеразами, что приводит к замедлению транскрипции. При клонировании геномной ДНК эукариотической клетки экспрессия генов не происходит из-за отсутствия у бактерий системы сплайсинга. Следовательно, для репрессии эукариотических генов в клетках прокариот необходимо, чтобы данные гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. В связи с этим для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК (или синтетическая ДНК), содержащая кодирующую последовательность, в составе векторной молекулы (например, плазмиды) присоединяется к регуляторным элементам бактерии-промотора, оператору и рибосомам-связывающему участку.

Таким образом, в сконструированных промежуточных рекомбинантных ДНК эукариотический ген будет находиться под контролем бактериальных регуляторных элементов. Целесообразнее встраивать ген в подходящий вектор для экспрессии, который уже содержит регуляторные элементы, способствующие активной экспрессии встроенного гена после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку

Например, к таким эффективным регуляторным участкам принадлежит промотор гена  $\beta$ -лактамазы. Промотор гена  $\beta$ -лактамазы нерегулируемый, а использование таких промоторов не всегда удобно, так как синтезированные белки в большом количестве могут блокировать рост бактерий. В связи с этим целесообразнее использовать регулируемые сильные промоторы, включить которые для синтеза чужеродного белка можно и в том случае, когда получена большая бактериальная масса. В частности, к числу регулируемых сильных промоторов следует отнести термочувствительный промотор  $p_L$ , который отвечает за экспрессию нескольких генов бактериофага. Белок репрессор, блокирующий данный промотор, активен при 31 °С, но неактивен при 38 °С, следовательно, при инкубировании бактерий при 31 °С чужеродный ген не экспрессируется и, наоборот, повышение температуры вызывает инактивацию репрессора и высокий уровень синтеза нужного белка.

Последовательность оснований длиной 6–8 нуклеотидов, распо-

ложенная непосредственно перед иницирующим кодоном АУГ у *E. coli*, определяет эффективность процесса трансляции. Эта последовательность представляет собой участок связывания мРНК с рибосомой, и его сдвиг в ту или иную сторону способен уменьшать эффективность трансляции мРНК. По имени исследователей, идентифицировавших этот участок, он был назван **последовательностью Шайн–Дальгарно**. Обычно эту последовательность включают в состав самого вектора вместе с иницирующим кодоном на нужном расстоянии. При экспрессии векторов такого типа образуется гибридный белок, в котором несколько N-концевых аминокислотных остатков происходит от источника регуляторных элементов и иницирующего кодона прокариотического гена. Такие гибридные белки часто более стабильны; обработка их химическим или ферментативным способом приводит к выделению эукариотической части белка.

Суммарная активность экспрессируемого гена возрастает с ростом числа копий рекомбинантной ДНК в расчете на клетку. Используя многокопийные плазмиды, можно получить сверхсинтез нужных белковых продуктов. Получены температурно-чувствительные мутантные плазмиды, способные накопить до 1–2 тыс копий на клетку без нарушения жизненно важных функций бактерий. Обычно же используемые плазмидные векторы поддерживаются в клетке в количестве 20–50 копий. Получение бактериальных штаммов сверхпродуцентов плазмидных генов – одна из важнейших задач современной биотехнологии в экономическом, медицинском и социальном аспектах.

## **5 Использование генетической инженерии в животноводстве**

Применение методов генетической инженерии в животноводстве открывает перспективу изменения ряда свойств организма: повышение продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличение скорости роста, улучшение качества продукции и др. Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть **трансгенными**, а ген, интегрированный в геном реципиента, **трансгеном**. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества, а дальнейшая селекция позволяет закрепить их в потомстве и создавать трансгенные линии.

Этапы получения трансгенных животных путём микроинъекции ДНК представлена на схеме (рис. 4).

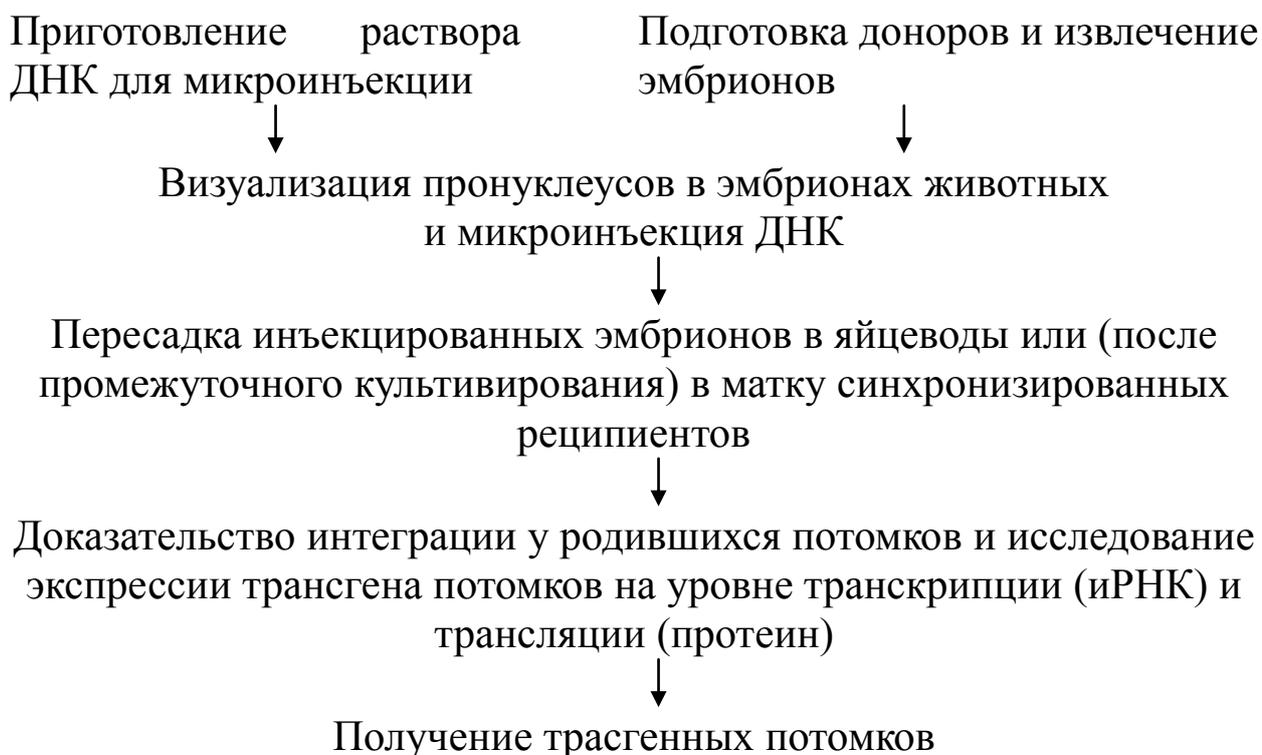


Рисунок 4 – Схема получение трансгенных животных

Для исследования у трансгенных животных выделяют РНК из тех тканей, в которых предполагается наиболее высокий уровень экспрессии. Качественный и количественный анализы экзогенных белков позволяют судить об уровне трансляции инъекцированного генного материала.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появиться так называемые *мозаики*. К мозаикам относят животных, происходящих из одной зиготы, но имеющих разные генотипы. Помимо клеточных линий, содержащих трансген, они имеют еще нетрансгенные клеточные линии. Подсчитано, что около 30% первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции ДНК, мозаики, что затрудняет создание чистых *трансгенных линий* животных. Этим объясняется тот факт, что трансген передается потомству с ожидаемой в соответствии с законами Г. Менделя частотой 50%. Часть мозаиков вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии – выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням,

а также создание так называемых животных-биореакторов – продуцентов ценных биологически активных веществ.

В конце 70-х годов XX века на основе технологии рекомбинантной ДНК получили гормон роста (ГР) микробного происхождения. Было доказано, то ГР оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный. Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23–31% при дозе 13 мг в день. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие использовать его один раз в две недели и даже в месяц. При ежедневной инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20–30% при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши с геном ГР были получены в 1982 году. У них отмечались повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы. Однако у трансгенных свиней с геном ГР (1989) увеличение роста не наблюдалось.

У потомства трансгенных свиней, получавших модифицированный кормовой рацион с повышенным содержанием белка (18% сырого протеина) и с дополнительным количеством лизина, отмечались более высокие среднесуточные привесы (на 16,5%).

У трансгенных овец с генами ГР и РФ ГР, несмотря на повышенный уровень ГР, скорость роста не увеличивалась. Вместе с тем, по данным большинства исследователей, у трансгенных свиней наряду с повышением содержания белка наблюдалось двукратное уменьшение толщины шпика (7–8 мм у трансгенных против 18–20 мм у контрольных животных); аналогичные показатели отмечены у трансгенных овец (25–30% жира у контрольных животных против 5–7% у трансгенных овец).

Рассматривается возможность уменьшения лактозы в молоке путем создания животных, у которых присутствует специфический для молочной железы промотор, соединенный с геном фермента  $\beta$ -галактозидазы, катализирующий распад лактозы. Молоко таких животных, не содержащее лактозы, могут использовать люди, у которых не синтезируется  $\beta$ -галактозидаза. Ведутся работы по введению генных конструкций в организм трансгенных животных, вырабатывающих антитела, предотвращающие маститы.

Другая важная задача – выведение трансгенных животных, устойчивых к заболеваниям. Ведутся исследования в целях получения трансгенных животных, резистентных к маститу за счет повышения содержания белка лактоферина в тканях молочной железы. Л.К. Эрнст продемонстрировал устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК к лейкозу крупного рогатого скота, к заражению вирусом лейкоза.

Использование трансгенных животных в медицине является перспективным. Получение биологически активных соединений за счёт включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков.

В России группой ученых под руководством Л.К. Эрнста получены трансгенные овцы с геном химозина, в 1 л молока которых содержится 200–300 мг химозина, основного компонента для производства сыра. Из 3 л молока трансгенной овцы можно получить достаточное количество химозина для производства 1 т сыра из коровьего молока.

Возможности генетической инженерии в животноводстве и других отраслях народного хозяйства огромны и перспективны. На основе методов генетической инженерии получены инсулин, соматотропин, интерфероны.

Таким образом, нами изучены приемы и методы генетической инженерии. Освоены методы биотехнологии рекомбинантных ДНК, химический и энзиматический методы секвенирования ДНК. Обозначены векторные молекулы, используемые в генетической инженерии. Узнали о достижениях генетической инженерии в отрасли животноводства и рассмотрели перспективы дальнейшего использования.

### **Контрольные вопросы**

1. Дайте определение термину «генетическая инженерия», «рекомбинантная ДНК».
2. Когда и кем была получена первая рекомбинантная ДНК? Из каких фрагментов она была составлена?
3. Перечислите основные этапы становления и развития генетической инженерии.
4. Перечислите наиболее важные методы биотехнологии рекомбинантных ДНК.
5. На какие группы можно условно разделить ферменты, расщепляющие ДНК в специфических участках?

6. Расскажите о химическом методе секвенирования ДНК. Приведите схему.
7. На чем основан энзиматический метод секвенирования ДНК?
8. С какой целью используют ДНК-зонды?
9. Расскажите об общей и сайт специфической генетической рекомбинации. Приведите схему процесса общей рекомбинации с участием белка *recBCD* у *E. coli*.
10. Что такое лигирование, какими основными методами осуществляется?
11. Расскажите о сшивании генов (фрагментов) ДНК по «липким» концам.
12. Какие молекулы ДНК называют векторными?
13. Какими особенностями должны обладать векторы?
14. Дайте определение термину «плазмида». Какие плазмиды называют конъюгативными, а какие неконъюгативными?
15. Кем и когда был получен первый плазмидный вектор?
16. Какие векторные плазмиды и векторные вирусы называют **гибридными** (или химерными) **плазмидами** (или фагами)?
17. Дайте определение термину «**трансфекция**».
18. Расскажите об экспрессии чужеродных генов у прокариот.
19. Назовите достижения генетической инженерии в отрасли животноводства. Какие имеются перспективы дальнейшего использования методов и приемов генетической инженерии?
20. Дайте определение понятиям «**трансгенное животное**», «**трансген**».
21. Перечислите этапы получения трансгенных животных.
22. Какие приёмы используют для трансформации генов в геном животного?
23. Почему образуются организмы «мозаики»?

### Рекомендуемая литература

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.
2. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003.
3. Тихонов, И.В. Биотехнология / И.В. Тихонов [и др.]. – СПб.: ГНОРД, 2005.
4. Клонирование ДНК: методы /под ред. Д. Гловера – М.: Мир, 1988.

## **ТЕМА: КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**

Цель заключается в освоении биотехнологических методов и приемов и возможности их применения в клеточной инженерии.

### **Вопросы**

- 1 Краткая история предмета.
- 2 Этапы получения гибридных клеток.
- 3 Возможности метода слияния клеток.
- 4 Гибридная технология.
- 5 Клонирование животных.
  - 5.1 История метода.
  - 5.2 Клонирование млекопитающих.
  - 5.3 Методы трансплантации ядер.
- 6 Трансплантация эмбрионов.

### **1 Краткая история предмета**

Клеточная инженерия – одно из наиболее важных направлений в биотехнологии.

Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияния клеток может быть полным, или же клетка-реципиент может приобрести отдельные части клетки-донора: цитоплазму, митохондрии, хлоропласты, ядерный геном или его крупные блоки. Введение небольших блоков генетической информации обычно осуществляется средствами генетической инженерии. Соматическая гибридизация имеет более широкие возможности для скрещивания филогенетически отдаленных организмов, чем половое скрещивание.

Бурное развитие клеточной инженерии пришлось на 50-е годы XX века, хотя попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. В конце XIX – начале XX века немецкие ученые Х. Фехтинг (1892), С. Рехингер (1893), Дж. Хаберланд (1902) сделали первую неудачную попытку стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Несмотря на отсутствие положительных результатов, их работы представляют большой интерес. В них были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того вре-

мени и нашли свое подтверждение несколько десятилетий спустя. Так, Х. Фехтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. С. Рехингер определил минимальный размер сегмента, образующего каллус. Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5–2 мм клетки не делились. Дж. Хаберландт впервые четко сформулировал идеи о возможности культивирования *in vitro* изолированных клеток растений и о тотипотентности клеток, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовать свой потенциал развития.

Первые успехи были получены в 1922 году американским ученым В. Роббинсом и немецким ученым В. Котте. Независимо друг от друга они показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Считается, что их работы легли в основу метода культуры изолированных корней растений.

Настоящее развитие метода культуры тканей и клеток высших растений началось в 1932 году с работ французского учёного Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта. Ими разработаны методы культивирования объектов. В 1960 году Е. Коккинг разработал метод получения изолированных протопластов. Это послужило толчком к получению соматических гибридов. В это же время Дж. Морел и Р.Г. Бутенко предложили метод клонального микроразмножения, который сразу же нашел широкое практическое применение.

Большие успехи достигнуты в развитии методов получения трансгенных растений, технологий использования изолированных тканей и клеток.

