

Лекция 1.

**ПОНЯТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ,
ЕЕ ЗАДАЧИ, ПОДБОР И
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

БИОТЕХНОЛОГИЯ

(*bios, taken, logos*)

1919 г.

Карл Эреки предложил термин «биотехнология»

«*Biotechnology of Meat, Fat and Milk Production in an Agricultural Large-Scale Farm*», Берлин, 1919



Karl Ereky
(1878 -1952)

«**БИОТЕХНОЛОГИЯ** – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты»

БИОТЕХНОЛОГИЯ - промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами.

1961 г.

термин **«БИОТЕХНОЛОГИЯ»**
внедрен в научный обиход



**Выход журнала
«Биотехнология
и биоинженерия»**

до **1970-х гг.**

биотехнологическими называли
производства, в которых применялись
микроорганизмы

*(от промышленного пивоварения до выпуска
антибиотиков)*





1984 г. после долгих дебатов члены Европейской Ассоциации Биотехнологии согласились с тем, что . . .

БИОТЕХНОЛОГИЯ – это научно-техническое направление, изучающее возможности использования биотехнологических процессов в технике и промышленном производстве



Биопроцесс в лаборатории развития клетки компании "Genentech".
Основана в 1976 г. Гербертом Бойером и Бобом Свэнсоном в южной части Сан-Франциско

Биотехнология. Предмет

комплексная наука, направленная на получение целевого продукта, с помощью биообъектов микробного, растительного и животного происхождения

Биотехнология. Задачи



Биообъекты. *Исследование новых возможностей использования биообъектов микробного, растительного и животного происхождения в биотехнологических процессах*

Методы. *Разработка методов и подходов модификации биообъектов с целью повышения их эффективности в биотехнологических процессах*

Процессы. *Разработка и внедрение биотехнологических процессов для решения широкого спектра теоретических и прикладных задач*

Биотехнология. Методы



Микробиологические и цитологические
(микроскопия, клеточные технологии: культивирование, гибридизация, реконструкция и др.)

Молекулярно-биологические
(молекулярные и генные технологии: рекомбиногенез, секвенирование, фаговый и клеточных дисплей и пр.)

Физико-химические
(мутагенез, инструментальные методы и пр.)

Современная биотехнология тесно стыкуется с рядом научных дисциплин, осуществляя их практическое применение или же являясь их основным инструментом.



Связь биотехнологии с другими науками (по В.И.Кефели, 1989)

Схематическое распределение основных продуктов биотехнологии

Технология	Здравоохранение	Сельскохозяйственное пр-во и пр-во продуктов питания	Сельское хозяйство	Энергетика	Химическая пром-ть
Сбраживание	Антибиотики, Витамины Ферменты Аминокислоты Нуклеотиды Стероиды Алкалоиды Диагностические препараты	Лимонная кислота Аминокислоты Нуклеотиды Ферменты Биополимеры	Биопестициды	Этанол Ацетонабутиловый спирт Биогаз	Химия этанола Этилен Уксусный альдегид Ацетон Бутанол Бутадиен
Энзиматическая инженерия		Фруктозо-глюкозный сироп Глюкозный сироп		Этанол	
Техника рекомбинантных ДНК (генетическая инженерия)	Интерфероны Гормоны Вакцины				
Культуры клеток	Интерфероны Вакцины Компоненты крови Моноклональные антитела	Белок одноклеточных (кормовой белок)	Клоны		

Питательные среды

Требования, предъявляемые к питательным средам.

1. Питательные среды должны содержать необходимые для питания микробов питательные вещества.
2. Иметь реакцию рН, оптимальную для выращиваемого вида микроба. -
3. Питательные среды должны иметь достаточную влажность и вязкость, т.к. микробы питаются по законам диффузии и осмоса.
4. Обладать изотоничностью и иметь определенный окислительно-восстановительный потенциал.
5. Питательные среды должны быть стерильными, обеспечивая тем самым возможность выращивания чистых культур.

Классификация питательных сред производится по их составу и назначению

1. По составу питательные среды делятся на простые и сложные

Различают группу сред общего назначения - простых. К этой группе относят мясо-пептонный бульон (простой питательный бульон), мясо-пептонный агар {простой питательный агар), питательный желатин. Эти среды применяются для выращивания многих патогенных микробов. Среда общего назначения, или простые питательные среды, готовятся обычно из гидролизатов с добавлением пептона и хлористого натрия. Их используют также как основу для приготовления сложных сред.

2. Ко второй группе относятся среды элективные, специальные и дифференциально-диагностические.

Среды элективные - избирательные условия для преимущественного развития интересующего продуцента для создания **накопительных культур**.

Желточный бульон
Селенитовый бульон
Среда Плоскирева.
Пептонная вода.

Специальные среды необходимы для культивирования бактерий, не растущих на простых питательных средах.