Широкое распространение получил метод трансплантации эмбрионов и создание гибридом. Интерес представляет также получение химерных животных.

## **2 Этапы получения гибридных клеток**

Слиянию клеток предшествует установление тесного контакта между плазматическими мембранами. Этому препятствует наличие поверхностного заряда на природных мембранах, обусловленного отрицательно заряженными группами белков и липидов. Деполяризация мембран переменным электрическим или магнитным полем, нейтрализация отрицательного заряда мембран с помощью катионов способствуют слиянию клеток.

Для индукции слияния клеток используются вещества различ-

ной природы: ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , полиэтиленгликоль, лизолецитин, моноолеат глицерина, вирус Сендай. К другим агглютинирующим агентам, способность которых вызывать слияние клеток была исследована специально, относятся лектины растений и антитела.

Преимущество вируса Сендай как сливающего агента заключается в полном отсутствии цитотоксического эффекта. Вирус перед употреблением инактивируют, облучая ультрафиолетовой лампой в течение 5 минут, при этом он теряет способность к размножению, но сохраняет способность сливать клетки. Вирус Сендей имеет два недостатка:

- необходимость наращивать, титровать, концентрировать и инактивировать вирус;

- клетки растений и грибов не имеют рецепторов к этому вирусу, поэтому он неприменим для их гибридизации.

Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, при этом получают *протопласты*. Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу, применяя лизоцим (для бактериальных клеток), зимолиазу улитки (для клеток грибов), комплекс целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, продуцируемый грибами (для клеток растений).

Для скрининга гибридных клеток используют различные подходы:

- 1) учет фенотипических признаков;
- 2) создание селективных условий, в которых выживают лишь гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

### 3 Возможности метода слияния клеток

Метод слияния отдельных соматических клеток открывает перед биотехнологией значительные перспективы:

*Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого.* Путём слияния клеток растений получены плодовые фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом (эквивалентные природному рапсу), петунии. Имеются стерильные межродовые гибриды картофеля и томата, стерильные гибриды арабидопсиса и турнепса, табака и картофеля, табака и белладонны, которые образуют морфологически ненормальные стебли и растения. Полученные клеточные гибриды между представителями различных семейств, существующие, однако, лишь как неорганизованно растущие клетки (табака и гороха, табака и сои, табака и конских бобов).

Получены межвидовые (*Saccharomyces uvarum* и *S. diastaticus*) и межродовые (*Kluuyveromyces lactis* и *S. cerevisiae*) гибриды дрожжей. Имеются данные о слиянии клеток различных видов грибов и бактерий. Проведены опыты по слиянию клеток лягушек и протопластов моркови. Гибридная растительно-животная клетка постепенно одевается клеточной стенкой и растет на средах, на которой культивируют растительные клетки, но ядро животной клетки быстро теряет свою активность

***Получение асимметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя.*** Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильного деления клеток в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей.

Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. Возможен прицельный перенос из клетки в клетку нужной хромосомы. Представляет интерес получения клеток, у которых гибридной является цитоплазма. Цитоплазматические гибриды образуются, когда после слияния клеток ядра сохраняют свою автономию и при последующем делении гибридной клетки оказываются в разных дочерних клетках. Скрининг таких клеток проводится по генам – маркерам ядерного и цитоплазматического геномов.

Клетки со слившейся цитоплазмой, но не ядрами, содержат ядерный геном одного из родителей и в то же время совмещают цитоплазматические гены слившихся клеток. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках.

***Получение гибридов путем слияния трех и более родительских клеток.*** Из таких гибридных клеток могут быть выращены растения (грибы)–регенераты.

***Гибридизация клеток, несущих различные программы развития.*** Слияние клеток различных тканей или органов, слияние нормальных клеток с клетками, программа развития которых изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получают ***гибридные клетки*** или ***гибридомы***, наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной клетки – способность к быстрому и неограниченному росту.

## 4 Гибридная технология

Получение гибридом на сегодняшний день – наиболее перспективное направление клеточной инженерии. Основная цель – «обесмертнить» клетку, продуцирующую ценные вещества путём слияния с раковой клеткой и клонирования полученной гибридной клеточной линии. Гибридомы получены на основе клеток представителей различных царств живого. Слияние клеток растений с клетками растительных опухолей позволяет получить клоны быстрорастущих клеток – продуцентов нужных веществ. Многообразны применения гибридной технологии к животным клеткам, где с ее помощью планируется получение неограниченно размножающихся продуцентов гормонов и белковых факторов крови. Наибольшее практическое значение имеют гибридомы – продукты слияния клеток злокачественных опухолей иммунной системы (миелом) с нормальными клетками той же системы – лимфоцитами.

Многие исследователи пытались отыскать способы получения антител с узкой специфичностью, однако в большинстве случаев попытки были безуспешными.

Решение проблемы было предложено в 1975 году английскими учеными Георгом Келером и Цезарем Мильштейном. Они разработали методику получения клеточных гибридов – гибридом. Гибридомы образуются в результате слияния лимфоцитов, взятых от иммунизированных животных, с клетками миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*. Животное иммунизируют, в ответ на введение антигена в организме мыши активизируются продуцирующие антитела – В-лимфоциты. Эти клетки могут жить только в организме хозяина, при переводе на искусственную питательную среду они гибнут. Если слить иммунную клетку с опухолевой, образуются гибридные клетки, способные неограниченно долго жить в искусственных средах. Одновременно они сохраняют способность синтезировать антитела. Гибридомы, синтезирующие определенные виды антител, отбирают на селективных ростовых средах. Затем их помещают в культуральную жидкость, в которой они размножаются и образуют много родственных клеток (клон). Такие клоны могут синтезировать антитела, получившие название моноклональных (МкАт). МкАт – антитела, однородные по структуре и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах.

Другой метод получения антител основан на инъекции получен-

ной гибридомы в брюшную полость мышки. Там гибридома реплицируется и вызывает образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела. Клетки и белки, не относящиеся к МкАт, удаляются. Оставшийся материал, представленный преимущественно антителами, используют. Этот метод позволяет получать высококонцентрированные препараты антител. Но массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей. Кроме того, получаемый материал требует доочистки. Это дорого и трудоемко, поэтому в настоящее время предпочтение отдается первому способу, с использованием культуры клеток.

Предпосылками для возникновения метода получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела, были разработки двух методических подходов:

1) получение миелом, адаптация их к условиям культивирования вне организма;

2) метод соматической гибридизации клеток.

У мышей можно легко получить миеломы. Эти опухоли являются потомками одной клетки, т. е. имеют моноклональное происхождение и секретируют уникальные иммуноглобулины, некоторые из них могут взаимодействовать с известными антигенами. Опухоли индуцируют у животных путем внутрибрюшного введения минеральных масел или инертного твердого пластика. Для возникновения миелом большое значение имеет генетический статус животного, и только у двух линий инбредных мышей (Balb/C и NZB) экспериментаторам удалось получить такие опухоли.

Другой предпосылкой возникновения метода получения гибридом явилась техника гибридизации соматических клеток, разработка которой широко проводилась после открытия феномена спонтанной гибридизации. При слиянии плазматических мембран клеток образуются клетки с двумя или большим числом ядер – гетерокарионы. После первого деления ядра сливаются и образуют одно ядро с набором хромосом от всех слившихся партнеров – образуется гибридная клетка. Одним из препятствий использования гибридомной техники являлось то, что в гибридах синтезировались не только антитела клеток иммунной селезенки, но и иммуноглобулины родительской миеломной линии, а также гибридные молекулы, состоящие из полипептидных цепей как миелом, так и селезенки. Эта проблема была преодо-

лена путем использования миеломных клеток, в которых отсутствовала экспрессия иммуноглобулинов.

Гибридная технология была с успехом использована и для получения гибридов опухолевых лимфоидных клеток с Т-лимфоцитами. Получены гибридомы с сохранением дифференцированных функций Т-лимфоцитов: Т-киллеры, Т-супрессоры, Т-хелперы. Эти гибридомы синтезируют разнообразные иммунорегуляторные факторы, что позволяет выделять и исследовать их структуру. Получена и макрофагальная гибридома. Исследование этих гибридом внесло большой вклад в изучение закономерностей функционирования отдельных популяций Т-лимфоцитов и макрофагов.

Полностью процедура получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы:

- 1) иммунизация животных;
- 2) подготовка клеток к слиянию; слияние;
- 3) отбор продуцирующих специфические антитела клонов;
- 4) клонирование;
- 5) реклонирование;
- 6) массовая наработка гибридомных клеток;
- 7) получение культуральной жидкости или асцита, содержание антитела;
- 8) выделение этих антител.

Обычно вся процедура от момента начала иммунизации до выделения антител занимает 3–4 месяца.

Первый шаг в процессе получения гибридной клеточной линии, продуцирующей антитела одного типа, состоит во введении мышам антигена. После ряда иммунизаций, проведенных в течение нескольких недель, проверяют, произошло ли развитие у животных иммунного ответа. Если ответ развился, то животных умерщвляют, извлекают селезенку, промывают ее, измельчают и несильно встряхивают для высвобождения единичных клеток, среди которых находятся и антителопродуцирующие В-клетки. Взвесь клеток селезенки смешивают с взвесью миеломных клеток, дефектных по гипоксантин-гуанинфосфорибозил-трансферазе (ГГФРТ). Комбинированную взвесь в течение нескольких минут инкубируют в 35%-м полиэтиленгликоле, а затем переносят в среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда ГАТ).

Обработка полиэтиленгликолем облегчает слияние клеток, тем не менее слияние происходит редко и является в достаточной степени

случайным событием. В смеси присутствуют клетки миеломы, селезенки, а также слившиеся клетки миеломы-селезенки, миеломы-миеломы, селезенки-селезенки. Однако в среде ГАТ растут только гибридные клетки миеломы-селезенки, все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать.

Клетки селезенки и слившиеся клетки селезенки-селезенки вообще не растут в культуре, а миеломные клетки и слившиеся клетки миеломы-миеломы не могут использовать гипоксантин в качестве предшественника в процессе биосинтеза пуриновых оснований гуанина и аденина, без которых невозможен синтез нуклеиновых кислот. Но у них есть другой естественный путь синтеза пуринов – при участии дигидрофолатредуктазы, поэтому в состав среды и входит аминоптерин, ингибирующий активность этого фермента. Таким образом, миеломные клетки и слившиеся клетки миеломы-миеломы не могут синтезировать пурины в среде ГАТ и погибают.

Слившиеся клетки селезенки-миеломы растут в среде ГАТ, поскольку:

1) клетки селезенки поставляют функциональную ГГФРТ, которая может утилизировать экзогенный гипоксантин среды, несмотря на блокирование синтеза пуринов с участием дигидрофолатредуктазы аминоптеринном;

2) клетки миеломы способны активно делиться.

Тимидин необходим для устранения блокирования в синтезе пиримидинов, обусловленного ингибированием дигидрофолатредуктазы. На 10–14-е сутки после слияния клеток в среде ГАТ остаются и растут только слившиеся клетки селезенки-миеломы. Их затем вносят в лунки пластиковых микротитровальных плашек и выращивают на полной культуральной среде без ГАТ.

После отбора гибридных клеток, синтезирующих определенные антитела, можно приступить к их массовому наращиванию с целью получения больших количеств моноклональных антител. В начале культивирования гибридные клетки могут расти медленно и плохо переносить низкую плотность посева. В связи с этим при пересеве клеток их надо разводить не более чем в 3–5 раз. Ускорению роста клеток может способствовать добавление клеток питающего слоя.

Моноклональные антитела находят очень широкое применение, так как их основное преимущество – высокая специфичность. Это связано с тем, что моноклональные антитела продуцируются одним лимфоцитом, который распознает лишь одну антигенную детерми-

нанту, поэтому их широко используют, в том числе для диагностики и терапии различных заболеваний человека и животных. Например, антитела против опухолевых антигенов, сшитые с токсинами, могут быть применены для селективного убивания опухолевых клеток в организме человека. Однако употребление этих антител очень ограничено, так как при введении их в организм человека, особенно повторном, возникают реакции на гетерологический белок. Поэтому желательно получать моноклональные антитела человека.

Человек не может служить экспериментальной моделью, поэтому обычные способы получения антител, т. е. использовании активной иммунизации, невозможны. В связи с этим одним из направлений исследований является разработка способов иммунизации вне организма. Другой сложностью является сама техника получения стабильных антителообразующих линий человека. В настоящее время для получения моноклональных антител применяется несколько подходов:

- 1) обработка В-лимфоцитов человека вирусом Эпштейна-Барра;
- 2) гибридизация с миеломными клетками;
- 3) комбинация этих двух методов.

Вирус Эпштейна-Барра является лимфоцитотропным. Он проникает в клетки, адсорбируясь на рецепторе С3d компонента комплемента. Вирус трансформирует клетки, в результате чего у них появляется способность бесконечно размножаться в культуре, при этом сохраняется продукция иммуноглобулинов, преимущественно IgM класса.

Вероятно, наиболее перспективным подходом к получению моноклональных антител служит комбинация методов трансформации под действием вируса Эпштейна-Барра с соматической гибридизацией клеток.

В будущем моноклональные антитела смогут заменить сложную антисыворотку для типирования тканей человека при выборе доноров для трансплантации органов. Эти антитела уже применяют для изучения структуры антигенов главного комплекса гистосовместимости человека.

В вирусологии с помощью моноклональных антител строят карты молекулы гемагглютиниона вируса гриппа. В подобных исследованиях установлена скорость мутации вируса гриппа при его культивировании *in vitro* в присутствии одного нейтрализующего моноклонального антитела. Этим моноклональным антителом опознавались только вирионы, у которых произошел мутагенез. В данных опытах для определения скорости мутации можно использовать частоту про-

явления зон роста вируса. Эта работа важна для понимания генетических изменений вируса, происходящих в естественных популяциях.

Наиболее широко используются моноклональные антитела в медицинской диагностике для постановки диагнозов. Если к антителами присоединить радиоактивные или магнитоактивные материалы и ввести их в живой организм, то можно выявить в нем патологические зоны. Такие МкАт присоединяются к пораженным болезнью клеткам организма, а соответствующие индикаторные материалы позволяют выяснить их местонахождение.

МкАт используются и в процессах очистки веществ. Современные технологии основаны на присоединении антител к твердой матрице носителя. К ним добавляют смесь молекул, содержащую искомым антиген. Затем комплексы антиген – антитело отмываются от примесей, не связанных с матрицей. После разрушения ковалентных связей антиген – антитело в растворе остаются свободные антигены.

Если получить антитела определенного типа и иммунизировать ими животное, то образуются анти-антитела (антиидиотипные антитела). Они действуют на иммунную систему как псевдоантиген и поэтому могут быть использованы для ее стимуляции. На этом принципе основано получение вакцин нового типа. Наборы МкАт могут быть также предназначены для борьбы с аллергенами.

Моноклональные антитела и «мишеная» лекарственная терапия. Предполагается, что большое разнообразие раковых заболеваний обусловлено активацией эндогенных генов, вызванной химическими агентами, внутренними хромосомными перестройками. Эти гены кодируют определенные белки, и поэтому раковые клетки могут содержать уникальные белки на поверхности клетки. Возможно, именно эти белки участвуют в супрессии роста здоровых клеток. Инактивируя эти белки, можно тормозить рост раковых клеток. Благодаря высокой специфичности МкАт широко используются в качестве зондов для точного определения природы молекул поверхности клеток и клеточных органелл. С их помощью также можно проводить детекцию активности ферментов. Методы иммуноферментного анализа применяют в диагностике вирусных заболеваний растений. Это позволяет сократить время получения безвирусного посадочного материала, отбирать новые вирусоустойчивые сорта. При генноинженерных экспериментах можно быстро отбирать клоны-продуценты.

Моноклональные антитела можно использовать как диагностические средства: тест на беременность, диагностика хламидиоза,

стрептококковых инфекций горла, герпес 1-го (вызывает простудные поражения кожи на губах) и 2-го типа (вызывает генитальные инфекции), лейкоза и лимфомы, рака легких, молочной железы, толстой и прямой кишок и др.

Со временем МкАт можно будет использовать для лечения болезней. Благодаря способности моноклональных антител находить специфичные мишени и связываться с ними, например, с раковыми клетками, эти антитела стали называть «волшебными пулями». Если присоединить к антителу радиоактивный изотоп или токсическое химическое вещество, можно надеяться, что они разрушат клетку. Одна из проблем состоит в том, что антигены, наиболее характерные для раковых клеток, обнаружены также и в некоторых нормальных клетках, которые тоже должны будут погибнуть. Другая проблема состоит в том, что антитело связывается с поверхностью раковой клетки, а не проникает внутрь ее, чтобы доставить токсин по назначению. Тем не менее в этом направлении есть уже некоторый прогресс.

МкАт более эффективно, чем лекарства, подавляют иммунную систему. Они подавляют только Т-клетки, а не всю систему, как это делают медикаменты, и, таким образом, у больного сохраняется способность противостоять болезни. Эту способность МкАт можно использовать при трансплантации органов и тканей. МкАт можно использовать для более точного выявления типов антигенов при пересадке органов и тканей, чем меньше различаются антигены, тем меньше риск отторжения.

## **5 Клонирование животных**

### **5.1 История метода**

Все клетки организма животных несут одинаковую генетическую информацию. Однако в процессе морфогенеза соматические клетки дифференцируются, в результате чего часть генома репрессируется. Чем выше уровень специализации клеток, тем меньше их тотипотентность. Эта закономерность была установлена в экспериментах по пересадке ядер.

Впервые трансплантацию ядер соматических клеток зародышей в энуклеированные клетки лягушки осуществили американские исследователи Р. Бриггс и Т. Кинг в 1952 году. Ученые, пользуясь микропипеткой, удаляли ядра из яйцеклеток шпорцевой лягушки, а вместо них пересаживали ядра клеток эмбрионов, находящихся на раз-

ных стадиях развития. Проведенные исследования показали, что ядра ранних эмбрионов в стадии поздней бластулы и даже ранней гастролы обладают тотипотентностью и обеспечивают нормальное развитие эмбрионов.

Более широкие исследования, охватывающие не только амфибий, но и рыб, а также дрозофил, в 1962 году были начаты английским биологом Дж. Гордоном. Он первым в опытах с южноафриканскими жабами (*Xenopus laevis*) в качестве донора ядер использовал не зародышевые клетки, а уже вполне специализировавшиеся клетки эпителия кишечника плавающего головастика. Ядра яйцеклеток реципиентов он не удалял хирургическим путем, а разрушал ультрафиолетовыми лучами. В большинстве случаев реконструированные яйцеклетки не развивались, но примерно десятая часть их образовывала эмбрионы. 6,5% из этих эмбрионов достигали стадии бластулы, 2,5% – стадии головастика и только 1% развился в половозрелых особей. Однако появление нескольких взрослых особей в таких условиях могло быть связано с тем, что среди клеток эпителия кишечника развивающегося головастика довольно длительное время присутствуют первичные половые клетки, ядра которых могли быть использованы для пересадки. В последующих работах как сам автор, так и многие другие исследователи не смогли подтвердить данные этих первых опытов.

Позже Дж. Гордон модифицировал эксперимент. Поскольку большинство реконструированных яйцеклеток (с ядром клетки кишечного эпителия) погибает до завершения стадии гастролы, он попробовал извлечь из них ядра на стадии бластулы и снова пересадить их в новые энуклеированные яйцеклетки (такая процедура называется «серийной пересадкой» в отличие от «первичной пересадки»). Число зародышей с нормальным развитием после этого увеличивалось, и они развивались до более поздних стадий по сравнению с зародышами, полученными в результате первичной пересадки ядер.

Затем Дж. Гордон вместе с Ласки (1970) культивировали *in vitro* клетки почки, легкого и кожи взрослых животных и использовали уже эти клетки в качестве доноров ядер. Примерно 25% первично реконструированных яйцеклеток развивалось до стадии бластулы. При серийных пересадках они развивались до стадии плавающего головастика. Таким образом, было показано, что клетки трех разных тканей взрослого позвоночного (*X. laevis*) содержат ядра, которые могут обеспечить развитие, по крайней мере, до стадии головастика.

В свою очередь другими учеными были использованы для трансплантации ядра неделящихся и полностью дифференцированных клеток крови – эритроцитов лягушки *Rana pipiens*. После серийной пересадки таких ядер 10% реконструированных яйцеклеток достигало стадии плавающего головастика. Эти эксперименты показали, что некоторые ядра соматических клеток способны сохранять тотипотентность.

В 1985 году была описана технология клонирования костных рыб, разработанная советскими учеными Л.А. Слепцовой, Н.В. Дабагян и К.Г. Газарян.

Пересадки ядер у млекопитающих начались позднее, в 80-х годах. Это было связано с техническими трудностями, так как зигота млекопитающих имеет небольшие размеры. Например, диаметр зиготы мыши приблизительно 60 мкм, а диаметр оплодотворенной яйцеклетки лягушки около 1200 мкм, т. е. в 20 раз больше. Зигота коровы несколько крупнее, чем зигота мыши, диаметр ее составляет 160 мкм, но пронуклеусы скрыты яичным желтком, поэтому перед микроманипуляциями необходима специальная обработка зигот.

Несмотря на перечисленные трудности, первые сообщения о получении клонов мышей, идентичных донору, появились уже в 1981 году. В качестве донора были использованы эмбриональные клетки одной из линий мышей, взятые на стадии бластоцисты. Достоверность полученных данных вначале была поставлена под сомнение, так как воспроизвести результаты проведенных экспериментов в других лабораториях не удавалось, однако пару лет спустя Дж. Мак Грат и Д. Солтер также достигли успеха. В этих экспериментах клоны мышей удавалось получить лишь в том случае, если трансплантировали ядра эмбрионов на стадии не позднее 2 бластомеров. Было показано, что ядра 8-клеточных зародышей и клеток внутренней клеточной массы бластоцисты не обеспечивают развитие *in vitro* реконструированных яйцеклеток даже до стадии морулы, которая предшествует стадии бластоцисты. Небольшая часть (5%) ядер 4-клеточных зародышей дает возможность развиваться только до стадии морулы. Эти и многие другие данные показывают, что в эмбриогенезе у мышей клеточные ядра рано теряют тотипотентность, что связано, очевидно, с очень ранней активацией генома зародыша – уже на стадии двух клеток.

У других млекопитающих, в частности, у кроликов, овец и крупного рогатого скота, активация первой группы генов в эмбриогенезе происходит позднее, на 8–16-клеточной стадии. Возможно, поэтому

первые значительные успехи в клонировании эмбрионов были достигнуты на других видах млекопитающих, а не на мышах. Тем не менее работы с мышами, несмотря на их непростую судьбу, значительно расширили наши представления о методологии клонирования млекопитающих

## 5.2 Клонирование млекопитающих

Американские исследователи С. Стик и Дж. Робл, используя методику Мак Грата и Д. Солтера, в 1988 году получили 6 живых кроликов, пересадив ядра 8-клеточных эмбрионов одной породы в лишенные ядра яйцеклетки кроликов другой породы. Фенотип родившихся полностью соответствовал фенотипу донора. В этих экспериментах только 6 из 164 реконструированных яйцеклеток (3,7%) развились в нормальных животных. Ценность этой работы тем не менее в том, что она показала возможность клонирования эмбрионов кроликов.

Первые успешные эксперименты по клонированию сельскохозяйственных животных были проведены С. Уилладсином (S. Willadsen) в 1986 году. Он сливал безъядерные яйцеклетки с бластомерами, выделенными из 8 и 16-клеточного эмбриона овцы.

Дж. Робл и его сотрудники в 1987 году провели работы по пересадке ядер крупного рогатого скота. Они пересаживали в зиготы карิโอпласты – мужской и женский пронуклеусы вместе с окружающей их цитоплазмой, а также ядра 2-, 4- или 8-клеточных эмбрионов коровы. Реконструированные зародыши были заключены в агаровый цилиндр и пересажены в перевязанный яйцевод овцы. Через пять дней культивирования их вымывали, освобождали от агара и исследовали. Реконструированные зародыши в этой работе развивались только в тех случаях, когда в зиготы пересаживали пронуклеусы: 17% таких зародышей достигло стадии морулы или бластоцисты. Два зародыша были пересажены второму реципиенту – в матку коровы, и развитие их завершилось рождением живых телят. Если в качестве доноров использовали ядра 2-, 4- или 8-клеточных зародышей, то реконструированные яйцеклетки не развивались даже до стадии морулы.

Позже были и более успешные работы. С. Уилладсин (1989), в частности, сообщил, что ему удалось получить четырех генетически идентичных бычков в результате пересадки в реципиентные яйцеклетки ядер бластомеров одного 32-клеточного зародыша. Автор утверждал, что большинство ядер сохраняет тотипотентность на 32-клеточной стадии, а значительная их часть даже на 64-клеточной ста-

дии, обеспечивая нормальное развитие реконструированных яйцеклеток до стадии ранней бластоцисты в яйцеводе овцы. После пересадки в матку коров, окончательных реципиентов, как полагает автор, они могут и дальше нормально развиваться.

К. Бондиоли и соавторы (1990), используя в качестве доноров ядер 16–64-клеточные зародыши коров, трансплантировали 463 реконструированных зародыша в матку синхронизированных реципиентов и получили 92 живых теленка. Семь из них были генетически идентичны, представляя собой клон, полученный в результате пересадки ядер клеток одного донорского эмбриона.

Таким образом, клеточные ядра зародышей крупного рогатого скота достаточно долго сохраняют тотипотентность и могут обеспечить полное развитие реконструированных яйцеклеток. Иначе говоря, методические трудности клонирования зародышей крупного рогатого скота практически решены.

Экспериментов по клонированию свиней немного. Успешные исследования провели Р. Пратер с сотрудниками в 1989 году. Скудность данных, видимо, связана с определенными трудностями работы с этим объектом.

В 1993–1995 годах группа исследователей под руководством Йена Вилмута (Ian Wilmut) из Рослинского института получила клон овец – 5 идентичных животных, донорами ядер которых была культура эмбриональных клеток. Эта работа, особенно в части культуры эмбриональных клеток, – значительное достижение в клонировании млекопитающих, хотя она и не вызвала столь шумного интереса, как статья того же Вилмута с соавторами, опубликованная в начале 1997 года, где сообщалось, что в результате использования донорского ядра клетки молочной железы овцы было получено клональное животное – овца по кличке Долли. Последняя работа методически во многом повторяет предыдущее исследование 1996 года, но в ней ученые использовали эмбриональные и фибробластоподобные клетки плода и клетки молочной железы взрослой овцы.

Овца по кличке Долли развилась из реконструированной яйцеклетки, донором ядра которой была культивируемая клетка молочной железы овцы породы финн дорсет, и фенотипически не отличается от овец этой породы, но сильно отличается от овцы-реципиента. Анализ генетических маркеров подтвердил этот результат. Успех авторов данной работы, прежде всего, связан с использованием длительных клеточных культур, так как после многих пассажей в культуре клеток

могли быть отобраны малодифференцированные стволовые клетки, которые, вероятно, и были использованы как доноры ядер. Большое значение также имел тот факт, что авторы, учитывая результаты своих предыдущих работ, синхронизировали стадии клеточного цикла яйцеклеток реципиентов и клеток доноров.

В августе 1997 года появилось сообщение о том, что Алан Трунсон (Австралия) разработал технологию, которая позволяет сформировать эмбрион из 16, 32 или 64 клеток и затем каждая из них может использоваться для формирования 16, 32 или 64 идентичных эмбрионов. Коллектив исследователей во главе с Аланом Трунсоном создал 470 генетически идентичных эмбрионов рогатого скота от единственной бластоцисты. Такая технология обеспечивает безграничный источник генетического материала для клонирования.

Несмотря на отсутствие немедленных практических результатов сделанного открытия, теоретическую значимость его трудно переоценить. Впервые было доказано, что гены запрограммированы обратимо. Дальнейшие исследования могут позволить понять, как регулируется работа генов, дифференциация клеток, почему клетки в одних случаях растут и размножаются управляемо, а в других (при раке) – неконтролируемо.

### **5.3 Методы трансплантации ядер**

В нашей стране Б.В. Конюховым и Е.С. Платоновым в 1985 году был разработан метод переноса ядер методом микроманипуляции. Он протекает в два этапа: сначала тонкой микропипеткой прокалывают зоны пеллюциды и плазматической мембраны и извлекают пронуклеусы, а затем другой пипеткой, большего диаметра (12 мкм) в то же отверстие вводят диплоидное ядро донора. В этом случае меньше травмируются цитоплазма зиготы и транспортируемое ядро донора.

Трансплантация ядер может осуществляться и другим способом, с использованием цитохалазинов (веществ, синтезируемых грибами).

Цитохалазин В разрушает структуру микрофиламентов и способствует уникальному расположению ядра. Ядро остается соединенным с клеткой тоненьким стебельком цитоплазмы. При центрифугировании этот мостик разрывается, образуются безъядерные клетки (цитопласты) и кариопласты, представляющие собой ядра, окруженные тонким слоем цитоплазмы и цитоплазматической мембраной. Цитопласты отделяют от интактных клеток в градиенте плотности. Они сохраняют способность прикрепляться к поверхности культуры.

рального сосуда и могут быть использованы для слияния с кариопластами других клеток с целью получения жизнеспособной клетки.

Методы выделения кариопластов несколько сложнее и включают в себя ряд операций по центрифугированию, разделению в градиенте плотности и т. д. В некоторых случаях к смеси клеток и кариопластов добавляют частицы тантала диаметром 1–3 мкм. Они проникают в клетки и никогда в кариопласт, поэтому более тяжелые клетки осаждаются быстрее кариопластов.

Цитопласты содержат все виды органелл, присущие нормальной клетке, сохраняют способность прикрепляться к субстрату, образовывать складчатую мембрану, передвигаться, осуществлять пиноцитоз.