Дифференциально-диагностические среды используют для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ".

1. Среды для выявления протеолитической способности микробов, содержащие в своем составе молоко, желатин, кровь и т.д.
2. Среды с углеводами и многоатомными спиртами для обнаружения различных сахаролитических ферментов.

Подготовка биологических объектов.

1 этап подбор биологического объекта.

2 этап - получение **накопительных** культур

3 этап – получение **чистой** культуры на плотных питательных средах, на которых засевают образцы проб из накопительных культур.

Главный критерий при отборе продуцентов – способность синтезировать целевой продукт.

Микроорганизмы должны:

- обладать высокой скоростью роста;
- использовать для жизнедеятельности дешевые непищевые субстраты;
- быть устойчивыми к заражению посторонней микрофлорой;

Селекция – направленный отбор *мутантов*, т.е. организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК. Генеральный путь селекции – это путь от слепого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов.

Индукцированный мутагенез – резкое увеличение частоты мутаций биообъекта при искусственном повреждении генома.

Целенаправленный метод отбора продуцентов – *по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта*. Метод основан на регуляции ферментов по принципу обратной связи конечным продуктом биосинтетического пути.

Генетическая инженерия

Уровни генетической инженерии:

- **генная** – прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены;
- **хромосомная** – манипуляции с большими группами генов или целыми хромосомами;
- **геномная** – перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой.

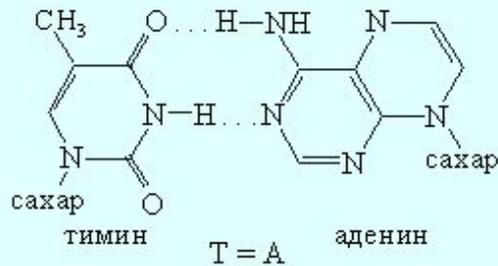
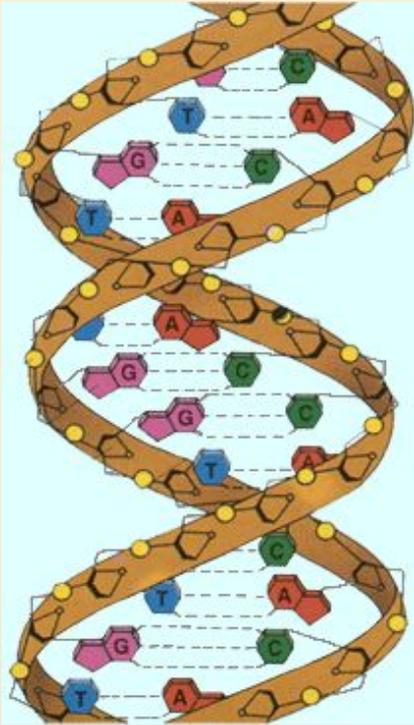
Четыре **основных этапа**:

1. Получение нужного гена;
2. Его встраивание в генетический элемент (вектор), способный к репликации;
3. Введение гена, входящего в состав вектора, в организм-реципиент;
4. Идентификация (скрининг и селекция) клеток, которые приобрели желаемый ген (гены).

Получение генов:

- 1. Выделение его из ДНК.**
- 2. Химико-ферментативный синтез генов.**
- 3. Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК (мРНК).**

Структура ДНК



Нуклеозид (Nucleoside) – пуриновое или пиримидиновое основание, ковалентно связанное с пятиуглеродным сахаром (пентозой). Если сахар – рибоза, то рибонуклеозид, если сахар дезоксирибоза, то дезоксирибонуклеозид

Нуклеотид (Nucleotide) – Нуклеозид, к которому присоединена одна или более фосфатных групп; присоединение происходит по 5'-углеродному атому сахарного кольца.