Кариопласты окружены тонким слоем цитоплазмы (около 10% от всей клеточной цитоплазмы), содержат компактный эндоплазматический ретикулум, несколько митохондрий и рибосом.

Для реконструкции клеток суспензию кариопластов в солевом буфере добавляют к монослою культуры цитопластов из пропорции 100 кариопластов на 1 цитопласт. Инкубируют и отмывают раствором Эрла для удаления неслившихся кариопластов.

Дальнейший прогресс человечества во многом связан с развитием клеточной и генетической инженерии. Вместе с тем необходимо помнить, что неконтролируемое распространение генно-инженерных живых организмов и продуктов может нарушить биологический баланс в природе.

## **6 Трансплантация эмбрионов**

Ускорение темпов селекции сельскохозяйственных животных в значительной степени зависит от возможности использования мирового фонда генетических ресурсов.

Использование мирового генофонда является задачей большой народнохозяйственной значимости. Эта работа началась с экспорта-импорта животных, затем большее значение приобрел экспорт-импорт спермы, что позволило сделать этот процесс более оперативным и экономически обоснованным. В настоящее время открылась возможность обмена генетическими ресурсами путем экспорта-импорта ранних эмбрионов.

Этот метод имеет ряд преимуществ, которые состоят в следующем: вероятность заражения заболеваниями значительно меньше; быстрота реализации ожидаемых потенциальных качеств выдающихся животных.

При отборе коров, доноров эмбрионов, руководствуются комплексом селекционных признаков: породность, экстерьер, конституция, морфофункциональные свойства вымени, легкость отелов, жизнеспособность приплода и др. Предпочтение отдают животным с длительным сроком использования, высокой молочной продуктивностью (не менее 220% стандарта породы).

В качестве реципиентов можно использовать коров и телок клинически здоровых, без признаков нарушения обмена веществ, с отелами без осложнений, хорошо выраженной охотой. Минимальный возраст телок 16–18 месяцев с живым весом 350–380 кг.

Для проведения мероприятий, направленных на получение эмбрионов, необходимо подготовить животных к осеменению.

Гормональную обработку доноров следует начинать не ранее 60-го дня после отела. Обычно ее проводят после 2–3 эстральных циклов.

Стимуляция и синхронизация охоты осуществляются с помощью прогестерона – женского полового гормона стероидной природы, регулирующего ход эстрального цикла, простагландинов, а также их комбинации. Этот прием позволяет вызывать появление охоты у групп племенных животных в один и тот же период времени. В настоящее время используют в основном два типа гонадотропинов: гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). ГСЖК получают из крови кобыл с 40-го по 130-й день жеребости. Гонадотропин имеет длительный (50–120 часов) период полураспада в организме крупного рогатого скота, что объясняется наличием в его молекуле сиаловой кислоты. Достоинством ГСЖК является достаточность всего одной инъекции для вызывания суперовуляции, что позволяет сократить затраты труда и уменьшить стрессовое воздействие на животных. Активность ГСЖК выражают в интернациональных (И.Е.) или мышинных (м.е.) единицах действия. Одна И.Е. эквивалентна приблизительно 2,0–2,5 м.е. Обычная доза ГСЖК, применяемая для индукции суперовуляции, составляет 2500–3000 И.Е. Недостаток ГСЖК – его высокие антигенные свойства, что иммунизирует обработанных животных и делает проблематичным повторное использование доноров.

Фолликулостимулирующий гормон получают из гипофиза животных, чаще всего свиней, или из мочи климактерических женщин. Фолликулостимулирующий гормон имеет непродолжительный (около 6 часов) период полураспада. Поэтому его вводят в организм в течение

ние 4–5 дней утром и вечером, с интервалом между инъекциями в 12 часов, с целью поддержания необходимой для суперовуляции концентрации гормона в крови животного. Наибольшее распространение получили схемы вызывания суперовуляции с общей дозой 32 и 50 мг ФСГ со снижающейся дозировкой при последующих инъекциях. Препараты ФСГ, в отличие от ГСЖК, не вызывают кистозных изменений в яичниках и не индуцируют выработку антител.

Существует несколько схем вызывания суперовуляции у коров и телок-доноров эмбрионов (табл.2).

Таблица 2 – Схемы обработки коров-доноров на суперовуляцию

Схема №	День эстрального цикла	Препарат	Время (кратность) введения	Доза
<b>1</b>	8–12	ГСЖК	Однократно	2500–3000 И.Е.
	10–14	Клопростенол	Утро/вечер через 48 ч после инъекции СЖК	0,5–1/0,5 мг
<b>2</b>	8–12	ФСГ	Утро/вечер	6/6 мг
	9–13	ФСГ	Утро/вечер	5/5 мг
	10–14	ФСГ	Утро/вечер	3/3 мг
	11–15	ФСГ	Утро/вечер	2/2 мг
				Всего – 32 мг
	10–14	Клопростенол	Утро/вечер через 48 ч после первой инъекции ФСГ	0,5–1/0,5 мг
<b>3</b>	8–12	ФСГ	Утро/вечер	7/7 мг
	9–13	ФСГ	Утро/вечер	65/6,5 мг
	10–14	ФСГ	Утро/вечер	6/6 мг
	11–15	ФСГ	Утро/вечер	5,5/5,5 мг
				Всего – 50 мг
	10–14	Клопростенол	Утро/вечер через 48 ч после первой инъекции ФСГ	0,5-1/0,5 мг
<b>4</b>	8–12	ФСГ + Пролонгон	Однократно	32–50 мг
	10–14	Клопростенол	Утро/вечер через 48 ч после первой инъекции ФСГ	0,5–1/0,5 мг

Осеменение доноров проводят через 48–54 часа после введения простагландина. Доноров осеменяют 3–4 раза с интервалом 10–12 часов. Извлечение эмбрионов проводят на 7–8-й день после первого осеменения.

Извлечение эмбрионов до 70-х годов производили в основном хирургическим путем, впоследствии он был заменен менее травматичным и трудоемким нехирургическим, основанным на введении в матку особого зонда по естественному каналу.

Из этой жидкости извлекаются эмбрионы. В среднем при супер-овуляции от донора можно получить от 5 до 7 эмбрионов. После извлечения эмбрионы оценивают. Полноценные эмбрионы должны иметь шарообразную форму, неповрежденную прозрачную оболочку, одинаковые бластомеры с четкой плазматической оболочкой и светлую гомогенную цитоплазму.

После оценки пригодные эмбрионы трижды промывают стерильным 20%-м раствором ФС (фетальная сыворотка) ФСБ (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко). Эти операции проводят последовательно, пересаживая эмбрионы из капли в каплю.

Интервал времени между получением зародыша и началом следующего технологического этапа (краткосрочного хранения, криоконсервации) не должен превышать двух часов.

Краткосрочное хранение целесообразно, если рассинхронизация между стадией развития эмбриона и половым циклом реципиентов не превышает 1,5 суток. В остальных случаях применяют криоконсервацию. Порядок заправки эмбриона в пайетту для замораживания приведен на рисунке 5.

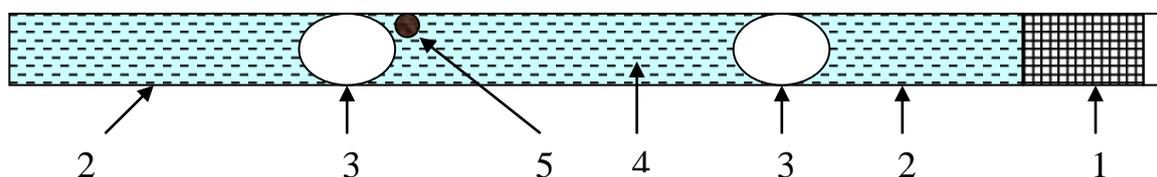


Рисунок 5 – Порядок заправки эмбриона в пайетту для замораживания:

- 1 – пробка пайетты; 2 – 0,75 М раствор сахарозы; 3 – воздушный пузырёк;
- 4 – 1 М раствор глицерина в 20%-м растворе ФС и ФСБ; 5 – эмбрион

Трансплантация эмбрионов в настоящее время является одной из наиболее актуальных проблем в области животноводства. С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить выход числа потомков от

высокопродуктивных коров. Применение этого метода также упрощает обмен генофондом сельскохозяйственных животных между странами и континентами. Пересадка эмбрионов может быть использована для получения потомства от ценных, но бесплодных коров, утративших способность к размножению в результате несчастного случая, болезни или по возрасту.

Таким образом, нами была изучена краткая история предмета, этапы получения гибридных клеток. Определены возможности метода слияния клеток, клонирования животных, трансплантации эмбрионов.

### **Контрольные вопросы**

1. Назовите этапы получения гибридных клеток.
2. Какие недостатки имеет вирус Сендей?
3. Дайте определение термину «протопласты».
4. Назовите возможности метода слияния клеток.
5. Какие этапы включает в себя процедура получения моноклональных антител?
6. Почему в среде ГАТ растут только гибридные клетки миеломы селезенки, а все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать?
7. Почему моноклональные антитела находят все более широкое применение?
8. Назовите подходы, применяемые в настоящее время для получения моноклональных антител.
9. Расскажите об истории метода клонирования.
10. Кем и когда был разработан метод переноса ядер методом микроманипуляции?
11. Расскажите о трансплантации эмбрионов.

### **Рекомендуемая литература**

1. Егоров, Н.С. Биотехнология. Проблемы и перспективы / Н.С. Егоров, А.В. Олескин, В.Д. Самуилов. – М.: Высш. шк., 1987.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.
3. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003.
4. Тихонов, И.В. Биотехнология / И.В. Тихонов [и др.]. – СПб.: ГНОРД, 2005.

## **ТЕМА: БИОИНДУСТРИЯ ФЕРМЕНТОВ**

Основной сферой использования ферментных препаратов являются пищевая, мясная текстильная, кожевенная промышленность и сельское хозяйство. Применение ферментных препаратов в данных отраслях промышленности во много раз ускоряет производственные процессы, обеспечивает более экономичное использование сельскохозяйственного сырья, увеличивает выход продукции высокого качества. При этом достигаются существенное снижение себестоимости продукции и улучшение показателей использования фондов и оборотных средств. Целью данной темы является ознакомление с ферментами и их применением. Изучение способа стабилизации ферментов – иммобилизации.

### **Вопросы**

1. Ферменты и их применение.
2. Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций
3. Белковая инженерия.
4. Иммобилизация ферментов:
  - 4.1 Носители для иммобилизованных ферментов.
  - 4.2 Методы иммобилизации ферментов.
  - 4.3 Применение иммобилизованных ферментов

### **1. Ферменты и их применение**

В 1946 году Самнер и Нортрон получили Нобелевскую премию за выделение в кристаллическом виде первого фермента – уретразы. Так было доказано, что биологические катализаторы представляют собой белки.

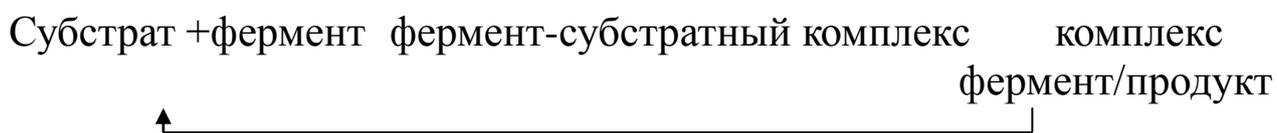
Сегодня мы знаем, что ферменты (или энзимы) катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки. При помощи ферментов получают ряд продуктов: фруктозный сироп, L-аминокислоты, медикаменты. Ферменты используются в пищевой промышленности и во многих областях деятельности человека.

Ферменты – это биологические молекулы, синтезируемые живыми клетками. В каждой клетке имеются сотни различных ферментов. Они сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко при-

меняют в практике. С их помощью осуществляются многочисленные химические реакции. Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств:

- все ферменты представляют собой глобулярные белки;
- информация о них, как и о других белках, закодирована в ДНК;
- они увеличивают скорость реакции, но сами в этой реакции не расходуются;
- их присутствие не влияет ни на природу, ни на свойства конечного продукта (или продуктов) реакции;
- очень малое количество фермента вызывает превращение больших количеств субстрата, в среднем ферменты способны катализировать около 1000 реакций в секунду;
- активность ферментов меняется в зависимости от кислотности, температуры, давления, а также от концентрации как субстрата, так и самого фермента;
- ферменты снижают энергию активации катализируемой реакции;
- в молекуле фермента есть активный центр, который вступает в контакт с субстратом. Этот активный центр имеет особую форму;
- катализируемая ферментами реакция обратима;
- ферменты высокоспецифичны, т. е. один фермент катализирует обычно только одну реакцию.

Фермент, соединяясь с субстратом, образует коротко живущий фермент-субстратный комплекс. По завершении реакции фермент-субстратный комплекс распадается на продукт (или продукты) и фермент.



По характеру катализируемых реакций ферменты делят на 6 основных классов:

1. **Оксидоредуктазы** – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, т. е. перенос атомов водорода и кислорода от одного вещества к другому (глюкозооксидаза, каталаза, алкогольдегидрогеназа).
2. **Трасферазы** – ферменты, катализирующие перенос определенной группы атомов – метильной, ацильной, фосфатной или амино-

группы – от одного вещества к другому (протеинкиназа, гликогенфосфоорилаза, пируваткиназа).

**3 Гидролазы** – ферменты, катализирующие реакции гидролиза, при которых из субстрата образуется два продукта (протеазы, амилазы, целлюлазы).

**4 Лиазы** – ферменты, катализирующие присоединение групп к двойным связям, или, например, присоединение химической группы по двойной связи. При этом могут разрываться связи C-C, C-N, C-O, C-S (аспартаза, фумараза).

**5 Изомеразы** – ферменты, катализирующие реакции изомеризации (глюкозоизомераза, триозофосфатизомераза).

**6 Лигазы** (синтетазы) – ферменты, катализирующие реакции соединения двух молекул в результате образования новых связей C-N, C-O, C-S или C-C, сопряженные с распадом АТФ (ДНК-лигаза, триптофансинтетаза).

Ферменты синтезируются, как все белки, на рибосомах и локализируются в цитоплазме и в различных субструктурах, встроенных в мембраны; находятся на поверхности клетки или в окружающей клетку среде.

Ферментные реакции подразделяются на анаболические (реакции синтеза) и катаболические (реакции распада). Совокупность всех этих реакций в живой клетке или живом организме составляет то, что мы называем *метаболизмом*. В клетке одновременно работает несколько метаболических путей. Реакции протекают согласованно, подчиняясь строгой регуляции, что объясняется специфической природой ферментов. Таким образом, ферменты служат для регулирования происходящих в клетке реакций и обеспечивают надлежащую их скорость.

Для каждого фермента существует свой оптимум кислотности, при котором его катаболическое действие максимально. При резком изменении кислотности сред ферменты могут инактивироваться в результате необратимой денатурации (изменение конфигурации, раскручивание). Температура на действие ферментов влияет так же, как и на все химические процессы. Однако ускорение реакции с повышением температуры наблюдается в ограниченных пределах, поскольку многие ферменты уже при температуре 40–50 °С денатурируют.

Ферменты широко используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Источниками ферментов могут быть животные, растения и микроорганизмы. К настоящему времени установлено наличие более двух тысяч

ферментов, а несколько сотен из них получено как индивидуальные вещества. В промышленности используют только 30. Микроорганизмы в качестве продуцентов ферментов представляют особый интерес, поскольку их метаболизм, а следовательно, и работа ферментных систем осуществляется с очень большой интенсивностью.

Помимо высокой интенсивности метаболизма, следует помнить об очень большой скорости прироста биомассы микроорганизмов. Это позволяет в течение коротких промежутков времени (иногда за 24–72 часа) получать такие количества сырья для выделения ферментов, которые не могут сравниться с тем, что дают растения и животные.

Важное свойство микроорганизмов – способность расти, используя различные дешевые субстраты, в том числе не имеющие пищевого значения (целлюлоза, углеводы нефти, метан, метанол и т. д.). Некоторые субстраты, используемые микроорганизмами, токсичны для человека и животных.

Выделение ферментных препаратов из клеток микроорганизмов и особенно из культуральной среды после их выращивания проще и экономичнее, чем из растительных и животных тканей. Ряд ферментов обнаружен только у микроорганизмов.

Очистка окружающей среды от ряда загрязняющих ее веществ возможна благодаря способности ферментов, образуемых микроорганизмами, разрушать компоненты пластмасс, пестициды и другие ядовитые соединения.

Большую часть ферментов, поступающих на рынок, составляют гидролазы, из которых 60% составляют пептидогидролазы (в основном щелочные и нейтральные протеазы), так как именно они являются основными в промышленной биотехнологии.

Рассмотрим некоторые группы ферментов, которые используются в промышленности наиболее широко.

**Аминолитические ферменты** ( $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза, глюкоамилаза). Их используют для гидролиза крахмала и гликогена. Например,  $\alpha$ -амилаза гидролизует любые  $\alpha$ -1,4-глюкоановые связи;  $\beta$ -амилаза последовательно отщепляет остатки мальтозы от концевой цепи; глюкоамилаза последовательно отщепляет остатки глюкозы от концов цепей. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, в хлебопечении.

**Протеолитические ферменты** (пепсин, трипсин). Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пеп-

тидах. Важная их особенность – выборочный, селективный характер действия на пептидные связи в молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами; трипсин – только на связь между аргинином и лизином. Ферментов этого класса очень много.

В промышленности их классифицируют по способности проявлять активность в определенной области кислотности:

- кислотность 1,5–3,7 – кислотные протеазы;
- кислотность 6,5–7,5 – протеазы;
- кислотность больше 8,0 – щелочные протеазы.

Применение протеаз широкое:

- мясная промышленность – для умягчения мяса;
- кожевенная промышленность – при обезволивании и смягчения шкур;
- кинопроизводство – для растворения желатинового слоя на пленка при их регенерации;
- парфюмерная промышленность – при создании добавок в зубную пасту, крема, лосьоны;
- промышленность синтетических моющих средств – при применении моющих добавок для удаления загрязнений белковой природы;
- медицина – при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов.

***Пектолитические ферменты*** (пектин, пектиновые кислоты, пропектин) объединены в одну группу по внешнему проявлению своего действия – уменьшению молекулярной массы и снижению вязкости пектиновых веществ, представителей полисахаридов. Они содержатся в фруктах, корнеплодах, стеблях (лен).

Все пектиназы делятся на два вида:

- 1) гидролазы;
- 2) трансэлимилазы.

Первые отщепляют метильные остатки (пектинэстеразы) или разрывают  $\alpha$ -1, 4-гликозидные связи (полигалактуроназы). Вторые ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей.

Применение:

- в текстильной промышленности – вымачивание льна перед его переработкой;
- в виноделии – осветление вин, уничтожение мутности;

- в консервировании – при приготовлении фруктовых соков.

**Целлюлолитические ферменты.** Очень специфичны, их действие проявляется лишь при деполимеризации молекул целлюлозы. Обычно они действуют в виде комплексов, которые в целом доводят гидролиз до глюкозы.

Использование их очень перспективно:

- в гидролизной промышленности – получение глюкозы из целлюлозы;
- в медицинской – выделение лекарственных веществ (стероидов) из растений;
- в пищевой – улучшение качества растительных масел;
- в сельском хозяйстве - как добавки в комбикорма для жвачных животных.

Ферменты, как класс биологических молекул, обладают очень низкой стабильностью. Поэтому даже при небольших отклонениях внешних условий от тех, которые характерны для микроокружения ферментов в клетке, может оказаться достаточно, чтоб нарушить структуру и функцию ферментов, т. е. инактивировать их.

Для практических целей, однако, часто требуется, чтобы ферменты работали при повышенных температурах, экстремальных значениях рН, в присутствии высоких концентраций органических растворителей или поверхностно-активных веществ и т. п. В связи с этим возникает проблема существенного увеличения стабильности ферментов. Стабилизацию ферментов можно осуществить разными способами.

## 2 Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций

**Концентрация фермента.** При высокой концентрации субстрата и при постоянстве других факторов, таких, например, как температура и рН, скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента. Катализ осуществляется всегда в условиях, когда концентрация фермента гораздо ниже концентрации субстрата. Поэтому с возрастанием концентрации фермента растет и скорость ферментативной реакции.

**Концентрации субстрата.** При данной концентрации фермента скорость ферментативной реакции возрастает с увеличением концентрации субстрата.

**Температура.** С повышением температуры ускоряется движение

молекул, вследствие чего у молекул субстрата и фермента оказывается больше шансов столкнуться друг с другом. В результате увеличивается вероятность того, что реакция произойдет. Температура, обеспечивающая максимальную активность, называется оптимальной температурой. Если температура поднимается выше этого уровня, скорость ферментативной реакции снижается, несмотря на увеличение частоты столкновения.

Температурный оптимум для большинства ферментов лежит в пределах 37–40 °С. Существуют, однако, ферменты с более высоким температурным оптимумом – 70 °С.

**рН.** При постоянной температуре любой фермент работает наиболее эффективно в узких пределах рН. Оптимальным считается то значение рН при котором реакция протекает с максимальной скоростью. При более высоких и более низких рН активность фермента снижается. При слишком резких сдвигах рН фермент денатурирует.

### 3. Белковая инженерия

Получение измененных белков, отличающихся от белков-прототипов заменой лишь одного аминокислотного остатка в строго заданном положении, позволяет целенаправленно изменять структуру ферментов, а значит, их каталитические свойства и стабильность.

Суть метода состоит в следующем. Для белков с установленной первичной и третичной структурой (известно более сотни таких белков) выбирают сайт мутации, т. е. тот аминокислотный остаток, который подлежит замене. Затем ищут или создают искусственным путем кольцевую генетическую структуру – плазмиду, в состав которой входит ген, кодирующий нужный белок. Потом химическим путем синтезируют олигодезоксирибонуклеотид длиной 12–18 оснований. Его химический состав должен быть таков, чтобы соответствовать небольшому участку первичной структуры выбранного белка (длиной 4–6-аминокислотных остатков), включающего сайт мутации. Однако в процессе химического синтеза вместо нуклеотидного триплета, кодирующего «нативную аминокислоту», в состав нуклеотидной последовательности вводят другой триплет, который кодирует новый аминокислотный остаток. На основе однонитевой плазмиды и синтезированного олигонуклеотида ферментным путем создают гетеродуплексную двунитевую плазмиду, в состав которой входит «мутантный ген», несущий информацию о структуре белка с заменой аминокислотного

остатка в определенном положении. Получают клетки, которые осуществляют биосинтез мутантного запрограммированного белка. Этот метод дорог, и поэтому наиболее эффективным будет его использование в случае тех ферментов, которые, во-первых, сами достаточно дорого стоят и, во-вторых, инактивация которых связана с химической модификацией какой-то «ключевой» группы (например, окислением N-группы вблизи активного центра или дезаминированием остатков аспаргина).

## 4 Иммобилизация ферментов

Наибольшие успехи в стабилизации ферментов связаны с применением метода иммобилизации. Иммобилизованными ферментами называются ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства.

В 1971 году на первой конференции по инженерной энзимологии был утвержден термин «*иммобилизованные ферменты*».

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами. Такие ферменты легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса, они более стабильны. Иммобилизованные ферменты долговечны. Их можно использовать для непрерывного производства, пропуская реагенты через фермент и собирая продукт на конечном этапе.

### 4.1 Носители для иммобилизованных ферментов

Для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей. К носителям предъявляются следующие требования (Дж. Порат, 1974): высокая химическая и биологическая стойкость; высокая химическая прочность; достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность; возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран); легкая активация; высокая гидрофильность; невысокая стоимость.

Общая классификация приведена на рисунке 6.

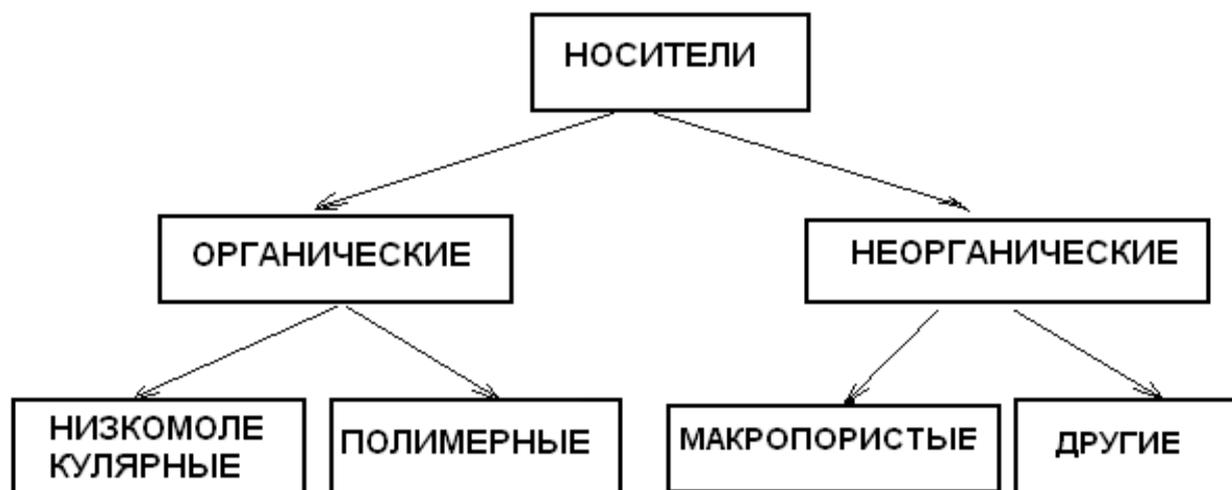


Рисунок 6 – Носители для иммобилизации ферментов

### Органические полимерные носители

#### 1 Природные полимерные носители:

1) *белковые* – в качестве носителей используют структурные белки, такие, как кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена – желатин;

2) *полисахаридные* – наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные;

3) *липидные*.

#### 2 Синтетические полимерные носители:

1) *полиметиленовые*;

2) *полиамидные*;

3) *полиэфирные*.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул.

Существенным недостатком большинства полимерных носителей является их способность накапливаться в организме. В этом отношении предпочтение отдается природным полимерам, которые гидролизуются ферментами. Поэтому в состав лекарственных препаратов часто входит декстран, а из синтетических носителей полимеры на основе N-винилпирролидона. В настоящее время ведутся эксперименты по созданию синтетических полимеров, расщепляющихся с образованием нетоксичных продуктов обмена.

### Носители неорганической природы.

В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силихромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модифи-

кации. Основное преимущество неорганических носителей – легкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

## 4.2 Методы иммобилизации ферментов

Существует два метода иммобилизации ферментов: физическая и химическая иммобилизация.

**Физическая иммобилизация**, т. е. иммобилизация, при которой фермент не соединен с носителем ковалентной связью. В свою очередь в этой группе выделяют 4 подгруппы (рис.7):

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной смеси с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
- включение в двухфазную реакционную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из этих фаз.

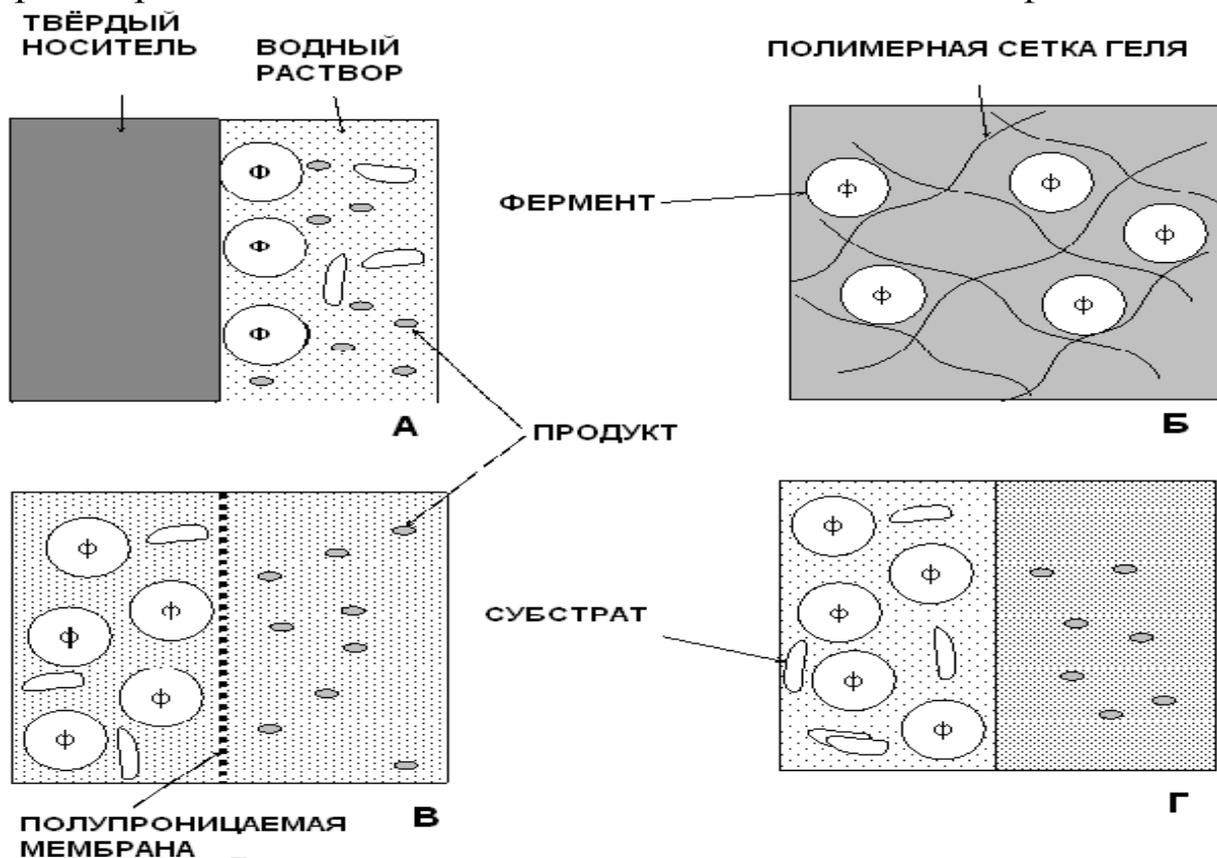


Рисунок 7 – Способы иммобилизации ферментов: А – адсорбция на нерастворимых носителях; Б – включение в поры геля; В – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны; Г – использование двухфазной реакционной среды

**Адсорбционная** иммобилизация является наиболее старым из существующих способов иммобилизации ферментов, начало ей было положено еще в 1916 году. Этот способ достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмывки неадсорбированного белка иммобилизованный фермент готов к использованию. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка. Взаимодействия с носителем могут оказаться настолько сильными, что сорбция биокатализатора может сопровождаться разрушением его структуры. Например, при адсорбции некоторых растительных клеток на гранулах цитодекса клеточная стенка деформируется, повторяя рельеф поверхности частиц носителя.