rNMP - рибонуклеозидмонофосфат

rNDP - рибонуклеозиддифосфат

rNTP - рибонуклеозидтрифосфат

dNMP - дезоксирибонуклеозидмонофосфат

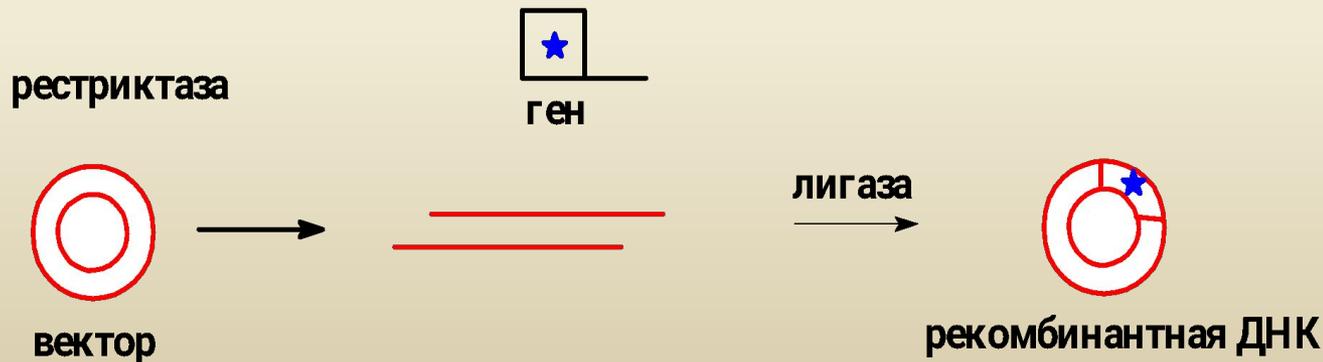
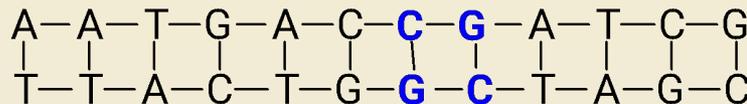
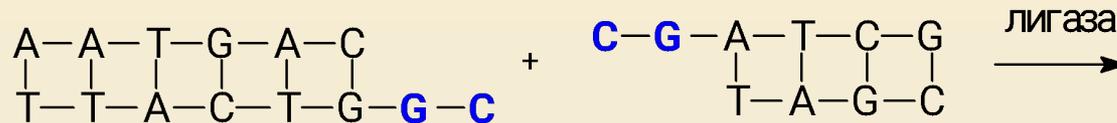
dNDP - дезоксирибонуклеозиддифосфат

dNTP - дезоксирибонуклеозидтрифосфат

Введение гена в вектор.

Вектор (Vector) - самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная пламида), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма донора в организм реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей..

Липкие концы (Cohesive ends) – взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двуцепочечной молекулы; образуются в результате ступенчатых разрезов двуцепочечных ДНК.



Перенос генов в клетки организма-реципиента.

Трансформация - это перенос свободной ДНК, в том числе и плазмидной, в реципиентную клетку, вызывающий изменение признаков клетки.

Путем **конъюгации** происходит перенос лишь некоторых плазмид (конъюгативных). В этом случае информация перекачивается из одной клетки бактерии (мужской, донорной) в другую клетку (женскую, реципиентную) по половым ворсинкам, представляющим собой белковые трубочки.

Трансдукция - понимают передачу всего набора генов вируса или фага, приводящую к развитию вирусных частиц в клетке.

Идентификация клеток-реципиентов, которые приобрели желаемый ген (гены).

Первая стадия – отбор клеток, несущих соответствующий вектор (послуживший для трансплантации гена).

Вторая стадия – поиск клеток, несущих не только вектор, но и ген-мишень.

1. Методы, основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов:

- определение нуклеотидной последовательности ДНК;
- гибридизация выделенной из клеток ДНК с зондом, который может быть или интересующим нас геном, или соответствующей ему мРНК;

Гибридизация (Hybridization) – отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, с образованием ДНК/РНК- или ДНК/ДНК-гибридов, стабилизируемых водородными связями. **Отжиг** (Annealing) – процесс образования двуцепочечных молекул (ДНК-ДНК или ДНК-РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

2. Методы, основанные на идентификации признака, кодируемого геном:

- непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок – продукт транскрипции и трансляции гена-мишени;
- использование селективных сред, поддерживающих рост только тех клеток, которые получили ген-мишень;
- иммунологическая детекция;

Клеточная инженерия.

Основой клеточной инженерии является **гибридизация** соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого.

Возможности метода слияния клеток.

- Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого.
- Получение асимметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя.
- Получение гибридов путем слияния трех и более родительских клеток.
- Гибридизация клеток, несущих разные программы развития, - слияние клеток различных органов или тканей, слияние нормальных клеток с клетками, чья программа развития изменена в результате злокачественного перерождения, получение «гибридомных» клеток.

Методы хранения штаммов-продуцентов

- Лиофильное высушивание клеток (обезвоживание под вакуумом после замораживания при температуре $-40 \div -60^{\circ}\text{C}$ и ниже).
- Высушивание на воздухе в стерильной почве, песке, на активированном угле, на семенах некоторых растений, на дисках агар-агара, на бумаге, шерстяных нитках и других носителях
- Сохранение спор (метод пригоден для спорообразующих бактерий).
- Криоконсервация – глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте (-196°C) или его парах (-150°C).
- Комбинированные способы хранения.

Сохранение ценных свойств биообъектов при масштабировании:

- Создание щадящих условий в биореакторе, максимально приближенных к условиям в лабораторном культиваторе.
- Применение антимуtagens – веществ, снижающих частоту спонтанных мутаций.
- Использование продуцентов с так называемыми многократно вырожденными мутациями.
- Создание селективных условий, в которых преимущество получает интересующий нас штамм.