**Преимущество метода адсорбционной** иммобилизации – доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей. Им также можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость. Важный фактор – простота применяемых методик. При адсорбционном связывании можно решить и проблему очистки фермента, так как связывание белка с носителем во многих случаях достаточно специфическое. К сожалению, прочность связывания фермента с носителем не всегда достаточно высока, что ограничивает применение метода.

**К недостаткам адсорбционной иммобилизации** следует отнести отсутствие общих рекомендаций, позволяющих сделать правильный выбор носителя и оптимальных условий иммобилизации конкретного фермента.

**Включение в гели.** Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т. е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего

объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты в зависимости от концентрации полимера и его природы содержат от 50 до 90% воды.

Общий принцип иммобилизации ферментов с **использованием мембран** заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный раствор фермента можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование). При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора фермента. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом. Если вместо водонерастворимого отвердевающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называется иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получают нити) и включение в липосомы. Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента. Основным недостатком мембранных систем – невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

При иммобилизации ферментов с **использованием систем двухфазного типа** ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

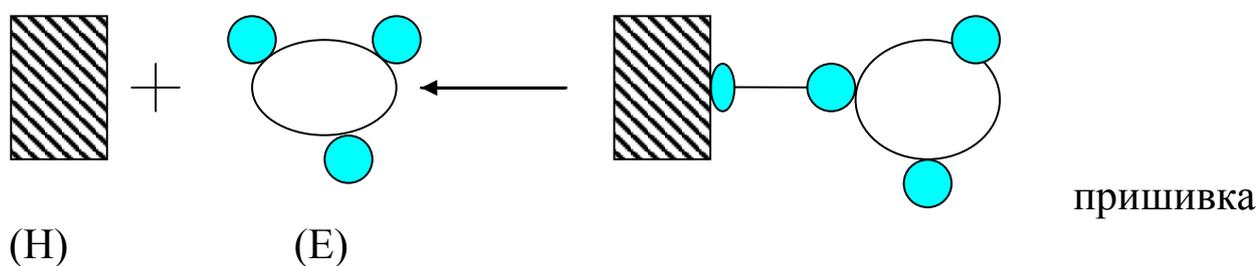
*Химическая иммобилизация*, при которой путем химического

воздействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности, между белком и носителем. В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима.

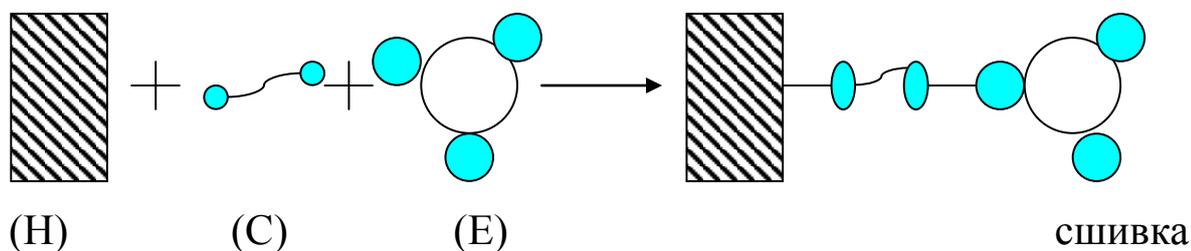
Конструирование иммобилизованных препаратов здесь происходит по следующим общим принципам:

- имеется не более трех принципиально различающихся элементов-блоков: собственно молекула фермента (Е), носитель (Н) и сшивающий би- и полифункциональный реагент (С), называемый также «сшивка», «вставка», «ножка», «спейсер» и т. д.;
- создаются конструкции из связанных химическими связями трех элементов: Н-С-Е (как минимум) или Н-Е и Е-С (как минимум) – «сшивки», «пришивки» и «вшивки» соответственно.

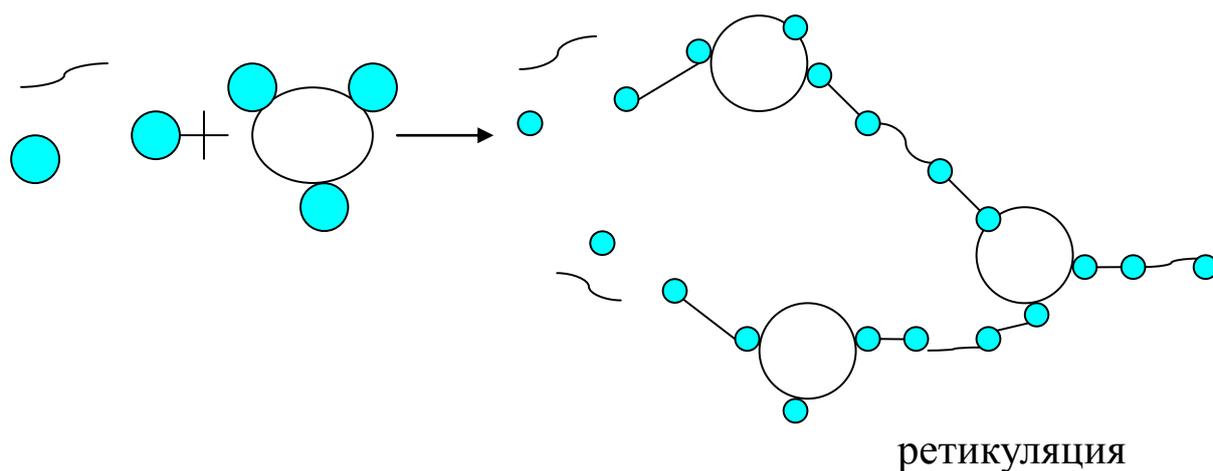
1.



2.

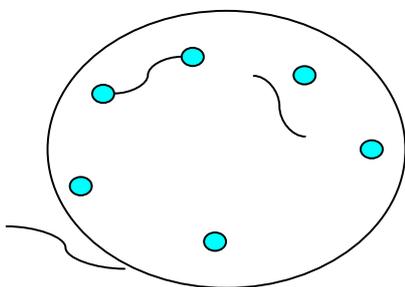


3.



4.

наложение «химических скобок»



Блок-схемы ковалентной иммобилизации ферментов

Методы химической иммобилизации обладают следующими достоинствами.

1. Ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает прочность образующего конъюгата.

2. Химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких, как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность.

### 4.3. Применение иммобилизованных ферментов

Особенно ощутимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленности.

В будущем важную роль в контроле окружающей среды и в клинической диагностике должны сыграть такие методы, как биолюминесцентный и иммуноферментный анализы.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме.

Проблемы биоконверсии массы и энергии в настоящее время пытаются решить микробиологическим путем. Тем не менее иммобилизованные ферменты вносят ощутимый вклад в осуществление фототолерантности воды и в биоэлектрокатализ.

Заслуживает внимание и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Иммобилизованные ферменты могут использоваться и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента можно подействовать через носитель, подвергая последний ультразвуковой обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям. Это позволяет регулировать каталитическую активность системы фермент – носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии.

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены прежде всего в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислот, оптически активных L-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.

Примером процесса, в котором успешно используется иммобилизованные ферменты, является производство кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы. Он широко используется в США и Японии в качестве подсластителя. Например, во фруктовых напитках, так как он значительно дешевле сахарозы. Сироп готовят из дешевого источника углеводов – крахмала, получаемого из кочерыжек кукурузных початков. Процесс осуществляется с участием трех ферментов. Сначала получают крахмальную массу путем перемалывания (растирания) кукурузы, затем две амилазы превращают крахмал в глюкоз-

ный сироп. Обесцвеченный и сконцентрированный сироп добавляют в различные пищевые продукты и напитки. С помощью фермента глюкозоизомеразы можно превратить этот сироп в смесь, содержащую равное количество глюкозы и фруктозы. Для этого сироп пропускают через колонку, в которой содержится фермент, иммобилизованный путем адсорбции на целлюлозном ионообменнике. Активность фермента со временем постепенно снижается, поэтому обычно используют несколько колонок, работающих одновременно. Фруктоза слаще глюкозы, хотя обе содержат одинаковое число калорий на единицу массы. Это означает, что, используя кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы, можно получить такой же сладкий продукт, как с глюкозой, но с меньшим содержанием калорий. Ежегодно в США производится около 4 млн т сиропа.

В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, именно на этом пути медицину ждет создание новых высокоэффективных методов лечения. Примером использования иммобилизованных ферментов может служить производство полусинтетических пенициллинов из природных пенициллинов. Иммобилизованный фермент химически модифицирует одну из боковых групп молекулы пенициллина, что приводит к повышению антибиотической активности пенициллинов.

Таким образом, мы изучили основные классы ферментов, которые используются в народном хозяйстве. Рассмотрели методы иммобилизации ферментов.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Назовите основные классы ферментов.
- 2 Охарактеризуйте класс ферментов – оксидоредуктазы, назовите представителей данного класса.
- 3 Охарактеризуйте класс ферментов – трансферазы, назовите представителей данного класса.
- 4 Охарактеризуйте классы ферментов – гидролазы и лиазы, назовите представителей данного класса.
- 5 Охарактеризуйте класс ферментов – изомеразы и лигазы, назо-

вите представителей данного класса.

6 Назовите источники ферментов.

7 Какие группы ферментов используются в промышленности наиболее широко?

8 Охарактеризуйте группу аминолитических ферментов.

9 Охарактеризуйте группу протеолитических ферментов. Области применения протеаз.

10 Охарактеризуйте группу пектолитических ферментов. На какие виды они подразделяются? Область применения.

11 Охарактеризуйте группу целлюлолитических ферментов. Области применения.

12 Какие факторы и как влияют на скорость ферментативных реакций?

13 Расскажите о методе получения измененных белков. Его значении.

14 Дайте определение термину «*иммобилизованные ферменты*». Когда он был утверждён?

15 Назовите носители для иммобилизованных ферментов.

16 Назовите достоинства метода химической иммобилизации.

17 Расскажите о физической иммобилизации ферментов.

18 Расскажите о применении иммобилизованных ферментов.

### **Рекомендуемая литература**

1 Егоров, Н.С. Биотехнология. Проблемы и перспективы /Н.С. Егоров, А.В. Олескин, В.Д. Самуилов. – М.: Высш. шк., 1987.

2 Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.

3 Егорова, Т.А. Основы биотехнологии /Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003.

4 Тихонов, И.В. Биотехнология /И.В. Тихонов [и др.]. – СПб.: ГНОРД, 2005.

# ТЕМА: БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПРОБЛЕМЫ ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

## Вопросы

1. Общие показатели загрязненности сточных вод.
  - 1.1 Химическое потребление кислорода.
  - 1.2 Биологическое потребление кислорода.
2. Аэробная переработка отходов (в присутствии кислорода).
3. Анаэробное разложение.
4. Извлечение полезных веществ.

### 1. Общие показатели загрязненности сточных вод

Бурное развитие техники, отраслей промышленности, сельского хозяйства и прирост населения планеты ухудшают экологическую обстановку в мире.

Из-за промышленной, сельскохозяйственной и бытовой деятельности человека постоянно происходит изменение физических, химических и биологических свойств окружающей среды, причем многие из этих изменений неблагоприятны. В связи с химизацией сельского хозяйства в водоемы попадает большое количество пестицидов, гербицидов, дефолиантов, антибиотиков, дезинфицирующих средств, азотистых и фосфорных соединений.

Отечественный и зарубежный опыт показывает, что охрана водных ресурсов и окружающей среды от загрязнения сточными водами не может быть полностью решена путем строительства очистных сооружений. Даже при соблюдении всех необходимых технических условий их эксплуатации степень очистки сточных вод в среднем практически достигает не более 80–90%, что не обеспечивает защиту водисточников окружающей среды от остаточного загрязнения минеральными и трудноокисляемыми органическими соединениями, возбудителями инфекционных и инвазионных заболеваний.

Например, для очистки помещений на крупных животноводческих фермах и комплексах используются гидросмывы. Ежегодно объем жидких стоков составляет 1,3 млрд м<sup>3</sup>, или около 1 км<sup>3</sup>. В них содержится 4,5 млн т азота, 2,2 млн т фосфора, 3,5 млн т калия.

Под качеством воды понимается совокупность ее характеристик и свойств, обусловленных природой и концентрацией содержащихся в ней примесей. В связи с невозможностью индивидуального аналитического определения всех присутствующих в сточной воде соедине-

ний прибегают к суммарной оценке их содержания.

К общим показателям загрязнения сточных вод относят показатели, которые характеризуют общие свойства воды: органолептические; физико-химические; содержание нерастворимых примесей (содержание взвешенных веществ (зольность); концентрацию нерастворимых веществ (общее содержание органических и неорганических примесей, органический углерод); перманганатную и дихроматную окисляемость (химическое потребление кислорода – ХПК); биохимическое потребление кислорода (БПК).

Совокупность этих показателей позволяет оценить общее состояние сточных вод и предложить наиболее эффективный способ их очистки.

Определение таких показателей, как органолептические (цвет, вид, запах, прозрачность, мутность), оптическая плотность, цветность, кислотность и т. д., не вызывает каких-либо трудностей. Значительно сложнее определить общее содержание органических веществ в сточных водах, которые необходимо знать для контроля работы очистных сооружений, повторного использования сточных вод в технологических процессах, выбора метода очистки и доочистки, определение окончания процесса очистки, а также для оценки возможности сброса воды в водоемы.

Из большого числа способов, применяемых для определения содержания органических веществ, более подробно разберём два, которые наиболее широко используются:

**1.1. Химическое потребление кислорода (ХПК).** Методика основана на окислении веществ, присутствующих в сточных водах, 0,25%-м раствором дихромата калия при кипячении пробы в течение 2 часов в 50%-м (по объему) растворе серной кислоты. Для полноты окисления органических веществ применяется катализатор – сульфат серебра. Исследования показали, что большинство органических соединений в таких условиях окисляется до  $H_2O$  и  $CO_2$ , однако ряд соединений (пиридин, бензол и его гомологи, нафталин) в этом режиме окисляются не полностью. Тем не менее дихроматный способ имеет широкое применение из-за его простоты и возможности автоматизации при проведении эксперимента.

**1.2. Биологическое потребление кислорода (БПК).** Измеряется количеством кислорода, которое расходуется микроорганизмами при аэробном биологическом разложении веществ, содержащихся в сточных водах при стандартных условиях за определенный интервал вре-

мени. Определение БПК требует специальной аппаратуры; при манометрических способах измеряется уменьшение давления в аппарате за счет потребления кислорода. Исследования проводят в аппарате Варбурга или в специально разработанном респирометре.

Измерение БПК выполняют следующим образом: в герметичный ферментер помещается определенное количество исследуемой сточной воды, которую засевают микроорганизмами; в процессе культивирования регистрируется изменение количества кислорода (или кислорода воздуха), пошедшего на окисление соединения, присутствующего в сточных водах.

Второй, кулонометрический способ определения БПК более сложен в аппаратном оформлении, он основан на компенсации объема кислорода, потребленного микроорганизмами, за счет электролиза соответствующего количества воды, при этом объем выделившегося кислорода определяется по затратам электричества.

Стоки кислой и щелочной породы перед определением БПК надо нейтрализовать. Высококонцентрированные стоки перед анализом разбавляют, так как возможно ингибирование повышенными концентрациями загрязнений.

Особое значение при измерении БПК имеют количество и качество микрофлоры. Используют микрофлору из уже работающих биологических систем, адаптированную именно к данному спектру загрязнений. Количество ее должно соответствовать ее концентрации в работающих очистных сооружениях.

Определение лишь одного из показателей качества сточной воды (ХПК или БПК) не всегда позволяет оценить ее доступность для биологической очистки.

Целью очистки производственных сточных вод является удаление из них взвешенных и растворимых органических и неорганических соединений до концентрации, которые не превышают заранее регламентированные (ПФК). В зависимости от характера загрязнений и их концентраций возможно применение различных способов очистки сточных вод. Наиболее распространены методы:

механические (коагуляция, нейтрализация с последующим отстаиванием);

физико-химические (ионный обмен, сорбция);

термические;

биохимические.

Биохимические способы очистки относятся к процессам биотех-



## 2. Аэробная переработка отходов (в присутствии кислорода)

Существует две большие группы аэробных процессов биоочистки:

- экстенсивная;
- интенсивная.

К экстенсивным относят методы, непосредственно не связанные с управлением культивированием микроорганизмов. Это поля орошения, поля фильтрации, биопруды. Микроорганизмы, находящиеся в верхних слоях почвы полей орошения и фильтрации или воды биопрудов, образуют ценозы, за счет их деятельности происходит очистка воды.

В основе интенсивных способов лежит деятельность активного ила или биопленки.

Активный ил представляет собой темно-коричневые хлопья размером до нескольких сотен микрометров. Он состоит на 70% из живых организмов и около 30% составляют твердые частицы неорганической природы. Живые организмы вместе с твердым носителем, к которому они прикреплены, образуют *зооглей* – симбиоз популяций организмов, покрытых общей слизистой оболочкой. Взаимодействие микроорганизмов в пределах одного зооглея достаточно сложно, и основой его служит симбиотическая взаимосвязь организмов разных популяций. Соотношение капсульных и бескапсульных форм клеток в иле называется *коэффициентом зооглейности* ( $k_z$ ).

Переработка отходов с помощью активного ила была предложена в 1914 году. Однако этот метод обладает рядом недостатков:

- более высокие эксплуатационные расходы из-за необходимости перемешивания и аэрации;
- большие трудности в осуществлении и поддержке процесса;
- образование большого избытка биомассы.

Несмотря на это, процесс остается наиболее распространенным.

Микроорганизмы, выделенные из активного ила, относят к различным родам: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Micococcus*. Наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas*. Они окисляют спирты, жирные кислоты, парафины, ароматические углеводороды и др. соединения. Широко представлены и бактерии рода *Bacterium* (выделено более 30 видов, которые осуществляют деградацию нефти, парафинов, нафтенов, фенолов, альдегидов, жирных кислот). Алифатические углеводороды окисляются представителями рода *Bacillus*. Окислительная способность перечис-

ленных микроорганизмов для различных органических соединений различна, и лишь для бактерий рода *Pseudomonas* она практически одинакова для разных видов загрязнений.

Существенная роль в создании и функционировании консорциума клеток принадлежит простейшим. Функции простейших многообразны:

- они сами не принимают непосредственного участия в потреблении органических веществ, но регулируют видовой и возрастной состав микроорганизмов в активном иле, поддерживая его на оптимальном уровне;
- поглощая большое количество бактерий, простейшие способствуют выходу значительного количества бактериальных экзоферментов, которые могут концентрироваться в слизистой оболочке и принимать участие в деструкции загрязнений.

В активном иле встречаются представители 4 классов простейших: саркодовые (*Sarcodina*); жгутиковые инфузории (*Mastigophora*); реснитчатые инфузории (*Ciliata*); сосущие инфузории (*Suctorina*).

Простейшие выбирают из смешанной культуры бактерий лишь те виды, которые они усваивают. Одна инфузория пропускает через свой организм от 20 до 40 тыс. бактерий за сутки. Поедание старых ослабленных форм облегчает размножение оставшихся и приводит к появлению молодых, биологически активных особей.

Кроме одноклеточных в активном иле могут обитать колероватки, нематоды, олигохеты.

В активных илах высокого качества на 1 млн бактериальных клеток должно быть 10–15 простейших организмов, это соотношение называется *коэффициентом протозойности*  $k_p$ . Скорость биохимического окисления растет с увеличением значения коэффициентов зооглейности и протозойности. Следует отметить, что простейшие очень чувствительны к присутствию в сточных водах небольших концентраций определенных органических соединений (фенол и формальдегид уже в незначительных концентрациях угнетают их развитие).

Несколько другую картину представляет биоценоз, возникающих в биофильтрах. На поверхности загрузки материала биофильтра происходит образование биологической пленки. В отличие от биоценоза активного ила, количественный и видовой состав которого

практически одинаков во всей системе очистки, на разных уровнях биофильтра создаются свои ценозы микроорганизмов, которые порой резко отличаются не только количественным, но и качественным составом. Это вызвано тем, что по мере прохождения сточных вод через биофильтр за счет жизнедеятельности предыдущего ценоза меняется характеристика органических загрязнений воды, попадающей на следующий уровень. При этом сначала потребляются более легко усвояемые загрязнения, по мере продвижения воды происходит потребление более трудно усвояемых компонентов смеси. В нижней части таких биоценозов в больших количествах скапливаются простейшие и другие организмы, которые функционируют за счет потребления части биопленки, оторвавшейся с поверхности носителя. Созданный таким образом биоценоз способен почти полностью извлечь из сточных вод все органические примеси.

При работе с биологическим фильтром надо следить за состоянием сточных вод, не допускать перегрузку фильтра и предотвращать уничтожение микрофлоры токсичными соединениями и нерастворимым остатком.

Большинство очистных сооружений аэробного типа работает под открытым небом и не предусматривает систем регуляции температуры, следовательно, температура может колебаться от 2–5 °С до 25–35 °С. С понижением температуры до 10–15 °С развиваются психрофильные формы микроорганизмов. Снижение температуры с 20 до 6 °С приводит к падению скорости очистки в 2–3 раза, в биоценозе преимущественно развиваются мезофильные и термофильные формы микроорганизмов. Бактериальные формы лучше растут в нейтральной или слабощелочной среде (рН 5,0–6,5). Наилучшее значение рН для систем биологической очистки считается область от 5,5 до 8,5.

Аэробный способ очистки сточных вод основан на использовании системы аппаратов: аэротенк – вторичный отстойник. Аэротенк представляет собой открытое железобетонное сооружение, в котором происходит перемешивание сточных вод, микробного ила и воздуха. В отстойниках ил осаждается и накапливается. Схема системы аэробной очистки промышленных стоков приведена на рисунке 9.

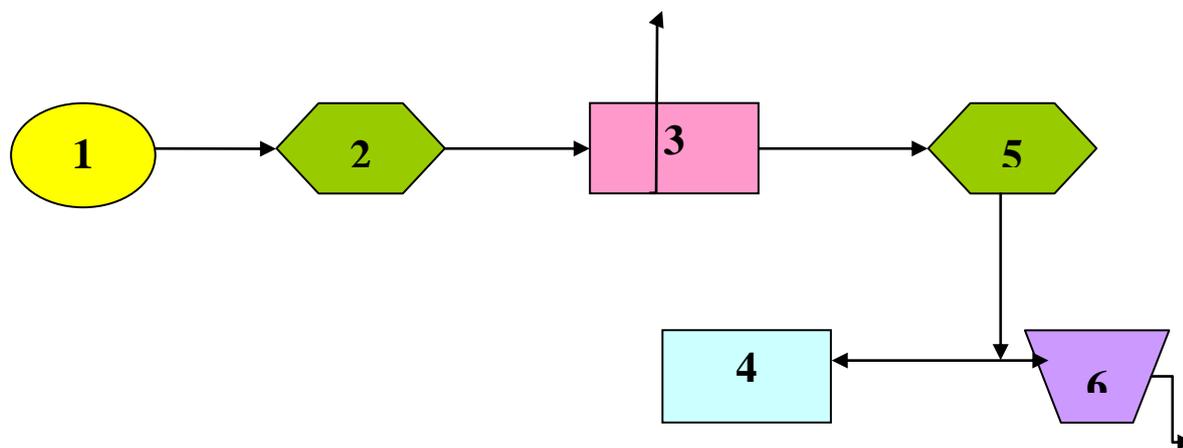


Рисунок 9 – Схема системы аэробной очистки промышленных стоков

1 – усреднитель; 2 – отстойник; 3 – аэротенк; 4 – регенератор ила;  
5 – отстойник; 6 – уплотнитель ила

В зависимости от способа смещения суспензии активного ила с очищаемой водой и гидродинамического режима движения суспензии активного ила аэротенки подразделяются на следующее:

- аэротенк-вытеснитель;
- аэротенк-смеситель;
- аэротенк сложного типа.

В аэротенке-вытеснителе свежая порция активного ила и очищаемая вода одновременно попадают в аппарат и далее происходит движение суспензии активного ила по аппарату в режиме, приближающемся к идеальному вытеснению.

В аэротенке-смесителе активный ил и очищаемая сточная вода поступают по всей длине аппарата одновременно, в аппарате создается режим, близкий к полному смешению, одновременно из аппарата отводится суспензия активного ила.

В аппаратах сложного типа на разных этапах очистки одновременно реализуются и режим смещения, и режим вытеснения.

**К достоинствам** аэротенк-вытеснителя следует отнести то, что процесс при его достаточной длительности позволяет полностью извлечь все загрязнения из сточных вод. **К недостаткам** относится то, что микроорганизмы активного ила в начальный момент очистки контактируют со сточной водой, содержащей максимальное количество органических загрязнений, очистная система крайне чувствительна к резким увеличениям или колебаниям начальной концентрации загрязнений.

Этих недостатков лишен аэротенк-смеситель, так как сточная

вода, попадая в аэротенк, быстро распределяется по объему, при этом концентрация загрязнений снижается до стационарных значений.

В аэротенках сложного типа сочетаются оба способа проведения процесса. В первой зоне аппарата, где происходит контакт высококонцентрированных стоков с активным илом, добиваются режима, приближенного к полному смещению, во второй части – для достижения большей полноты извлечения загрязнений из сточной воды – создают режим потока, приближенного к идеальному вытеснению. К аппаратам такого типа относят аэротенки с рассредоточенной подачей сточной воды и сосредоточенной подачей активного ила.

Внешний вид аэротенка приведен на рисунках 10–12.



Рисунок 10 – Аэротенк



Рисунок 11 – Биологическая очистка. Аэротенк



Рисунок 12 – Биологическая очистка. Аэрационная система. Воздуходувки

Для очистки сточных вод используют **перколяционные фильтры**. Одна из модификаций установки состоит в использовании чередующегося двойного фильтра (ЧДФ), когда фильтры, на которые сначала поступает поток жидкости, периодически меняются местами с другими фильтрами. ЧДФ ценно при очистке промышленных стоков. Для разрушения слоев грязи в толще фильтров используют также обратную циркуляцию и пульсирующую подачу.

В 1973 году в Англии были созданы вращающиеся биологические реакторы. Они представляют собой вращающиеся соты из пластиковых полос, попеременно погружаемые в сточные воды и поднимаемые на поверхность. При таком способе увеличивается площадь поверхности, с которой может контактировать биомасса, и улучшается аэрация.

Для очистки сточных вод используется принцип «псевдосжиженного слоя». Существует два типа установок:

**1 Уловитель Саймона Хартли.** Биомассу наращивают в пустотах внутри прокладок из пористого полиэфира, которые удерживаются внутри реактора с помощью соток. Прокладки периодически удаляют из реактора, густую биомассу (до 15 кг на каждый м<sup>3</sup> обводненного носителя) отжимают, и пустые прокладки возвращают в реактор.

**2 Оксигенатор Дорра Оливера.** В данном случае в качестве подложки используют песок, который периодически выпускают из реактора, очищают и используют снова.

### 3. Анаэробное разложение

Самая распространённая технология анаэробной переработки - разложение ила сточных вод. Процесс брожения осуществляется в специальных аппаратах – метантенках.

Процесс брожения состоит из двух стадий – кислой и метановой. Каждая из этих стадий осуществляется определённой группой микроорганизмов: кислая – органотрофами, метановая – литотрофами. Обе эти группы присутствуют в метантенках одновременно, поэтому кислото- и газообразование протекает параллельно. Биodeградация органических веществ при метановом брожении в метантенках протекает в три последовательные фазы (табл. 3).

Таблица 3 – Фазы метанового брожения

Группа бактерий, участвующих в процессе	Исходное вещество	Продукт
<b>Биогидролиз полимеров и ацидогенез</b>		
Гидролитические ацетогенные	Комплекс органических веществ	Высшие жирные кислоты
<b>Ацетогенез и дегидрогенизация</b>		
Водородпродуцирующие бактерии	Высшие жирные кислоты	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> COOH
<b>Метаногенез</b>		
Метанобразующие бактерии	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> COOH	CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub>

В первой фазе около 76% органических кислот переходит в высшие жирные кислоты, до 20% – в ацетат и 4% – в водород.

Первую фазу можно разделить на фазы гидролиза и ацидогенеза (кислотообразования). Во второй фазе главными являются процессы образования из высших жирных кислот ацетата (52%) и водорода (24%). В третьей фазе (брожение) метаногенные бактерии образуют из ацетата 72% метана, из H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> – 28% метана. Соотношение промежуточных и конечных продуктов в процессе метанового брожения зависит от состава среды, условий ферментации и присутствующей микрофлоры.

В первой фазе брожения принимают участие микроорганизмы, обладающие целлюлолитической, протеолитической, липолитической, сульфатвосстанавливающей, денитрифицирующей и другими видами активности. Состав доминирующей микрофлоры данной фазы зависит от состава микрофлоры поступающего в метантенки субстрата, а также от химической природы деградируемых органических веществ.

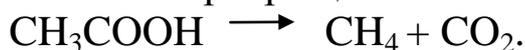
Существенная роль в процессах метанового брожения принадлежит ацетогенным водородпродуцирующим бактериям. Эти бактерии превращают пропионат в ацетат,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ , если в среде одновременно присутствуют водородпотребляющие бактерии.

В третьей фазе – метаногенной – участвуют метанобразующие бактерии.

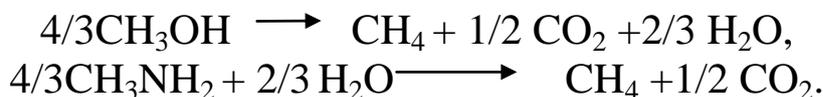
В качестве субстрата многие метаногены потребляют формиат, который трансформируют в метан:



При переработке различных коммунальных и промышленных стоков пищевых производств основным субстратом для метаногенов является ацетат, который также превращается в метан:



К этой группе метаногенов относятся *Methanosarcna barkeri*, *Methanococcus mazei*, *Methanothrx soengeni*. Некоторые метаногены конвертируют в метан также метанол и метиламин:



Метан при метановом брожении получается также из  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ , образующегося в результате деятельности в основном ацетогенных бактерий.

Установлено, что аэробное метановое брожение применяют для детоксикации стоков. Аэробные бактерии деградируют не только углеводы, липиды, протеины, нуклеиновые кислоты, но и многие соединения нефтехимической промышленности, например, бензольную кислоту:



Адаптированные ассоциации анаэробов деградируют ацетальдегид, ацетон, бутанол, этилацетат, этилакрилат, глицерол, нитробензол, фенол, пропанол, пропиленгликоль, кротоновую, фумаровую валериановую кислоты, винилацетат, парафины, синтетические полимеры и многие другие вещества и продукты.

Метановое брожение можно рассматривать не только как средство защиты окружающей среды, но и как метод получения газообразного топлива, ценных органических удобрений и даже кормовых добавок. Например, путем метанового сбраживания мелассной барды спиртового брожения был получен концентрат витамина  $\text{B}_{12}$ .

Получение метана – важный путь утилизации сельскохозяйственных отходов. Он получается в виде биогаза – смеси метана и  $\text{CO}_2$ . Присутствие  $\text{CO}_2$  ограничивает теплотворную способность биогаза как топлива, которая в зависимости от соотношения  $\text{CH}_4/\text{CO}_2$  составляет 20,9–33,4 кДж/м<sup>3</sup>. Содержание метана в биогазе может варьировать от 50 до 85%.

Получение биогаза – процесс, отличающийся простотой оборудования и доступностью сырья, требует небольших капиталовложений.

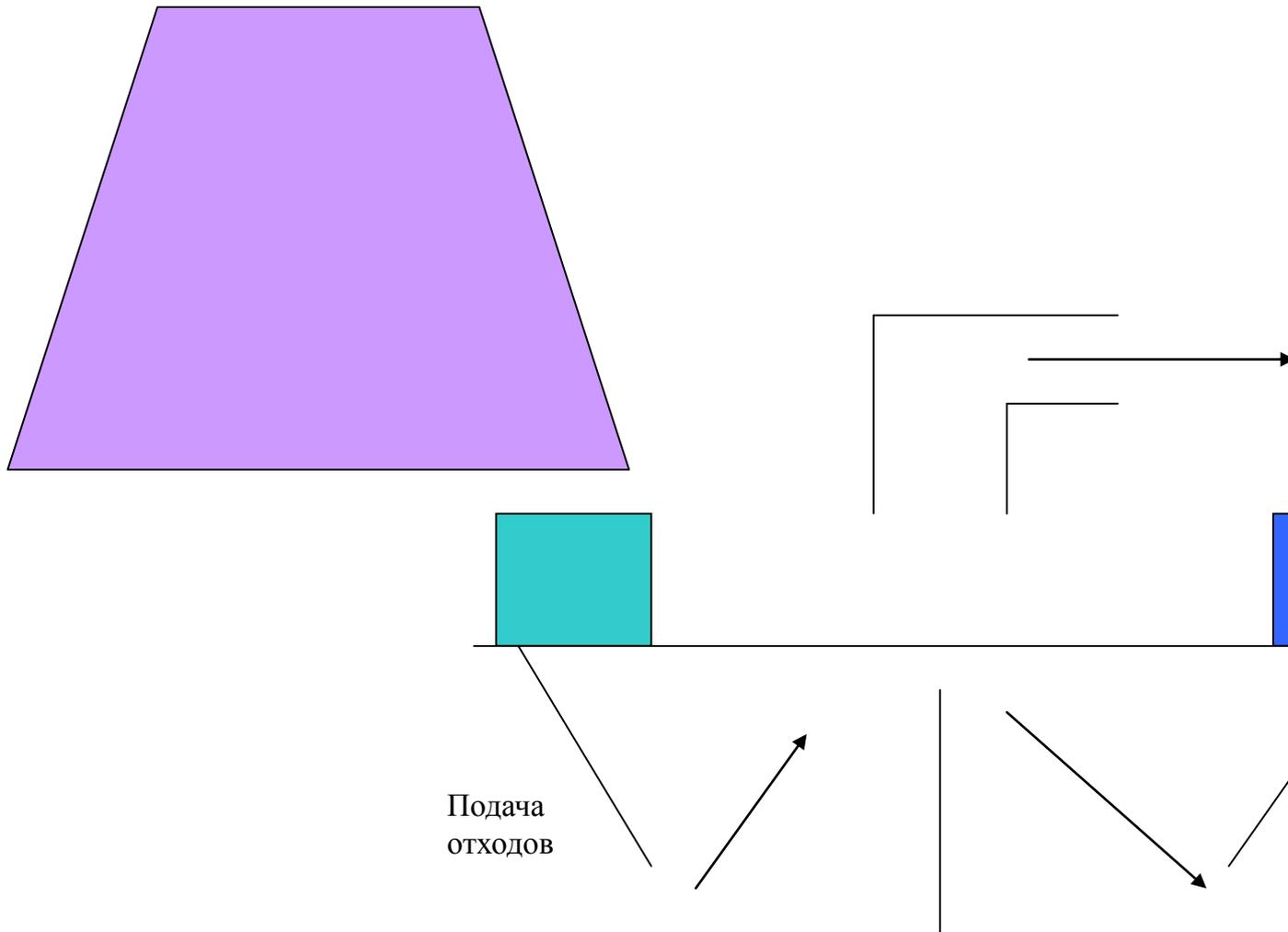


Рисунок 13 – Схема устройства реактора для обработки сельскохозяйственных отходов

Подача отходов и отбор отработанного стока осуществляются в нижней части реактора. Режим его работы может быть как периодическим, так и полунепрерывным.

Для получения биогаза можно использовать испорченные продукты, стоки крахмалперерабатывающих предприятий, жидкие отходы сахарных заводов, бытовые отходы, сточные воды городов и спиртовых заводов, отходы сельского хозяйства.

Получение биогаза на городских свалках относится к типу твердофазной ферментации.

#### 4. Извлечение полезных веществ

Одна из главных задач технологии, связанной с окружающей средой, – это сохранение природных ресурсов путем повторного использования полезных веществ, содержащихся в отходах. Получение полезных материалов из отходов имеет два аспекта: извлечение и концентрирование полезных веществ из отходов; превращение отходов в полезные материалы.

**Извлечение веществ из воды.** Воду можно рассматривать как возобновляемый ресурс. Повторное использование промышленных сточных вод экономично только в тяжелой промышленности, где можно применять не такую чистую воду, как питьевую, и поэтому можно свести к минимуму обработку сточных вод. Основные трудности при очистке сточных вод связаны с наличием соединений, которые не поддаются переработке.

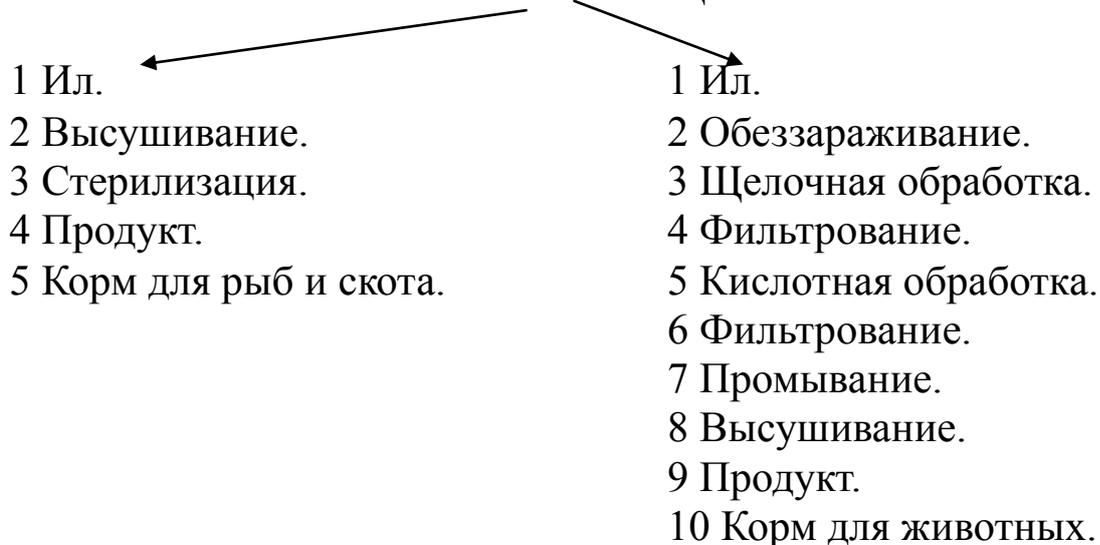
**Извлечение веществ из отходов сельскохозяйственного производства.** Потребность в удобрениях постоянно возрастает, однако цены на химические удобрения всё время растут, поэтому становится выгодным использование отходов животноводства в качестве органических удобрений. Содержание различных компонентов приведено в таблице 4.

Таблица 4 – Содержание различных компонентов в навозе

Животные	Сухое вещество, %	Содержание различных компонентов (кг/т свежего навоза)			
		Азот	Фосфор	Калий	Магний
Крупный рогатый скот	4–23	2,4–6,5	0,4–0,8	2–5,8	0,2–0,6
Свиньи	5–25	1,6–6,8	0,6–2,1	1,7–3,6	0,3–0,7
Птицы	23–68	9,6–23	2,4–12	3,8–11,6	1,2–2,2

**Корма для животных.** В процессе переработки отходов при участии микроорганизмов образуется много микробного белка, который можно использовать для корма скоту.

### СХЕМА ЭКСТРАКЦИИ БЕЛКА



Таким образом, биотехнология может оказать существенное влияние на решение экологических проблем, позволит осуществить систему профилактических мероприятий и ликвидировать последствия загрязнения окружающей среды. Мы выяснили, какие объекты могут быть подвергнуты биотехнологической обработке, и рассмотрели методы биологической очистки стоков и выбросов.

### Контрольные вопросы

1 Назовите показатели загрязнения сточных вод, которые характеризуют общие свойства воды.

2 Расскажите о способе ХПК, применяемом для определения содержания органических веществ.

3 Расскажите о способе БПК, применяемом для определения содержания органических веществ.

4 Расскажите, как работают перколяционные фильтры.

5 Назовите достоинства и недостатки в работе аэротенка-вытеснителя, аэротенка-смесителя.

6 Из каких стадий состоит процесс брожения? Какими группами микроорганизмов осуществляется каждая из стадий?

7 Назовите фазы метанового брожения. Какие микроорганизмы принимают участие первой и второй фазах брожения?

8 Как происходит экстракция белка из активного ила?

### **Рекомендуемая литература**

1. Егоров, Н.С. Биотехнология. Проблемы и перспективы / Н.С. Егоров, А.В. Олескин, В.Д. Самуилов. – М.: Высш. шк., 1987.
2. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003.
3. Сельскохозяйственная биотехнология /под. ред. В.С. Шевелуха. – М.: Высш. шк., 1998.
4. Баев, А.А. Биотехнология/ А.А. Баев. – М.: Наука, 1984.
5. Герасименко, В.Г. Биотехнология / В.Г. Герасименко. – Киев: Вища школа, 1989.
6. Бекер, М.Е. Биотехнология /М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. – М.: ВО «Агропромиздат», 1990.

## Оглавление

Введение	3
<b>Тема: Биотехнология: принципы, применение</b>	5
1. История биотехнологии и современное состояние	5
2. Биосистемы, объекты и методы в биотехнологии	8
3. Современная биотехнология в животноводстве	10
4. Биотехнология и растениеводство	12
5. Биотехнология и ветеринария	14
6. Биотехнология и медицина	15
Контрольные вопросы	16
Рекомендуемая литература	16
<b>Тема: Основы генетической инженерии</b>	17
1. История развития генетической инженерии	17
2. Биотехнология рекомбинантных ДНК	19
3. Конструирование рекомбинантных ДНК	24
4. Экспрессия чужеродных генов	27
5. Использование генетической инженерии в жи- вотноводстве	29
Контрольные вопросы	32
Рекомендуемая литература	33
<b>Тема: Клеточная инженерия</b>	34
1. Краткая история предмета	34
2. Этапы получения гибридных клеток	35
3. Возможности метода слияния клеток	36
4. Гибридомная технология	38
5. Клонирование животных	44
5.1. История метода	44
5.2. Клонирование млекопитающих	47
5.3. Методы трансплантации ядер	49
6. Трансплантация эмбрионов	50
Контрольные вопросы	54
Рекомендуемая литература	54
<b>Тема: Биоиндустрия ферментов</b>	55
1 Ферменты и их применение	55
2 Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций	60
3. Белковая инженерия	61
4. Иммобилизация ферментов	62

4.1. Носители для иммобилизованных ферментов	62
4.2. Методы иммобилизации ферментов	64
4.3. Применение иммобилизованных ферментов	68
Контрольные вопросы	70
Рекомендуемая литература	71
<b>Тема: Биотехнология и проблемы защиты окружающей среды</b>	<b>72</b>
1. Общие показатели загрязненности сточных вод	72
1.1. Химическое потребление кислорода	73
1.2. Биологическое потребление кислорода	73
2. Аэробная переработка отходов	76
3. Анаэробное разложение	82
4. Извлечение полезных веществ	85
Контрольные вопросы	86
Рекомендуемая литература	87

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

*Курс лекций*

*Четвертакова Елена Викторовна*

*Редактор Л.М. Убиенных*

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать 02.03.2010. Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. Тираж 120 экз. Заказ №

Издательство Красноярского государственного аграрного университета  
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117